

Expresión de la lipasa LipA de *Serratia marcescens* en *Escherichia coli* BL21 (DE3):

Purificación y caracterización de la actividad aciltransferasa en reacciones de transesterificación entre aceite de palma (*Elaeis guineensis*) y etanol como aceptor acilo.

Johan Sebastian Rueda Quecho

Trabajo de grado presentado como requisito Para optar el título de Biólogo

Director

Jorge Hernández Torres

Ph.D. en Ciencias

Co-directores

Oriana Danuta Serna Daza

Bióloga

Jefferson Barraza Gómez

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo incondicional, su amor y su paciencia durante todo mi proceso educativo.

A mis tías que pese al tiempo siempre estuvieron con su amor y cariño apoyándome durante todo mi proceso universitario.

Al profesor Jorge Hernández por abrir las puertas de su laboratorio y enseñarme con su paciencia las bases necesarias para el inicio de mi formación científica.

A la profesora Oriana Danuta por su acompañamiento, tiempo y guianza durante todo el proceso de formación en el laboratorio.

Al químico Jefferson Barraza por sus correcciones y guianza durante la ejecución del proyecto.

A Diana Gómez por su acompañamiento, su cariño y su apoyo incondicional durante este tiempo.

A mis amigos con los que discutí durante horas lo importante que es el mundo de la biología.

A mis compañero de laboratorio con los cual compartí el último año de este pregrado.

A este proyecto que hace parte del macroproyecto 'EVALUACIÓN DE LA TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE PALMA AFRICANA CON ETANOL (BIODIESEL), USANDO EXTRACTOS CRUDOS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3), TRANSFORMADA CON GENES MUTANTES DERIVADOS DEL DISEÑO RACIONAL DE FORMAS SOLUBLES DE DOS LIPASAS BACTERIANAS' financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander.

Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	15
1.1 General	15
1.2 Específicos	15
2. Marco Teórico.....	16
2.1 El biodiésel.....	16
2.2 La transesterificación	17
2.3 Transesterificación por biocatalizadores.....	18
2.4 Enzimas lipasas.....	19
2.5 LipA de <i>S. marcescens</i>	20
2.6 Origen del vector de expresión pET_Sm_LipA.....	21
2.9 Cuantificación mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- ¹ H)	23
3. Materiales y Métodos.....	24
3.1 Sobreexpresión heteróloga de Sm_LipA.....	24
3.2 Purificación de Sm_LipA	25
3.3 Determinación de la actividad específica de Sm_LipA frente al <i>p</i> -Nitrofenil butirato (<i>p</i> -NPB)	26
3.3.1 Determinación de la concentración de proteína.....	26

3.4 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad hidrolasa de Sm_LipA	27
3.5 Evaluación de la síntesis de FAEE utilizando Sm_LipA purificada como catalizador de la reacción de transesterificación	27
3.5.1 Caracterización del aceite palma como materia prima	27
3.5.2 Identificación y cuantificación de FAEE	29
3.5.3 Reacción de transesterificación del aceite de palma y etanol utilizando a Sm_LipA como catalizador	30
3.5.4 Análisis de datos	30
4. Resultados	30
4.1. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad hidrolasa de Sm_LipA	32
4.4 Evaluación de la síntesis de FAEE utilizando Sm_LipA purificada como catalizador de la reacción de transesterificación	33
4.4.1 Caracterización del aceite de palma	33
4.4.2 Identificación de FAEE	35
4.4.3 Reacción de transesterificación del aceite de palma y etanol utilizando a Sm_LipA como catalizador	35
4.4.4 Análisis estadístico de los datos	36
5. Discusión	38
6. Conclusiones	41
7. Recomendaciones	41
Referencias Bibliográficas	43
Apéndices	53

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Ecuación general de transesterificación. Tomado de Schuchardt et al., 1998	17
Figura 2. Modelo de la estructura cristalina de LipA de <i>S. marcescens</i> (código PDB 2qua). Se pueden observar los 8 iones de Ca^{2+} necesarios para la conformación de la estructura 3D y el lid que tapa el centro activo en un ambiente polar.....	20
Figura 3. Mapa del vector pET_Sm_LipA. Un gen LipA sintético (Epoch Life Science™), basado en la secuencia del código PDB 2qua y con el uso de codones de <i>E. coli</i> , fue clonado en el vector pET-21d (+). Se muestran las posiciones del promotor transcripcional T7, el gen de resistencia a la ampicilina (amp^r), el gen regulador lac I, el origen de replicación ori, el gen de regulación Rop y la etiqueta 6XHis-tag, para futura purificación. Reproducido con permiso del autor.	22
Figura 4. Ecuación para calcular la actividad específica de la hidrólisis del p-NPB (Quinn et al., 1982)	27
Figura 5. Expresión y purificación de Sm_LipA (SDS-PAGE). Carril 1: PageRuler™ (Thermo Scientific, USA); carril 2: extractos crudos de <i>E. coli</i> . Extractos obtenidos durante la recuperación de cuerpos de inclusión, carril 3: lisis; carril 4: lavado 1; carril 5: lavado 2 y purificación mediante columna de afinidad: Carril 6: elución 1 y carril 7: elución 2. Flecha: Sm_LipA.....	31

- Figura 6. Efecto del pH y la temperatura sobre actividad hidrolasa de Sm_LipA purificada. A) Efecto del pH. Cada ensayo fue llevado a cabo en 25 mM de buffer sodio-fosfato (pH 5 a 9) a una temperatura de 40 °C y 0,4 mM p-NPB como sustrato. B) Efecto de la temperatura. Cada ensayo fue realizado en 25 mM de buffer sodio-fosfato a pH 7,25 y 0,4 mM p-NPB como sustrato; el rango de temperatura evaluada fue de 25 a 50 °C. 33
- Figura 7. Proporción molar del aceite de palma. TAG 71,8%; FFA 12,9%; 1.2 DAG 5,8%; 1.3 DAG 9,23%..... 34
- Figura 8. Espectros RMN-¹H para la determinación de la síntesis de FAEE. Azul: aceite de palma utilizado como sustrato. Rojo: aceite de palma sometido a reacciones de transesterificación enzimática. 35
- Figura 9. Modelo lineal de conversión de FAEE y concentraciones de catalizador, para cada uno de los ensayos realizados. Línea azul: modelo lineal. Líneas verdes: intervalos de confianza al 95%. Líneas naranjas: límites de predicción para futuros ensayos..... 37

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Determinación de perfil de ácidos grasos del aceite de palma africana, según la metodología de Knothe & Kenar (2004) y siguiendo las modificaciones planteadas por Barraza et al., (2016).	28
Tabla 2. Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FFA y FAEE siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al., (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza et al. (2016).	28
Tabla 3. Purificación de Sm_LipA	32
Tabla 4. Perfil de ácidos grasos presentes en muestras de aceite de palma (<i>Elaeis guineensis</i>) ..	34
Tabla 5. Análisis cuantitativo de los MAG, DAG, TAG, FFA y FAEE posterior a la reacción de transesterificación enzimática.	36

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Parámetros de sonicación directa.....	53
Apéndice B. Parámetros para las corridas del espectro de resonancia	54
Apéndice C. Tabla de ANOVA y diferencias entre cada uno de los tratamientos ensayados.....	55

Resumen

TÍTULO: Expresión de la lipasa recombinante LipA de *Serratia marcescens* en *Escherichia coli* BL21 (DE3): Purificación y caracterización de la actividad aciltransferasa en reacciones de transesterificación entre aceite de palma (*Elaeis guineensis*) y etanol como aceptor acilo*.

AUTOR: Johan Sebastián Rueda Quecho**.

PALABRAS CLAVES: Lipasa, transesterificación, ésteres etilo de ácidos grasos, alcoholólisis, aciltransferasa, cromatografía, purificación.

La producción industrial de biodiésel se logra a través de la transesterificación entre un aceite vegetal y un alcohol de cadena corta (metanol o etanol). Esta reacción se cataliza mediante la adición de hidróxidos, tales como NaOH. Sin embargo, la catálisis básica conduce a reacciones de saponificación que implican la pérdida de materia prima y la necesidad de pasos extras en la posterior separación de biodiésel de los jabones (*i.e.*, mayores costos de producción). Por esta razón, las nuevas tecnologías exploran la síntesis del biodiésel a través de catalizadores biológicos como las lipasas, que producen ésteres de alta calidad con una alta especificidad. En este trabajo de grado, se llevó a cabo la sobreexpresión de LipA de *Serratia marcescens* (Sm_LipA) en *Escherichia coli* BL21 (DE3). La enzima recombinante se monitoreó mediante ensayos de actividad hidrolasa sobre *p*-nitrofenil butirato y posteriormente se purificó mediante cromatografía de afinidad. Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo utilizando aceite de palma y etanol como sustratos, en una proporción molar de 1:9 y 1-3 U de Sm_LipA recombinante, durante 6 h. Los resultados revelan una actividad aciltransferasa superior a las exhibidas por lipasas de referencia tales como CALB de *Candida antarctica* y lipasa G de *Penicillium camembertii*. La conversión de $33.1\% \pm 2.6$ de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) justifica explorar la producción escalada de LipA recombinante para la producción de biodiésel.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. y Co- Directores: Oriana Danuta Serna Daza, Bióloga; Jefferson Barraza Gómez, Químico

Abstract

TITLE: Expression of the recombinant lipase LipA of *Serratia marcescens* in *Escherichia coli* BL21 (DE3): Purification and characterization of acyltransferase activity in transesterification reactions between palm oil (*Elaeis guineensis*) and ethanol as acyl acceptor*.

AUTHOR: Johan Sebastián Rueda Quecho**.

KEYWORDS: Lipase, transesterification, fat acids ethyl-esters, alcoholysis, acyltransferase, chromatography, purification.

The industrial biodiesel production is achieved through transesterification between a plant oil and a short-chain alcohol (methanol or ethanol). This reaction is catalyzed by the addition of hydroxides, such as NaOH. However, basic catalysis leads to saponification reactions entailing loss of raw material and need for extra steps in the subsequent separation of biodiesel from soaps (*i.e.*, higher production costs). For this reason, new technologies explore the synthesis of biodiesel by means of biological catalysts such as lipases, which produce high quality esters at high specificity. In this work, the overexpression of LipA from *Serratia marcescens* (Sm_LipA) was carried out in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant enzyme was monitored by hydrolase assays against *p*-nitrophenyl butyrate and subsequently purified through affinity chromatography. The transesterification reactions were carried out using palm oil and ethanol as substrates, in a ratio of 1:9 and 1-3 U of recombinant Sm_LipA, for 6 h. The results reveal an acyltransferase activity above those exhibited by reference lipases such as CALB from *Candida antarctica* and lipase G from *Penicillium camembertii*. The conversion of $33.1\% \pm 2.6$ of ethyl esters of fatty acids (FAEE) constitute evidence in favour of the escalated production of recombinant LipA for biodiesel production.

* Research Work

** Science faculty, Department of Biology. Director: Jorge Hernández Torres, Ph.D. and Co-Directors: Oriana Danuta Serna Daza, Biologist; Jefferson Barraza Gómez, Chemist

Introducción

El biodiésel es un biocarburante líquido compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga (Van Gerpen 2005). A escala industrial, el biodiésel se obtiene mediante catálisis química ácida o básica. No obstante, estos métodos producen desechos contaminantes, favorecen reacciones paralelas de saponificación e implican elevados costos en maquinaria de reacción y purificación (Balat 2007; Benjumea *et al.*, 2004; Sharma 2015). Para superar estas desventajas, se ha propuesto el uso de biocatalizadores como las lipasas, igualmente eficientes pero con bajo impacto sobre el ambiente (Aracil *et al.*, 2006).

Las lipasas o carboxilesterasas (EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas ubicuas que participan en el metabolismo y transporte de los lípidos en organismos vivos (Jaeger, Karl Erich *et al.*, 1994). Son enzimas de alto interés comercial, dado que catalizan una amplia gama de reacciones, tienen una elevada especificidad, alta tolerancia a solventes orgánicos y pueden reaccionar en interface acuosa y no acuosa (González-Bacerio *et al.*, 2010).

Actualmente, las lipasas son empleadas en la industria alimentaria, dado que presentan una alta afinidad por los triglicéridos (TAG), diglicéridos (DAG) y monoglicéridos (MAG) (Yu *et al.*, 2007). No obstante, su capacidad de catalizar reacciones de esterificación y transesterificación las han llevado a ser un medio atractivo en la síntesis de biocombustibles (Hasan *et al.*, 2006). Los trabajos realizados con lipasas fúngicas como Cal-B de *Candida antártica* arrojaron un alto rendimiento en la catálisis del biodiesel a partir de aceites vegetales (Ognjanovic *et al.*, 2009). Por este motivo, esta lipasa es una de las principales alternativas para sustituir el uso de catalizadores

químicos en la producción de biocombustibles. Sin embargo, los precios para adquirir esta enzima son elevados (>USD \$1.000/kg) (FEDEPALMA).

La producción local de lipasas recombinantes es una de las alternativas más prometedoras para amortiguar los altos costos de importación. La sobreexpresión de lipasas de origen bacteriano en *Escherichia coli* presenta ventajas como tiempos de crecimiento cortos, alta producción de enzima, escasa degradación por proteasas y no requiere modificaciones post-traduccionales como las lipasas eucariotas. Además, los costos de producción son mínimos frente a la compra de lipasas comerciales (Goodman & Howard 1989).

La lipasa LipA de *Serratia marcescens* ha mostrado ser una alternativa para la fabricación de biodiésel. Su similitud estructural con las lipasas comerciales como la de *Pseudomonas fluorescens* (65% de identidad), su alta especificidad por el sustrato y los bajos costos de producción de manera recombinante, son algunas de las características que la hacen atractiva para este fin. Pero, sobre todo, estudios previos en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología, lograron corroborar la capacidad de LipA para catalizar reacciones de transesterificación, evidenciando un rendimiento de 46.5% en la producción de Etil ésteres de ácidos grasos (*Fatty Acid Ethyl Esters*, FAEE) (Barraza *et al.*, 2016). Dado el alto rendimiento enzimático obtenido con extractos crudos, se concluyó que la producción local de LipA sería económicamente viable y podría reemplazar a las lipasas importadas. No obstante, no se ha demostrado que los porcentajes de la síntesis de FAEE mediante LipA igualan o superan a los de enzimas comerciales.

En este sentido, este trabajo de grado tiene como objetivo la purificación de la lipasa LipA de *S. marcescens*, sobreexpresada en *E. coli*. Esto permitirá determinar la actividad específica de LipA y su capacidad para catalizar reacciones de transesterificación. Los valores de porcentaje

molar del FAEE producido se contrastarán con los de otras enzimas comerciales empleadas en la misma reacción.

1. Objetivos

1.1 General

Caracterizar la actividad aciltransferasa de la lipasa LipA de *Serratia marcescens* recombinante purificada, en reacciones de transesterificación entre aceite de palma crudo y etanol como aceptor acilo.

1.2 Específicos

1. Purificar la lipasa LipA recombinante de *S. marcescens* mediante columnas de afinidad.
2. Determinar la actividad específica de LipA de *S. marcescens* frente al *p*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB).
3. Estimar las condiciones más favorables de temperatura y pH para Sm_LipA respecto a la hidrólisis del *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB).
4. Evaluar la producción de FAEE utilizando Sm_LipA purificada como catalizador en reacciones de transesterificación de aceite de palma y etanol, mediante el monitoreo de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) por RMN-¹H.

2. Marco Teórico

2.1 El biodiésel

El biodiésel es un biocombustible líquido compuesto de ésteres monoalquílicos FAEE (*Fatty Acid Ethyl Esters*) o FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*) de ácidos grasos de cadena larga (Van Gerpen 2005). Debido a sus características carburantes, biodegradables y su baja emisión de CO₂, el biodiésel es considerado la principal alternativa energética renovable para sustituir parcialmente el uso de combustibles fósiles. Por estos motivos, su fabricación y producción han venido creciendo exponencialmente durante los últimos años (Hill *et al.*, 2006).

En Colombia, según datos de la Federación Nacional de Biocombustibles, la producción de biodiésel ha incrementado considerablemente. Se ha pasado a producir de 2.000 t en 2008 a 40.000 t en 2017, lo que significa un aumento extraordinario teniendo en cuenta el tiempo evaluado (Mingorance *et al.*, 2004; Pertuz *et al.*, 2014).

El biodiésel se fabrica a partir de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes de cadena corta. La síntesis puede realizarse mediante pirólisis, microemulsificación o transesterificación, siendo esta última, la forma más viable económicamente (Meher *et al.*, 2006; Sharma 2015; Qi *et al.*, 2010).

2.2 La transesterificación

La transesterificación (también conocida como alcoholólisis) es el proceso de transformación de un éster en otro, en presencia de un catalizador químico (compuestos ácidos o básicos) o enzimático (lipasas) (Figura. 1). Los productos son ésteres de interés comercial como fragancias, perfumes, aromatizantes y biocombustibles, entre otros (Ma *et al.*, 1999).



Figura 1. Ecuación general de transesterificación. Tomado de Schuchardt *et al.*, 1998

La transesterificación puede ser catalizada por compuestos ácidos o alcalinos; frecuentemente, en procesos industriales se emplea NaOH o KOH. Sin embargo, estos catalizadores químicos también propician reacciones de saponificación de ácidos grasos libres, en las que se pierden grandes cantidades de materia prima en subproductos como jabón (Schuchardt *et al.*, 1998). Por otra parte, compuestos como ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido fosfórico (H₃PO₄) o ácido clorhídrico (HCl) tienen un alto rendimiento de producción (95%), sin inducir saponificación como los catalizadores básicos, sin embargo son altamente contaminantes y corrosivos para los equipos (Fukuda *et al.*, 2001). Pese a los buenos resultados que exhibe la catálisis química en reacciones de transesterificación, el empleo de estos compuestos, ácidos o básicos, presenta las siguientes dificultades: 1) Requieren de purificación de los ésteres; 2) El costo y mantenimiento de los equipos es alto y 3) Producen altos volúmenes de desechos nocivos para el ambiente (Benjumea *et al.*, 2004; Sharma 2015).

2.3 Transesterificación por biocatalizadores

Los catalizadores químicos han venido cediendo terreno a los biológicos en la fabricación de productos comerciales (Jaeger *et al.*, 1994), en particular a las lipasas, ya que su función biológica es justamente de hidrolizar triglicéridos a ácidos grasos libres (Kumar *et al.*, 2016). Además, las lipasas son activas en las interfaces acuosa y no acuosa, y presentan alta tolerancia a solventes orgánicos, pH y temperatura (Kumar *et al.*, 2012).

Investigaciones con diferentes lipasas (fúngicas y bacterianas) demostraron que estas enzimas también pueden catalizar reacciones de transesterificación (Bajaj *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012), abriendo una nueva frontera en la producción renovable de biocombustibles. Nuevos estudios evidenciaron que la producción de ésteres con lipasas permite reacciones más estables, energéticamente más eficientes y no generan sub-productos perjudiciales para el ambiente como ocurre con las reacciones de transesterificación catalizadas con reactivos químicos (Schuchardt *et al.*, 1998).

Empleando lipasas extraídas de *P. fluorescens*, *C. antarctica* y *Burkholderia* sp. se ha explorado intensivamente la síntesis de biocombustibles a partir de aceites vegetales y alcoholes de cadena corta. Los resultados muestran un alto rendimiento en la producción, con un bajo consumo de energía (Chen *et al.*, 2003; Iso *et al.*, 2001; Liu, Huang *et al.*, 2012). Paralelamente, las lipasas de *C. antarctica* y *Pseudomonas cepacia* mostraron ser importantes para la síntesis de otros ésteres comerciales como esencias de alimentos, perfumes, fragancias y cosméticos (Xin *et al.*, 2011; Vidya *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2012).

2.4 Enzimas lipasas

Las lipasas o carboxilasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las serina-hidrolasas, cuya función en organismos vivos es la hidrólisis de triacilglicéridos (TAG), diacilglicéridos (DAG) y monoacilglicéridos (MAG) (Mead *et al.*, 2002). Dado que las lipasas son proteínas importantes en el metabolismo y transporte de las grasas, se encuentran en todos los grupos taxonómicos.

Pese a su ubicuidad, las lipasas presentan marcadas diferencias entre ellas. Los análisis de la estructura cristalina de lipasas de diferentes especies evidencian una baja identidad entre las secuencias proteicas. No obstante, el plegamiento α/β hidrolasa se encuentra rigurosamente conservado en la mayoría de las enzimas (Cycler & Schrag 1997). Estructuralmente, estas proteínas ostentan un centro catalítico hidrofóbico, el cual favorece la interacción de los ácidos grasos con la enzima. Típicamente, el sitio activo está compuesto por una triada catalítica de tres residuos Ser-Asp/Glu-His. Un dominio, en forma de tapa (“*lid*”), cubre el sitio activo hidrofóbico en caso de ausencia de sustrato. El *lid* es un componente exclusivo de estas enzimas (Jaeger, Karl Erich *et al.*, 1994; Mead *et al.*, 2002).

Las lipasas han sido incorporadas en procesos industriales, aprovechando sus múltiples propiedades: 1) capacidad para reaccionar bajo condiciones acuosas o no, 2) catalizar reacciones a bajas temperaturas, 3) diversidad de sustrato, alta selectividad por el sustrato, 4) limpieza de sus reacciones, y 5) potencial para catalizar reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación (Gopinath *et al.*, 2013; Mahadik *et al.*, 2002; Salihu *et al.*, 2012).

Actualmente, las lipasas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* y *Pseudomonas* sp., entre otras, son utilizadas con éxito en la fabricación de alimentos, detergentes, tratamiento de cueros, síntesis

de ésteres y elaboración de fragancias, cosméticos y biocombustibles (Gandhi 1997; Hasan *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2014; Arumugam & Ponnusami 2014).

2.5 LipA de *S. marcescens*

LipA es una lipasa extracelular producida por la bacteria Gram negativa *S. marcescens*. Esta proteína está conformada por una secuencia de 613 aminoácidos (64,9 kDa), en la que se destacan:

- 1) La cadena de residuos hidrofóbicos (VVISGHSLLGG) implicada en la conformación del sitio activo (Akatsuka *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995),
- 2) La dependencia de iones Ca^{2+} para el plegamiento de su estructura terciaria (Figura. 2) (Meier *et al.*, 2007) y
- 3) La triada catalítica canónica (Ser^{207} , Asp^{256} , His^{314}) que forma el sitio activo. Este último es similar a las encontradas en lipasas fúngicas como *Tidestromia lanuginosa*, lo que sugiere que LipA es de las más relacionadas estructuralmente con las lipasas eucariotas (Meier *et al.*, 2007).

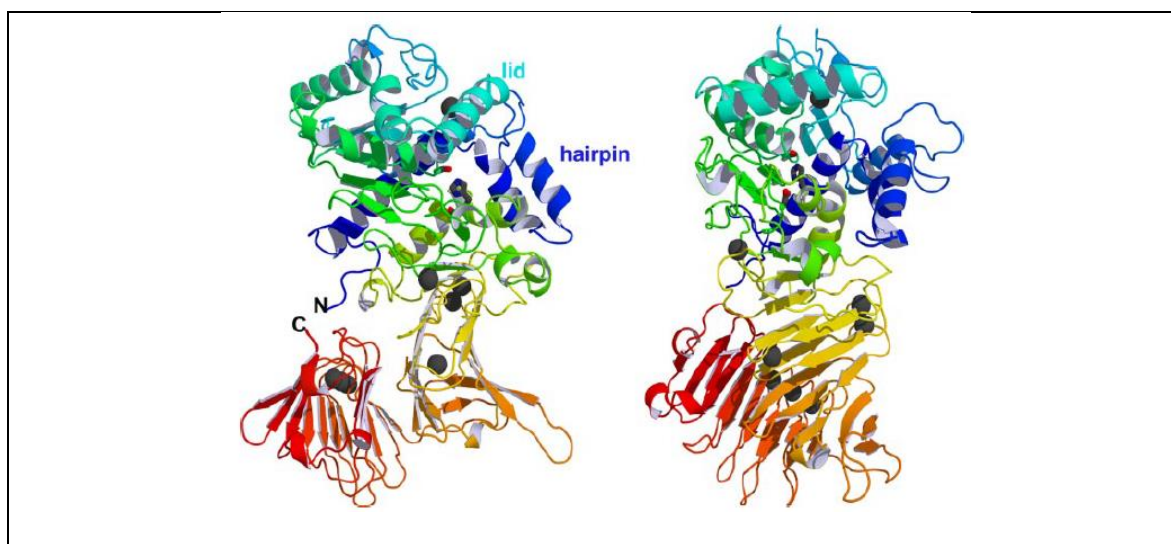


Figura 2. Modelo de la estructura cristalina de LipA de *S. marcescens* (código PDB 2qua). Se pueden observar los 8 iones de Ca^{2+} necesarios para la conformación de la estructura 3D y el lid que tapa el centro activo en un ambiente polar

La caracterización funcional *in vitro* revela que, al igual que las lipasas de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. y *Proteus* sp., LipA de *S. marcescens* exhibe un amplio espectro de sustratos, alta especificidad por el sustrato, termoestabilidad (30 a 50 °C, óptima a 45 °C), tolerancia a un amplio rango de pH (5 a 10, óptimo entre 7 y 8) y elevada tolerancia a solventes orgánicos y detergentes. (Mohammadi *et al.*, 2015; Zaki & Saeed 2012; Abdou 2003; Gupta *et al.*, 2013). Adicionalmente, LipA es sensible a solventes con iones metálicos (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}), que causan una pérdida total de su actividad (Zaki *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008).

Investigaciones en diversas ramas del conocimiento proclaman a LipA como una enzima con alto potencial biotecnológico. Su implementación en la industria farmacológica ha permitido la síntesis de medicamentos antiinflamatorios como (S)-Flurbiprofeno y Ketoprofeno (Z. De Long *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2006). Además, es utilizada como intermediario en la síntesis de medicamentos para el tratamiento de trastornos cardíacos como el Diltiazem (Z. D. Long *et al.*, 2007). Finalmente, algunos autores proponen el uso de esta enzima en la fabricación de alimentos y la obtención de diferentes aceites vegetales con alto contenido de ácidos grasos libres (Zaki *et al.*, 2012). En resumen, LipA ostenta un amplio potencial en la industria biotecnológica.

2.6 Origen del vector de expresión pET_Sm_LipA

Desde hace un par de años, el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología ha venido trabajando en cooperación con el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Escuela de Química, en la producción local de lipasas bacterianas. En el trabajo de grado precedente al actual (Barraza *et al.* 2016), se logró sobreexpresar exitosamente en *E. coli* BL21

(DE3) el gen nativo *LipA* de *S. marcescens*, utilizando el vector de clonación pET21d (+). En la Figura. 3 se muestra el mapa del vector pET_Sm_LipA producto de dicho trabajo.

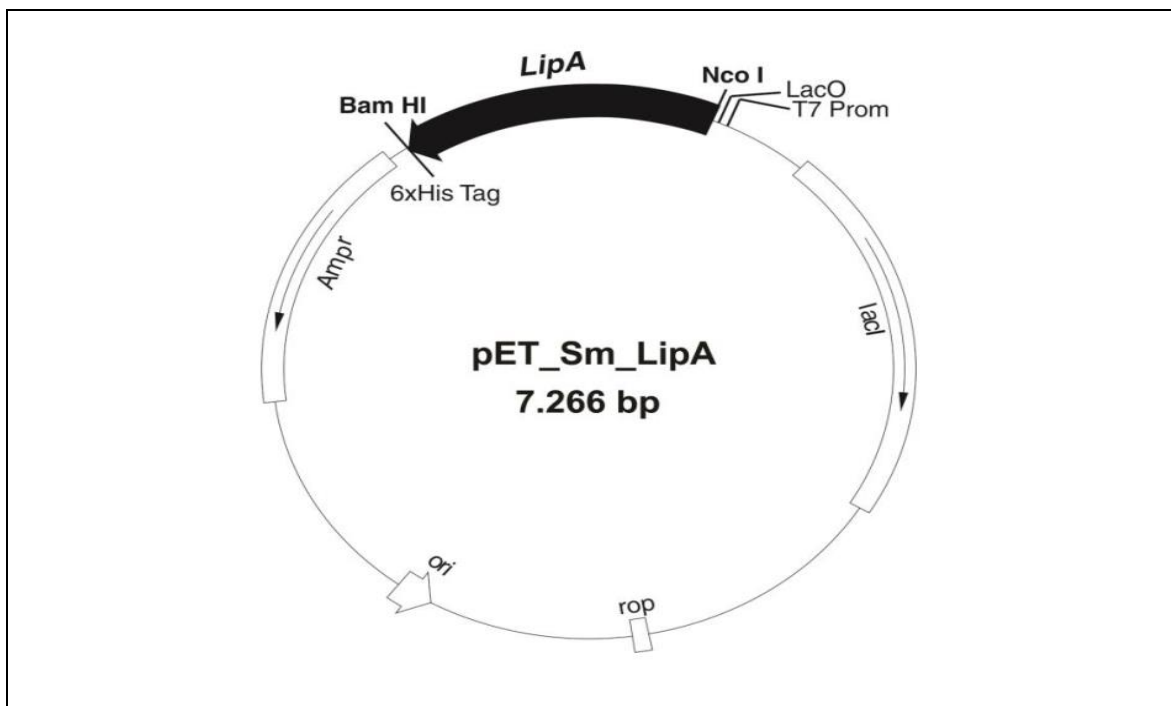


Figura 3. Mapa del vector pET_Sm_LipA. Un gen *LipA* sintético (Epoch Life Science™), basado en la secuencia del código PDB 2qua y con el uso de codones de *E. coli*, fue clonado en el vector pET-21d (+). Se muestran las posiciones del promotor transcripcional T7, el gen de resistencia a la ampicilina (*amp^r*), el gen regulador *lac I*, el origen de replicación *ori*, el gen de regulación *Rop* y la etiqueta 6XHis-tag, para futura purificación. Reproducido con permiso del autor.

En el trabajo de Barraza *et al.*, (2016), se logró demostrar por primera vez que la enzima LipA de *S. marcescens* era capaz de catalizar la reacción de transesterificación del aceite de palma y etanol como sustratos, con extractos crudos de *E. coli* recombinante. Específicamente, se determinaron las mejores condiciones para la transesterificación sin solvente: relación molar etanol:aceite = 9:1, carga enzimática 10 U/g de aceite y temperatura ambiente. No obstante, la enzima permanecía en extractos crudos de *E. coli*, por lo que no fue posible calcular la actividad

específica, dato esencial para poder comparar la eficiencia de las enzimas. Gracias a que se le adicionó una etiqueta 6XHis-tag en fase, se pudo dar continuidad a ese trabajo, mediante la purificación con columna de afinidad y cálculo de actividad específica con la enzima pura, objeto del presente estudio.

2.9 Cuantificación mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H)

La espectroscopia RMN-¹H es una técnica empleada principalmente para determinar estructuras y concentraciones moleculares de compuestos orgánicos (Vigli *et al.*, 2003). Esta técnica se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos (protones) y su espín (Elguero *et al.*, 2008).

El seguimiento y cuantificación de reacciones de transesterificación con aceites vegetales o animales ha sido ampliamente estudiado por medio de RMN-¹H. Permitiendo de esta manera tener un perfil de los ácidos grasos, antes y después la transesterificación. Los ensayos de RMN-¹H ayuda a determinar la pureza de los ésteres derivados en tiempos cortos (3 min) (Morgenstern *et al.*, 2006; Knothe & Kenar., 2004). Sin embargo, esta prueba presenta algunas dificultades como, el solapamiento de señales y la imposibilidad de diferenciar completamente la composición de ácidos grasos saturados, entre otras (Gelbard *et al.*, 1995).

3. Materiales y Métodos

Como dicho anteriormente, en estudios previos realizados por Barraza *et al.*, (2016), se insertó el gen *LipA* de *S. marcescens* (Sm_LipA) en el vector pET-21d (+), haciendo uso de los sitios de restricción Nco I y BamH I. Esta construcción dio lugar al vector de expresión recombinante pET_Sm_LipA. Células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con pET_Sm_LipA. Como control en los ensayos se utilizaron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con plásmidos pET-21d (+). Las cepas fueron criopreservadas según Sambrook & Russell (2001) y depositadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología (LBM-UIS).

3.1 Sobreexpresión heteróloga de Sm_LipA

La sobreexpresión del gen Sm_LipA fue inducida mediante la adición de 0.4 mM IPTG, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 – 0.8 a 600 nm. Para alcanzar las condiciones de inducción, se partió de 250 mL de medio LB suplementado con 100 µg/ml ampicilina e incubado a 37 °C y 180 rpm. La sobreexpresión se verificó en ensayos de actividad, cuantificación de proteína y electroforesis en un geles de poliacrilamida dodecilsulfato sodico (SDS-PAGE), siguiendo los protocolos de Sambrook & Russell (2001). La evaluación de la expresión se realizó en ensayos por triplicado.

3.2 Purificación de Sm_LipA

A partir de 250 mL de cultivo y luego de 3 h de inducción, las células fueron concentradas por centrifugación a 10.000 g y 4 °C durante 15 min. Las células concentradas fueron resuspendidas en 10 mL de 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) y lisadas por sonicación directa (ANEXO #1), para recuperar la proteína concentrada en cuerpos de inclusión en la fracción insoluble citoplasmática (FIC) de la célula hospedera.

Los cuerpos de inclusión fueron recuperados mediante centrifugación a 14.000 g durante 30 min y purificados mediante lavados sucesivos con 5 vol de una solución buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 100 mM NaCl y 2% Tritón X-100, y solución buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA y 100 mM NaCl, respectivamente. Posteriormente, fueron recuperados por centrifugación a 14.000 g durante 30 min y solubilizados mediante una incubación durante 3 h a temperatura ambiente en 10 mL de solución Tris-HCl pH 8,0 y 8 M Urea.

Las proteínas solubilizadas fueron purificadas mediante columna de afinidad QIAexpress® Ni-NTA(QIAGEN®). El gel de afinidad fue lavado dos veces con 4 ml de buffer de lavado desnaturizante (*Wash buffer denaturing*, QIAexpress-Ni-NTA), para eliminar proteínas con uniones débiles. Luego, las proteínas recombinantes retenidas por la columna de afinidad fueron eluidas con dos lavados de 1 ml de buffer de elución desnaturizante (*Elution buffer denaturing*, QIAexpress-Ni-NTA). Finalmente, las proteínas fueron dializadas mediante incubación en solución buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 10 mM de CaCl₂ a 4 °C durante 24 h, en aras de eliminar posibles inhibidores de la actividad enzimática y permitir su reconstitución.

De cada paso de la purificación se tomaron muestras para verificar la calidad del proceso y visualizar las proteínas obtenidas. Los geles SDS-PAGE de 10% acrilamida fueron coloreados siguiendo el protocolo de tinción corta de nitrato de plata propuesto Chevallet *et al.* (2006).

3.3 Determinación de la actividad específica de Sm_LipA frente al *p*-Nitrofenil butirato (*p*-NPB)

La hidrólisis del *p*-NPB fue monitoreada por la variación de la absorbancia del *p*-nitrofenol butirato a 400 nm. La actividad hidrolasa se evaluó en una mezcla de reacción que contenía 20 μ L de LipA purificada o extractos crudos, 1,9 mL de buffer fosfato de sodio (25 mM buffer fosfato de sodio, pH 7.25) y 0.4 mM de *p*-NPB, a temperatura ambiente (~ 25 °C) durante 3 min. La unidad internacional de actividad (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de *p*-NPB por min bajo las condiciones establecidas. La actividad específica para la hidrólisis del *p*-NPB fue calculada con la fórmula presentada en la Figura. 4.

3.3.1 Determinación de la concentración de proteína La concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo de Bradford (Bradford 1976), utilizando como curva patrón Albúmina de Suero Bovino (BSA) disuelta en 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, utilizando un rango de concentraciones de 0.0 a 0.4 mg/ml. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm.

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

Donde:

m= Pendiente (min^{-1})

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

V_t = Volumen total de la reacción (mL)

V_m = Volumen de la solución enzimática (mL)

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 *p*-NPB a 25°C en 1 min

Figura 4. Ecuación para calcular la actividad específica de la hidrólisis del *p*-NPB (Quinn *et al.*, 1982)

3.4 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad hidrolasa de Sm_LipA

La variación de la actividad hidrolasa específica de LipA purificada fue medida en gradientes de pH y temperatura, mediante ensayos con *p*-NPB. Las mediciones de actividad se realizaron cada 5°C en el rango 25 a 50°C . Para el caso del pH, las mediciones se realizaron en Buffer sodio-fosfato para cada unidad en el rango de 5 a 9. Todos los ensayos fueron ejecutados por triplicado.

3.5 Evaluación de la síntesis de FAEE utilizando Sm_LipA purificada como catalizador de la reacción de transesterificación

3.5.1 Caracterización del aceite palma como materia prima El perfil de ácidos grasos del aceite de palma se determinó por RMN- ^1H , siguiendo la metodología de Knothe & Kenar (2004) y las modificaciones propuestas por Barraza *et al.*, (2016). Cada medición fue realizada por triplicado (Tabla 1).

Tabla 1.

Determinación de perfil de ácidos grasos del aceite de palma africana, según la metodología de Knothe & Kenar (2004) y siguiendo las modificaciones planteadas por Barraza et al., (2016).

Ácidos grasos	Corrimiento químico (δ , ppm)	Ecuación
α CH ₂ totales	2.21	$N_{\alpha\text{CH}_2 \text{ totales}} = A_{2.25-2.40}/2$
Linolénico	0.98	$N_{\text{C18:3}} = A_{0.96-1.0}/3$
Linoleico	2.77	$N_{\text{C18:2}} = 0.5*(A_{2.74-2.80} - 4N_{\text{C18:3}})$
Oleico	2.02	$N_{\text{C18:1}} = (A_{1.94-2.10}/4) - N_{\text{C18:2}} - N_{\text{C18:3}}$
Insaturados		$N_{\text{insat}} = N_{\text{C18:1}} + N_{\text{C18:2}} + N_{\text{C18:3}}$
Saturados		$N_{\text{sat}} = N_{\text{totales}} - N_{\text{insat}}$
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 cadena de cada ácido graso. A: Área, N: moles, N_x: moles de un compuesto X.

Por otro lado, la cuantificación de TAG, DAG, MAG y FFA para conocer el estado inicial del sustrato se realizó siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al., (2014 y 2015) y tomando en cuenta las modificaciones propuestas por Barraza et al., (2016) (Tabla 2).

Tabla 2.

Cuantificación de MAG, DAG, TAG, FFA y FAEE siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría et al., (2014 y 2015) y modificaciones de Barraza et al. (2016).

Señal	Corrimiento químico (δ , ppm)	Multiplicidad	Tipo de protón	Numero de ¹ H que causan la señal	Compuesto	Fórmula
2-MAG	4.93	M	HOCH ₂ - CH(OR)- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 2-MAG	$N_{2\text{-MAG}} = P_C * A_{4.90-4.96}$
1-MAG	3.94	M	ROCH ₂ - CHOH- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 1-MAG	$N_{1\text{-MAG}} = P_C * A_{3.90-3.98}$

Señal	Corrimiento químico (δ , ppm)	Multiplicidad	Tipo de protón	Numero de ^1H que causan la señal	Compuesto	Fórmula
1,2 DAG	5.08	M	ROCH ₂ - CH(OR')- CH ₂ OH	1	Grupo glicerilo en 1,2- DAG	$N_{1,2\text{-DAG}} = \text{Pc} * A_{5.05-5.12}$
TAG + 1,2 DAG	4.22 y 4.28	M	ROCH ₂ - CH(OR')- CH ₂ OR" + ROCH ₂ - CH(OR')- CH ₂ OH	3	Grupo glicerilo en TAG y 1,2- DAG	$N_{\text{TAG}} = (\text{Pc} * 2A_{4.26-4.36} - 2N_{1,2\text{-DAG}}) / 4$
FAEE	2.27	t/4	CH ₃ CH ₂ O- (CO)-CH ₂ -	2	α CH ₂ del etil éster	$N_{\text{FAEE } \alpha\text{CH}_2} = \text{Pc} * 4A_{2.25-2.275} / 2$
1,3 DAG	4.05-4.21	M	ROCH ₂ - CH(OH)- CH ₂ OR'	5	Grupo glicerilo en 1,3- DAG	$N_{1,3\text{-DAG}} = (\text{Pc} * A_{4.04-4.36} - 4N_{\text{TAG}} - 2N_{1\text{-MG}} - 2N_{1,2\text{-DAG}} - 2N_{\text{FAEE}}) / 5$
FFA	2.31	M	HO-(CO)- CH ₂ - + Todos los α CH ₂ de TAG, DAG, MAG y FAEE	2	α CH ₂ de FFA, TAG, DAG, MAG y FAEE	$N_{\text{FFA}} = (\text{Pc} * A_{2.25-2.40} - 6N_{\text{TAG}} - 4N_{1,2\text{-DAG}} - 4N_{1,3\text{-DAG}} - 2N_{\text{FAEE}} - 2N_{1\text{-MG}} - 2N_{2\text{-MG}}) / 2$
Porcentaje molar (%)						$\%X = 100 * (N_X / N_{\text{Totales}})$
Los subíndices indican el área en ppm de cada señal o el tipo de compuesto. A= área, N= moles, N _x = moles de un compuesto X, N _{totales} = $\sum N_x$, Pc= constante de proporcionalidad.						

3.5.2 Identificación y cuantificación de FAEE La síntesis de FAEE, posterior a la transesterificación, fue evaluada con la aparición de un cuartete (*q*) a 4.12 ppm y un cuarto de triplete (*t/4*) a 2.27 ppm. La cuantificación del etil éster fue determinada de la misma manera que con el aceite de palma (sección 3.5.1-Tabla 2).

3.5.3 Reacción de transesterificación del aceite de palma y etanol utilizando a Sm_LipA como catalizador Las reacciones de transesterificación fueron incubadas en tubos de ensayo de fondo redondo durante 6 h a 40 °C. Cada reacción contenía aceite de palma y etanol en una relación molar de 1:9. La etanólisis fue catalizada con la adición de Sm_LipA purificada en 1, 2 y 3 U específicas.

El exceso de etanol fue retirado de la fase oleosa mediante incubación durante 1 h a 90 °C, previa centrifugación a 10.000 g para permitir una separación por fases. A partir del aceite recuperado se realizó análisis RMN-¹H en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Sede UIS Guatiguará. (ANEXO #2).

3.5.4 Análisis de datos Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos de las reacciones de transesterificación fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y explicadas con un modelo lineal utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI 17.2.00 (2009), Statpoint technologies INC.

4. Resultados

Con anterioridad al inicio de este trabajo y en conformidad con los autores que han sobreexpresado Sm_LipA en *E. coli*, se sabía que la enzima tendía a formar cuerpos de inclusión. Por consiguiente, al fraccionar el lisado total de *E. coli*, Sm_LipA se mantuvo en la fracción insoluble citoplasmática (FIC). Los cuerpos de inclusión fueron recuperados mediante centrifugación y purificados

mediante lavados sucesivos. La fracción insoluble se pasó por una columna de afinidad de Níquel (NI-NTA). Partiendo de 250 mL de cultivo, se obtuvieron 0,063 mg de enzima purificada, con un rendimiento de 62,5% (Tabla 3). La pureza de la enzima se evidenció en geles SDS-PAGE, en los que se visualizó una banda única y con una masa molecular estimada de 65 kDa (Figura. 5).

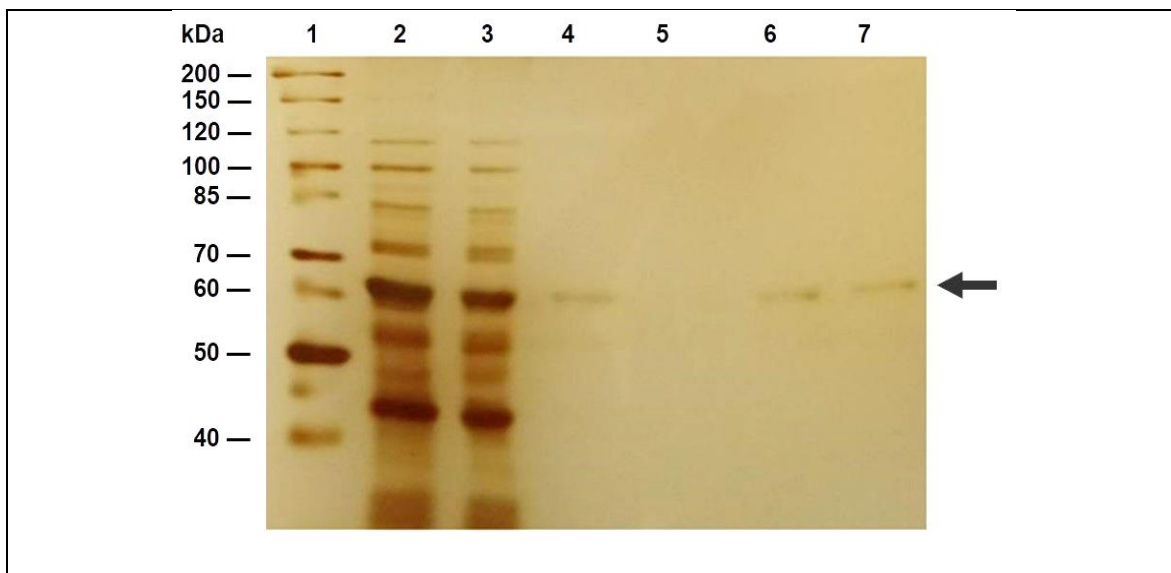


Figura 5. Expresión y purificación de Sm_LipA (SDS-PAGE). Carril 1: PageRuler™ (Thermo Scientific, USA); **carril 2:** extractos crudos de *E. coli*. Extractos obtenidos durante la recuperación de cuerpos de inclusión, **carril 3:** lisis; **carril 4:** lavado 1; **carril 5:** lavado 2 y purificación mediante columna de afinidad; **Carril 6:** elución 1 y **carril 7:** elución 2. Flecha: Sm_LipA.

La actividad específica de Sm_LipA fue de 65,1 U/mg, es decir, se duplicó en relación con los extractos crudos (Tabla 3).

Tabla 3.

Purificación de Sm_LipA

Pasos de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extractos crudos de LipA	6,562	0,229	28,6	100%
Columna de afinidad	4,10	0,063	65,1	62,5%

La actividad fue determinada utilizando *p*-NPB como sustrato en 25mM de buffer sodio fosfato a pH 7,25 y temperatura ambiente (~25°C).

4.1. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad hidrolasa de Sm_LipA

El efecto de la temperatura y el pH fueron determinados para Sm_LipA purificada utilizando *p*-NPB como sustrato. Se evaluó el efecto del pH sobre la actividad de Sm_LipA usando buffer sodio-fosfato en el rango de pH de 5 a 9. Sm_LipA presentó actividad hidrolasa en valores de pH ligeramente básicos, siendo el óptimo pH 8,0. En valores de pH ligeramente ácido (5 a 6) se evidenció actividad residual, correspondiente a menos del 20% (Figura. 6 A).

Por otra parte, la enzima mostró termoestabilidad en el rango de temperaturas de 25 a 40 °C, presentando valores de hidrólisis por encima del 90%. La actividad enzimática presentó valores óptimos a 40 °C (Figura. 6 B). Sin embargo, la enzima pierde abruptamente más del 50% de la actividad en temperaturas por encima de 50 °C (Figura. 6 B).

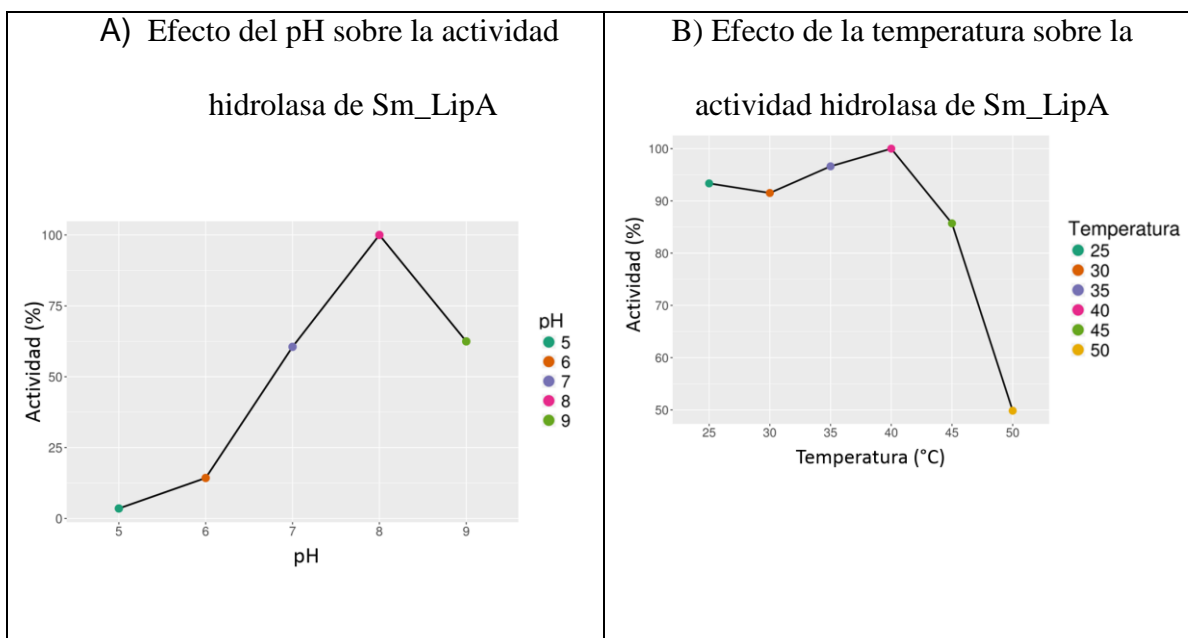


Figura 6. Efecto del pH y la temperatura sobre actividad hidrolasa de Sm_LipA purificada. A) Efecto del pH. Cada ensayo fue llevado a cabo en 25 mM de buffer sodio-fosfato (pH 5 a 9) a una temperatura de 40 °C y 0,4 mM p-NPB como sustrato. B) Efecto de la temperatura. Cada ensayo fue realizado en 25 mM de buffer sodio-fosfato a pH 7,25 y 0,4 mM p-NPB como sustrato; el rango de temperatura evaluada fue de 25 a 50 °C.

4.4 Evaluación de la síntesis de FAEE utilizando Sm_LipA purificada como catalizador de la reacción de transesterificación

4.4.1 Caracterización del aceite de palma Antes de proceder a realizar reacciones de transesterificación, se determinaron las proporciones molares de ácidos grasos saturados e insaturados del aceite de palma, mediante ensayos de RMN-¹H. Los valores de ácidos grasos insaturados (50,2%) y saturados (49,7%) fueron proporcionales en la muestra. A su vez, los perfiles de ácidos grasos insaturados se encontraron en una proporción de 0,44, 6,24 y 43,5% por oleico (C18:1), linoleicos (C18:2) y linolénico (C 18:3), respectivamente. Finalmente, el peso molecular promedio fue de 843,81±3,2 con un error promedio de 0,6 % (Tabla 4).

Tabla 4.

Perfil de ácidos grasos presentes en muestras de aceite de palma (Elaeis guineensis)

Ácido graso	Porcentaje molar \pm SD	Peso molecular (g/mol) \pm SD	Peso molecular teórico (g/mol)	Error (%)
Linolénico (18:3)	0,44 \pm 0,3	843,81 \pm 3,2	849,1929	0,6
Linoleico (18:2)	6,24 \pm 1,5			
Oleico (18:1)	43,5 \pm 0,5			
Insaturados	50,2 \pm 1,6			
Saturados (C12:C18)	49,7 \pm 1,6			

En relación con la presencia de TAG, DAG, y FFA se evidenció una proporción molar predominante de TAG (71,8 \pm 3,2%). Por el contrario, los valores FFA, 1,3 DAG y 1.2 DAG se presentaron en menor cantidad, encontrándose en proporciones molares de 12,93 \pm 2.8, 9,23 \pm 0.5 y 5,8 \pm 0.4 %, respectivamente. Los MAG no fueron identificados en muestras de aceite crudo (Figura.7).

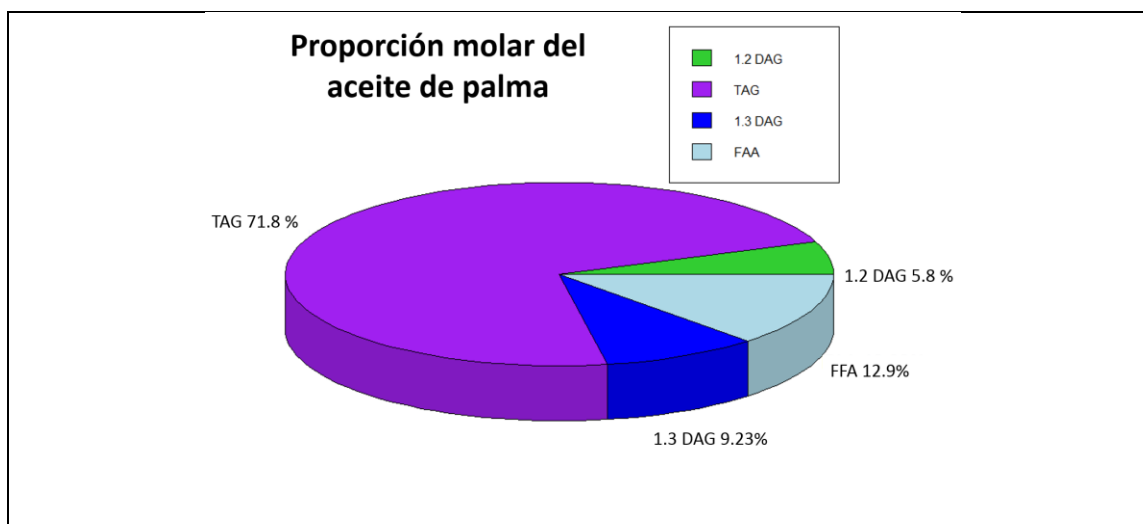


Figura 7. Proporción molar del aceite de palma. TAG 71,8%; FFA 12,9%; 1.2 DAG 5,8%; 1.3 DAG 9,23%.

4.4.2 Identificación de FAEE La síntesis de FAEE en las muestras de aceite de palma sometidas a reacciones de transesterificación se determinó con la aparición de las señales q y t/4 a 4.12, 4.13 y a 2.27 ppm respectivamente (Barraza *et al.*, 2016;Ghesti at al., 2007). Así mismo, se observó la disminución de la señal a 4.22 ppm producida por los TAG (dd, dd), la aparición de MAG a 3.90 y 4.90 ppm y el aumento de la señal a 2.31 ppm perteneciente a los FFA (Figura.8).

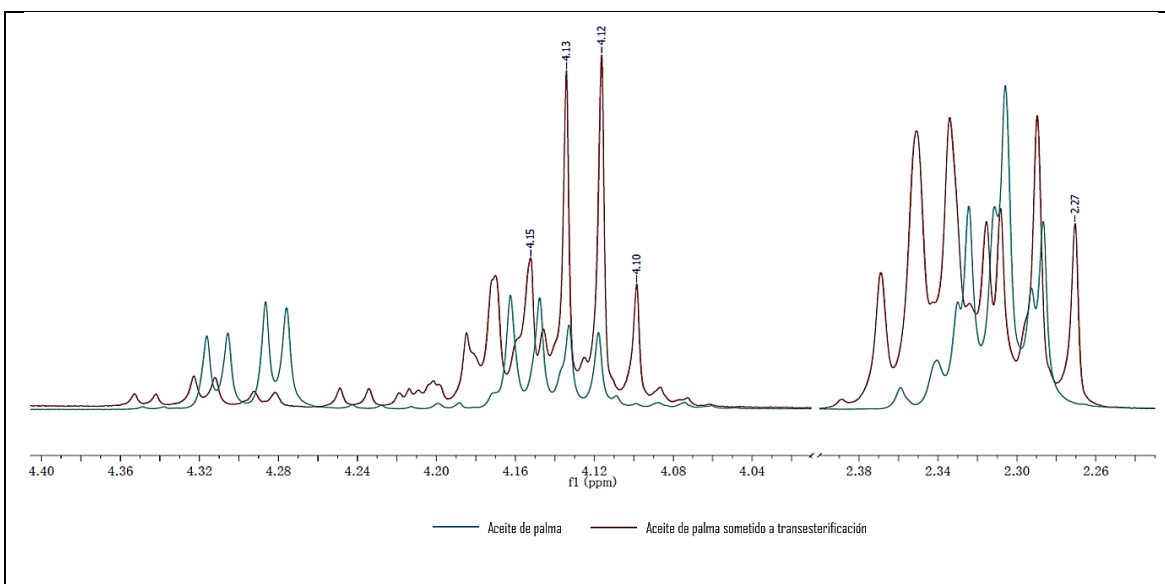


Figura 8. Espectros RMN-¹H para la determinación de la síntesis de FAEE. Azul: aceite de palma utilizado como sustrato. Rojo: aceite de palma sometido a reacciones de transesterificación enzimática.

4.4.3 Reacción de transesterificación del aceite de palma y etanol utilizando a Sm_LipA como catalizador Reacciones de transesterificación entre aceite de palma y etanol (relación molar 1:9, como determinado por Barraza *et al.*, 2016) fueron catalizadas con Sm_LipA (1, 2 y 3 U específicas) durante un tiempo de incubación de 6 h (Tabla 5).

Tabla 5.

Análisis cuantitativo de los MAG, DAG, TAG, FFA y FAEE posterior a la reacción de transesterificación enzimática.

Reacción	Unidades enzimáticas (U/mg)	Relación molar Etanol: Aceite	Porcentajes Molares (%)						
			2.MAG	1.MAG	1,2DA G	1,3DA G	TA G	FF A	FAEE E
1	1	9:1	2,2	12,1	12	10,4	5,6	33,4	24,3
2	1	9:1	2,9	14	9,7	12,8	4,7	36,9	19,0
3	1	9:1	1,9	13	10	12,9	5	38,8	18,4
4	2	9:1	1,2	14,6	5,5	15,8	1,7	37	24,2
5	2	9:1	1,8	13,5	9,3	10,5	4,6	36,3	24,0
6	2	9:1	1	14,7	6,9	11,5	3,3	36	26,5
7	3	9:1	1,2	17	6,1	9,7	2,6	30,4	33,0
8	3	9:1	2	15,5	7,1	7,7	2,1	29,7	35,7
9	3	9:1	1,4	16	7,1	11,4	3,2	30,4	30,5

Los porcentajes molares fueron calculados siguiendo la metodología de Nieva-Echevarría *et al.*, (2014) y modificaciones de Barraza *et al.*, (2016).

Los resultados arrojaron un aumento proporcional en la producción de FAEE en relación con el incremento de unidades enzimáticas en la reacción. Los valores promedio de conversión de FAEE de acuerdo con el incremento de unidades enzimáticas fueron de 20,6%±3,2, 24,9%±1,3 y 33,1%±2,6, respectivamente (Cálculos no mostrados).

Por otra parte, la proporción molar de los ácidos grasos (MAG, DAG, TAG y FFA) muestran una mayor proporción de 1-MAG (14,5±1,5), 1,3-DAG (11,4±2,3), 1,2 DAG (8,2±2,1) y FFA (30,4±3,4), y una reducida concentración de 2-MAG (1,7±0,6) y TAG (3,6±1,3) en cada una de las reacciones efectuadas (Tabla 5).

4.4.4 Análisis estadístico de los datos El incremento de los porcentajes molares (% m/m) de FAEE, a medida que se incrementan las unidades enzimáticas, se explican en un 83,6% con un modelo lineal. El coeficiente de correlación de 0,915 indica una fuerte relación entre las unidades

enzimáticas y la síntesis de FAEE, con un nivel de confianza del 95%. Lo anterior, significa que el incremento en las unidades de Sm_LipA incentiva la síntesis de FAEE (Figura.9).

De la misma manera, los análisis de varianza (ANOVA) realizados a los %m/m de FAEE después de la reacción de transesterificación revelan una diferencia significativa al 95% de confianza, entre las medias, para los tratamientos de 1 U a 3 U y de 2 U a 3 U. Sin embargo, resultados de comparación de cada tratamiento muestran que las reacciones con 2 U y 1 U no se diferencian significativamente (Anexos # 3).

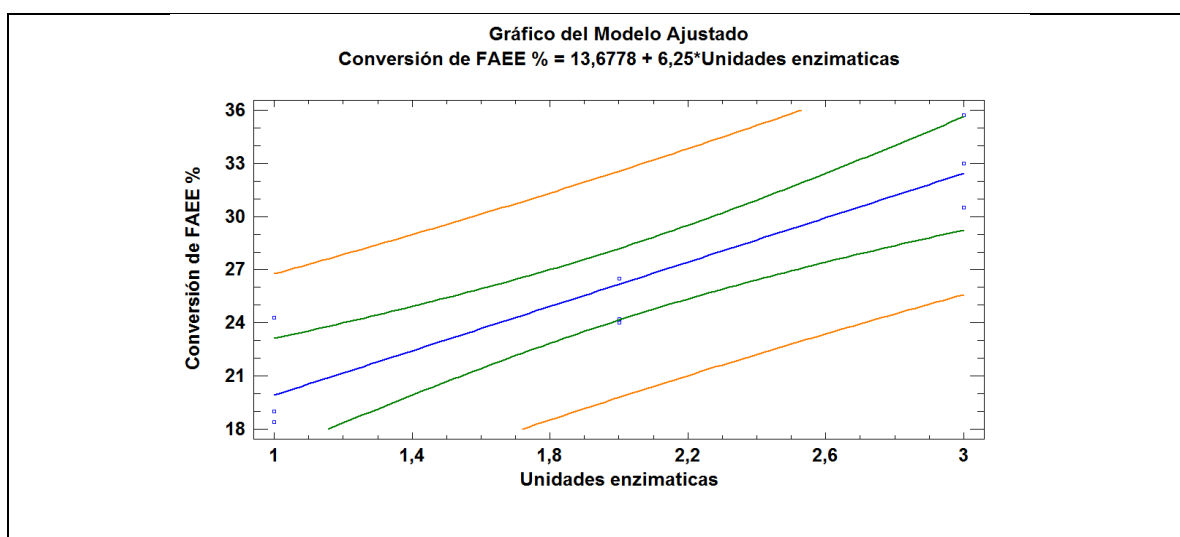


Figura 9. Modelo lineal de conversión de FAEE y concentraciones de catalizador, para cada uno de los ensayos realizados. Línea azul: modelo lineal. Líneas verdes: intervalos de confianza al 95%. Líneas naranjas: límites de predicción para futuros ensayos

5. Discusión

El presente trabajo de grado constituye un avance importante en la caracterización de las lipasas bacterianas como alternativa para la producción de biodiésel. Un trabajo previo se realizó con extractos crudos de *E. coli* recombinante y se determinó la influencia de parámetros fisicoquímicos a nivel preliminar, dado que la enzima no era pura y estaba mezclada con urea (Barraza *et al.*, 2016). No obstante, los valores de actividad específica no fueron calculados por obvias razones.

Por medio de cromatografía de afinidad de níquel (NI-NTA) se logró la purificación de una única proteína con un tamaño aproximado de 65 kDa (Figura. 5, carriles 6 y 7), valor que coincide con el esperado para Sm_LipA y lo reportado por la literatura (Li *et al.*, 1995; Mohammadi *et al.*, 2015; Akatsuka *et al.*, 1994). La purificación tuvo un rendimiento de 62,5%, lo que implica una pérdida importante de la enzima. Las causas probables pueden ser la saturación de la columna de níquel y la pérdida de proteína en cada de lavado (Figura. 5). En el trabajo de Barraza *et al.*, (2016) los valores de actividad específica no superaron las 13 U/mg, evidentemente afectada por la contaminación con otras proteínas y urea. La enzima purificada presentó una actividad específica de 65,1 U/mg, lo que representa un incremento de 500%. Entre las enzimas de referencia, se destaca la lipasa B de *Candida antarctica*, la cual ostenta una actividad específica de 9 U/mg (Sigma-Aldrich producto 62288). Esto quiere decir que LipA supera en actividad hidrolasa a la lipasa B en el orden de 7.233%, un valor realmente excepcional.

En este trabajo se confirmaron las condiciones óptimas de pH 8.0 y 40 °C para la actividad hidrolítica de Sm_LipA. Estos valores permanecían como preliminares en el trabajo de Barraza *et*

al., (2016), debido a la presencia de urea en el medio de reacción. Los ensayos de actividad a pH 5 y 6 mostraron una reducción en la actividad hidrolasa del 95 y 90% respectivamente (Figura. 6 A). Además, temperaturas superiores a 45 °C causaron pérdida de actividad por desnaturalización de la proteína (Figura. 6 B). Estos resultados son coherentes con lo reportado por Hu *et al.*, (2009), Abdou (2003) y Mohammadi *et al.*, (2015).

La proporción molar del aceite de palma reveló cifras equitativas en la composición de ácidos grasos saturados (49.7%) e insaturados (50.2%). Estos últimos, representados en su mayoría por ácidos oleico (43.5%), linoleico (6.24%) y linolénico (0.44%). Además, se determinó la composición de TAG (71.8%) y DAG (15%) y la nula presencia de MAG. Todos estos datos coinciden con los publicados en la literatura científica (Ramos *et al.*, 2009; Demirbaş 2003; Rincón *et al.*, 2009; Barraza *et al.*, 2016) y constituyen un fuerte control de calidad de los métodos analíticos aquí empleados.

De acuerdo con los análisis de los perfiles de RMN-¹H, se confirmó lo reportado por Barraza *et al.*, (2016), es decir la síntesis de etil ésteres por LipA, tras la aparición de los picos en 4.13, 4.12 y 2.27 ppm. No obstante, la cuantificación de los FAEE se realizó solo con la señal t/4 a 2.27 ppm dado que el efecto represor del grupo carbonilo en el etil éster hace de la señal t/4 una señal aislada, lo que no sucede con la señales contaminada 4.12 y 4.13 (Ghesti *et al.*, 2007; Barraza *et al.*, 2016). Los porcentajes molares del aceite sometido a reacciones de transesterificación muestran que el 71% de los TAG presentes en el aceite crudo fue mayormente hidrolizados en sus derivados DAG, MAG, FFA y glicerol. Estos datos corroboran la alta actividad de Sm_LipA en la hidrólisis de estos lípidos.

Pero sobre todo lo anterior, en esta investigación se evidenció la capacidad de Sm_LipA para catalizar reacciones de transesterificación, mostrando una composición molar promedio de 33,1%±2,6 % de FAEE. Este valor es fundamental para poder comparar la actividad de la enzima con otras de referencia y el resultado fue que LipA supera a las lipasas comerciales estudiadas

anteriormente para este mismo sustrato (aceite de palma y etanol). Moreira *et al.*, (2007) reportaron que lipasas fúngicas como lipolasa de *Thermomyces lanuginosus*, Cal-B de *Candida antártica B* y Lipasa G *Penicillium camembertii* tienen una conversión de 15, 3 y 1,25%, respectivamente. Las lipasas bacterianas como PS de *Burkholderia cepacia* y AK de *Pseudomonas fluorescens* exhiben una conversión de FAEE de 25 y 30% respectivamente (Moreira *et al.*, 2007). Comparando LipA con esas isoformas, los valores serían similares. No obstante, existe una diferencia de 18 h menos de reacción en las pruebas con Sm_LipA, lo que permite concluir que LipA de *S. marcescens* es superior en la tasa de producción de biodiésel.

Por otra parte, es importante mencionar que, lipasas anteriormente citadas, como Cal-B, han mostrado una síntesis de FAEE del 87% cuando se utilizó aceite de soja como sustrato (Rosset *et al.*, 2011). Salis *et al.*, (2008) reportaron una relación directa entre la composición del aceite y la síntesis de biodiesel. por este motivo el uso de aceites de almendras, maíz, colza y girasol exhiben una mejor conversión de biodiesel, dado que tienen altos contenidos de ácidos oleicos y un alto contenido de ácidos mono-insaturados (Ramos *et al.*, 2009).

Tomados en conjunto todos los resultados, en este trabajo de grado se demostró que Sm_LipA es una enzima muy atractiva en la implementación de biocatalizadores para la fabricación de biodiésel. Su actividad transesterasa destacada y su alta expresión de manera recombinante hacen de esta enzima un catalizador eficiente en comparación con las enzimas comerciales. Estas conclusiones justifican ampliamente explorar el escalado a nivel piloto para la producción industrial y masiva de LipA y posteriormente de biodiésel.

6. Conclusiones

- 1) Se logró sobreexpresar exitosamente la lipasa *LipA* de *Serratia marcescens* en *E. coli* y posteriormente se purificó en columna de afinidad de Níquel (NI-NTA).
- 2) Se logró determinar una actividad específica para LipA purificada de 65,1 U/mg.
- 3) Se consiguió estimar la máxima actividad hidrolítica de LipA a una temperatura de 40°C y pH 8.
- 4) Se confirmó la capacidad de LipA para catalizar reacciones de transesterificación utilizando como sustrato aceite de palma y etanol. Los resultados arrojaron una alta eficiencia de LipA para sintetizar etil ésteres; dado que, presentan una tasa de producción promedio de 33,1%±2,6 % FAEE empleando 3 U. Encontrándose por encima de otras lipasas comerciales en la misma reacción.

7. Recomendaciones

- 1) Someter a prueba solventes orgánicos que permita una mejor interacción entre el sustrato y la enzima.
- 2) Identificar sustratos (aceites o alcoholes) más afines que mejoren la síntesis de FAEE.

- 3) Alargar los tiempos de reacción de la transesterificación, para tratar de alcanzar la conversión del 100% de FAEE.
- 4) Desarrollar mutantes con modificaciones en su sitio activo, que permitan una interacción más fácil entre el sustrato y la enzima.
- 5) Probar la inmovilización de Sm_LipA para incrementar su vida útil y aumentar la conversión de FAEE.

Referencias Bibliográficas

- Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *Journal of dairy science*, 86(1), 127-132.
- Akatsuka, H., Kawai, E., Omori, K., Komatsubara, S., Shibatani, T., & Tosa, T. (1994). The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *Journal of bacteriology*, 176(7), 1949-1956.
- Acil, J., Vicente, M., Martinez, M., & Poulina, M., (2006). Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 213–223.
- Arumugam, A., & Ponnusami, V. (2014). Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams. *Renewable Energy*, 64, 276-282.
- Bae, H. A., Lee, K. W., & Lee, Y. H. (2006). Enantioselective properties of extracellular lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of (S)-flurbiprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(1-2), 24-29.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14.
- Balat, M., (2007). Production of Biodiesel from Vegetable Oils: A Survey. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 29(November 2013), pp.895–913.
- Barraza, J., Hernandez, J., (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) (tesis de pregrado). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

- Benjumea, P. N., Agudelo, J. R., & Cano, G. J. (2004). Estudio experimental de las variables que afectan la reacción de transesterificación del aceite crudo de palma para la producción de biodiesel. *Scientia et Technica*, 10(24).
- Boyer, P. M., & Hsu, J. T. (1993). Protein purification by dye-ligand chromatography. In *Chromatography* (pp. 1-44). Springer Berlin Heidelberg.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Camerini-Otero, R. D., & Hsieh, P. (1995). Homologous recombination proteins in prokaryotes and eukaryotes. *Annual review of genetics*, 29(1), 509-552.
- Charcosset, C. (1998). Purification of proteins by membrane chromatography. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(2), 95-110.
- Chen, J. W., & Wu, W. T. (2003). Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 466-469.
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1(4), 1852.
- Close, T. J., Kortt, A. A., & Chandler, P. M. (1989). A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant molecular biology*, 13(1), 95-108.
- Cygler, M., & Schrag, J. D. (1997). [1] Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. In *Methods in enzymology* (Vol. 284, pp. 3-27). Academic Press.
- Demirbas, A. (2005). Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in energy and combustion science*, 31(5-6), 466-487.
- Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., & Keskinler, B. (2009). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by

- transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource technology*, 100(6), 1983-1991.
- Elguero, J., Alkorta, I., Pardo, C., Claramunt, R. M., & Santa María, M. D. (2004). *Resonancia magnética nuclear de protón: Aplicaciones en Química Orgánica*. Manual Lora Tamayo', Madrid, España: Instituto de Química Médica, Centro de Química Orgánica, CSIC, Departamento de Química Orgánica I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Departamento de Química Orgánica y Biología, Facultad de Ciencias, UNED.
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillarme, D. (2014). Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 101, 161-173.
- Fukuda, H., Kondo, A., & Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(5), 405-416.
- Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6), 621-634.
- Gelbard, G., Bres, O., Vargas, R. M., Vielfaure, F., & Schuchardt, U. F. (1995). ¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(10), 1239-1241.
- Ghesti, G. F., de Macedo, J. L., Resck, I. S., Dias, J. A., & Dias, S. C. L. (2007). FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with ¹H NMR spectroscopy methods. *Energy & Fuels*, 21(5), 2475-2480.
- González-Bacero, J., Rodríguez Hernández, J., & Monte Martínez, A. D. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1).
- Goodman, S. D., & Nash, H. A. (1989). Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature*, 341(6239), 251.

- Gopinath, S. C., Anbu, P., Lakshmi Priya, T., & Hilda, A. (2013). Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed research international*, 2013.
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., & Ming, J. (2008). Protein production and purification. *Nature methods*, 5(2), 135.
- Gupta, B., Gupta, K., & Mukherjee, S. (2013). Lipase production by *Serratia marcescens* strain SN5gR isolated from the scat of lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) in Silent Valley National Park, a biodiversity hotspot in India. *Annals of microbiology*, 63(2), 649-659.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research*, 10(11), 1788-1795.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial technology*, 39(2), 235-251.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 103(30), 11206-11210.
- Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923-2950.
- Hu, B., Pan, J., Yu, H. L., Liu, J. W., & Xu, J. H. (2009). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*, 44(9), 1019-1024.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 390-397.

- Joseph, S., & David, W. R. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *The Quarterly Review of Biology*, 76(3), 348-349.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., & Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9150-9154.
- Knothe, G., & Kenar, J. A. (2004). Determination of the fatty acid profile by ¹H- NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), 88-96.
- Konieczny, A., & Safer, B. (1983). Purification of the eukaryotic initiation factor 2-eukaryotic initiation factor 2B complex and characterization of its guanine nucleotide exchange activity during protein synthesis initiation. *Journal of Biological Chemistry*, 258(5), 3402-3408.
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S., & Arora, P. K. (2016). Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biological procedures online*, 18(1), 2.
- Kumar, A., Sharma, P. & Kanwar, S.S., 2012. Lipase catalized esters syntheses in organic media: A review. *International journal of institutional pharmacy and lifes ciences*, pp.91–119.
- Li, S., Lin, K., Pang, H., Wu, Y., & Xu, J. (2013). Production, characterization, and application of an organic solvent-tolerant lipase present in active inclusion bodies. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(2), 612-623.
- Li, S., Pang, H., Lin, K., Xu, J., Zhao, J., & Fan, L. (2011). Refolding, purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Serratia marcescens* ECU1010. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3-4), 171-176.
- Li, X., Tetling, S., Winkler, U. K., Jaeger, K. E., & Benedik, M. J. (1995). Gene cloning, sequence analysis, purification, and secretion by *Escherichia coli* of an extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Applied and environmental microbiology*, 61(7), 2674-2680.
- Liu, C. H., Huang, C. C., Wang, Y. W., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2012). Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy*, 100, 41-46.

- Liu, L. N., Chen, X. L., Zhang, X. Y., Zhang, Y. Z., & Zhou, B. C. (2005). One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Biotechnology*, 116(1), 91-100.
- Long, Z. D., Xu, J. H., Zhao, L. L., Pan, J., Yang, S., & Hua, L. (2007). Overexpression of *Serratia marcescens* lipase in *Escherichia coli* for efficient bioresolution of racemic ketoprofen. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47(3-4), 105-110.
- Long, Z., Xu, J., & Pan, J. (2007). Immobilization of *Serratia marcescens* lipase and catalytic resolution of trans-3-(4'-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester. *Chinese Journal of Catalysis*, 28(2), 175-179.
- Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38(5), 715-721.
- Martínez, A. P. P., & Escobar, Á. E. S. (2014). La palmicultura colombiana: Sostenibilidad económica, social y ambiental. *Tendencias*, 15(1), 3.
- Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of molecular medicine*, 80(12), 753-769.
- Meher, L. C., Sagar, D. V., & Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 10(3), 248-268.
- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K. E., & Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large β -roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Journal of biological chemistry*, 282(43), 31477-31483.
- Meyer, M. M., Silberg, J. J., Voigt, C. A., Endelman, J. B., Mayo, S. L., Wang, Z. G., & Arnold, F. H. (2003). Library analysis of SCHEMA- guided protein recombination. *Protein Science*, 12(8), 1686-1693.
- MIngorance, F., Minelli, F. & Le Du, H., (2004). El cultivo de la palma africana en el chocó. *Suippcol*, 1, pp.7–160.

- Mohammadi, M., Sepehrizadeh, Z., Ebrahim-Habibi, A., Shahverdi, A. R., Faramarzi, M. A., & Setayesh, N. (2015). 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, 84-92.
- Moreira, A. B., Perez, V. H., Zanin, G. M., & de Castro, H. F. (2007). Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. *Energy & Fuels*, 21(6), 3689-3694.
- Morgenstern, M., Cline, J., Meyer, S., & Cataldo, S. (2006). Determination of the kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR). *Energy & Fuels*, 20(4), 1350-1353.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2014). A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food research international*, 66, 379-387.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M. J., & Guillén, M. D. (2015). Usefulness of ¹H NMR in assessing the extent of lipid digestion. *Food chemistry*, 179, 182-190.
- Novagen, I. (2005). pET system manual. 11th edition.
- Ognjanovic, N., Bezbradica, D., & Knezevic-Jugovic, Z. (2009). Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource technology*, 100(21), 5146-5154.
- Oliva, A., Llabrés, M., & Fariña, J. B. (2001). Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 25(5-6), 833-841.
- Patel, V., Nambiar, S., & Madamwar, D. (2014). An extracellular solvent stable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. DMVR46: partial purification, characterization and application in non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 49(10), 1673-1681.
- Peterson, E. A., & Sober, H. A. (1956). Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *Journal of the American Chemical Society*, 78(4), 751-755.

- Qi, D. H., Chen, H., Matthews, R. D., & Bian, Y. Z. (2010). Combustion and emission characteristics of ethanol–biodiesel–water micro-emulsions used in a direct injection compression ignition engine. *Fuel*, 89(5), 958-964.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, Á. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, 100(1), 261-268.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*, 17(10), 1030.
- Rincón, S. M., & Martínez, D. M. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *Revista Palmas*, 30(2), 11-24.
- Rosset, I. G., Tavares, M. C. H., Assaf, E. M., & Porto, A. L. M. (2011). Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. *Applied Catalysis A: General*, 392(1-2), 136-142.
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44.
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., & Solinas, V. (2008). Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 54(1-2), 19-26.
- Schmitt, J., Hess, H., & Stunnenberg, H. G. (1993). Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular biology reports*, 18(3), 223-230.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., & Vargas, R. M. (1998). Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(3), 199-210.
- Sharma, K. R. (2015). Improvement of biodiesel product yield during simple consecutive-competitive reactions. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 5(04), 204.

- Statgraphics Centurion, X. V. I. (2009). Statpoint technologies. INC. version, 16, 17.
- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. In *Methods in enzymology* (Vol. 463). Academic Press.
- Van Gerpen, J. (2005). Biodiesel processing and production. *Fuel processing technology*, 86(10), 1097-1107.
- Vidya, P., & Chadha, A. (2010). *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed esterification and transesterification of 3-(furan-2-yl) propanoic acid/ethyl ester: A comparison in ionic liquids vs hexane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 65(1-4), 68-72.
- Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A., & Dais, P. (2003). Classification of edible oils by employing 31P and 1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5715-5722.
- Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L., & Burnett, J. P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*, 215(4533), 687-689.
- Winzor, D. J. (2003). Analytical exclusion chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 56(1-3), 15-52.
- Wu, C., Soh, K. Y., & Wang, S. (2007). Ion-exchange membrane chromatography method for rapid and efficient purification of recombinant baculovirus and baculovirus gp64 protein. *Human gene therapy*, 18(7), 665-672.
- Xin, J. Y., Chen, L. L., Zhang, Y. X., Zhang, S., & Xia, C. G. (2011). Lipase-catalyzed transesterification of ethyl ferulate with triolein in solvent-free medium. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 457-462.
- Yadav, G. D., & Devendran, S. (2012). Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium. *Process Biochemistry*, 47(3), 496-502.

- Yu, M., Lange, S., Richter, S., Tan, T., & Schmid, R. D. (2007). High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 255-263.
- Zaki, N.H. & Saeed, S.E., 2012. Production, Purification and Characterization of Extra Cellular Lipase from *Serratia marcescens* and its Potential Activity for Hydrolysis of Edible Oils. *Journal of Al-Nahrain University*, 15(1), pp.94–102.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P., & Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature genetics*, 20(2), 123.
- Zhao, L. L., Xu, J. H., Zhao, J., Pan, J., & Wang, Z. L. (2008). Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochemistry*, 43(6), 626-633.

Apéndices**Apéndice A. Parámetros de sonicación directa**

Equipo	Procesador de ultrasonido VCX-750
Diametro del sensor	13mm
Volumen de la suspensión celular	20 ml (volumen inicial 250ml)
Amplitud de la vibración	45%
Tiempo de pulso on/off	5"/5"
Tiempo total	6 min

Apéndice B. Parámetros para las corridas del espectro de resonancia

Espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz

Densidad de flujo magnético (T)	9,4
Patrón de referencia	TMS
Programación de pulso	Zg 30
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

Apéndice C. Tabla de ANOVA y diferencias entre cada uno de los tratamientos ensayados

A)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	241,722	2	120,861	18,85	0,0026
Intra grupos	38,4733	6	6,41222		
Total (Corr.)	280,196	8			

B)

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2		-4,33333	5,05916
1 - 3	*	-12,5	5,05916
2 - 3	*	-8,16667	5,05916

* indica una diferencia significativa.

Tablas resultados ANOVA. A) se presenta el valor- P que muestra que existe una diferencia estadística entre cada uno de los tratamientos utilizados. B) diferencia entre cada uno de los tratamientos * indica diferencia significativa entre cada una de las reacciones.