

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LIPASA LipA DE *Serratia marcescens*
(PDB: 2QUA) EN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USO DE EXTRACTOS CRUDOS PARA
LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON
ETANOL (BIODIÉSEL)**

JEFFERSON YADIR BARRAZA GÓMEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

**EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LIPASA LipA DE *Serratia marcescens*
(PDB: 2QUA) EN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USO DE EXTRACTOS CRUDOS PARA
LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON
ETANOL (BIODIÉSEL)**

JEFFERSON YADIR BARRAZA GÓMEZ

**Trabajo de grado presentado para optar al título de
Químico**

DIRECTOR

**Jorge Hernández Torres, Ph.D.
Biólogo Molecular**

CODIRECTORES

**Daniel Ricardo Molina Velasco, Ph.D.
Químico**

**Oriana Danuta Serna Daza
Bióloga**

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

“Para las personas creyentes,
Dios está al principio.
Para los científicos
está el final de todas sus reflexiones”.

Max Planck

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, cuidados, paciencia y esfuerzos. Gracias profundamente por estar siempre pendientes de mi educación.

Al profesor Jorge Hernández por sus revisiones, supervisión y conocimiento aportado. Por abrirme las puertas del CINBIN y el grandioso mundo de la Biología Molecular.

Al profesor Daniel Molina por su acompañamiento y consejos. Por aportar todos aquellos recursos que permitieron la realización de este proyecto.

A Oriana Daza por su orientación y supervisión constante. Por estar siempre dispuesta a enseñarme con paciencia.

A mis compañeros de carrera: Elizabeth, Angélica, Silvia, Jose, Isidro, Bryan, Olga, Kelly, Lorena, Jessica, Diana, Andrés y Anita con quienes compartí bellos y gratos momentos.

A mis compañeros del CINBIN Leidy, Juan David, Nathaly por sus sugerencias, colaboración y compañía.

A Mary Helena Torres por su constante y alegre disposición.

A las evaluadoras Martha Daza y Stelia Mendez por sus observaciones y consejos.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1	OBJETIVOS	16
1.1	GENERAL	16
1.2	ESPECÍFICOS	16
2	MARCO TEÓRICO	17
2.1	EL ACEITE DE PALMA AFRICANA COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL	17
2.2	ETIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS COMO COMBUSTIBLE	17
2.3	ALTERNATIVAS EXISTENTES EN LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL	18
2.4	LIPASAS	20
2.5	IDEAS PREVIAS EN LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA	26
2.6	TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE	26
2.7	CUANTIFICACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN- ¹ H)	27
3	METODOLOGÍA	29
3.1	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE CON EL GEN SINTÉTICO <i>LIP</i> A SALVAJE	29
3.2	TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3)	29
3.3	SOBREEXPRESIÓN DE <i>LIP</i> A INDUCIDA CON IPTG	29
3.4	VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE <i>LIP</i> A FRENTE A CAMBIOS EN LA FUERZA IÓNICA, Y SOLVENTES ORGÁNICOS INHIBITORIOS DE ACTIVIDAD (ETANOL, GLICEROL)	31
3.5	DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADA CON EXTRACTOS CRUDOS DE <i>LIP</i> A. MONITOREO POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN- ¹ H)	32
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE CON EL GEN SINTÉTICO <i>LIP</i> A SALVAJE	35
4.2	TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> BL21 (DE3)	36
4.3	SOBREEXPRESIÓN DE <i>LIP</i> A INDUCIDA CON IPTG	36
4.4	VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE <i>LIP</i> A FRENTE A CAMBIOS EN LA FUERZA IÓNICA, Y SOLVENTES ORGÁNICOS INHIBITORIOS DE ACTIVIDAD (ETANOL, GLICEROL)	42
4.5	DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADA CON EXTRACTOS CRUDOS DE <i>LIP</i> A. MONITOREO POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN- ¹ H)	43

<u>5 CONCLUSIONES</u>	<u>49</u>
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>49</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>59</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>62</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción general de transesterificación o etanolisis de triglicéridos.	18
Figura 2. Reacciones catalizadas por lipasas. Modificado de Barbosa (2013).	21
Figura 3. Reacción de hidrólisis del p-nitrofenil butirato (pNPB).	30
Figura 4. Mapa del plásmido recombinante pET_Sm_LipA.	36
Figura 5. Localización subcelular de LipA. SDS-PAGE del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG (0.4 mM) después de 24 h, a 37 °C.	39
Figura 6. Producción de LipA para cada tiempo de inducción. SDS-PAGE de extractos FIC del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG (0.4 mM) a 37 °C.	39
Figura 7. Carbamilación de un residuo aminoacídico.	41
Figura 8. Proporción molar del aceite crudo de palma africana.	44

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformada.	37
Gráfica 2. Variación de la actividad específica de LipA para cada tiempo de inducción..	39
Gráfica 3. Efecto de la concentración de urea en la solubilización de LipA	40
Gráfica 4. Efecto de la concentración de CaCl ₂ en el replegamiento de LipA	40
Gráfica 5. Disminución de la actividad enzimática a 42°C.....	41
Gráfica 6. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de LipA	43
Gráfica 7. Efecto de solventes orgánicos inhibitorios de actividad sobre LipA.....	43
Gráfica 8. Identificación de FAEE por RMN- ¹ H.	45
Gráfica 9. Diagrama de Pareto estandarizado para FAEE	48
Gráfica 10. Superficie de respuesta estimada para FAEE.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de biodiésel con varias lipasas comerciales.....	20
Tabla 2. Rangos de pH y temperatura estables de algunas lipasas.....	23
Tabla 3. Valores óptimos de temperatura y pH para la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> nativa (nROL) y recombinante (rROL) a dos concentraciones de Tris-HCl.....	23
Tabla 4. Aplicaciones de lipasas en la industria. Modificado de Patil <i>et al.</i> (2011).....	25
Tabla 5. Determinación del perfil de ácidos grasos	32
Tabla 6. Cuantificación de FAEE, TAG, DAG, MAG y FFA.....	33
Tabla 7. Variables independientes y niveles usados en la producción de FAEE.	34
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite de palma africana y peso molecular promedio del triglicérido, utilizando RMN- ¹ H.....	44
Tabla 9. Resultados del diseño experimental	46
Tabla 10. Análisis de Varianza (ANOVA) para FAEE.	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Parámetros de sonicación directa.....	63
Anexo B. Parámetros del equipo RMN- ¹ H en la detección-cuantificación de FAEE y perfil de ácidos grasos.....	63
Anexo C. Traducción del gen Lip A.....	64

RESUMEN

TÍTULO: EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA LIPASA LipA DE *Serratia marcescens* (PDB: 2QUA) EN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USO DE EXTRACTOS CRUDOS PARA LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON ETANOL (BIODIÉSEL)[†]

AUTOR: Jefferson Yadir Barraza Gómez[‡]

PALABRAS CLAVE: LipA, lipasa, *Serratia marcescens*, transesterificación, aceite de palma, biodiésel (FAEE), ¹H-RMN.

DESCRIPCIÓN: La transesterificación mediada por lipasas es una alternativa en permanente exploración, ya que intenta resolver las problemáticas de la producción química de biodiésel. A pesar de las grandes ventajas que ofrecen las lipasas en la industria biotecnológica, su uso a gran escala se ha visto limitado e incluso desestimado, debido a los altos costos de adquisición en el mercado internacional. A nivel nacional, este problema podría solucionarse con la producción local de lipasas. En el presente Trabajo de Grado, se llevó a cabo la expresión recombinante de la lipasa LipA de *Serratia marcescens* en *Escherichia coli* BL21 (DE3) con el fin de demostrar la capacidad de la enzima para catalizar la transesterificación del aceite de palma crudo, utilizando etanol como aceptor acilo. En una primera etapa, se clonó el gen sintético *LipA* (basado en el código PDB: 2QUA) en el vector pET-21d y se indujo la expresión con IPTG. Se estableció que el tiempo más favorable para la extracción de LipA recombinante era de 3 h después de la inducción. En conformidad con la literatura científica, se encontró que LipA forma agregados hidrofóbicos en forma de cuerpos de inclusión. En consecuencia, se identificaron las condiciones más adecuadas para la reconstitución de la lipasa recombinante, a saber, sonicación directa, 1.6 M urea y 8 mM CaCl₂. En la segunda etapa se determinaron las mejores condiciones de transesterificación haciendo uso de un diseño experimental de superficie de respuesta. Los resultados evidenciaron la capacidad aciltransferasa de LipA y el fuerte potencial de esta lipasa en la producción de biodiésel, obteniéndose un porcentaje molar de 46.5% FAEE, con una relación molar 9:1 EtOH: aceite, una carga enzimática de 10 U/g de aceite, pH 8 y temperatura ambiente en un sistema sin solvente.

[†] Trabajo de Grado.

[‡] Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Jorge Hernández Torres, Daniel Ricardo Molina Velasco, Oriana Danuta Serna Daza.

ABSTRACT

TITLE: HETEROLOGOUS EXPRESSION OF LIPASE LipA FROM *Serratia marcescens* (PDB: 2QUA) IN *Escherichia coli* BL21 (DE3): USE OF RAW EXTRACTS FOR THE ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF AFRICAN PALM OIL WITH ETHANOL (BIODIESEL)[†]

AUTHOR: Jefferson Yadir Barraza Gómez[‡]

KEYWORDS: LipA, lipase, *Serratia marcescens*, transesterification, palm oil, biodiesel (FAEE), NMR-¹H.

DESCRIPTION: Lipase-mediated transesterification is an alternative in permanent exploration, since it could solve the problems of the chemical production of biodiesel. In spite of the great advantages offered by lipases in the biotechnology industry, its utilization on a large scale has been limited and even dismissed, due to the high acquisition costs in the international market. At the national level, this problem could be solved with the local production of lipases. In the present work, the recombinant expression of LipA lipase from *Serratia marcescens* was carried out on *Escherichia coli* BL21 (DE3) in order to demonstrate the ability of the enzyme to catalyze the transesterification of crude palm oil using ethanol as acyl acceptor. In a first step, the synthetic *LipA* gene (based on the PDB ID: 2QUA) was cloned into the pET-21d vector and the expression was induced with IPTG. It was established that the most favorable time for extraction of recombinant LipA was 3 h after induction. According to the scientific literature, it was found that LipA forms hydrophobic aggregates in the form of inclusion bodies. Accordingly, the most suitable conditions for recombinant lipase reconstitution were identified, namely direct sonication, 1.6 M urea and 8 mM CaCl₂. In the second stage, the best transesterification conditions were determined using an experimental surface response design. Results evidenced acyltransferase ability of LipA and the strong potential of this lipase in biodiesel production, by obtaining a molar percentage of 46.5% FAEE, with the molar ratio 9:1 of EtOH: oil, enzyme loading of 10 U/g of oil, pH 8 and room temperature in a solvent free system.

[†] Graduation Project.

[‡] Universidad Industrial de Santander. Science Faculty. School of Chemistry. Directors: Jorge Hernández Torres, Daniel Ricardo Molina Velasco, Oriana Danuta Serna Daza.

INTRODUCCIÓN

Colombia ostenta un futuro promisorio en la industria de los biocombustibles, por su creciente participación en la producción de materias primas renovables como la agroindustria palmicultora ¹.

El biodiésel, o mezcla de etil ésteres de cadena larga (*fatty acid ethyl esters*, FAEE), es hasta ahora la mejor alternativa para reemplazar parcialmente el diésel de petróleo. En primer lugar, el uso de este biocombustible no requiere cambios en el diseño de los motores diésel ². En segundo lugar, se ha demostrado que sus mezclas poseen una densidad de energía y valores caloríficos muy cercanos al diésel ^{2,3}. Finalmente, el biodiésel reduce tanto la dependencia del petróleo como la contaminación atmosférica, es decir, la reducción de material particulado, S, CO y poliaromáticos ^{2,4}.

Desafortunadamente la producción química de biodiésel es una industria contaminante por el volumen y la naturaleza de los residuos que libera ^{5,6}. No obstante, las lipasas podrían sustituir el uso de catalizadores químicos para la producción bioquímica de los etil ésteres ⁵⁻⁸. Para lograr este propósito, se requiere de grandes volúmenes de producción de lipasas y que éstas sean más eficientes y estables en su actividad catalítica. Por esta razón, las investigaciones actuales en biotecnología se inclinan hacia el diseño de isoformas de lipasas adaptadas a las necesidades de la industria ⁹. Gracias a los avances en la ingeniería genética, la expresión y mutación de genes específicos, se puede incrementar la producción, purificación y eficiencia de las lipasas ¹⁰⁻¹².

La transesterificación enzimática mediada por lipasas (conversión de un éster en otro éster) es una alternativa en permanente exploración y ofrece ventajas como: 1) alta tasa de conversión de los ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*, FFA) sin producir jabón, 2) ahorro de energía, pues no requiere temperaturas mayores a 50 °C; 3) el subproducto es fácilmente recuperable y 4) la purificación del FAEE es sencilla ^{13,14}. En Colombia, la producción enzimática de biodiésel a nivel industrial es insostenible, ya que el precio de la enzima importada (normalmente la lipasa B de *Candida antarctica*) asciende a casi US \$1300/kg. En estas condiciones, la producción local de lipasas es esencial para disminuir los costos en la fabricación de biodiésel.

En este proyecto se evaluó la transesterificación enzimática del aceite de palma africana crudo con la lipasa LipA de *S. marcescens* sobreexpresada en *E. coli*, preliminarmente, con extractos crudos. Pese a que los valores de actividad específica fueron bajos en comparación con los de lipasas comerciales; los resultados en la producción de FAEE fueron favorables y se puede pensar en nuevos proyectos de modificación genética de *LipA* para maximizar el rendimiento.

1 OBJETIVOS

1.1 General

- Evaluar la actividad aciltransferasa de extractos crudos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada con el gen *LipA* que codifica la lipasa nativa de *Serratia marcescens*, utilizando aceite de palma africana y etanol como aceptor acilo.

1.2 Específicos

- Sobreexpresar la lipasa salvaje de *S. marcescens* en *E. coli* BL21 (DE3).
- Demostrar la actividad hidrolasa de la lipasa recombinante.
- Determinar la variación de la actividad catalítica de LipA frente a cambios en la fuerza iónica y solventes orgánicos inhibitorios de actividad (etanol, glicerol).
- Establecer las mejores condiciones de transesterificación catalizada con extractos crudos de la lipasa recombinante, monitoreando FAEE con RMN-¹H.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 El aceite de palma africana como materia prima para la producción de biodiésel

El aceite de palma africana es un derivado de los frutos de *Elaeis guineensis*, una palma originaria de la selva africana tropical ¹⁵. El aceite crudo extraído del mesocarpio (70–75% del peso seco) tiene un aspecto rojizo y una composición en lípidos abundantemente caracterizada: >90% de triacilglicerol (TAG), 5.3-7.7% de diacilglicerol (DAG), 0.21-0.34% de monoacilglicerol (MAG), 2.4-4.5% de ácidos grasos libres (*Free Fatty Acids*, FFA) y 1% de componentes menores como carotenoides, vitamina E y β -sistosterol, etc. ^{16,17}. Los TAG contienen aproximadamente 50% de ácidos grasos saturados (especialmente palmítico, *i.e.* C₁₆H₃₂O₂), 40% monoinsaturados y 10% poliinsaturados ¹⁸. La producción de aceite de palma africana se concentra especialmente en Indonesia (49%), Malasia (37%), Tailandia (3%), Nigeria (2%), Guinea (1%), Colombia (1%) y otros países menos productores ¹⁸. De acuerdo con Lombana *et al.* (2015), en 2014 se produjeron en Colombia 1 109 586 toneladas de aceite de palma crudo, de las cuales 363 476 fueron destinadas para biodiésel ¹⁹. El aceite de palma tiene usos en la industria alimentaria ²⁰, cosmética ²¹ y de biocombustibles ²². Por su alto contenido en ácidos grasos saturados, su uso en la industria alimentaria es desaconsejado, aunque se consume ampliamente ¹⁸. Igualmente, por contribuir a la emisión de gases de invernadero y a la deforestación de la selva tropical, el empleo del biodiésel de aceite de palma es cuestionado ²³. No obstante, la problemática es mucho más compleja, porque el cultivo de la palma africana constituye el eje de la economía y la fuente de trabajo para los países productores ²².

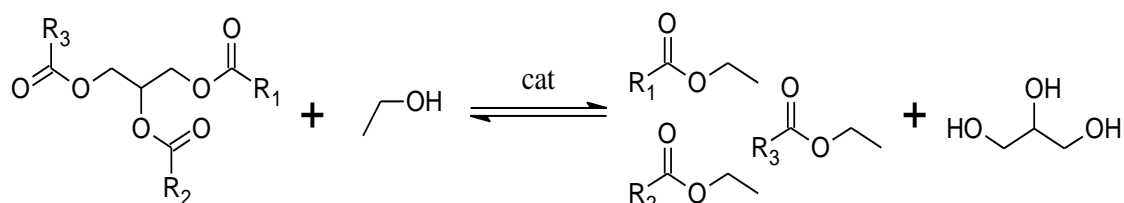
2.2 Etil ésteres de ácidos grasos como combustible

Los ésteres etílicos o metílicos de ácidos grasos (*Fatty Acid Ethyl / Methyl Esters*, FAEE o FAME respectivamente) son derivados de ácidos grasos (C₁₂ a C₂₀), en los cuales el grupo sustituyente –OH del ácido es remplazado por –OCH₂CH₃ (o –OCH₃) para formar un éster. Estos compuestos tienen importancia en la industria química, pues son intermedios reactivos de varias sustancias como alcanamidas, ésteres de sacarosa, lubricantes, cosméticos, fármacos y detergentes (estearatos alquílicos sulfonados). Por otra parte, como biocombustible (biodiésel), pueden sustituir parcialmente el diésel de petróleo ^{24–26}.

La producción de biodiésel por transesterificación, utilizando aceite vegetal como materia prima y álcali como catalizador, es industrialmente aceptada por su alta conversión y velocidades de reacción. Sin embargo, la transesterificación enzimática ha llamado la atención puesto que provee una alta pureza del producto y permite una fácil separación del subproducto (glicerol). No obstante, la producción enzimática a nivel industrial es por ahora inviable, debido al alto costo de la enzima ¹⁴; en Colombia, el precio asciende a

COP \$4.4 millones/kg. En la figura 1 se describe la reacción general de transesterificación de triglicéridos con etanol, para formar FAEE y glicerol. El catalizador (cat) puede ser un compuesto inorgánico (CaO, NaOH, H₂SO₄, etc.) o una lipasa; la reacción ocurre en etapas sucesivas, teniendo DAG y MAG como intermediarios ²⁷.

Figura 1. Reacción general de transesterificación o etanolisis de triglicéridos, que conducen a la formación de FAEE y glicerol.



2.3 Alternativas existentes en la producción de biodiésel

La fabricación de biodiésel se puede hacer a partir de aceites vegetales (soya, jatrofa, colza, maíz, girasol, palma africana, maní, canola, semilla de algodón, etc.), grasa animal (sebo vacuno, manteca de cerdo, etc.), aceite de cocina usado y algas ^{17,28,29}, por medio de tres procesos diferentes: pirólisis (o craqueo), microemulsificación y transesterificación; éste último proceso puede llevarse a cabo usando álcali (NaOH, KOH, CaO), ácido (H₂SO₄, H₂SO₃), enzimas (lipasas), catalizadores heterogéneos (zirconia amorfa o dopada con Al, Ti, K) o incluso se puede usar alcohol en estado supercrítico para promover la reacción ^{14,25,30}.

2.3.1 Pirólisis

El craqueo se basa en la transformación de compuestos simples (TAG) en mezclas complejas (alcanos, alquenos y ácidos carboxílicos) al aplicar calentamiento. De esta forma, los aceites vegetales reducen su viscosidad y mejoran el índice de cetano. Las desventajas del craqueo incluyen un elevado costo del equipo, la necesidad de una torre de destilación para separar las fracciones y la incorporación de sulfuros al producto, similar al encontrado en la gasolina, lo que lo hace menos amigable con el ambiente ^{2,14}.

2.3.2 Microemulsificación

La microemulsificación es una técnica que combina diésel de petróleo (gasóleo), aceite vegetal, alcohol (metanol, etanol, propanol), surfactante (alcoholes pesados) y mejoradores de cetano (alquil nitratos) ^{31,32}; éste tipo de mezcla reduce la viscosidad, incrementa el índice de cetano y favorece la difusión del combustible. No obstante, su uso prolongado genera problemas en el inyector de aguja, deposiciones de carbón y combustión incompleta ^{14,33}.

2.3.3 Transesterificación con catálisis básica

La transesterificación con álcali es el método más popular, más eficiente y menos corrosivo en la producción de biodiésel a nivel industrial. Este utiliza una mezcla de alcohol y aceite en una relación molar de 6:1; la reacción dura alrededor de una hora y requiere de agitación (~200 rpm) y temperatura (60 °C) ^{7,34}. Sin embargo, la presencia de FFA genera reacciones de saponificación que hace necesaria una etapa final de lavado y neutralización, para eliminar el jabón y el residuo de álcali, respectivamente. Estos pasos adicionales incrementan los costos de producción, pues invierte alrededor de 20 L de residuos líquidos por cada 100 L de alquil ésteres ²⁶. También hay que destacar que la catálisis básica no permite producir FAME o FAEE de materias primas que contengan un grado de acidez superior a 1 mg KOH/g aceite (aceite de palma crudo ~5.3 mg KOH/g aceite) ^{5,26}.

2.3.4 Transesterificación con catálisis ácida

La catálisis ácida no tiene inconvenientes con la presencia de FFA pero requiere de altos tiempos de reacción y elevados costos de equipamiento, debido a la corrosión generada por el ácido. Adicionalmente, la catálisis ácida también requiere de una etapa de neutralización y separación de la mezcla producida, lo que ocasiona problemas ambientales y económicos relacionados con la generación de aguas residuales y alto consumo de energía ²⁶.

2.3.5 Transesterificación con lipasas

El uso de un catalizador biológico como las lipasas permite solucionar la mayoría de los inconvenientes causados por los catalizadores químicos: se esterifican los FFA a FAEE sin generación de jabón en los aceites con altos índices de acidez; las temperaturas requeridas no superan los 50 °C; el subproducto se puede recuperar fácilmente y la purificación del FAEE es simple. Adicionalmente, si la lipasa se encuentra inmovilizada, ésta puede ser fácilmente recuperada y reutilizada, lo que favorece la producción económica y ambientalmente limpia de alquil ésteres. Desafortunadamente, la inhibición de la lipasa causada por el alcohol de cadena corta y el excesivo costo de la misma son una gran desventaja para su uso escalado ^{12,14,26}. En la tabla 1 se muestra la producción de biodiésel usando algunas lipasas comerciales, nótese que en su mayoría son de origen fúngico.

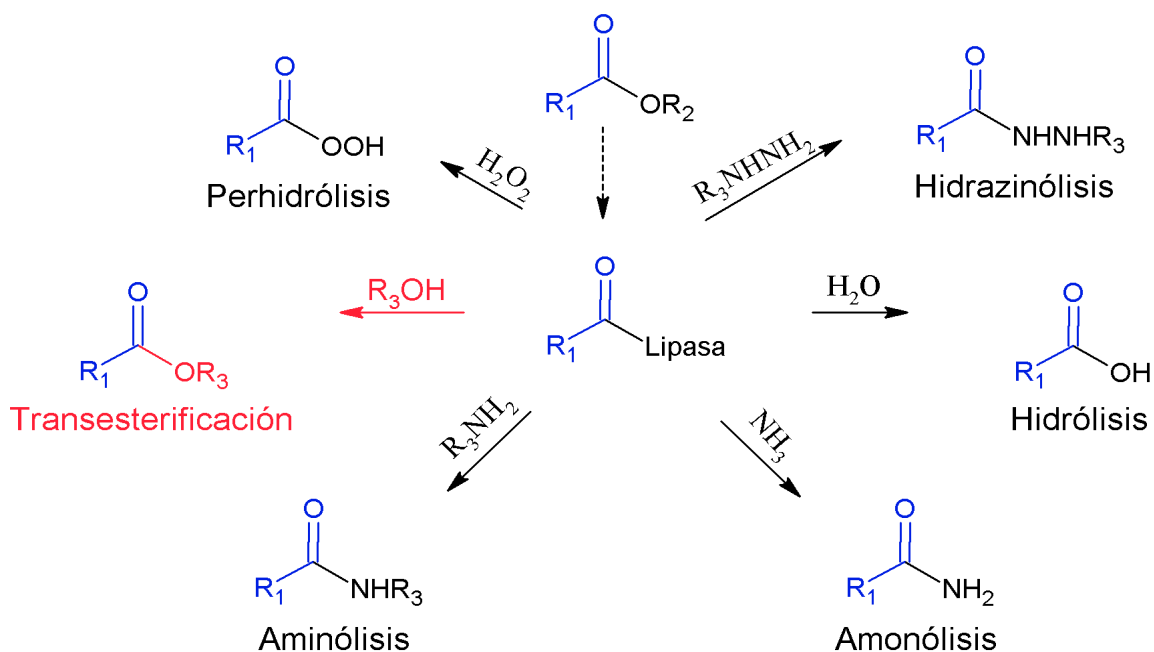
Tabla 1. Producción de biodiésel con varias lipasas comerciales. Tomado de Hwang *et al.* (2014) ¹².

Commercial name	Lipase origin	Oil	Alcohol	Alcohol/oil	Temp (°C)	Yield (%)
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sunflower oil	Methanol	4.5	40	>95
		Sunflower oil	Iso-butanol	3	40	45.3
Lipase LA201	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Sunflower oil	2-Propanol	3	40	72.8
Lipase PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Mahua oil	Ethanol	4	40	96
		Soybean oil	Methanol	7.5	35	67
		Sunflower oil	1-Butanol	3	40	88.4
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	Sunflower oil	Methanol	3	40	>80
		Sunflower oil	Ethanol	3	40	79.1
		Soybean oil	Ethanol	3	60	90
Lipozyme TL IM	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Sunflower oil	Methanol	3	40	>60
		Soybean oil	Methanol	3	40	90
		Sesame oil	Ethanol	5	50	100
Lipopan 50BG	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Sunflower oil	Ethanol	3.4	20	70
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i>	Sunflower oil	Methanol	3	40	93.2
		Sunflower oil	Ethanol	20.6	25	90
		Soybean oil	Ethanol	14.4	25	100
		Soybean oil	Ethanol	3	60	57
		Cotton oil	Methanol	6	50	97
		Sesame oil	Ethanol	5	50	78.2
Soybean oil	Methanol	6	40	95		

2.4 Lipasas

Las lipasas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las serina-hidrolasas. Son enzimas de mucho interés y aplicación en síntesis orgánica, debido a que catalizan una gran variedad de reacciones químicas con diferentes sustratos, presentando además una elevada especificidad, regio y enantioselectividad. Las lipasas poseen la característica única de trabajar entre dos fases, acuosa y no acuosa (*i.e.* orgánica), y la presencia de una “tapadera” que cubre el sitio activo, propiedades que las diferencian de las esterasas ^{35,36}. La figura 2 resume las reacciones más comunes llevadas a cabo por las lipasas, omitiendo la esterificación (ácido graso y alcohol), la interesterificación (intercambio de ácidos grasos entre TAG) y la intraesterificación (migración de ácidos grasos dentro de la misma molécula de TAG) que son procesos también catalizados por lipasas.

Figura 2. Reacciones catalizadas por lipasas. Modificado de Barbosa (2013) ³⁷.



2.4.1 Estructura y conformación de las lipasas

Desde 1990 se comenzó a dilucidar la estructura tridimensional (3D) de las lipasas a través de la cristalografía de rayos X ^{38,39}; se estableció que dichas enzimas presentan una configuración general de tipo α/β hidrolasa ⁴⁰. Su triada catalítica está compuesta por una serina (Ser) nucleofílica, un residuo ácido que puede ser Asp o Glu y una His donadora de protón, siempre en ese orden en la secuencia de aminoácidos ⁴¹. Adicionalmente, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del solvente, se descubrió que las lipasas oscilan entre dos conformaciones intercambiables, mediante un mecanismo catalítico complejo llamado "activación interfacial". Este mecanismo describe la interconversión entre la conformación abierta (activa) y la cerrada (inactiva) por medio de un elemento móvil conocido como "tapadera" ("*lid*" o "*flap*"), el cual es un segmento helicoidal compuesto por una o dos estructuras α -hélice cortas, con una cara interna de residuos hidrofóbicos que puede interactuar activamente con la zona hidrofóbica que rodea el sitio activo, conocida como "bolsillo o hueco hidrofóbico", compuesto por los aminoácidos Phe, Trp, Iso, Leu y Tyr ^{42,43}.

2.4.2 Factores que afectan la actividad lipasa

El efecto de diversos factores sobre la actividad y estabilidad de las lipasas ha sido estudiado por muchos investigadores, tanto en enzimas purificadas ^{44,45} como en extractos

crudos ^{46,47}. Parámetros tales como la temperatura, pH, disolventes orgánicos, iones metálicos, detergentes y otros inhibidores pueden mejorar o suprimir la actividad lipolítica ⁴⁸.

Las lipasas son activas y estables en condiciones alcalinas y en un amplio intervalo de temperaturas, lo que las hace ideales para diversas aplicaciones ⁴⁸. Sin embargo, se suele considerar rangos de pH neutros (6.0-7.5), levemente ácidos (4.0-5.0) o alcalinos (>8) ^{48,49} y temperaturas entre 30-60 °C para la mayoría de lipasas (ver tabla 2). No obstante, se pueden encontrar ejemplares como la lipasa *Aspergillus terreus*, que muestra una excelente tolerancia a la temperatura (15-90 °C) y pH (3.0-12.0), conservando el 100% de su actividad a 60 °C en un intervalo de pH 4.0-10.0, durante 24 horas ⁵⁰. Asimismo, existen lipasas como *Penicillium cyclopium* ⁵¹ y *Penicillium wortmani* ⁵² estables a pH 7.0 y 40- 45 °C, pero inactivas por encima de 50 °C. La tabla 3 muestra un ejemplo del drástico cambio que sufre la actividad específica de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (nativa y recombinante) al modificar dichas variables ⁵³.

Los iones metálicos, por su parte, forman complejos con ácidos grasos ionizados, cambiando su solubilidad y comportamiento en interfaces, afectando así, el medio donde trabaja la lipasa ⁴⁸. En la literatura abundan ejemplos como la lipasa purificada de *Bacillus coagulans* BTS-3, que presenta inhibición por cationes de Al³⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, mientras que aumenta su actividad en presencia de K⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Mg²⁺; iones como Na⁺ no tienen ningún efecto sobre la actividad lipolítica ⁵⁴. La fuerza iónica, es un parámetro estrechamente ligado a los iones metálicos; esta influye sobre la carga y estructura 3D de la proteína; lipasas como *Thermomyces lanuginosus* exhiben una gran dependencia de la fuerza iónica para mantener su integridad estructural a pH neutro ⁵⁵.

Cuando fueron probados los efectos de disolventes orgánicos en la lipasa *Pseudomonas putida* 3SK, se encontró al iso octano como el más adecuado para la hidrólisis de grasas en un sistema de dos fases ⁵⁶. De igual forma, la actividad de la lipasa *Fusarium solani* FSI aumentó en presencia de concentraciones crecientes de hexano y tolueno. En contraste, la incubación de esta enzima con disolventes solubles en agua disminuyó su actividad después que la concentración del solvente superó el 10% v/v ⁵⁷. El uso de solventes orgánicos está relacionado con la eficiencia de las lipasas en el medio de reacción; para el caso específico del biodiésel, se ha investigado con varios propósitos: 1) disminuir el problema de inmiscibilidad entre reactantes, 2) reducir la viscosidad de la mezcla o incrementar la transferencia de masa alrededor de la enzima, 3) si la enzima es inmovilizada, se utilizan solventes no polares para mantener el agua residual alrededor de la misma ⁵. Sin embargo, la presencia de solventes altamente hidrofílicos como el etanol y el glicerol, que son inevitables en la producción de FAEE, promueven la inhibición de la enzima y la tasa de difusión respectivamente; lo que se traduce en pérdida del biocatalizador y aumento en los tiempos de reacción ^{5,58,59}.

Tabla 2. Rangos de pH y temperatura estables de algunas lipasas. Tomado de Hasan et al. (2009) ⁴⁸.

Origen de lipasa	Rangos de pH y temperatura
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB128	pH 4.0–7.5 at 30 °C for 24 h, and pH 5.5 at 30 °C for 1 h
<i>Bacillus</i> sp. FH5	98.6% and 93% for 1 h at 40 and 45 °C
<i>Aeromonas sobria</i> LP004	pH 6.5–10.0 at <40 °C
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	pH 5.0 and 9.0 at 50 °C
<i>Chromobacterium</i>	pH 5.0–8.0
<i>Chromobacterium</i> lipase B	pH 4.0–11.0
<i>Staphylococcus</i>	pH 6.0–8.0
<i>Pseudomonas</i>	pH 5.0–10.5
<i>Bacillus</i> sp. LBN4	80 °C for 10 min
<i>Rhizopus oryzae</i>	4.5 to 7.5
<i>Pseudomonas</i> sp. 7323,.	>25 °C
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	pH 8.0 and 10.5 to 70 °C

Tabla 3. Valores óptimos de temperatura y pH para la lipasa de *Rhizopus oryzae* nativa (nROL) y recombinante (rROL) a dos concentraciones de Tris-HCl. Tomado de Guillén (2012) ⁵³.

Valores óptimos	nROL	nROL	rROL	rROL
	200 mM	400 mM	200 mM	400 mM
Temperatura (°C)	40	40	40	30
pH	8	7.25	8	7.25
Actividad específica (UA·mg prot ⁻¹) para la temperatura óptima y pH 7.25	604 ± 15	142 ± 6	21791 ± 460	11111 ± 303
Actividad específica (UA·mg prot ⁻¹) para el pH óptimo y temperatura 30°C	593 ± 9	115 ± 3	35281 ± 621	11111 ± 303

2.4.3 La lipasa LipA de *S. marcescens*

La lipasa LipA de *S. marcescens* consta de 613 aminoácidos (64.9 kDa) y pertenece a la familia de enzimas lipolíticas I.3 en la clasificación de Arpigny & Jaeger (1999) ⁶⁰, junto con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* SIK W ^{61–63}. Como otras lipasas de la familia I.3, LipA es secretada por el sistema de secreción tipo I de las bacterias Gram negativas

⁶⁴. Esta enzima posee 13 copias en tándem de un motivo de unión al calcio GGXGXDXUX (U = aminoácido hidrofóbico), en la región C-terminal, pero 8 iones Ca^{2+} por molécula. La triada catalítica consiste de Ser207, Asp256 e His314 y su estructura cristalina con una resolución de 1.8 Å, revela una estrecha relación estructural con las lipasas eucariotas y una variación en la conformación del plegamiento α/β hidrolasa, así como un *lid* adicional ⁶⁵.

La actividad lipasa quedó demostrada al igual que su especificidad *sn* -1,3 ⁶⁶. Los valores de pH y temperatura que favorecen su actividad son 8 y 42 °C respectivamente ^{45,67} y el *pI* se calcula en 4.3-4.6 \pm 0.1 ^{62,66}.

La enzima ha sido sobreexpresada en *E. coli* con niveles de expresión relativamente bajos, a pesar del cambio de vector y de secuencias en 5' ^{61,65}. Además de su expresión limitada, se concluyó que es de naturaleza insoluble y formadora de cuerpos de inclusión ^{65,67}. Asimismo, algunos cálculos estimaron un 30% (187/613) de aminoácidos hidrofóbicos (VILFMWY) y un análisis de la estructura primaria, con los principales predictores de solubilidad, reflejaron que la proteína es insoluble (e.g. PROSO score: 0.580, insoluble). En *S. marcescens*, la enzima es extracelular pero carece de péptido señal N-terminal ⁶¹.

2.4.4 Aplicaciones de las lipasas

Pese a que las lipasas son ubicuas en la naturaleza, pues se encuentran en microorganismos, plantas, hongos y animales; las que más han ganado la atención de la industria son las de origen microbiano. En efecto, las lipasas microbianas soportan condiciones relativamente extremas de temperatura, pH y presencia de solventes orgánicos, manteniendo su quimio-, regio- y enantioselectividad⁶⁸. Sin embargo, también operan en condiciones suaves, lo que reduce los costos energéticos y de infraestructura en los biorreactores, además de proteger los productos de la hidrólisis causada por altas presiones o elevadas temperaturas⁶⁹. Las industrias del procesamiento de alimentos y de la perfumería han aprovechado otras propiedades de las lipasas microbianas como su alta especificidad, alta eficiencia catalítica, toxicidad nula de productos o subproductos y su carácter biodegradable⁷⁰. Sin embargo, la característica más atractiva de dichas lipasas, desde el punto de vista industrial, es su facultad para utilizar los MAG, DAG, TAG y FFA en la transesterificación, proceso que consiste en la conversión de un éster en otro, por medio del intercambio de un grupo alcóxido ²⁶. Esta actividad particular hace a las lipasas muy interesantes en la industria de los biocombustibles, para la producción de biodiésel. En la tabla 4 se listan algunas de las aplicaciones industriales de las lipasas.

Tabla 4. Aplicaciones de lipasas en la industria. Modificado de Patil *et al.* (2011) ⁶⁸.

Industria	Acción	Aplicación
Productos lácteos	Hidrólisis de la leche, grasa, maduración del queso, modificación de la mantequilla	Desarrollo de agentes saborizantes en queso, leche y mantequilla
Bebidas	Mejoramiento en el aroma	Bebidas alcohólicas, <i>e.g.</i> , sake y vino.
Aderezos	Mejoramiento de la calidad	Mayonesa
Cosmética	Esterificación	Cremas hidratantes y bronceadoras, aceites de baño, etc.
Surfactantes	Sustituye las fosfolipasas en la producción de lisofosfolípidos	Ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y carbohidratos utilizados como detergentes industriales y como emulsionantes en la formulación de salsas y helados.
Agroquímica	Esterificación	Herbicidas como el fenoxipropionato
Farmacéutica	Hidrólisis específica de ésteres ópticamente activos	Enriquecimiento enantiomérico
Combustibles	Transesterificación	Producción de biodiésel
Control de contaminación	Hidrólisis y transesterificación de aceites y grasas	Remoción de manchas difíciles y degradación de aceites y grasas.

Numerosas lipasas han sido caracterizadas bioquímicamente; no obstante, pocas de ellas se producen y comercializan a gran escala para propósitos investigativos e industriales, *e.g.*, *Thermomyces lanuginosus* (Lipopan™), *Mucor miehei* (Lipozyme™), *Rhizomucor miehei* (Palatase M™) y *Candida antárctica* (CALB Novozym 435™). Como puede verse, las lipasas comerciales son, prevalentemente, de origen fúngico y por lo tanto la producción recombinante se realiza en determinadas cepas de hongos. En vista de que algunas lipasas bacterianas han demostrado un alto potencial biotecnológico para los mismos propósitos que las fúngicas, surge el interés de profundizar en su caracterización bioquímica. Si actividades en la transesterificación logran equipararse entre bacterianas y fúngicas, se podría intentar escalar la producción heteróloga en *E. coli* y la purificación a gran escala. Una excelente candidata es la lipasa LipA de *S. marcescens*. A su favor, LipA ostenta varias ventajas en el estudio de la producción de biodiésel: 1) su naturaleza bacteriana, lo que facilita la expresión heteróloga en *E. coli*, sin necesidad de modificaciones post-traduccionales; 2) su previa clasificación como lipasa EC 3.1.1.3 ^{61,66}; 3) su homología con lipasas bacterianas utilizadas en la industria (*Pseudomonas sp*) ⁶¹ y 4) su identidad secuencial con lipasas eucariotas como CALB [27%, según cálculos previos].

2.5 Ideas previas en la transesterificación enzimática

La transesterificación enzimática se puede lograr usando tanto enzimas extracelulares como intracelulares (*whole cell*), éstas últimas están siendo bastante investigadas ^{59,71} debido a que las lipasas extracelulares (enzimas libres) presentan bajos rendimientos y altos costos, además de tratamientos complejos para la recuperación, purificación e inmovilización ²⁶.

En 1990, Mittelbach reportó la transesterificación de aceite de girasol con metanol, etanol y butanol, usando lipasas de *Mucor miehei* y *C. antarctica* en presencia y ausencia de éter de petróleo ⁷². Los rendimientos para el etanol y el butanol fueron altos aún en ausencia de solvente; no obstante, para el metanol se obtuvieron trazas de metil éster en ausencia de solvente. Nelson *et al.* (1996) encontraron que la lipasa B (SP435) de *C. antarctica* es más afín con alcoholes secundarios (isopropanol, 2-butanol) y la de *M. miehei* más eficiente con alcoholes primarios de cadena corta (conversión del 95%) en presencia de hexano ⁷³. No obstante, el metanol presentó el menor rendimiento (19.4%) en ausencia de solvente, debido a la inhibición que éste causaba a la enzima inmovilizada. Este hallazgo fue confirmado por Abigor *et al.* (2000) quienes reportaron un rendimiento de 15% y 72% utilizando como aceptor acilo metanol y etanol, respectivamente, y aceite de almendra de palma como sustrato ⁷⁴. Gran cantidad de autores han reportado pruebas de transesterificación con diferentes lipasas (*Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), *Rhizopus oryzae*, etc.), fuentes de materia prima (aceite de: jatrofa, semilla de algodón, colza, etc.) y alcoholes (2-etil-1-hexanol, 2-propenol, etc.). En general, se registraron altos rendimientos, entre 67 y 97% ¹⁴.

Con el fin de minimizar la interacción del metanol insoluble con la lipasa, la metanólisis ha sido estudiada adicionando el alcohol en tres pasos sucesivos ^{75,76}. Sin embargo, investigaciones realizadas por Shimada *et al.* (2002) sugirieron que se pueden obtener buenos rendimientos y menores tiempos de reacción si se adiciona el alcohol en sólo dos pasos: 1/3 del alcohol al inicio de la reacción y 2/3 posteriormente ¹³. Adicionalmente, el uso de co-solventes orgánicos también se ha estudiado. Por ejemplo, Iso *et al.* (2001) reportaron altas conversiones con metanol usando 1,4 dioxano ⁷⁷; Li *et al.* (2006) reportaron el uso de *tert*-butanol, Lipozyme TL IM, Novozyme 435 y aceite de colza, con conversiones del 95% ⁷⁸. Las ventajas que ofrece el uso de co-solvente son: 1) disminuir la inmiscibilidad entre el alcohol, la enzima libre y el sustrato, 2) obligar a que el agua se fije alrededor de la enzima favoreciendo su estabilidad y 3) reducir la viscosidad de la mezcla para aumentar la tasa de difusión ²⁶.

2.6 Tecnología del ADN recombinante

A pesar de las grandes ventajas que ofrecen las lipasas en las reacciones y la gran necesidad de la industria por disminuir contaminantes líquidos, su uso se ha visto limitado

e incluso descartado, debido a los altos costos de adquisición, producción y mantenimiento de estos biocatalizadores ^{10,79}. Es en este escenario en el que la “tecnología del ADN recombinante”, “clonación molecular” o “ingeniería genética” serviría para solucionar dichos problemas con la producción de lipasas recombinantes. Las enzimas recombinantes son proteínas expresadas dentro de la misma célula que originó el material genético (expresión homóloga) o diferente (expresión heteróloga). El origen del gen a expresar puede ser natural o sintético.

Inicialmente, el gen a expresar debe incorporarse dentro de un elemento móvil de ADN conocido como plásmido o vector de expresión, el cual posee las secuencias necesarias para su autorreplicación y expresión funcional de sus genes. La recombinación entre el gen de interés y el plásmido se logra con la ayuda de enzimas que cortan el ADN (enzimas de restricción) y enzimas que ligan (ADN ligasas). Los plásmidos recombinantes o quimeras se incorporan dentro de la bacteria huésped (generalmente *E. coli*) en un proceso denominado “transformación”. Las bacterias transformadas se seleccionan con antibióticos (normalmente Ampicilina, Amp), al cual confieren resistencia uno o más genes que hacen parte del vector. De esta forma se garantiza que las bacterias sobrevivientes, todas contienen el plásmido recombinante. Una vez se confirma la transformación y estabilidad del vector recombinante, la cepa bacteriana se propaga en medio líquido ^{80,81}. Finalmente, la expresión del gen recombinante se controla a voluntad adicionando moléculas inductoras no degradables (e.g. isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, IPTG) al medio de cultivo.

La escogencia de *Escherichia coli* como hospedero de expresión es debido a grandes ventajas que posee esta bacteria gram-negativa, a saber: 1) un rápido crecimiento y alta densidad en medios de bajo costo, 2) genética bien caracterizada y 3) disponibilidad de un gran número de vectores de clonación y cepas mutantes que permiten una producción de proteínas recombinantes rápida, económica y de alto rendimiento ^{82,83}. Adicionalmente cepas como BL21 son preferidas en el ámbito industrial, pues producen bajas cantidades de acetato y no poseen las proteasas Lon y OmpT, lo que disminuye considerablemente la degradación de proteína recombinante ^{84,85}.

2.7 Cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H)

La espectroscopia RMN-¹H es extensamente valorada en el análisis estructural de compuestos. No obstante, debido a que la señal obtenida es directamente proporcional al número de núcleos que la originan, la cuantificación también es posible ⁸⁶. La Resonancia posee ciertas ventajas en comparación con los métodos cromatográficos: 1) la muestra no requiere derivatización, lo cual 2) disminuye errores experimentales, 3) no consume altos volúmenes de solventes, 4) permite identificar y cuantificar simultáneamente, 5) es sencilla, rápida (3 min) y eficaz ⁸⁷⁻⁹⁰.

La cuantificación de ácidos grasos y sus derivados alquil ésteres por medio de RMN-¹H ha sido ampliamente estudiada en aceites vegetales y grasas animales, permitiendo además, obtener el perfil de ácidos grasos ^{89,91,92}, la composición molar de lípidos (TAG, DAG, MAG y FFA) ⁹³ y la pureza de sus derivados ^{87,88,94}. Por otro lado, las dificultades que presenta la técnica son: 1) insensibilidad frente trazas, 2) imposibilidad de discriminar completamente la composición de ácidos saturados y 3) solapamiento de señales. Esta última problemática ha obstaculizado la cuantificación de FAEE y disminuido la correlación con otras técnicas cuantitativas como cromatografía de gases y líquida de alta eficiencia (GC y HPLC, respectivamente) ⁹⁵.

3 METODOLOGÍA

3.1 Construcción del vector de expresión recombinante con el gen sintético *LipA* salvaje

Se diseñó un gen sintético de la forma nativa de la lipasa LipA de *S. marcescens*, basado en la secuencia del código PDB (*Protein Data Bank*) 2QUA. El gen sintético fue clonado en los sitios de restricción Nco I y Bam HI del vector de expresión pET-21d (+), obteniéndose el plásmido recombinante pET_Sm_LipA. La síntesis del gen fue contratada con la empresa Epoch Life Science Inc. y la precisión de la construcción se confirmó mediante secuenciación por electroforesis capilar con la empresa Macrogen Inc. (Korea).

3.2 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen), usando choque térmico en presencia de CaCl₂⁹⁶, con los plásmidos pET-21d (+) y pET_Sm_LipA. Las cepas fueron criopreservadas según Sambrook & Russell (2001)⁹⁷.

3.3 Sobreexpresión de *LipA* inducida con IPTG

La sobreexpresión de pET_Sm_LipA se llevó a cabo en 100 mL de medio SOB, pH 7, 100 µg/mL Amp, 180 rpm y 37 °C (baño maría). Se hizo seguimiento del crecimiento bacteriano a una densidad óptica de 600 nm (DO₆₀₀), diluyendo la muestra 25 veces. La expresión se indujo con 0.4 mM IPTG cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ entre 1.0-1.3.

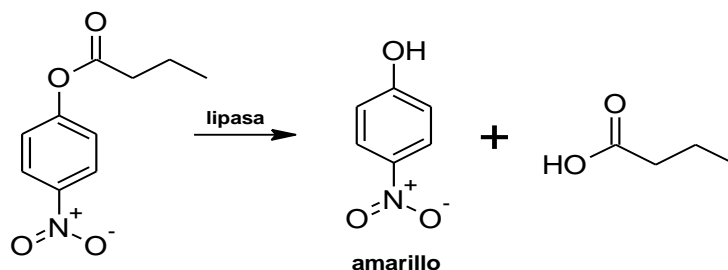
Fracciones de 10 mL del medio de cultivo (FM), periplasma (FP) y citoplasma (soluble, FCS e insoluble, FIC) fueron recuperadas luego de 0, 1, 3, 6 y 24 h de inducción, con el objeto de corroborar dónde y cuándo se producía la proteína recombinante. Asimismo, la sobreexpresión se verificó por ensayos de actividad (ver sección 3.3.1), cuantificación de proteína (ver sección 3.3.2) y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La sobreexpresión se realizó por triplicado.

3.3.1 Determinación de la actividad hidrolítica frente al p-nitrofenil butirato (pNPB)

La actividad hidrolítica de la lipasa se cuantificó por espectrofotometría, midiendo el incremento de absorbancia del p-nitrofenol ($pK_a = 7.15$ a 25 °C, $\epsilon_{400} = 14775 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 7.25) a 400 nm^{98,99} durante 3-5 min. Este es generado por la hidrólisis de 0.4 mM p-nitrofenil butirato (pNPB), en 25 mM buffer fosfato de sodio, pH 7.25. La reacción (figura 3) inició con la disolución de 20 µL de extracto crudo en 2.4 mL de buffer con 100 µL de sustrato a 25 °C^{98,100,101}. La temperatura ambiente fue seleccionada, ya que se observó que los extractos crudos disminuían su actividad a la temperatura óptima de LipA (42 °C)⁶⁷.

La unidad internacional de actividad (U) es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de pNPB por min, bajo las condiciones establecidas ¹⁰².

Figura 3. Reacción de hidrólisis del p-nitrofenil butirato (pNPB).



$$\text{Actividad específica (U/mg)} = m \frac{10^6}{\epsilon_{400}} * \frac{V_t}{V_m} * \frac{FD}{C_{\text{prot}}} * \frac{1 \text{ l}}{1000 \text{ ml}}$$

Donde:

m = pendiente (min^{-1})

ϵ_{400} = coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol ($14775 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 7.25)

V_t = Volumen total de la reacción (μL)

V_m = Volumen de la solución enzimática (μL)

FD = Factor de dilución enzimático

C_{prot} = concentración de proteína en la solución enzimática (mg/mL)

U = cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un μmol de pNPB a 25°C en 1 min.

3.3.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

La concentración de proteína se determinó a través del método colorimétrico de Bradford (máximo de absorción 595 nm). La curva patrón se preparó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) en 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1.6 M urea y 8 mM CaCl_2 (concentraciones de 0.0-1.4 mg/mL). La medición se realizó 2 min después de haber adicionado 1 mL de agente colorante a 20 μL de muestra ¹⁰³.

3.3.3 Activación de la lipasa

Debido a que la LipA de *S. marcescens* forma cuerpos de inclusión en el hospedero, se hizo necesaria la aplicación de tres pasos esenciales para la reconstitución de la enzima ^{65,67,96}:

- 1) **Extracción:** se realizó sonicación indirecta (“extracto indirecto”), que consiste esencialmente en la ruptura previa de la pared celular con una solución 20% p/v de

sacarosa y el posterior rompimiento de la membrana citoplasmática con un baño ultrasónico (37 kHz) durante 5 min a temperatura ambiente.

- 2) Solubilización: alícuotas de 100 μ L del extracto indirecto fueron centrifugadas (14 000 x g) y resuspendidas en diferentes concentraciones de urea (0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 M) con 8 mM CaCl_2 , 100 mM Tris-HCl pH 8. Se realizaron pruebas de actividad y cuantificación de proteína, con el fin de determinar la concentración más favorable de agente solubilizante. Este ensayo fue hecho por duplicado.
- 3) Replegamiento: alícuotas de 100 μ L del extracto indirecto, se centrifugaron (14 000 x g) y resuspendieron en diferentes concentraciones de CaCl_2 (4, 8, 12 y 16 mM) con 0.8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8. Se realizaron pruebas de actividad y cuantificación de proteína para determinar la concentración más favorable de cofactor. Este ensayo fue hecho por duplicado.

3.3.4 Sobreproducción de lipasa recombinante

Con la finalidad de obtener abundante extracto crudo para las pruebas de transesterificación, fue necesaria la sobreproducción de LipA. *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_Sm_LipA fue inoculada en 600 mL de medio LB e incubado bajo las mismas condiciones de sobreexpresión (ver sección 3.3). El volumen total se distribuyó en tres erlenmeyers de 500 mL para facilitar la aireación. Las bacterias se recolectaron a 3 h de inducción.

El método de activación de la lipasa sufrió ligeras modificaciones puesto que se manejaban volúmenes mayores. La extracción de la lipasa se efectuó a través de sonicación directa (“extracto directo”). Se concentraron las bacterias a 4600 x g y se resuspendieron en 60 mL de 100 mM Tris-HCl pH 8; posteriormente, un procesador de ultrasonido (ver anexo A) realizó la lisis celular bajo un baño de hielo. El factor de concentración fue de 5X y la reconstitución de la lipasa se obtuvo con 1.6 M urea y 8 mM CaCl_2 .

3.4 Variación de la actividad catalítica de LipA frente a cambios en la fuerza iónica, y solventes orgánicos inhibitorios de actividad (etanol, glicerol)

3.4.1 Fuerza iónica

Para medir el efecto de esta variable, se monitoreó por duplicado la hidrólisis del pNPB en diferentes concentraciones de NaCl (0.0 a 1.2 M), utilizando extractos crudos de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con pET_Sm_LipA, a pH 7.25 y temperatura ambiente. El valor fijo de pH fue necesario para poder aplicar el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol.

3.4.2 Estabilidad de lipasas recombinantes frente al etanol y glicerol.

Las lipasas pierden actividad por la acción inhibitoria de alcoholes de cadena corta y glicerol ^{5,13}. Se evaluó por duplicado la pérdida de actividad de LipA en diferentes concentraciones de etanol y glicerol (0, 3, 6 y 12% v/v), a pH 7.25. Luego de 1 h de incubación con el inhibidor, se midió la actividad en la reacción de pNPB.

3.5 Determinación de las mejores condiciones de transesterificación catalizada con extractos crudos de LipA. Monitoreo por Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H)

3.5.1 Caracterización de la materia prima

El perfil de ácidos grasos se determinó por RMN-¹H (ver tabla 5), atendiendo la metodología propuesta por Knothe & Kenar (2004) ⁹²; este análisis se realizó por triplicado. Asimismo, se cuantificó la cantidad de TAG, DAG, MAG y FFA presentes en el aceite crudo, con el fin de conocer el estado inicial del sustrato (ver tabla 6).

Tabla 5. Determinación del perfil de ácidos grasos. Modificado de Knothe & Kenar (2004).

Ácido graso	Corrimiento químico (δ, ppm)	*Fórmula
αCH ₂ totales	2.31	$N_{\alpha\text{CH}_2 \text{ totales}} = A_{2.25-2.40}/2$
Linolénico	0.98	$N_{\text{C}_{18:3}} = A_{0.96-1.0}/3$
Linoleico	2.77	$N_{\text{C}_{18:2}} = 0.5*(A_{2.74-2.80} - 4N_{\text{C}_{18:3}})$
Oleico	2.02	$N_{\text{C}_{18:1}} = (A_{1.94-2.10}/4) - N_{\text{C}_{18:2}} - N_{\text{C}_{18:3}}$
Insaturados		$N_{\text{unsat}} = N_{\text{C}_{18:1}} + N_{\text{C}_{18:2}} + N_{\text{C}_{18:3}}$
Saturados		$N_{\text{sat}} = N_{\text{totales}} - N_{\text{unsat}}$
Porcentaje molar (%)		$\%X = 100*N_X/N_{\alpha\text{CH}_2 \text{ totales}}$

*Los subíndices indican el barrido en ppm de cada señal (δ) o el tipo de ácido graso.

A: área, N: moles y N_x: moles de X compuesto.

Tabla 6. Cuantificación de FAEE, TAG, DAG, MAG y FFA. Modificado de Nieva-echevarría *et al.* (2014) ⁹³.

Señal	Corrimiento químico (δ , ppm)	Multiplificación	Tipo de protones	Número de ^1H que causan la señal	Compuesto	[†] Fórmula
2-MAG	4.93	m	$\text{HOCH}_2\text{-CH}(\text{OR})\text{-CH}_2\text{OH}$	1	Grupo glicerilo en 2- MAG	$N_{2\text{-MAG}} = \text{Pc} \cdot A_{4.90\text{-}4.96}$
1-MAG	3.94	m	$\text{ROCH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{OH}$	1	Grupo glicerilo en 1- MAG	$N_{1\text{-MAG}} = \text{Pc} \cdot A_{3.90\text{-}3.98}$
1,2-DAG	5.08	m	$\text{ROCH}_2\text{-CH}(\text{OR}')\text{-CH}_2\text{OH}$	1	Grupo glicerilo en 1,2- DAG	$N_{1,2\text{-DAG}} = \text{Pc} \cdot A_{5.05\text{-}5.12}$
TAG + 1,2-DAG	4.22 y 4.28	m	$\text{ROCH}_2\text{-CH}(\text{OR}')\text{-CH}_2\text{OR}'' + \text{ROCH}_2\text{-CH}(\text{OR}')\text{-CH}_2\text{OH}$	3	Grupo glicerilo en TAG y 1,2- DAG	$N_{\text{TAG}} = (\text{Pc} \cdot 2A_{4.26\text{-}4.36} - 2N_{1,2\text{-DAG}}) / 4$
FAEE	2.27	t/4	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}(\text{CO})\text{-CH}_2\text{-}$	2	αCH_2 del etil éster	$N_{\text{FAEE } \alpha\text{CH}_2} = \text{Pc} \cdot 4A_{2.25\text{-}2.275} / 2$
1,3-DAG	4.05-4.21	m	$\text{ROCH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{OR}'$	5	Grupo glicerilo en 1,3- DAG	$N_{1,3\text{-DAG}} = (\text{Pc} \cdot A_{4.04\text{-}4.36} - 4N_{\text{TAG}} - 2N_{1\text{-MG}} - 2N_{1,2\text{-DAG}} - 2N_{\text{FAEE}}) / 5$
FFA	2.31	m	$\text{HO}(\text{CO})\text{-CH}_2\text{-}$ + Todos los αCH_2 de TAG, DAG, MAG y FAEE	2	αCH_2 de FFA, TAG, DAG, MAG y FAEE	$N_{\text{FFA}} = (\text{Pc} \cdot A_{2.25\text{-}2.40} - 6N_{\text{TAG}} - 4N_{1,2\text{-DAG}} - 4N_{1,3\text{-DAG}} - 2N_{\text{FAEE}} - 2N_{1\text{-MG}} - 2N_{2\text{-MG}}) / 2$
					Porcentaje molar (%)	$\%X = 100 \cdot N_X / N_{\text{Totales}}$

[†]Los subíndices indican el barrido en ppm de cada señal (δ) o el tipo de compuesto. A: área, N: moles y N_X : moles de X compuesto y N_{Totales} es la sumatoria de $N_{1\text{-MAG}}$, $N_{2\text{-MAG}}$, $N_{1,2\text{-DAG}}$, $N_{1,3\text{-DAG}}$, N_{TAG} , $N_{\text{FAEE } \alpha\text{CH}_2}$ y N_{FFA} . Pc es la constante de proporcionalidad.

3.5.2 Identificación y cuantificación de FAEE

La presencia de FAEE se pudo verificar por la aparición de un cuartete (*q*) a 4.12 ppm⁸⁸ y la existencia de un cuarto de triplete (*t/4*) a 2.27 ppm. La cuantificación del etil éster se calculó siguiendo la metodología de Nieva-echevarría *et al.* (2014) ligeramente modificada por el autor (ver tabla 6). Los parámetros utilizados en la toma de espectros de Resonancia tanto para el numeral 3.5.1 como para 3.5.3 se registran en el anexo B.

3.5.3 Diseño experimental: transesterificación del aceite de palma con etanol y extractos crudos de LipA

Todas las reacciones de transesterificación se produjeron en balones de fondo redondo (25 mL) sin solvente, con 100 mg de aceite de palma en agitación constante y temperatura ambiente, durante 6 h. El extracto crudo de LipA se encontraba suspendido en 100 mM Tris-HCl, 1.6 M urea y 8 mM CaCl₂. Con el fin de evitar la inhibición de la lipasa, se adicionó el etanol en dos pasos utilizando una adaptación de la metodología propuesta por Shimada *et al.* (2002). En el primer paso (0 h), se agregó un tercio de la relación molar total de etanol. En el segundo paso (4 h), se adicionaron los dos tercios restantes para completar la relación molar total²⁶. Cumplido el tiempo de reacción, se centrifugaron las muestras a 10 000 x *g*, se rescató la fase superior (oleosa) y se llevaron a calentamiento (80 °C) durante 1 h. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta el análisis RMN-¹H.

Con el objeto de analizar y mejorar el efecto de la interacción de dos variables en el rendimiento de FAEE (ver tabla 7), se utilizó la metodología de superficie de respuesta, con un diseño factorial de tres niveles (3²). Este modelo se llevó a cabo con un punto central y una réplica, teniendo un total de 20 ejecuciones. Los datos fueron analizados utilizando *STATGRAPHICS Centurion XVI* versión 16.1.18. Para la transesterificación se utilizó aceite de palma como reactivo limitante y etanol como aceptor acilo.

Tabla 7. Variables independientes y niveles usados en la producción de FAEE.

Variables independientes	Niveles		
Relación EtOH:aceite, mol/mol	3	6	9
Carga enzimática, U	1	2	3

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

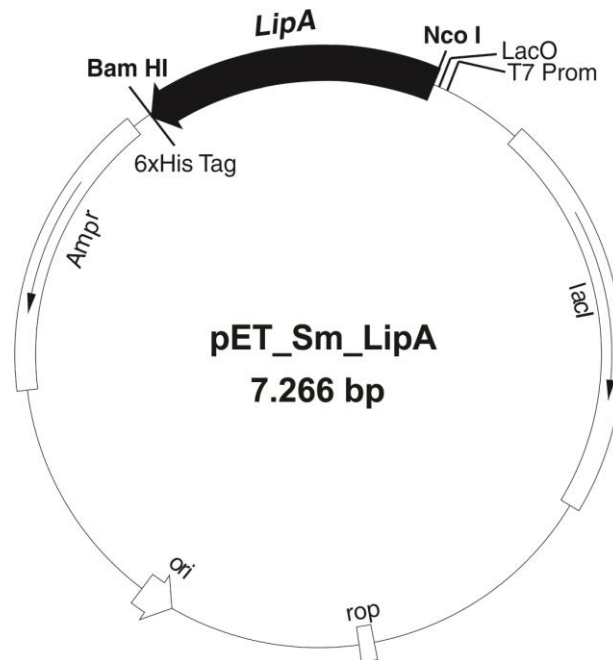
4.1 Construcción del vector de expresión recombinante con el gen sintético *LipA* salvaje

El plásmido pET_Sm_LipA (7266 bp) es el producto de la recombinación del vector pET-21d (+) (5540 bp) y el gen *LipA* (1857 bp) nativo de *S. marcescens*. *LipA* codifica para una lipasa de 619 aminoácidos (65.625 Da \cong 66 kDa), con una extensión de 6 histidinas en el extremo C-terminal (6XHistidine-tag), para futura purificación en columnas de afinidad. Los sitios de clonación fueron *Nco* I (AUG) y *Bam* HI (*Stop*). La selección de transformantes se hizo mediante cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) sobre ampicilina, gracias a que pET-21d (+) es portador del gen de resistencia *amp^r* (β -Lactamasa). La figura 4 esquematiza el plásmido recombinante mostrando las direcciones de transcripción (flechas) y las posiciones de:

- El *Repressor Of Primer* (Rop): codifica una proteína pequeña (\cong 63 aa) que regula negativamente la replicación del plásmido; es decir, mantiene un número de copias bajo en *E. coli*¹⁰⁴.
- El gen regulador *lacI* (*lacI reg*): codifica la proteína represora Lac I, la cual se une a la región operadora e impide la transcripción del gen recombinante¹⁰⁵.
- El promotor T7 prom: región de ADN (5' TAATACGACTCACTATAG 3') que reconoce la T7 RNA polimerasa para iniciar la transcripción desde G¹⁰⁶.
- La región *lacO* (*lacO reg*) u Operador *lac*: sitio de unión, que en ausencia de inductor (lactosa o IPTG), es muy afín a la proteína represora. Esta última impide la transcripción cuando se une al operador¹⁰⁷.

Desde 1994, *LipA* de *S. marcescens* ha sido clonado en diferentes plásmidos y expresado en *E. coli*, a saber: pUC19⁶¹, pBGS18, pUC119, pGSD6, pRSC6, pSE420⁶² y pET-24a (+)¹⁰⁸. Los trabajos más recientes han utilizado vectores de la serie pET^{65,67,71,108} por las ventajas que éstos ofrecen (disponibilidad comercial, promotor fuerte, múltiples sitios de clonación, regulación de la expresión, entre otras). El anexo C muestra la traducción del gen *LipA* sintético con el uso de codones para *E. coli*, iniciando el marco de lectura abierto con el codón AUG y finalizando la síntesis con el codón de parada UAA.

Figura 4. Mapa del plásmido recombinante pET_Sm_LipA. El gen *LipA* se representa con la flecha en color negro. También se muestran otros componentes del plásmido pET-21d (+): Gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*, gen regulador *lacI*, el origen de replicación *ori* y el gen *rop*.



4.2 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3)

Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con los plásmidos pET-21d (+) y pET_Sm_LipA, como se describió en la metodología. Las cepas recombinantes fueron criopreservadas e incluidas en el cepario del Centro Industrial y Biología Molecular (CINBIN), sede UIS-Guatiguará.

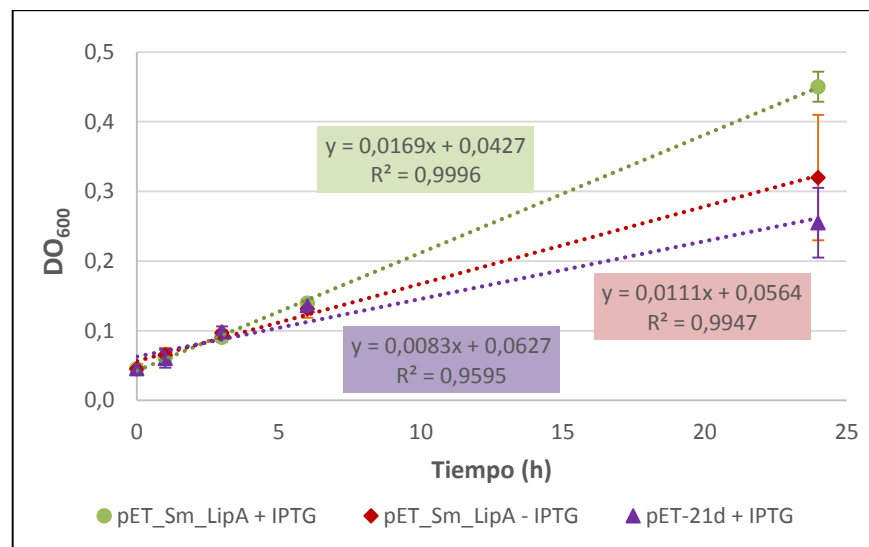
4.3 Sobreexpresión de *LipA* inducida con IPTG

Para iniciar con los experimentos de expresión, inicialmente se realizaron curvas de crecimiento de las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pET-21d (control negativo) y pET_Sm_LipA con y sin inducción. Interesantemente, se notó un mejor crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pET_Sm_LipA e inducida con IPTG. Este comportamiento ya había sido observado por Li *et al.* (2012), quienes encontraron que las células recombinantes de *E. coli* presentaban una mayor densidad celular (CDW), superior incluso a *S. marcescens* YXJ-1002⁷¹. La gráfica 1 evidencia un crecimiento aparentemente lineal durante las 24 horas y el siguiente orden de crecimiento:

pET_Sm_LipA + IPTG > pET_Sm_LipA - IPTG > pET-21d + IPTG

Sin embargo, la ausencia de más puntos, son la razón por la cual no se detallan las diferentes fases del crecimiento bacteriano ¹⁰⁹. Es prematuro intentar explicar la influencia de LipA en el crecimiento de *E. coli*, pero también es conocido que las proteínas recombinantes pueden ejercer un efecto positivo o negativo en el metabolismo de dicho hospedero ¹¹⁰ y en este caso específico la presencia de LipA es sin duda favorable. Tanto el hospedero como la construcción del plásmido influyen en la tasa de crecimiento (Saraswat *et al.* 1999), lo que obliga a evaluar cada caso individualmente.

Gráfica 1. Curvas de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con los siguientes plásmidos: En violeta, pET-21d + IPTG (control negativo); en verde, pET_Sm_LipA + IPTG y en rojo, pET_Sm_LipA - IPTG. Factor de dilución 25. Las viñetas representan el promedio (\bar{X}) de tres mediciones independientes \pm desviación estándar (SD).



Es conocido que LipA de *S. marcescens* forma cuerpos de inclusión insolubles ^{61,65,108} y los resultados mostrados a continuación reflejan este comportamiento.

En primer lugar, se inició la separación electroforética mediante SDS-PAGE de extractos crudos de la cepa de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA + IPTG, fraccionados mediante centrifugación diferencial así: citoplasma insoluble (FIC), citoplasma soluble (FSC), periplasma (FP), medio (FM) y proteína celular total (PT). El propósito del experimento era poder presenciar una banda a \approx 66 kDa, en la cepa transformada con pET_Sm_LipA + IPTG. En la figura 5 se aprecia, efectivamente, una banda entre 60 y 70 kDa. Otras conclusiones se sacaron al observar el perfil proteico de las diferentes fracciones obtenidas:

- 1) La lipasa LipA presuntiva se restringió exclusivamente a la fracción insoluble del citoplasma, tal como otros autores lo han reportado ^{61,65,67} (ver figura 5).
- 2) A pesar de que LipA tiene un péptido señal que permite a *S. marcescens* secretar la enzima ^{61,71}, esta secuencia no cumple esa función en *E. coli*. Esta observación se confirma en la figura 5, por la ausencia de la banda a ≈ 66 kDa en las demás fracciones.

Como no se contaba con un método específico para la detección de LipA, por ejemplo, mediante *western blot*, se observó la aparición gradual de la proteína en relación con el tiempo. En la figura 6 se separaron extractos de la FIC de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA + IPTG y se apreció claramente el incremento a través del tiempo de la banda a ≈ 66 kDa. Estos resultados, aunque no contundentes, demostraron que muy probablemente sí se estaba produciendo la lipasa recombinante.

Desde luego, la prueba definitiva de la producción de LipA estuvo dada por los ensayos de actividad hidrolítica (ver al pie de las figuras 6 y 7). Es preciso aclarar, que *E. coli* carece de lipasas eficientes que puedan hidrolizar triglicéridos ($3.22 \cdot 10^{-8} / \text{g} \cdot \text{min}$) ¹¹² o ésteres ^{112,113}. De esta manera, cualquier actividad lipasa, debe provenir de la proteína recombinante.

Al interpretar la gráfica 2, es evidente la actividad hidrolasa, particularmente en extractos crudos de *E. coli* transformada con pET_Sm_LipA + IPTG (12 ± 4 U/mg), pero esta empezó a disminuir drásticamente después de 3 h, debido al aumento de proteínas propias del hospedero. Inesperadamente, también se registró actividad en extractos sin IPTG (5 ± 3 U/mg), lo que indica que la represión de la expresión de *LipA* no es absoluta. Es probable que la composición del medio de cultivo haya influenciado la expresión de *LipA*, específicamente por un incremento en los niveles de AMPc. Esta hipótesis no es nueva ya que otros autores la han propuesto, dada la expresión sin inducción de otras proteínas recombinantes ¹¹⁴. Es importante remarcar que la actividad hidrolítica se restringió a la fracción insoluble, lo que significa que los resultados de actividad son compatibles con lo observado en los SDS-PAGE.

Finalmente, la actividad nula que tiene el cultivo de pET-21d + IPTG demuestran que la actividad hidrolítica registrada en todos los ensayos es debida exclusivamente a la expresión del gen *LipA* inserto.

Figura 5. Localización subcelular de LipA. SDS-PAGE del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG (0.4 mM) después de 24 h, a 37 °C. Marcador (M) PageRuler™ #26614. Fracción del: citoplasma insoluble (FIC), citoplasma soluble (FSC), periplasma (FP), medio (FM) y proteína celular total (PT). Abajo: Actividad hidrolítica frente al pNPB, presente (+) y ausente (x).

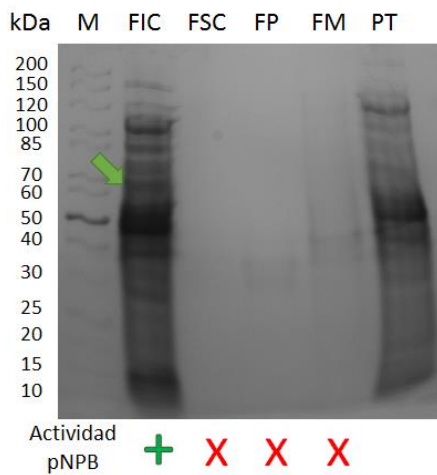
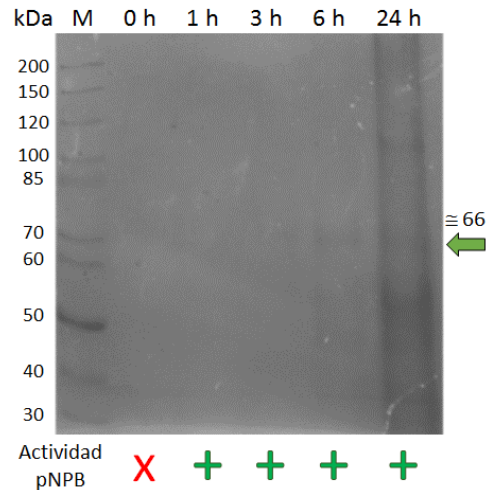
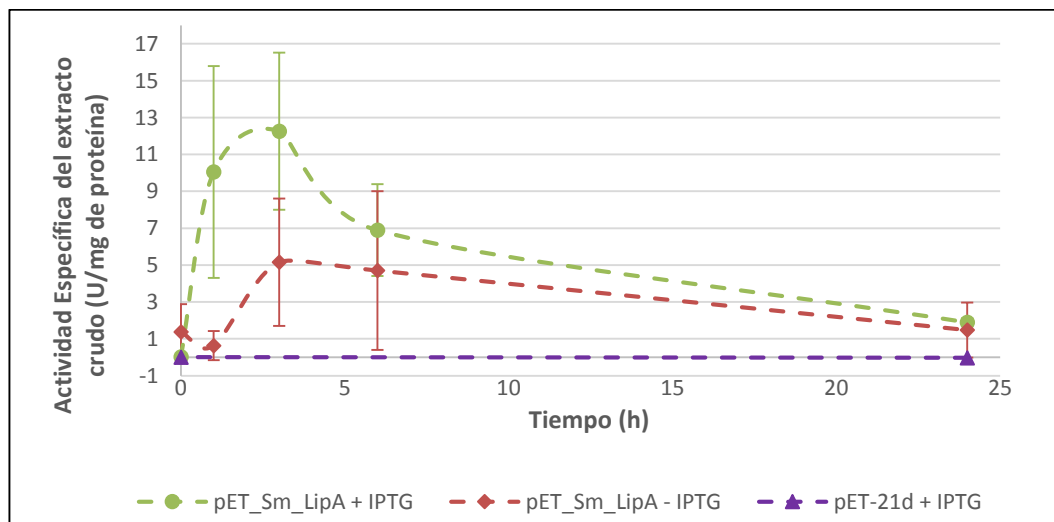


Figura 6. Producción de LipA para cada tiempo de inducción. SDS-PAGE de extractos FIC del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG (0.4 mM) a 37 °C. Marcador (M) PageRuler™ #26614. Actividad hidrolítica frente al pNPB, presente (+) y ausente (x).



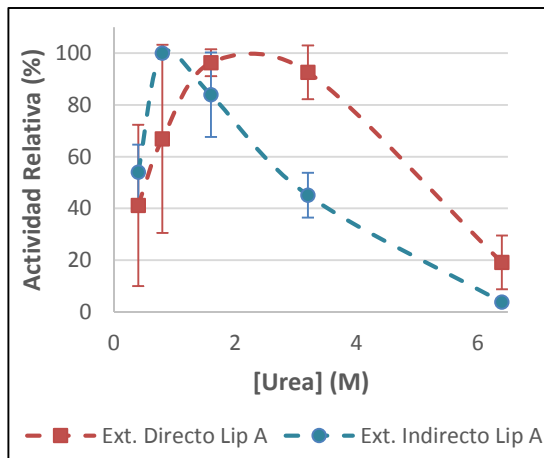
Gráfica 2. Variación de la actividad específica de LipA para cada tiempo de inducción. Muestras extraídas de la FIC de cada cultivo. En violeta, pET-21d + IPTG (control negativo); en verde, pET_Sm_LipA + IPTG y en rojo, pET_Sm_LipA - IPTG. Los datos representan el $\bar{X} \pm SD$ de tres mediciones independientes.



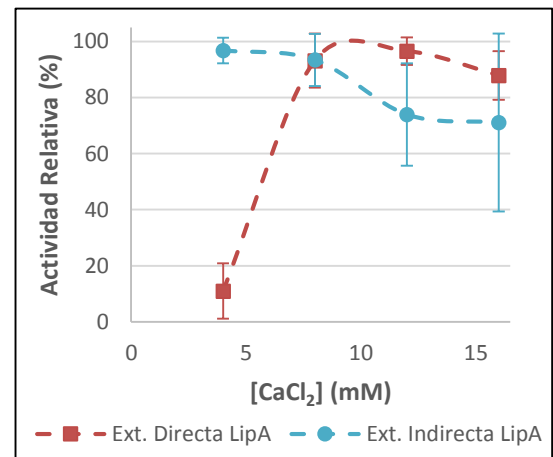
Observaciones previas de otros autores, advirtieron que LipA recombinante, además de ser insoluble, también está en una forma inactiva^{65,67}. Ciertamente, se tuvo que realizar la reconstitución de la enzima solubilizándola con diferentes concentraciones de urea y replegándola con variaciones de CaCl₂.

La activación de la lipasa inició con la disrupción de las células; esta probó ser más eficiente cuando se realizó de forma directa (8.1 U/mg; indirecta: 4.3 U/mg). Inmediatamente después, se fijó la cantidad de 1.6 M urea y 8 mM CaCl₂ en los extractos directos y 0.8 M urea, 8 mM CaCl₂ en los extractos indirectos (ver gráficas 3 y 4). Esta diferencia de agente solubilizante y el punto de 12 mM CaCl₂ se atribuyó a la liberación de más proteína en la lisis directa, por ende, es necesario aplicar estos dos ensayos frente a cada lote de cultivo si se modifican las condiciones del mismo.

Gráfica 3. Efecto de la concentración de urea en la solubilización de LipA. Extractos FIC directo e indirecto (8 mM CaCl₂) del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG a las 3 h de inducción. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación. Los datos representan el $\bar{X} \pm SD$ de dos mediciones independientes.



Gráfica 4. Efecto de la concentración de CaCl₂ en el replegamiento de LipA. Extractos FIC directo (1.6 M urea) e indirecto (0.8 M urea) del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG a las 3 h de inducción. El 100 % de actividad relativa corresponde a la máxima actividad de cada preparación. Los datos representan el $\bar{X} \pm SD$ de dos mediciones independiente.



El comportamiento que sufre la enzima, tanto con la variación de urea como de Ca²⁺, no es anómalo, puesto que ambos son agentes caotrópicos y aumentan la solubilidad en agua de sustancias no polares según la serie de Hofmeister^{80,115,116}, no sobra recalcar que LipA es dependiente de Ca²⁺ para su correcto plegamiento^{65,66}. Empero, al superarse la concentración máxima de soluto dentro de la matriz, la desnaturalización (en el caso de

la urea) y la precipitación por salado de la proteína (en el caso de CaCl_2) ocasionan el descenso de la actividad ⁸⁰.

La gráfica 5 justifica la razón por la cual no se trabajó con la temperatura óptima (42 °C) reportada por Mohammadi *et al.* (2015) ⁶⁷. Esta disminución de actividad se atribuye hipotéticamente al exceso de urea en el extracto crudo (lipasa no purificada ni dializada), ya que se puede presentar carbamilación de la proteína por encima de 37 °C ¹¹⁷⁻¹¹⁹. La reacción de carbamilación se detalla en la figura 7.

Gráfica 5. Disminución de la actividad enzimática a 42°C. Extracto FIC del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG a las 3 h de inducción, reconstitución de LipA: 1.6 M urea, 8 mM CaCl_2 . La actividad sin incubación corresponde al 100 %. Las barras representan el $\bar{X} \pm \text{SD}$ de dos mediciones independientes.

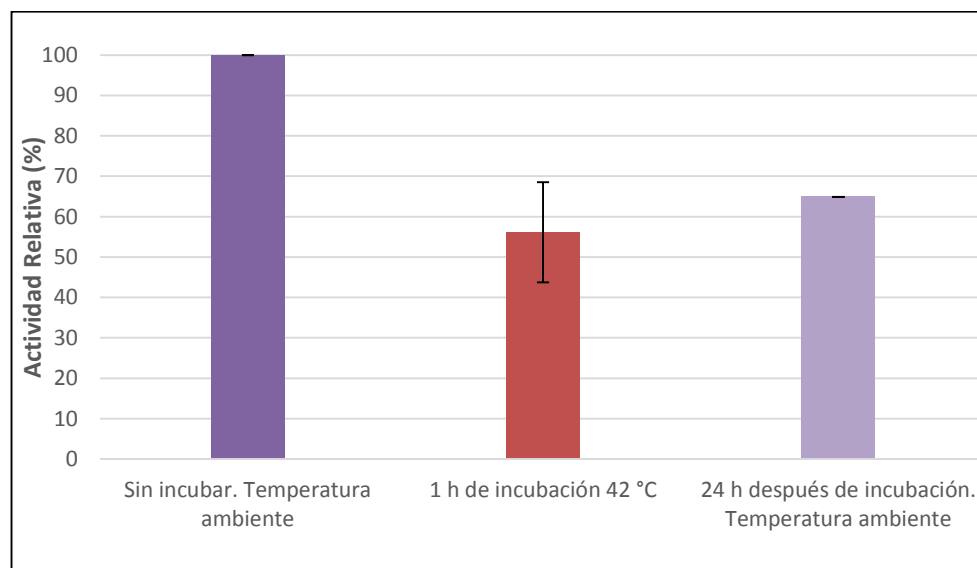
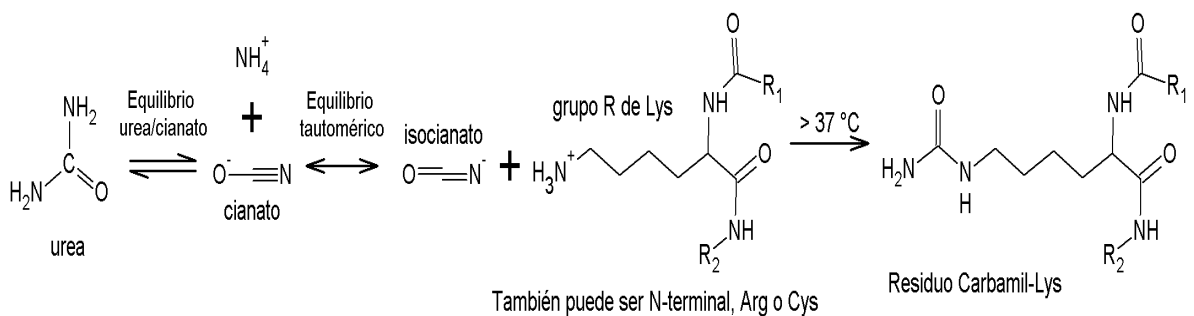


Figura 7. Carbamilación de un residuo aminoacídico.



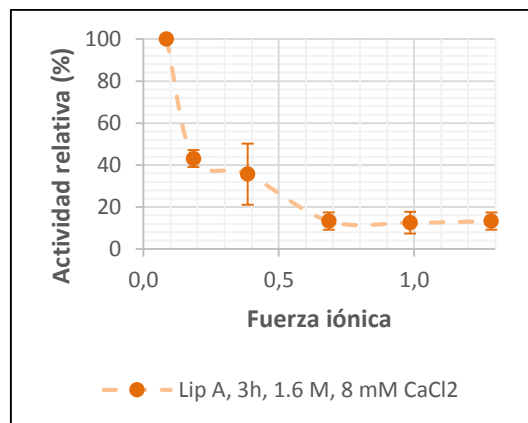
4.4 Variación de la actividad catalítica de LipA frente a cambios en la fuerza iónica, y solventes orgánicos inhibitorios de actividad (etanol, glicerol)

La dramática disminución de la actividad de LipA con el aumento de la fuerza iónica (ver gráfica 6), puede deberse al fenómeno físico-químico *salting out*, que promueve la aglomeración de la proteína y por ende su mal plegamiento ¹²⁰. Adicionalmente, la presencia de iones Na⁺ contribuye negativamente a la actividad lipolítica inclusive en concentraciones bajas, tal y como lo demostró ¹²¹, que estimaron una caída de actividad a 90.0 ±4.5 % con 10 mM de NaCl. Esta información es útil a la hora de preparar las soluciones de extracción, lavado, solubilización, replegamiento y purificación de la enzima, puesto que se pueden adicionar iones Na⁺ innecesarios en el extracto final aun si se realiza diálisis.

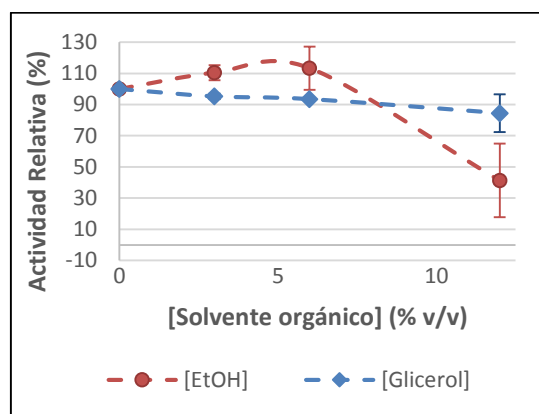
La incubación de LipA con etanol a temperatura ambiente mostró un considerable aumento de actividad (110 ±5 %) a 3 % v/v (≅ 514 mM) y una tendencia similar a la hallada por Long *et al.* (2007) (ver gráfica 8), quienes registraron un máximo de actividad (≅ 110 ±5 %) cuando la matriz de la reacción (S)-ketoprofen etil ester → (S)-ketoprofeno contenía 500 mM de etanol ¹⁰⁸. Por otro lado, Zhao *et al.* (2008) demostraron que LipA es tolerante a varios detergentes y solventes, pero entre estos últimos, 10 mM etanol redujo la actividad a 88.0 ±8.1 % después de 24 h de incubación a 30 °C ¹²¹. Los resultados de este trabajo prueban que LipA mantiene una actividad superior, por debajo de 6% v/v etanol (≅ 1.0 M) durante 1 h a 25 °C, esto es coherente con la producción de FAEE, que fue mayor con la relación EtOH:aceite más alta (9:1).

Por el contrario, la presencia de glicerol, subproducto de la transesterificación, induce un descenso lento de actividad a medida que aumenta su concentración (84 ±12 % a 12% v/v), empero, niveles < 6% v/v glicerol mantienen un 93 ±1 % de actividad. La caída de actividad a causa del glicerol ha sido reportada por Li *et al.* (2011) en el replegamiento de la lipasa de *Serratia marcescens* ECU1010 (81 ±4 % a 10 % v/v) ¹²². El glicerol, como agente inhibitorio ha sido mencionado en diferentes ocasiones ⁵ y su contribución negativa a la actividad de las lipasas en general, se atribuye a dos motivos esencialmente: 1) crea un ambiente hidrofílico alrededor de la lipasa (especialmente si está inmovilizada) que impide el contacto con el sustrato ¹²³, 2) la transferencia de masa se ve limitada al aumentar la viscosidad del medio ⁵. Estos problemas han sido resueltos con el uso de solventes y co-solventes ^{5,26}.

Gráfica 6. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de LipA. Extracto FIC del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG a las 3 h de inducción, reconstitución: 1.6 M urea, 8 mM de CaCl₂. La actividad sin NaCl corresponde al 100 %. Los datos representan el $\bar{X} \pm SD$ de dos mediciones independientes.



Gráfica 7. Efecto de solventes orgánicos inhibitorios de actividad sobre LipA. Extracto FIC del cultivo pET_Sm_LipA + IPTG a las 3 h de inducción, reconstitución: 1.6 M urea, 8 mM de CaCl₂. La actividad sin solvente orgánico corresponde al 100 % de cada preparación. Los datos representan el $\bar{X} \pm SD$ de dos mediciones independientes.



4.5 Determinación de las mejores condiciones de transesterificación catalizada con extractos crudos de LipA. Monitoreo por Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H)

4.5.1 Caracterización de la materia prima

La proporción molar de los ácidos grasos insaturados y saturados totales del aceite de palma africana, se reportaron en la tabla 8. La deducción del peso molecular tomó como base de cálculo la masa molar de los ácidos grasos: Oleico (C18:1), Linoleico (C18:2), Linolénico (C18:3) y Palmítico (C16:0); unidos a una molécula de glicerol. La composición hallada es coherente con la reportada previamente en la literatura ^{124,125}

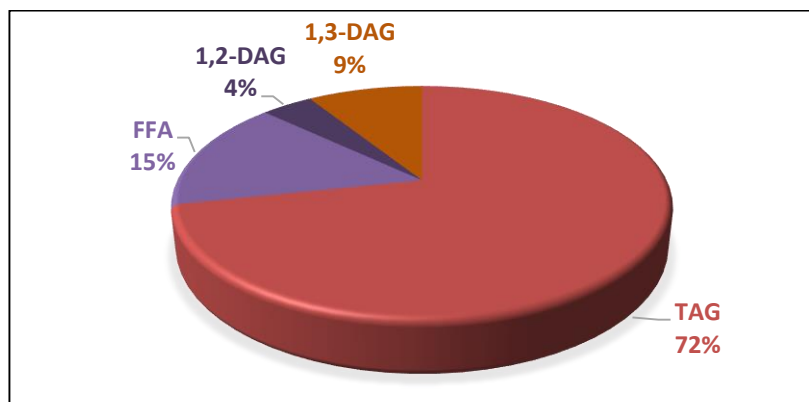
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos del aceite de palma africana y peso molecular promedio del triglicérido, utilizando RMN-¹H.

Ácido graso	Porcentaje molar ± SD	Peso molecular promedio ± SD (g/mol)	Peso molecular teórico (g/mol) ^a	% Error
Linolénico (C18:3)	0.42 ± 0.08			
Linoleico (C18:2)	8.4 ± 0.1			
Oleico (C18:1)	43.6 ± 0.4	847.7 ± 0.3	849.1929	0.2
Insaturados totales	52.4 ± 0.5			
Saturados (C12-C18)	47.6 ± 0.5			

^a Rincón & Martínez (2009).

La figura 8 resume la composición molar inicial del sustrato, evidenciándose la gran acidez del aceite (15%), el gran contenido de TAG (72%), la existencia de DAG (13%) y ausencia de MAG. Rincón & Martínez (2009) reportaron una acidez máxima del 5 %¹²⁵ (expresada como ácido palmítico; ≡ 14.8 % m/m), la cual es muy cercana al valor hallado por Resonancia. La pequeña diferencia puede deberse a la base de cálculo utilizada, puesto que RMN-¹H tiene en cuenta todos los FFA y no sólo el ácido palmítico.

Figura 8. Proporción molar del aceite crudo de palma africana.

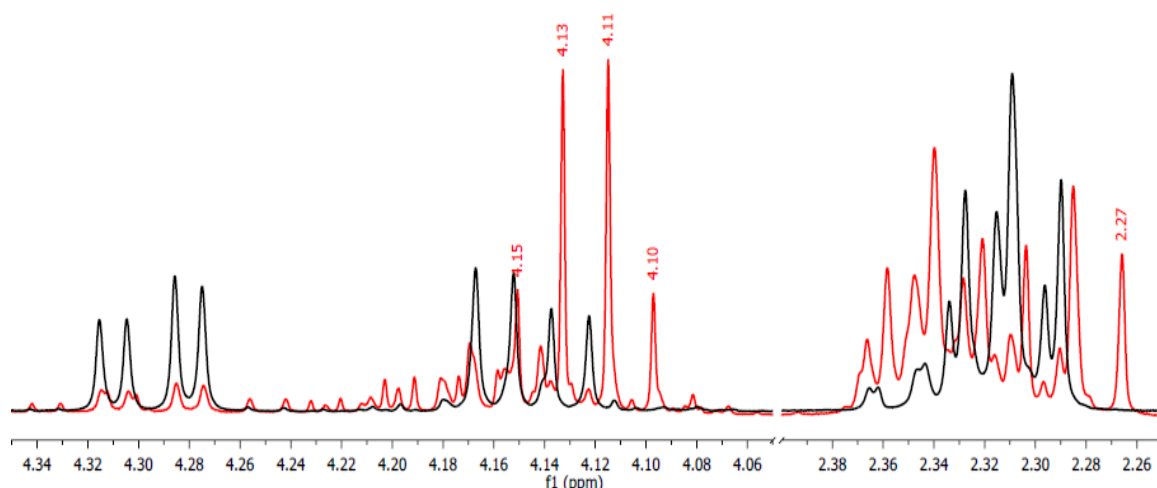


4.5.2 Identificación y cuantificación de FAEE

La presencia de FAEE se comprobó claramente con la aparición del *q* a 4.12 ppm, la simultánea disminución de las señales a 4.22 (dd, dd) y el *t*/*4* a 2.27 ppm (ver gráfica 8), esta última señal pertenece a un triplete semisolapado de los αCH_2 del FAEE, que se encuentra a campo más alto debido a que el efecto desprotector del grupo carbonilo en el etil éster es menor que en los FFA, TAG, DAG o MAG^{93,94}. Dado que la señal del *q* se encuentra en muchas ocasiones contaminada con la presencia de 1,3-DAG se optó por usar el *t*/*4*. Pese a que no se ha reportado aún, el uso del *t*/*4* para la cuantificación de FAEE, las siguientes razones dieron confianza para su implementación:

- 1) el aceite crudo no poseía dicha señal,
- 2) es la señal que sobresale a campo más alto ,en la región de los αCH_2 (2.25-2.40 ppm),
- 3) después de la transesterificación los únicos compuestos nuevos eran: el FAEE y los MAG, estos últimos tenían señales aisladas (ver tabla 6) que se pudieron cuantificar y comparar con la señal a 2.27 ppm; los resultados no fueron similares (cálculos no mostrados).
- 4) Los porcentajes hallados de FAEE utilizando la señal a 2.27 ppm y el q a 4.12 ppm sí fueron semejantes (cálculos no mostrados).

Gráfica 8. Identificación de FAEE por RMN- ^1H . Espectro rojo corresponde al aceite sometido a transesterificación con etanol (9:1) y LipA durante 6 h, a 25 °C. Espectro negro pertenece al aceite crudo de palma (control).



4.5.3 Diseño experimental: transesterificación del aceite de palma con etanol y extractos crudos de LipA

Todos los productos obtenidos después de 6 h de reacción se registraron en la tabla 9. Estos datos permitieron hacer dos presunciones importantes:

- 1) Extractos crudos de LipA recombinante tienen una preferencia marcada por la hidrólisis de triglicéridos (98.6 % FFA, ejecución 9). En todas las ejecuciones (excepto en la 13) siempre el producto predominante fue FFA
- 2) Extractos crudos de LipA recombinante no poseen estereoespecificidad *sn*-1,3 bajo las condiciones de reacción establecidas. Esto es fácil de deducir analizando la razón entre 1,3-DAG y 1,2-DAG (> 1, excepto en la ejecución 15) y la razón entre 1-MAG y 2-MAG (siempre > 9), es decir, los intermediarios predominantes después de los FFA son los 1,3-DAG y 1-MAG, característicos de lipasas *sn*-2. Este resultado es muy interesante puesto que es contrario a lo reportado por Matsumae & Shibatani (1994).

Tabla 9. Resultados del diseño experimental. Productos finales de la transesterificación con LipA a temperatura ambiente, bajo las condiciones dadas de EtOH: aceite y carga enzimática

	Ejecución	Relación molar EtOH: aceite	Carga Enzimática (U)	Porcentaje molar (%)						
				FAEE	FFA	TAG	1,2-DAG	1,3-DAG	1-MAG	2-MAG
1	1	3	1	5.3	55.1	11.7	7.7	13.6	6.3	0.3
	2	6	1	10.6	50.8	8.2	5.2	16.7	7.7	0.7
	3	9	1	28.8	45.0	6.8	2.0	10.2	6.7	0.4
	4	3	2	4.7	64.1	8.8	6.9	7.5	7.5	0.5
	5	6	2	4.7	56.5	11.1	6.5	12.0	8.9	0.4
	6	6	2	4.1	57.1	13.3	5.5	12.1	7.7	0.1
	7	9	2	14.3	62.4	4.9	3.8	7.3	6.8	0.5
	8	3	3	1.3	65.3	9.3	5.0	10.7	8.0	0.3
	9	6	3	0.96	98.6	0.2	0.05	0.2	0.04	0.002
	10	9	3	11.3	38.2	9.5	4.9	23.9	10.9	1.2
2	11	3	1	11.8	58.1	7.1	5.2	10.0	7.4	0.3
	12	6	1	8.9	48.6	13.3	7.3	14.7	6.6	0.6
	13	9	1	46.5	30.8	1.7	3.8	8.5	7.9	0.8
	14	3	2	6.3	68.7	5.9	4.1	8.6	5.9	0.5
	15	6	2	7.5	63.3	7.2	7.3	4.4	9.5	0.8
	16	6	2	9	57.8	7.5	6.2	10.8	8.0	0.6
	17	9	2	10.3	51.6	10.5	7.5	11.4	7.9	0.9
	18	3	3	4.1	67.5	5.9	6.6	8.7	6.6	0.7
	19	6	3	3.3	56.5	16.4	6.0	10.4	7.1	0.4
	20	9	3	19.4	62.3	4.5	1.8	6.6	5.0	0.4

Los datos experimentales fueron ajustados a una ecuación polinomial de segundo orden y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la producción de FAEE. El programa particiona la variabilidad de FAEE en piezas separadas para cada uno de los efectos y compara su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P < 0.05 (ver tabla 10), indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R^2 y R^2 ajustado, muestran que la variación en el rendimiento de FAEE está correlacionada con las variables independientes en un 82.2 y 73.98 % respectivamente; este último valor es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes. La moderada correlación puede deberse a complicaciones experimentales, especialmente a la ausencia de solvente, que no permite

una homogénea interacción entre el sustrato y la enzima, aumentando así la dispersión de los datos.

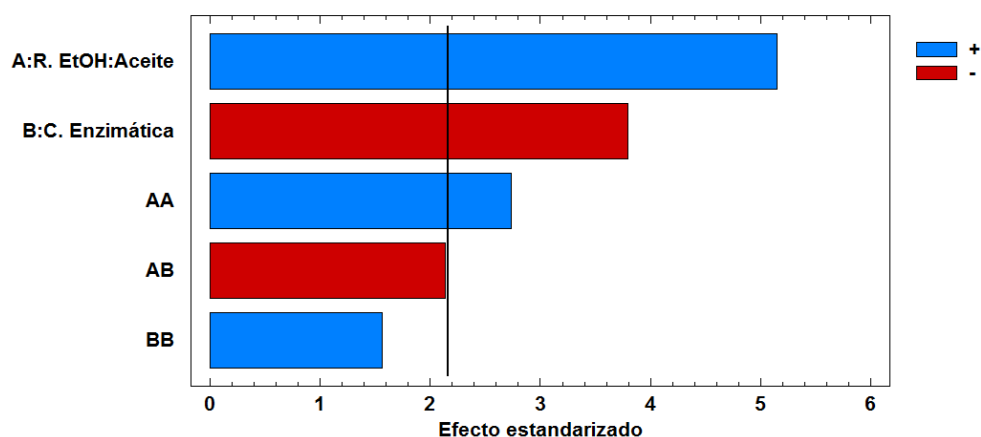
El error estándar del estimado 5.44, indica la desviación estándar de los residuos y el error medio absoluto 3.16 revela el valor promedio de los residuos; estos estadísticos permiten medir la precisión del modelo, es decir, el grado de correspondencia entre pares individuales de valores pronosticados y observados.

Tabla 10. Análisis de Varianza (ANOVA) para FAEE.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:R. EtOH:Aceite	785.701	1	785.701	26.54	0.0002
B:C. Enzimática	426.498	1	426.498	14.41	0.0022
AA	221.399	1	221.399	7.48	0.0170
AB	135.301	1	135.301	4.57	0.0521
BB	71.9976	1	71.9976	2.43	0.1429
bloques	84.2141	1	84.2141	2.84	0.1155
Error total	384.822	13	29.6017		
Total (corr.)	2161.6	19			
$R^2 = 0.822$					
$R^2_{Aj} = 0.739$					
% error estándar del est. = 5.44					
% error absoluto medio = 3.16					

El diagrama de Pareto (ver gráfica 9) permite visualizar de forma cualitativa, la contribución (positiva o negativa) de cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. Esto es equivalente a calcular un *Test-t* para cada efecto. La línea vertical puede utilizarse para juzgar cuáles variables influyen significativamente en la producción de FAEE, cualquier barra que se extienda más allá de la línea, corresponde a un efecto estadísticamente significativo con un 95.0% de nivel de confianza.

Gráfica 9. Diagrama de Pareto estandarizado para FAEE. Barras azules contribución positiva, barras rojas contribución negativa.

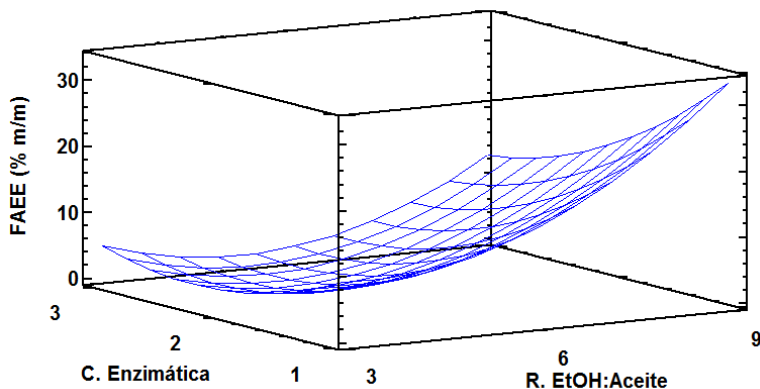


La ecuación del modelo ajustado que estima el porcentaje molar de FAEE en función de la relación molar EtOH: aceite (A) y la carga enzimática (B) se presenta a continuación:

$$\text{FAEE (\% m/m)} = 26.7214 - 3.74492*A - 13.4481*B + 0.765317*A^2 - 1.37083*AB + 3.92786B^2$$

La gráfica 10 descrita por la anterior ecuación, permite visualizar las mejores condiciones (máximo de la superficie) de reacción para los extractos crudos de LipA recombinante, estas son: una relación molar 9:1 EtOH: aceite, una carga enzimática de 1 U/100 mg de aceite (\equiv 10 U/g de aceite) a pH 8 y temperatura ambiente. Estas condiciones fueron las que permitieron obtener los mejores porcentajes de FAEE (28.8 y 46.5 %). Estos resultados son muy interesantes y prometedores para la industria de los biocombustibles puesto que se usan más de 400 U/g de aceite para obtener rendimientos altos de alquil éster ^{5,126}. Adicionalmente, el rendimiento de FAEE utilizando LipA es susceptible de ser mejorado, tomando a consideración: niveles más bajos de enzima, más altos de etanol, el uso de co-solventes, la purificación de la proteína y la incubación a temperatura óptima.

Gráfica 10. Superficie de respuesta estimada para FAEE.



5 CONCLUSIONES

Se logró sobreexpresar exitosamente el gen *LipA*, nativo de *Serratia marcescens*, en *E. coli* BL21 (DE3), utilizando el vector de clonación pET21d (+). Se notó un mayor crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pET_Sm_LipA e inducida con IPTG.

El mejor tiempo para recuperar la proteína fue a las 3 h de inducción y la extracción más eficiente se logró con sonicación directa.

Las mejores condiciones para la reconstitución de la enzima a pH 8, fueron:

- Extracto directo: 1.6 M urea, 8 -12 mM CaCl₂.
- Extracto indirecto: 0.8 M urea, 8 mM CaCl₂.

Se demostró la actividad hidrolasa de los extractos crudos de LipA recombinante frente al p-nitrofenil butirato (12 ± 4 U/mg) y se corroboró la actividad lipasa frente a triglicéridos de aceite de palma africana.

Se estableció que la presencia de NaCl disminuye drásticamente la actividad de extractos crudos de LipA recombinante.

Se encontró que extractos crudos de LipA aumentan moderadamente su actividad frente a concentraciones < 6% v/v etanol, por encima de este valor la actividad decrece rápidamente.

Se halló que el aumento en la concentración de glicerol induce un descenso lento de actividad. Sin embargo, niveles < 6 % v/v glicerol lograron mantener 93 ± 1 % de actividad.

Las mejores condiciones para la transesterificación del aceite de palma, utilizando etanol y extractos crudos de LipA recombinante, sin solvente, fueron: relación molar 9:1 EtOH: aceite, carga enzimática de 10 U/g de aceite y temperatura ambiente. Los extractos deben estar reconstituidos en 1.6 M urea, 8 mM CaCl₂, pH 8 y ausentes de NaCl.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mesa J. Biodiésel de palma en Colombia: un sueño hecho realidad. *PALMAS*. 2008;29(2):81-89.
2. Agarwal a. K, Das LM. Biodiesel Development and Characterization for Use as a Fuel in Compression Ignition Engines. *J Eng Gas Turbines Power*. 2001;123(2):440-447.
3. Graboski MS, McCormick RL. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Prog Energy Combust Sci*. 1998;24(97):125-164.
4. Wang WG, Lyons DW, Norton PM. Emissions from Nine Heavy Trucks Fueled by Diesel and Biodiesel Blend without Engine Modification. 2000;34(6):933-939.
5. Fjerbaek L, Christensen K V., Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng*. 2009;102(5):1298-1315.
6. Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *J Mol Catal B Enzym*. 2010;62(1):9-14.
7. Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*. 2001;92(5):405-416.
8. Ugur A, Sarac N, Boran R, Ayaz B, Ceylan O, Okmen G. New Lipase for Biodiesel Production: Partial Purification and Characterization of LipSB 25-4. 2014;2014.
9. Jaeger K, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):390-397.
10. Treichel H, de Oliveira D, Mazutti M a., Di Luccio M, Oliveira JV. A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol*. 2010;3(2):182-196.
11. Marton Z, Léonard-Nevers V, Syrén PO, *et al*. Mutations in the stereospecificity pocket and at the entrance of the active site of *Candida antarctica* lipase B enhancing enzyme enantioselectivity. *J Mol Catal B Enzym*. 2010;65(1-4):11-17.
12. Hwang HT, Qi F, Yuan C, *et al*. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111(4):639-653.
13. Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal - B Enzym*. 2002;17(3-5):133-142.

14. Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresour Technol.* 2008;99(10):3975-3981.
15. Tan C-H, Ghazali HM, Kuntom A, Tan C-P, Ariffin A a. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil. *Food Chem.* 2009;113(2):645-650.
16. Lau HLN, Puah CW, Choo YM, Ma AN, Chuah CH. Simultaneous quantification of free fatty acids, free sterols, squalene, and acylglycerol molecular species in palm oil by high-temperature gas chromatography-flame ionization detection. *Lipids.* 2005;40(5):523-528.
17. Lik Nang Lau H, Choo YM, Ma AN, Chuah CH. Selective extraction of palm carotene and vitamin E from fresh palm-pressed mesocarp fiber (*Elaeis guineensis*) using supercritical CO₂. *J Food Eng.* 2008;84(2):289-296.
18. Norhaizan ME, Hosseini S, Gangadaran S, Lee ST, Kapourchali FR, Moghadasian MH. Palm oil: Features and applications. *Lipid Technol.* 2013;25(2):39-42.
19. Lombana J, Vega J, Britton E, Herrera S. *Análisis Del Sector Biodiésel En Colombia Y Su Cadena de Suministro.* Barranquilla: Universidad del Norte; 2015.
20. Mba OI, Dumont M-J, Ngadi M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry – A review. *Food Biosci.* 2015;10:26-41.
21. Kalustian P. Pharmaceutical and cosmetic uses of palm and lauric products. *J Am Oil Chem Soc.* 1985;62(2):431-433.
22. Davis SC, Boddey RM, Alves BJR, *et al.* Management swing potential for bioenergy crops. *GCB Bioenergy.* 2013;5(6):623-638.
23. Carlson KM, Curran LM, Ratnasari D, *et al.* Committed carbon emissions, deforestation, and community land conversion from oil palm plantation expansion in West Kalimantan, Indonesia. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(19):7559-7564.
24. Carraretto C, Macor A, Mirandola A, Stoppato A, Tonon S. Biodiesel as alternative fuel: Experimental analysis and energetic evaluations. *Energy.* 2004;29(12-15 SPEC. ISS.):2195-2211.
25. Torres J, Suárez O, Narváez P, Sánchez F. Sulfonación de ésteres metílicos derivados del aceite de palma. 2008;9:77-87.
26. Azocar LH. Proceso enzimático para la producción de metil ésteres de ácidos grasos utilizando aceites residuales de fritura en mezcla con aceite de raps como materia prima. 2010.

27. Marchetti JM, Miguel VU, Errazu a. F. Possible methods for biodiesel production. *Renew Sustain Energy Rev.* 2007;11(6):1300-1311.
28. Tashtoush GM, Al-Widyan MI, Al-Jarrah MM. Experimental study on evaluation and optimization of conversion of waste animal fat into biodiesel. *Energy Convers Manag.* 2004;45(17):2697-2711.
29. Chen L, Liu T, Zhang W, Chen X, Wang J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. *Bioresour Technol.* 2012;111:208-214.
30. Demirbas A. Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide. *Energy Convers Manag.* 2007;48(3):937-941.
31. Knothe G, Dunn RO, Bagby MO. Biodiesel: The Use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels. *Energy.* 1997;666:172-208.
32. Chaluvadi N, Vijay P, Puli RVR, Dadi Y, Pavan CVVN. Diesel Engine Performance Improvement by Using Cetane Improver. *Int J Eng Innov Technol.* 2013;2(10):179-182.
33. Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol.* 1999;70(1):1-15.
34. Formo MW. Ester reactions of fatty materials. *J Am Oil Chem Soc.* 1954;31(11):548-559.
35. Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 1994;15(1):29-63.
36. Kumar A, Sharma P, Kanwar SS. Lipase catalyzed esters syntheses in organic media: a review. *Int J Institutional Pharm Life Sci.* 2012;2(April):91-119.
37. Barbosa LO. Obtención de Nuevos Derivados de Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) por Técnicas de Modificación Químico-estructural en Fase Sólida. 2013.
38. Winkler FK, D'arcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature.* 1990;343:771-774.
39. Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, *et al.* A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature.* 1990;343:767-770.
40. Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure.* 1994;2(4):293-308.

41. Bassegoda A, Cesarini S, Diaz P. Lipase improvement: goals and strategies. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012;2(3):1-8.
42. Carrasco-López C, Godoy C, Rivas B de las, *et al*. Activation of Bacterial Thermoalkalophilic Lipases Is Spurred by Dramatic Structural Rearrangements. *J Biol Chem*. 2008:1-22.
43. Wahab RA, Basri M, Basyaruddin M, *et al*. Engineering catalytic efficiency of thermophilic lipase from *Geobacillus zalihae* by hydrophobic residue mutation near the catalytic pocket. *Adv Biosci Biotechnol*. 2012;3:158-167.
44. Dong H, Gao S, Han SP, Cao SG. Purification and characterization of a *Pseudomonas sp.* lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnol Appl Biochem*. 1999;30(3):251-256.
45. Abdou AM. Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J Dairy Sci*. 2003;86(1):127-132.
46. Watanabe N, Ota Y, Minoda Y, Yamada K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric Biol Chem*. 1977;41(8):1353-1358.
47. Pereira-Meirelles F, Rocha-Leão M, Sant'Anna Jr. G. A Stable Lipase from *Candida lipolytica*. *Biotechnol Fuels Chem*. 1997;63-65:73-85.
48. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv*. 2009;27(6):782-798.
49. Ghosh PK, Saxena RK, Gupta R, Yadav RP, Davidson WS. Microbial lipases: Productions and Applications. *Sci Prog*. 1996;79(February 1996):119-157.
50. Yadav RP, Saxena RK, Gupta R, Davidson WS. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Appl Biochem*. 1998;28(3):243-249.
51. Chahinian H, Vanot G, Ibrik A, Rugani N, Sarda L, Comeau LC. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000;64(2):215-222.
52. Costa M a F, Peralta RM. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). *J Basic Microbiol*. 1999;39(1):11-15.
53. Guillén M. Caracterización, inmovilización y aplicación en biocatálisis de la lipasa en *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*. 2012.

54. Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, Kanwar SS, Gupta R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):38-44.
55. Fano M, Van De Weert M, Moeller EH, Kruse NA, Frokjaer S. Ionic strength-dependent denaturation of *Thermomyces lanuginosus* lipase induced by SDS. *Arch Biochem Biophys.* 2011;506(1):92-98.
56. Lee SY, Rhee JS. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15(7):617-623.
57. Maia MM, Heasley A, Camargo de Morais MM, *et al.* Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour Technol.* 2001;76(1):23-27.
58. Soumanou MM, Bornscheuer UT. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb Technol.* 2003;33(1):97-103.
59. Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79:331-337.
60. Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.* 1999;343:177-183.
61. Akatsuka H, Kawai E, Omori K, Komatsubara S, Shibatani T, Tosa T. The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol.* 1994;176(7):1949-1956.
62. Li X, Tetling S, Winkler UK, Jaeger KE, Benedik MJ. Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(7):2674-2680.
63. Bae H-A, Lee K-W, Lee Y-H. Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (S) -flurbiprofen. *J Mol Catal B Enzym.* 2006;40:24-29.
64. Angkawidjaja C, Kanaya S. Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(23):2804-2817.
65. Meier R, Drepper T, Svensson V, Jaeger KE, Baumann U. A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J Biol Chem.* 2007;282(43):31477-31483.
66. Matsumae H, Shibatani T. Purification and characterization of the lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid esters. *J Ferment Bioeng.* 1994;77(2):152-158.

67. Mohammadi M, Sepehrizadeh Z, Ebrahim-habibi A, Reza A, Ali M, Setayesh N. Bacterial expression and characterization of an active recombinant lipase A from *Serratia marcescens* with truncated C-terminal region. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;120:84-92.
68. Patil KJ, Chopda MZ, Mahajan RT. Lipase biodiversity. *Indian J Sci Technol.* 2011;4(8):971-982.
69. Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol.* 2013;16(3).
70. Verma N, Thakur S, Bhatt A. Microbial Lipases: Industrial Applications and Properties (A Review). *Int Res J Biol Sci.* 2012;1(8):88-92.
71. Li A, Ngo TPN, Yan J, Tian K, Li Z. Whole-cell based solvent-free system for one-pot production of biodiesel from waste grease. *Bioresour Technol.* 2012;114:725-729.
72. Mittelbach M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1990;67(3):168-170.
73. Nelson LA, Foglia TA, Marmer WN. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *J Am Oil Chem Soc.* 1996;73(8):1191-1195.
74. Abigor RD, Uadia PO, Foglia T a, *et al.* Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(6):979-981.
75. Du W, Xu Y, Liu D, Zeng J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *J Mol Catal B Enzym.* 2004;30:125-129.
76. Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel : Optimization of the biodiesel production. *J Mol Catal B Enzym.* 2006;43:142-147.
77. Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *J Mol Catal - B Enzym.* 2001;16(1):53-58.
78. Li L, Du W, Liu D, Wang L, Li Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *J Mol Catal B Enzym.* 2006;43(1-4):58-62.
79. Christopher LP, Hemanathan K, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Appl Energy.* 2014;119:497-520.

80. Voet D, Voet JG. Capítulo 8. Estructura tridimensional de las proteínas. In: *Bioquímica*. 3rd ed. Buenos Aires: Panamericana; 2006:273-274.
81. Curtis H, Barnes NS, Schnek A, Massarini A. Los genes en acción: estructura, expresión y control de la información génica. In: *Biología*. 7th ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2008:280-281.
82. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12:195-201.
83. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;67:289-298.
84. Phue J, Noronha SB, Hattacharyya R, Wolfe AJ, Shiloach J. Glucose Metabolism at High Density Growth of *E. coli* B and *E. coli* K: Differences in Metabolic Pathways Are Responsible for Efficient Glucose Utilization in *E. coli* B as Determined by Microarrays and Northern Blot Analyses. *Biotechnol Bioeng*. 2005;90(7):805-820.
85. Lara AR. Producción de Proteínas Recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Mex Ing Química*. 2011;10:209-223.
86. Bharti SK, Roy R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends Anal Chem*. 2012;35:5-26.
87. Knothe G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*. 2000;77(5):489-493.
88. Ghesti GF, de Macedo JL, Resck IS, Dias JA, Dias SCL. FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with ¹H NMR spectroscopy methods. *Energy and Fuels*. 2007;21(5):2475-2480.
89. Barison A, da Silva CWP, Campos FR, Simonelli F, Lenz CA, Ferreira AG. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem*. 2010;48(8):642-650.
90. Yara-Varón E, Eras J, Torres M, Canela-Garayoa R. ¹H RMN: Una herramienta rápida para la cuantificación de la etanolólisis sin solvente del aceite de coco mediante resting cells fúngicas. *Rev Tumbaga*. 2014;1(9):99-108.
91. Jie MSFLK, Lam CC. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of saturated, acetylenic and ethylenic triacylglycerols. *Chem Phys Lipids*. 1995;77:155-171.
92. Knothe G, Kenar JA. Determination of the fatty acid profile by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2004;106(2):88-96.

93. Nieva-echevarría B, Goicoechea E, Manzanos MJ, Guillén MD. A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Res Int.* 2014;66:379-387.
94. Satyarthi JK, Srinivas D, Ratnasamy P. Estimation of Free Fatty Acid Content in Oils , Fats , and Biodiesel by ¹H NMR Spectroscopy. *Energy and Fuels.* 2009;23(19):2273-2277.
95. Menezes M dos P, Melo LN De, Silva JPV da, *et al.* Evaluation of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Determining the Yield of Fatty Acid Ethyl Esters Obtained by Transesterification. *Energy & Fuels.* 2015;29(11):7343-7349.
96. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1987.
97. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Third edit. New York; 2001.
98. Quinn DM, Shirai K, Jackson RL, Harmony J a. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble p-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II. *Biochemistry.* 1982;21(26):6872-6879.
99. Iacazio G, Périssol C, Faure B. A new tannase substrate for spectrophotometric assay. *J Microbiol Methods.* 2000;42(3):209-214.
100. Shirai K, Jackson RL. Lipoprotein Lipase-catalyzed Hydrolysis. 1982;257(3):1253-1258.
101. Silva R, Carmona-Ribeiro A, Petri D. Catalytic Behavior of Lipase Immobilized onto Congo Red and PEG-Decorated Particles. *Molecules.* 2014;19(6):8610-8628.
102. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Units of Enzyme Activity. *FEBS J.* 1979;97(2):319-320.
103. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
104. Banner DW, Kokkinidis M, Tsernoglou D. Structure of the ColE1 Rop Protein at 1.7 Å Resolution. *J Mol Biol.* 1987;196:657-675.
105. Jacob F, Monod J. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J Mol Biol.* 1961;3:318-356.
106. Sousa R, Mukherjee S. T7 RNA Polymerase. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* Vol 73. Academic Press; 2003:1-41.

107. Pierce BA. Control de la expresión génica en procariontes. In: *Genética: Un Enfoque Conceptual*. 3rd ed. Madrid; 2009:425-452.
108. Long Z-D, Xu J-H, Zhao L-L, Pan J, Yang S, Hua L. Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *J Mol Catal B Enzym*. 2007;47:105-110.
109. Paliy O, Gunasekera TS. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;73:1169-1172.
110. Balbás P, Lorence A. Production of Recombinant Proteins. In: *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*. Vol 267. 2nd ed. ; 2004:31-32.
111. Saraswat V, Kim DY, Lee J, Park Y-H. Effect of specific production rate of recombinant protein on multimerization of plasmid vector and gene expression level. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;179:367-373.
112. Nantel G, Proulx P. Lipase Activity in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1973;316:156-161.
113. Antonczak AK, Simova Z, Tippmann EM. A critical examination of *Escherichia coli* esterase activity. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28795-28800.
114. Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 1998;209:95-103.
115. Florenzano FH, Politi MJ. Effect of urea on biomimetic aggregates. *Brazilian J Med Biol Res*. 1997;30:179-185.
116. Zhang Y, Cremer PS. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Curr Opin Chem Biol*. 2006;10(6):658-663.
117. Stark GR, Stein WH, Moore S. Reactions of the Cyanate Present in Aqueous with Amino Acids and Proteins. *J Biol Chem*. 1960;235(11):3177-3181.
118. Mun K-C, Golper TA. Impaired Biological Activity of Erythropoietin by Cyanate Carbamylation. *Blood Purif*. 2000;18:13-17.
119. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, *et al*. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*. 2007;13(10):1176-1184.
120. Zangi R, Berne BJ. Aggregation and Dispersion of Small Hydrophobic Particles in Aqueous Electrolyte Solutions. *J Phys Chem B*. 2006;110:22736-22741.

121. Zhao L, Xu J-H, Zhao J, Pan J, Wang Z-L. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent- tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochem.* 2008;43:626-633.
122. Li S, Pang H, Lin K, Xu J, Zhao J, Fan L. Refolding , purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Serratia marcescens* ECU1010. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;71:171-176.
123. Luque R, Lin CSK, Wilson K, Clark J, eds. Biochemical catalytic production of biodiesel. In: *Handbook of Biofuels Production. Processes and Technologies.* 2nd ed. ; 2016:176-177.
124. Akoh CC, Chang S-W, Lee G-C, Shaw J-F. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *J Agric Food Chem.* 2007;55:8995-9005.
125. Rincón SM, Martínez DM. Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *PALMAS.* 2009;30(2):11-24.
126. Prošková A., Kopicová Z, Kučera J, Škarková L. Lipase-catalyzed transesterification of rendering plant fat - Short communication. *Res Agric Eng.* 2010;56(3):122-125.

BIBLIOGRAFÍA

- AKATSUKA, H., *et al.*, 'The lipA Gene of *Serratia marcescens* Which Encodes an Extracellular Lipase Having No N-Terminal Signal Peptide', *Journal of Bacteriology*, 176 (1994), 1949–56.
- AZOCAR, Laura Haydée, 'Proceso Enzimático Para La Producción de Metil Ésteres de Ácidos Grasos Utilizando Aceites Residuales de Fritura En Mezcla Con Aceite de Raps Como Materia Prima' (Universidad de La Frontera, 2010).
- FJERBAEK, Lene; CHRISTENSEN, Knud V. y NORDDAHL, Birgir, 'A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification', *Biotechnology and Bioengineering*, 102 (2009), 1298–1315.
- HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali y HAMEED, Abdul, 'Methods for Detection and Characterization of Lipases: A Comprehensive Review', *Biotechnology Advances*, 27 (2009), 782–98.
- KNOTHE, Gerhard y JAMES, Kenar A., 'Determination of the Fatty Acid Profile by ¹H-NMR Spectroscopy', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106 (2004), 88–96.
- MATSUMAE, Hiroaki y SHIBATANI, Takeji, 'Purification and Characterization of the Lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 Responsible for Asymmetric Hydrolysis of 3-Phenylglycidic Acid Esters', *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77 (1994), 152–58.
- MEIER, Reto, *et al.*, 'A Calcium-Gated Lid and a Large SS-Roll Sandwich Are Revealed by the Crystal Structure of Extracellular Lipase from *Serratia Marcescens*', *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007), 31477–83.
- MENEZES, Maria dos Prazeres, *et al.*, 'Evaluation of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Determining the Yield of Fatty Acid Ethyl Esters Obtained by Transesterification', *Energy & Fuels*, 29 (2015), 7343–49.
- MOHAMMADI, Mohsen, *et al.*, 'Bacterial Expression and Characterization of an Active Recombinant Lipase A from *Serratia marcescens* with Truncated C-Terminal Region', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120 (2015), 84–92.
- NIEVA-ECHEVARRÍA, Bárbara, *et al.*, 'A Method Based on ¹H NMR Spectral Data Useful to Evaluate the Hydrolysis Level in Complex Lipid Mixtures', *Food Research International*, 66 (2014), 379–87.
- PATIL, Kishore J.; CHOPDA, Manojkumar Z. y MAHAJAN, Raghunath T., 'Lipase Biodiversity', *Indian Journal of Science and Technology*, 4 (2011), 971–82.

RANGANATHAN, Srivathsan V.; NARASIMHAN, Srinivasan L. y MUTHUKUMAR, Karuppan, 'An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel.', *Bioresource Technology*, 99 (2008), 3975–81.

RINCÓN, Sandra M. y MARTÍNEZ, Daniel M., 'Análisis de Las Propiedades Del Aceite de Palma En El Desarrollo de Su Industria', *PALMAS*, 30 (2009), 11–24

SAMBROOK J; FRITSCH, E. y MANIATIS T., 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^{da} edición. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (1987).

SHIMADA, Yuji, *et al.*, 'Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing', *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 17 (2002), 133–42.

ANEXOS

Anexo A. Parámetros de sonicación directa

Equipo	Procesador de ultrasonido VCX-750
Diámetro del sensor	13 mm
Volumen de suspensión celular	60 mL (cultivo inicial 600 mL)
Amplitud de vibración	45 %
Tiempo de pulso on/off	5"/5"
Tiempo total	6 min

Anexo B. Parámetros del equipo RMN-¹H en la detección-cuantificación de FAEE y perfil de ácidos grasos

Espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz

Densidad de flujo magnético (T)	9.4
Patrón de referencia	TMS
Programación de pulsos	zg30
Scans	8-16
Sonda (mm)	5
Temperatura (K)	298.15
Tiempo de adquisición (s)	5.45
Tiempo entre pulsos (s)	1
Ventana espectral (ppm)	15 (6009.62 Hz)
Tamaño de la muestra (mg)	8-12
Disolvente	CDCl ₃

