

Biotransformación de la triacetina en 1,2-diacetina mediante reacciones de hidrólisis/metanólisis haciendo uso de lipasas inmovilizadas

Juan Diego Alvarez Torrado

Trabajo de grado presentado para optar por el título de Químico

Director

Jhon Jairo Castillo León

Doctor en Química.

Codirectora

Claudia Cristina Ortiz López

Doctora en Microbiología.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mi mujer María Paula y a mi hija María Catalina por ser mi apoyo y mi razón para salir adelante día a día.

A mis padres por siempre confiar en mi y darme la oportunidad de poder estudiar algo que en realidad me apasiona.

A todos los que aportaron para la culminación de este proyecto.

A mis perras, Copo y Negrita, por siempre sacarme sonrisas, incluso en los días grises.

Agradecimientos

Agradezco a las mujeres de mi vida por ayudarme siempre a cumplir mis propósitos.

Al Dr. Roberto Fernández-Lafuente por sus aportes y consejos.

A mi familia por creer en mi.

Tabla de contenido

Introducción.....	18
1. Objetivos.....	22
1.1 Objetivo general	22
1.2. Objetivos específicos	22
2. Marco referencial.....	23
2.1. Lipasas	23
2.1.1. Estructura de las lipasas.....	25
2.1.2 Mecanismo catalítico de las lipasas.....	27
2.1.3 Mecanismo de activación interfacial en las lipasas.....	29
2.1.4 Modulación de las propiedades catalíticas mediante la inmovilización de enzimas:...	31
2.2 Ingeniería del medio de reacción.....	31
2.3 Ingeniería del derivado	34
2.4 Inmovilización de enzimas sobre soportes hidrofóbicos	36
2.5 Modificación de biocatalizadores con glutaraldehído	38
2.5.1. Lipasa de <i>Rizomucor miehei</i> (RML)	41
2.5.2 Lipasa de <i>Candida antarctica</i> B (CALB).....	44
2.5.3 El glicerol en la industria del biodiesel.	46
2.5.4 Los diacilglicerolos: usos y rutas de obtención	48
2.6 La triacetina y su potencial como sustrato para la obtención de moléculas con valor agregado.....	51
3. Metodología.....	53

3.1	Materiales y reactivos.....	54
3.2	Métodos experimentales.....	54
3.2.1.	Inmovilización de las lipasas sobre octil agarosa.....	55
3.2.2	Hidrólisis de triacetina.....	56
3.2.3	Hidrólisis/metanólisis de triacetina.	57
3.2.4	Estabilidad de los biocatalizadores en el medio de reacción.....	57
3.2.5	Determinación de la variación del pH en el medio de hidrólisis/metanólisis	58
3.2.6	Efecto de los productos de reacción en la desorción de los biocatalizadores.....	58
3.2.7	Aumento de la carga enzimática en biocatalizadores preparados en octil agarosa. .	59
3.2.8	Modificación de los biocatalizadores con glutaraldehído.	59
3.3	Métodos analíticos.....	59
3.3.1.	Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.....	60
3.3.2	Medición de la actividad enzimática haciendo uso de butirato de <i>para</i> -nitrofenilo (<i>p</i> -NPB)	60
3.3.3	Análisis de los productos de reacción mediante RP-HPLC	62
4.	Resultados y discusión	63
4.1	Inmovilización de lipasas mediante adsorción interfacial en soportes de octil agarosa.....	63
4.2	Inmovilización de RML en octil agarosa	64
4.3	Inmovilización de CALB en octil agarosa	66
4.4	Hidrólisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas	70
4.5	Determinación del medio de reacción para la hidrólisis/metanólisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas.....	79
4.6	Hidrólisis/metanólisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas.....	85
4.7	Aumento de la carga enzimática en RML-OC	93

4.8	Determinación de problemas de estabilidad operacional en biocatalizadores	98
4.9	Modificación con glutaraldehído de los biocatalizadores inmovilizados sobre octil agarosa	101
5.	Conclusiones.....	107
6.	Recomendaciones	109
	Bibliografía.....	111
	Apéndices	137

Lista de Figuras

<i>Figura 1:</i> Hidrólisis selectiva de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas para la obtención de 1,2-diacetina.....	20
Figura 2: Hidrólisis enzimática de TAG catalizada por lipasas.	23
Figura 3: Conformaciones estructurales en las lipasas. (tomado de: http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/Palomoweb/uusframe/interes2a.html)	26
Figura 4: Mecanismo catalítico de las lipasas (Adaptado de Barbosa, 2013).	28
Figura 5: Activación interfacial de las lipasas (Adaptado de Ruíz, 2012).	29
Figura 6: Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos (Adaptado de Ruíz, 2012).....	30
Figura 7: Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de las lipasas (Adaptado de Barbosa, 2013).....	32
Figura 8: Soportes hidrofóbicos preparados a partir de la agarosa.....	38
Figura 9: Versatilidad del glutaraldehído para modificar soportes preexistentes y conseguir diferentes tipos de inmovilización. Adaptado de “Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from <i>Candida antarctica</i> ” (Barbosa et al., 2012a).....	41
Figura 10: Biocatalizadores a utilizar en las reacciones enzimáticas. Verde: extractos, Azul: biocatalizadores, naranja: reacciones enzimáticas.....	55
Figura 11: Cinética de inmovilización de la lipasa de <i>Rizomucor miehei</i> en geles de octil agarosa a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando p-NPB como sustrato.....	65
Figura 12: Cinética de inmovilización de la lipasa de <i>Candida antarctica</i> B en geles de octil agarosa a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando p-NPB como sustrato.....	67
Figura 13: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por Lipozyme RM IM en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.....	71

- Figura 14: Fragmentación de las partículas del biocatalizador Lipozyme RM IM por efecto de la agitación. **A)** 15 minutos de reacción; **B)** 3 horas de reacción. 73
- Figura 15: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por Novozyme 435 en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM. 74
- Figura 16: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por CALB-OC (3,3 mg/g soporte) en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM 76
- Figura 17: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina (0,1 M) en buffer acetato a 25°C, pH 5 y con agitación a 200 RPM..... 78
- Figura 18: Hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) en buffer acetato catalizada por RML-OC (6,6 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM..... 81
- Figura 19: Determinación de la variación del pH con el tiempo en dos buffers usados como tampón en la reacción de hidrólisis/metanólisis con 50% de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM. 83
- Figura 20: Hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por RML-OC (6,6 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM. 85
- Figura 21: Hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por CALB-OC (3,3 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM..... 86
- Figura 22: .Hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por Novozyme 435 usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM. 87
- Figura 23: Hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por Lipozyme RM IM usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM. 89
- Figura 24: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50 % de metanol y pH 5 a 25 °C y agitando a 200 RPM. 91
- Figura 25: Prueba de estabilidad térmica para RML-OC(6,6 mg/g soporte) en medio MES 100 mM y 50% de metanol, pH 5 a 40 °C y agitando a 200 RPM..... 92
- Figura 26: Relación entre la carga enzimática y la actividad relativa del biocatalizador RML-OC a las 24 h de inmovilización usando p-NPB como sustrato..... 94

- Figura 27: Cinética de inmovilización de la lipasa de *Rizomucor miehei* en geles de octil agarosa (carga: 52,8 mg/g soporte) a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando p-NPB como sustrato. 95
- Figura 28: Problemas de difusión del sustrato empleado para la medición de actividad enzimática en sólidos porosos como la octil agarosa. 97
- Figura 29: Efecto de la carga enzimática del biocatalizador RML-OC en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de la triacetina (1 M)..... 98
- Figura 30: Prueba de estabilidad para derivados de la lipasa de *Rizomucor miehei* en medio MES (100 mM) con 50% de metanol, pH 5 y 25 °C agitando a 200 RPM. 99
- Figura 31: Desorción e inactivación de RML-OC (6,6 mg/g soporte) en hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50% de metanol y pH 5, a 25°C y agitando a 200 RPM. 100
- Figura 32: Efecto de la modificación de RML-OC (6,6 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina. 103
- Figura 33: Efecto de la modificación de RML-OC (39,6 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina. 103
- Figura 34: Efecto de la modificación de CALB-OC (3,3 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina. 104
- Figura 35: Efecto de la modificación de CALB-OC con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina. 105

Lista de Tablas

Tabla 1: Gradiente de elución para cromatografía RP-HPLC.....	62
Tabla 2: Actividad de los biocatalizadores preparados mediante adsorción en geles de octil agarosa usando p-NPB como sustrato, carga enzimática y porcentaje de inmovilización...	69
Tabla 3: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina (0,1 M).....	75
Tabla 4: Prueba de solubilidad para la triacetina en el medio de reacción usando diferentes porcentajes de metanol.	80
Tabla 5: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50% de metanol.....	90

Lista de Apéndices

Apéndice A. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Bradford.	137
Apéndice B. Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por RML-OC (6,6 mg/g) en buffer acetato a 25°C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.	138
Apéndice C. Cromatograma obtenido luego de incubar RML-OC en buffer acetato pH 5 con 50% de metanol durante 300 minutos.	138
Apéndice D. Curva de calibración para la cuantificación de 1,2-diacetina obtenida en las reacciones.	139
Apéndice E. Curva de calibración para la cuantificación de 1,3-diacetina obtenida en las reacciones.	139
Apéndice F. Curva de calibración para la cuantificación de 2-monoacetina obtenida en las reacciones.	140
Apéndice G. Curva de calibración para la cuantificación de triacetina usada como sustrato en las reacciones.	141

Abreviaturas

TAG: Triacilglicerol

DAG: Diacilglicerol

MAG: Monoacilglicerol

Lid: Tapadera de las lipasas

p-NPB: Butirato de *para*-nitrofenilo

RML: Lipasa de *Rizomucor miehei*

CALB: Lipasa B de *Candida antarctica*

OC: Octil agarosa

RML-OC: Lipasa de *Rizomucor miehei* inmovilizada en octil agarosa

CALB-OC: Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en octil agarosa

RML-OC-GLU: Lipasa de *Rizomucor miehei* inmovilizada en octil agarosa y modificada con glutaraldehído

CALB-OC-GLU: Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en octil agarosa y modificada con glutaraldehído

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa

RESUMEN

Título: BIOTRANSFORMACIÓN DE LA TRIACETINA EN 1,2-DIACETINA
MEDIANTE REACCIONES DE HIDRÓLISIS/METANÓLISIS HACIENDO USO DE
LIPASAS INMOVILIZADAS *

Autor: Juan Diego Alvarez Torrado **

Palabras Clave: CALB, RML, Octil agarosa, DAG, 1,2-diacetina

Resumen: Las lipasas son más probablemente el grupo de enzimas con mayor uso como biocatalizadores. Estas enzimas presentan una amplia especificidad (aceptando sustratos muy diferentes), presentando en muchos casos una alta regio o enantio selectividad o especificidad. Esta amplia gama de sustratos puede parecer contradictoria para una enzima, pero es consecuencia de la heterogeneidad de los sustratos naturales sobre los que puede actuar: triglicéridos, diglicéridos o monoglicéridos de ácidos grasos con una longitud y grado de saturación muy diferentes. Además, algunas lipasas son bastante robustas y pueden utilizarse en una amplia variedad de sistemas de reacción con relevancia industrial. En el caso de las reacciones de hidrólisis de triacetina los mejores biocatalizadores fueron los preparados en el laboratorio llegando a porcentajes de conversión del 80% utilizando RML-OC; algo muy distinto sucedió en las reacciones de hidrólisis/metanólisis en donde se observó una desorción de la enzima en los biocatalizadores, llegando a porcentajes de conversión del 33% utilizando CALB-OC. Finalmente, los biocatalizadores fueron modificados con glutaraldehído con el objetivo de evitar la desorción de la enzima hacia el medio de reacción, y se logró primero, aumentar su estabilidad y segundo, aumentar la cantidad de 1,2-diacetina producida.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Jhon Jairo Castillo León, Químico Ph.D

ABSTRACT

Title: BIOTRANSFORMATION OF TRIACETIN IN 1,2-DIACETIN BY HYDROLYSIS/METHANOLYSIS REACTION USING IMMOBILIZED LIPASES *

Author: Juan Diego Álvarez Torrado**

Keywords: CALB, RML, Octyl agarose, DAG, 1,2-diacetin

Abstract: Lipases are most probably the group of enzymes with the broadest use as biocatalysts. These enzymes couple a quite broad specificity (accepting very different substrates) with a, in many instances, very high regio or enantio selectivity or specificity. This wide range of substrates may seem contradictory for an enzyme, but it is the consequence of the heterogeneity of the natural substrates: triglycerides, diglycerides or monoglycerides of fatty acids with very different length and saturation degree. Moreover, some lipases are quite robust and can be used in a wide variety of reaction systems. Thus, lipases have been used as catalysts for very different reactions with industrial relevance. In this work the production of 1,2-diacetin was evaluated by hydrolysis and hydrolysis/methanolysis of triacetin using lipases immobilized in octyl agarose and other commercial lipase biocatalysts, in the case of the triacetin hydrolysis reactions the best biocatalysts were those prepared in the laboratory, reaching 80% conversion rates using RML-OC; something very different happened during the hydrolysis/methanolysis reactions where enzyme desorption was observed in the biocatalysts, reaching conversion rates of 30% using CALB-OC. Finally, the biocatalysts were modified with glutaraldehyde with the objective of avoiding the desorption of the enzyme towards the reaction medium, and it was achieved, first increasing its stability and second, increasing the amount of 1,2-diacetin produced.

*Bachelor thesis.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Jhon Jairo Castillo León, Químico Ph.D

Introducción

Durante los últimos años ha aumentado la búsqueda de biocombustibles (combustibles obtenidos a partir de biomasa), constituyendo una tendencia mundial para hacer frente a la escasez y altos costos del petróleo y especialmente disminuir el impacto ambiental que conlleva el uso de combustibles fósiles (Bonet *et al.*, 2009; Octave & Thomas, 2009; Johnson, 2014). Por ejemplo, con la producción y el uso de biodiesel se ha logrado disminuir el impacto ambiental en muchos países; sin embargo, en el proceso de obtención genera grandes cantidades de glicerol residual, el cual representa cerca del 10% en peso del biocombustible producido (Karinen & Krause, 2006; A. Rodrigues *et al.*, 2017).

Para la industria del biodiesel, el glicerol se ha convertido en un potencial contaminante ambiental, ya que a medida que aumenta la producción de biodiesel se genera un exceso de este en el mercado, situación que contribuye a una disminución en su precio de venta, lo cual ha impulsado la búsqueda de nuevas rutas para la valorización del glicerol y sus derivados (Bonet *et al.*, 2009; Leoneti *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2013). En 2017 se reportó una producción de 460.121 toneladas de biodiesel en Colombia, posicionando al país como uno de los

principales productores de biodiesel en América Latina, por lo que es de vital importancia para la industria colombiana de biodiesel encontrar alternativas que permitan solucionar esta problemática, como la generación de compuestos sencillos y con un alto valor agregado a partir del glicerol (Información Estadística Sector Biocombustibles en Colombia, 2017).

Entre las alternativas que se tienen actualmente para transformar el glicerol se encuentra la acetilación total de esta molécula con ácido acético, a partir de la cual se obtiene la triacetina. Este compuesto es un aceite transparente, combustible y de sabor amargo utilizado en diferentes industrias, como la de biocombustibles, cosmética y la industria de los plastificantes (Bonet *et al.*, 2009; Casas *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2011; Mufrodi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013; Mufrodi *et al.*, 2014; Lacerda *et al.*, 2015; Zare *et al.*, 2016). A pesar de que la triacetina es un compuesto con diversos usos, a partir de la hidrólisis selectiva de esta molécula se pueden obtener productos mucho más interesantes como moléculas quirales (*Figura 1: Hidrólisis selectiva de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas para la obtención de 1,2-diacetina*), ya que si la hidrólisis ocurre en la posición terminal la diacetina producida (1,2-diacetina) contaría con un centro quiral en el carbono 2, aumentando aún más el interés en la producción de esta forma regioisomérica de la diacetina (Hernández *et al.*, 2011).

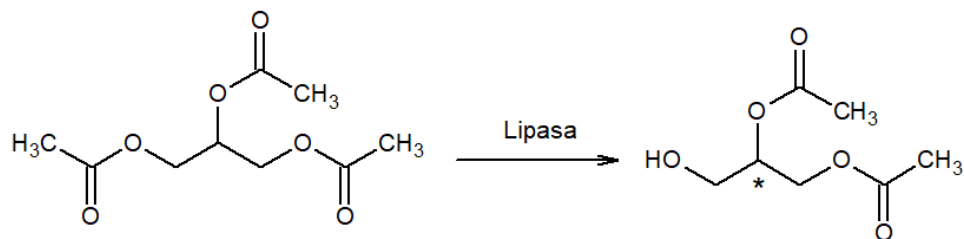


Figura 1: Hidrólisis selectiva de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas para la obtención de 1,2-diacetina.

Una de las rutas de mayor viabilidad para la obtención de diglicéridos regioisoméricamente puros se encuentra en las transformaciones biocatalíticas usando lipasas inmovilizadas. Las lipasas son algunas de las enzimas más utilizadas industrialmente, ya que tienen alta estereoespecificidad, enantio y regio selectividad, además de ser biocatalizadores muy versátiles permitiendo utilizarse en diferentes tipos de reacciones (hidrólisis, alcoholólisis, aminólisis, esterificación, transesterificación, interesterificación). Adicionalmente las lipasas, a diferencia de casi todas las enzimas se pueden usar en medios orgánicos, acuosos y además en medios de reacción no convencionales (líquidos iónicos y fluidos supercríticos) (Schmid & Verger, 1998a; Sheldon *et al.*, 2005; Santaniello *et al.*, 2006; Dhake *et al.*, 2013; Santaniello *et al.*, 2006; Sharma & Kanwar, 2014; Choi *et al.*, 2015). De acuerdo con lo anteriormente expuesto es posible aumentar el valor agregado de la triacetina usando reacciones sencillas como la hidrólisis o la metanólisis para la producción mayoritaria de diacilgliceroles regioisoméricamente puros. Durante esta investigación se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis e hidrólisis/metanólisis de la triacetina con la finalidad de obtener exclusivamente el regioisómero 1,2-diacetina, para lo cual se utilizaron lipasas inmovilizadas

disponibles comercialmente (Novozyme 435, Lipozyme RM IM) y biocatalizadores preparados en el laboratorio a partir de las lipasas de *Rizomucor miehei* (RML-OC) y *Candida antarctica B* (CALB-OC) inmovilizadas sobre octil agarosa. Adicionalmente, debido a la baja estabilidad de los derivados preparados en el laboratorio en las reacciones con 50% de metanol, se llevó a cabo la modificación de RML-OC y CALB-OC con glutaraldehído consiguiendo aumentar la estabilidad de estos en el medio de reacción.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Utilizar lipasas inmovilizadas en la hidrólisis y la metanólisis/hidrólisis de triacetina, para la obtención del regioisómero 1,2-diacetina.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad biocatalítica de los biocatalizadores de *Rizomucor miehei* y *Candida antarctica B* en la producción de 1,2-diacetina.
- Evaluar el efecto del glutaraldehído sobre la estabilidad y la regioselectividad de los biocatalizadores preparados.
- Determinar el mejor biocatalizador para la producción de 1,2-diacetina a partir de la hidrólisis y metanólisis /hidrólisis de triacetina.

2. Marco referencial

2.1. Lipasas

Las lipasas (serinhidrolasas; EC 3.1.1.3) son enzimas que tienen como función en el organismo la catálisis de reacciones de hidrólisis de triglicéridos (TAG) para formar ácidos grasos y glicerol (Figura 2), los cuales al tener un menor tamaño que los TAG pueden pasar al torrente sanguíneo.

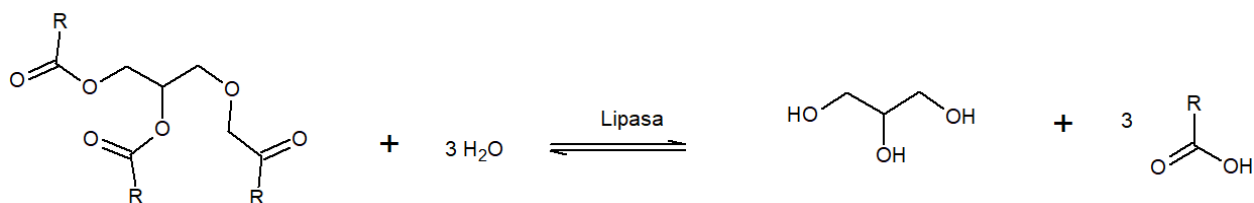


Figura 2: Hidrólisis enzimática de TAG catalizada por lipasas.

Estas enzimas se pueden obtener a partir de una gran variedad de organismos pero las de origen microbiano son de mayor interés para la industria, ya que presentan alta velocidad de reacción, altos porcentajes de conversión, es relativamente simple la manipulación genética para aumentar su capacidad productiva y son fácilmente recuperables del caldo de cultivo

(Smaniotto *et al.*, 2014). Las lipasas de origen microbiano son de las más versátiles que se conocen ya que pueden utilizarse para catalizar diversas reacciones tales como de hidrólisis, alcoholólisis, esterificación, interesterificación, aminólisis y acidólisis entre otras (Haki y Rakshit, 2003). Este tipo de enzimas presentan una amplia especificidad y en algunos casos alta enantio y regioselectividad, permitiendo además la obtención de compuestos enantioméricamente puros, razón por la cual son muy utilizadas en procesos de la industria farmacéutica y Química fina (Ahmed *et al.*, 2012).

Entre los microorganismos, una de las mejores fuentes de lipasas son los hongos (Mehta *et al.*, 2017). Las lipasas fúngicas se suelen preferir sobre las de origen bacteriano ya que son de naturaleza extracelular, lo que hace que sea más fácil su extracción permitiendo de esta forma reducir significativamente el costo de producción (Kumar & Ray, 2014; Singh & Mukhopadhyay, 2014). Industrialmente para muchos procesos se suelen utilizar lipasas fúngicas pero entre las más utilizadas cabe destacar la lipasa de *Rizomucor miehei* y la lipasa B de *Candida antarctica* (Anderson *et al.*, 1998; Rodrigues & Fernández-Lafuente, 2010a).

2.1.1. Estructura de las lipasas: Mediante cristalografía de rayos X se ha determinado la estructura de lipasas de diversos orígenes logrando identificarse en general una estructura tipo α/β hidrolasa; en este tipo de estructuras el núcleo está conformado por láminas beta rodeadas de alfa hélices (Cygler *et al.*, 1994; Cycler y Schrag, 1997). Esta estructura plegada, al igual que en las proteasas y algunas hidrolasas, presenta tres residuos aminoacídicos en su centro activo denominados triada catalítica (serina, histidina y ácido aspártico o glutámico) los cuales se ubican en el fondo de una cavidad conocida como bolsillo hidrofóbico o agujero del oxianión, esta cavidad permite la estabilización del intermediario cargado negativamente que se genera luego de la hidrólisis del éster (Norin *et al.*, 1994; Borrelli & Trono, 2015). En la mayoría de lipasas este sitio está cubierto por un elemento móvil denominado tapadera o *lid* el cual consta de una o dos cadenas polipeptídicas cortas en forma de alfa hélice, con base en lo anterior Uppenberg *et al.* plantearon una explicación a la alta estereoselectividad de CALB sobre los alcoholes secundarios (Uppenberg *et al.*, 1995).

Los estudios cristalográficos que se han hecho sobre diferentes lipasas han logrado demostrar que la enzima puede coexistir en dos conformaciones estructurales distintas, una abierta y la otra cerrada; en el primer caso el *lid* de la enzima cubre el centro activo mientras que en el segundo este *lid* se desplaza para dejarlo expuesto (Figura 3) (Cyclor & Schrag, 1997). Cuando la enzima se encuentra en medios acuosos homogéneos mediante interacciones hidrofóbicas entre la cara interna del *lid* y el bolsillo este se desplaza ocultando el centro activo, lo que conlleva a una dificultad en la entrada de sustrato y por ende la enzima cristaliza en conformación cerrada; algo muy diferente ocurre cuando la enzima está en

presencia de un sustrato o inhibidor competitivo, en este caso la enzima cristaliza en una conformación abierta ya que el *lid* que antes cubría el centro activo se desplaza mediante interacciones por medio de puentes salinos (Brzozowski *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1994).

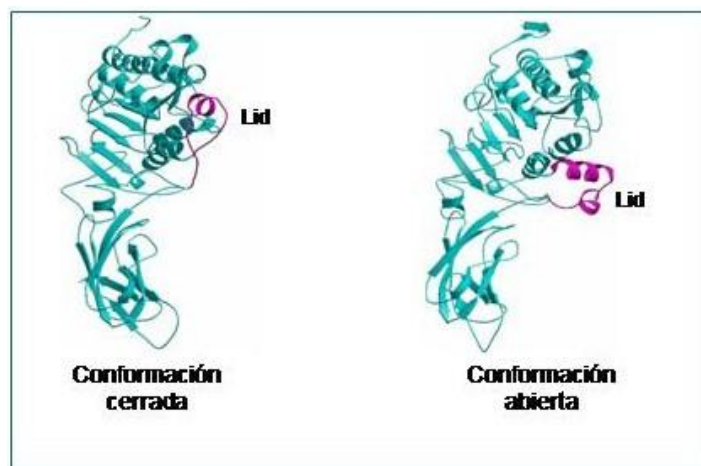


Figura 3: Conformaciones estructurales en las lipasas. (tomado de: <http://www.icp.csic.es/biocatalisis/web3/Palomoweb/uusframe/interes2a.html>)

Según lo anterior es de esperarse que el tamaño del *lid* tenga influencia sobre la actividad de las lipasas; esto ha sido demostrado mediante diversos estudios donde al mutar la enzima nativa con la finalidad de cambiar la estructura del *lid* se consigue variar su actividad biocatalítica (Brocca *et al.*, 2003; Wang, 2017). En 2006 Secundo *et al.* estudiaron el efecto de la mutación en el *lid* de diferentes lipasas (*Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fragi* (PFL) y *Bacillus subtilis* (BSLA)), los autores notaron que luego de mutar las enzimas no solo se modificaba su actividad sino también su selectividad, a partir de esto se puede concluir que en las lipasas el *lid* no solo juega un papel importante en la modulación de la actividad sino también en la selectividad de la enzima (Secundo *et al.*, 2006).

2.1.2 Mecanismo catalítico de las lipasas: Las reacciones catalizadas por lipasas tienen lugar en el centro activo de la enzima, este se encuentra localizado en un bolsillo que se ubica en la parte superior de la lámina β central, donde se da un mecanismo catalítico similar al que ocurre en las serina hidrolasas (Casas-Godoy *et al.*, 2012).

La hidrólisis del sustrato comienza con la unión de lípidos al centro activo donde se encuentra la triada catalítica de la lipasa (serina, histidina y ácido aspártico), esta unión es posible gracias a la polarización que el ácido aspártico genera sobre el grupo imidazol de la histidina. Seguidamente se da una transferencia de protón entre la serina y la histidina, de esta forma se da un aumento en la nucleofilia de la serina siendo así posible atacar el grupo carboxilo del sustrato formando el primer intermediario tetraédrico (IT1); este intermediario tiene una carga negativa en el oxígeno del grupo carbonilo la cual se encuentra estabilizada por al menos dos enlaces tipo puente de hidrógeno gracias al agujero del oxianión presente en la enzima. Posteriormente se da una transferencia de protón entre la histidina y el átomo de oxígeno presente en el grupo saliente del sustrato lo que genera la descomposición de IT1 para generar el complejo acil-enzima, donde por efecto de un segundo ataque nucleofílico se genera un segundo intermediario tetraédrico (IT2) el cual se descompone formando el producto de reacción y regenerando la serina para que de esta forma sea posible otro ciclo catalítico (Figura 4) (Kazlauskas, 1994; Schmid & Verger, 1998a; Casas-Godoy *et al.*, 2012).

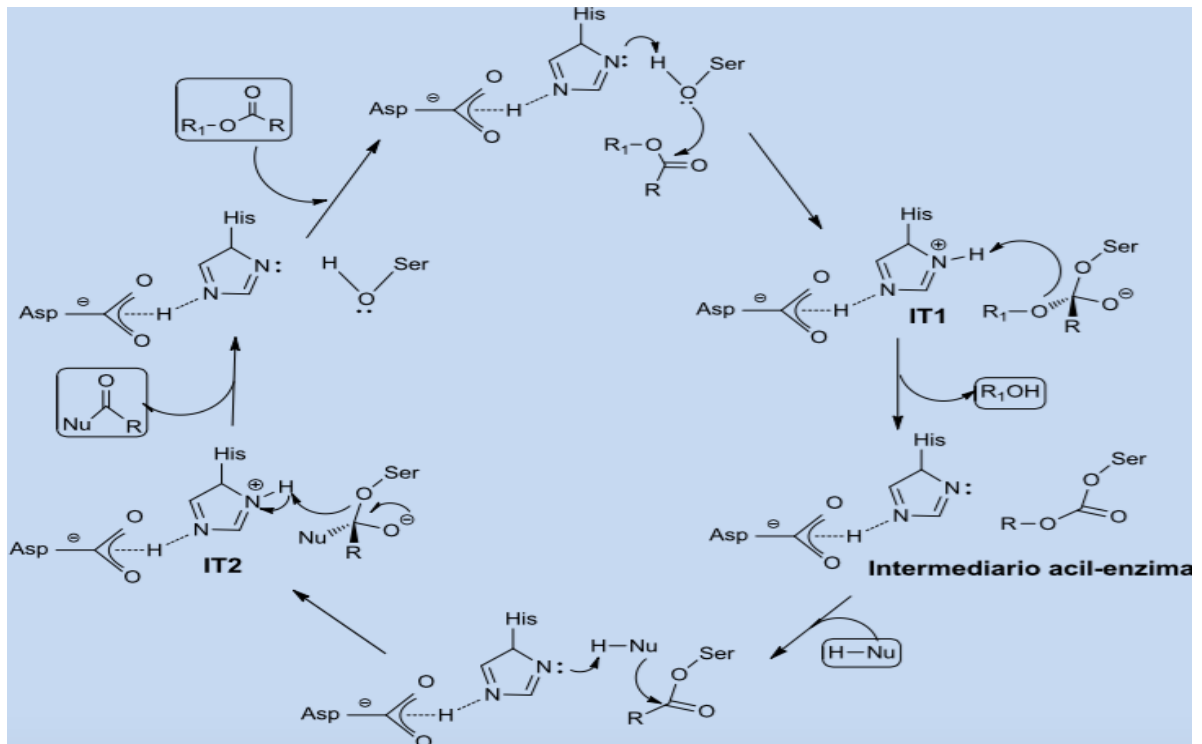


Figura 4: Mecanismo catalítico de las lipasas (Adaptado de Barbosa, 2013).

2.1.3 Mecanismo de activación interfacial en las lipasas: Las lipasas al igual que las esterasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces tipo éster en moléculas biológicas; sin embargo, a pesar de que catalizan la misma reacción se pueden diferenciar por el fenómeno de activación interfacial el cual se da exclusivamente en las lipasas, este se mide experimentalmente como un aumento drástico de actividad enzimática cuando se sobrepasa el límite de solubilidad del sustrato, es decir cuando la enzima entra en contacto con una interfase (Chapus *et al.*, 1975; De Caro *et al.*, 1981; Brzozowski *et al.*, 1991; Fojan *et al.*, 2000; Chahinian *et al.*, 2002). Según dicho mecanismo la enzima en medios acuosos se encuentra en una conformación cerrada (*lid* bloqueando el ingreso de sustrato al sitio activo) pero al estar en presencia de interfases hidrofóbicas cambia a una conformación abierta. Gracias a que las cadenas polipeptídicas que hacen parte de la tapadera presentan en sus caras internas una serie de residuos hidrofóbicos, al entrar en contacto con una interfase la tapadera se desplaza dando lugar a una conformación abierta. La Figura 5 muestra la activación interfacial en las lipasas donde las zonas verdes representan zonas hidrofóbicas y las rojas zonas hidrofílicas.

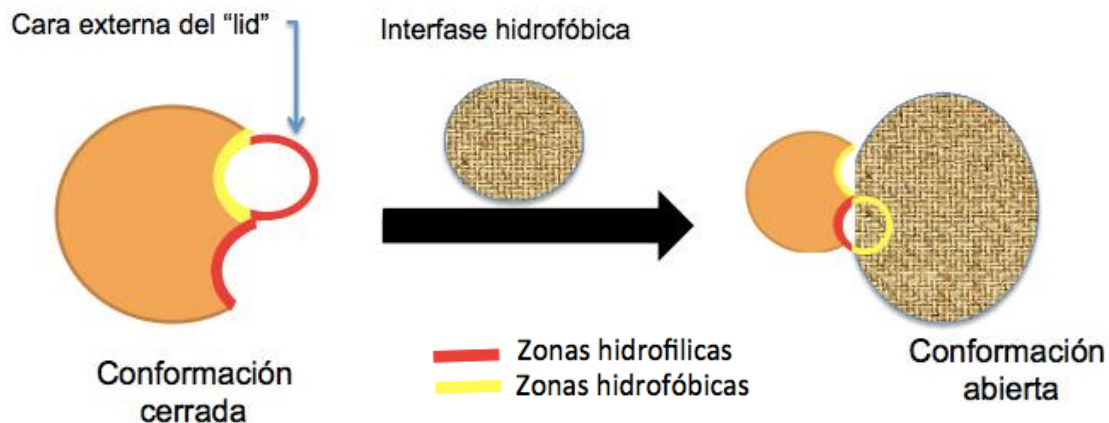


Figura 5: Activación interfacial de las lipasas (Adaptado de Ruíz, 2012).

Según este mecanismo, las lipasas en solución acuosa no deberían presentar actividad catalítica ya que al tener el sitio activo bloqueado por el *lid* este no permitiría el ingreso de sustrato; sin embargo, experimentalmente se observa que dichas enzimas sí presentan actividad bajo estas condiciones, que en muchos casos llega a ser comparable al de las esterasas no lipásicas; esto sugiere que en sistemas acuosos las conformaciones abierta y cerrada de las lipasas se encuentran en equilibrio, lo cual les permite ser catalíticamente activas aunque no se estén en presencia de una interfase (Figura 6).

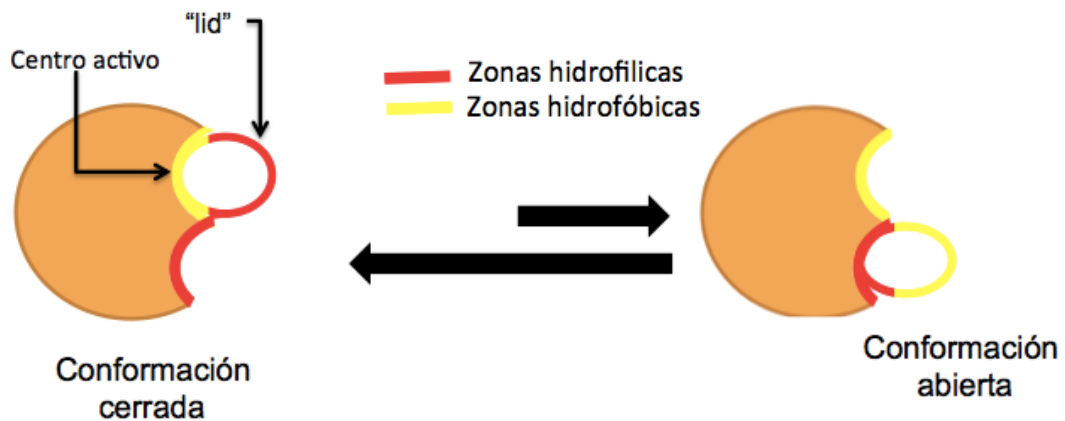


Figura 6: Equilibrio conformacional de las lipasas en medios acuosos homogéneos (Adaptado de Ruíz, 2012).

2.1.4 Modulación de las propiedades catalíticas mediante la inmovilización de enzimas: El equilibrio entre la conformación abierta y cerrada anteriormente mencionado puede desplazarse haciendo uso de interfases no polares permitiendo de esta forma la modulación de las propiedades de la enzima. Teniendo en cuenta esto se puede utilizar un gran número de interfases similares a sus sustratos naturales para aumentar la actividad de la enzima tales como burbujas de aire, gotas de grasa o soportes hidrofóbicos (Sugiura & Isobe, 1975; Bosley & Clayton, 1994; Bastida *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2000; Manoel *et al.*, 2015).

Una herramienta versátil que permite la modulación de las propiedades biocatalíticas de las lipasas es la ingeniería conformacional, esta hace uso de diferentes técnicas utilizadas en bioquímica, entre las que se encuentran la modificación química, genética, ingeniería del medio de reacción y del derivado entre otras (Fernández-Lorente *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2005). En el presente estudio se hará uso de las dos últimas.

2.2 Ingeniería del medio de reacción

Debido al complejo mecanismo de activación interfacial que presentan las lipasas es posible que un cambio en las condiciones de reacción tenga un efecto significativo en las propiedades de la lipasa, ya que de esta forma es posible generar un cambio en las interacciones globales entre la forma abierta y cerrada, lo que puede llegar a alterar la forma exacta de la

conformación abierta de la enzima (Palomo *et al.*, 2002a; Sheldon & Pereira, 2017). Según lo anterior, la ingeniería del medio hace referencia al estudio del efecto de las variaciones en las condiciones de reacción sobre la actividad, ya que estas pueden alterar el balance en las interacciones intermoleculares de la siguiente forma: el pH puede alterar las interacciones entre el *lid* y el resto de la superficie proteica, la fuerza iónica puede hacer desfavorable la presencia del bolsillo hidrofóbico mientras que los disolventes pueden favorecer la presencia de este, además de fortalecer las interacciones electrostáticas (Figura 7).

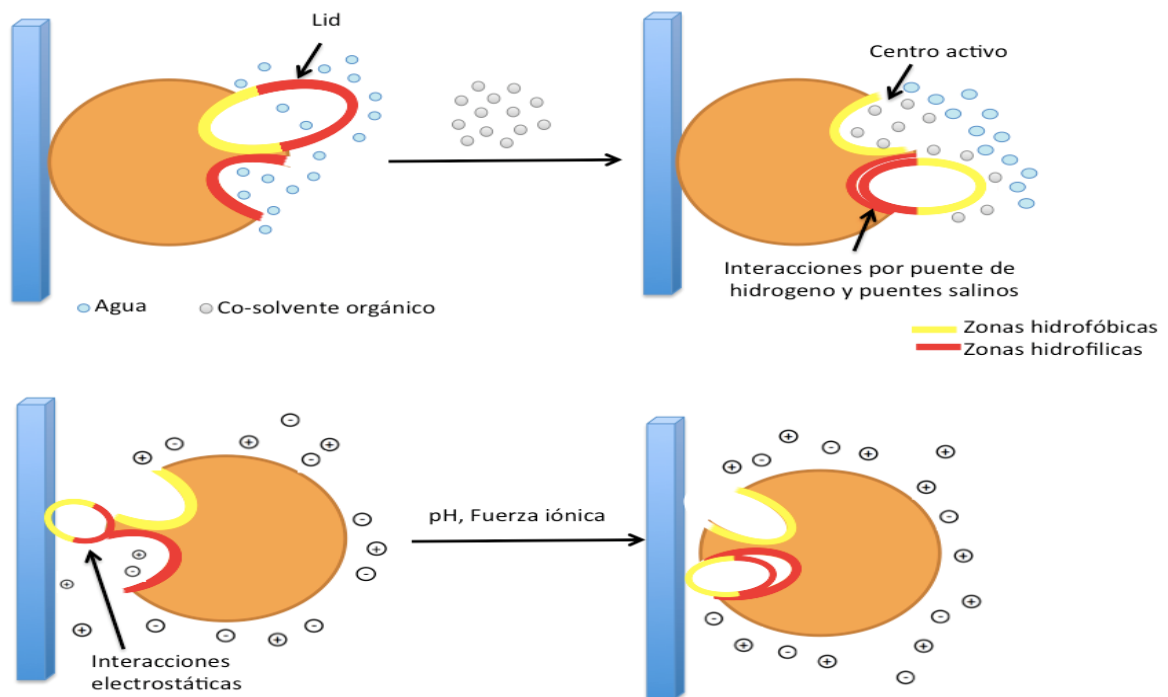


Figura 7: Efecto de las condiciones experimentales en el mecanismo de apertura y cierre de las lipasas (Adaptado de Barbosa, 2013).

En 1998 Mohapatra *et al.* usaron biocatalizadores preparados a partir de la lipasa de *Pseudomona cepacia* en la hidrólisis de (\pm) -1-cloro-2-acetoxi-3-(1-naftiloxi)propano para la obtención de propanolol, donde la enzima presentaba baja actividad y una enantioselectividad moderada en la hidrólisis de dicha mezcla racémica; sin embargo, los autores evidenciaron que las características de la enzima cambiaban luego de la adición de diferentes solventes; haciendo uso de un solvente altamente polar (DMSO) se conseguía una alta actividad pero se perdía enantioselectividad, utilizando THF se perdía actividad pero se obtenía una alta enantioselectividad y haciendo uso de acetona se lograba tanto una actividad como una enantioselectividad moderada (Mohapatra & Hsu, 1999).

En 2003 Castillo *et al.* utilizaron CALB inmovilizada en una resina acrílica (Novozyme 435) en la esterificación del xilitol con ácido oleico para la obtención de monoésteres, en este estudio los autores determinaron el grado de esterificación del polialcohol al utilizar diferentes mezclas de solventes orgánicos en el medio de reacción logrando aumentar el porcentaje de conversión de 6% (hexano) a 73% (DMSO/ 2-metil-2-propanol 80:20) con lo que se puede concluir que para esta reacción la formación de monoésteres se encuentra favorecida por el uso de solventes altamente polares (Castillo *et al.*, 2003).

En 2016 Szczęsna-Antczak *et al.* utilizaron dos lipasas (*Mucor circinelloides* y *Termomices lanuginosa*) para la obtención de 2-metilbutil ésteres mediante reacciones de transesterificación de aceites vegetales, donde en sistemas libres de solventes la actividad de las lipasas era baja pero variando la concentración de agua y dietilamina se lograban obtener altos porcentajes de conversión; los resultados obtenidos por los autores sugieren que a bajas

concentraciones de dietilamina estas moléculas contribuían a la retención de agua en el microentorno de la enzima y por ende aumentaban los rendimientos de la reacción permitiendo de esta forma disminuir significativamente las cantidades de mono y 1,2-diacilglicerol residuales (Szczęsna-Antczak *et al.*, 2016). Según lo anterior la ingeniería del medio es una herramienta potente para la modulación de las propiedades catalíticas de las lipasas; además, también es posible modificar la actividad enzimática haciendo uso de soportes a los cuales se adhiere la enzima mediante diferentes técnicas, lo que se conoce como ingeniería del derivado.

2.3 Ingeniería del derivado

Las lipasas, como todas las enzimas, sufren cambios conformacionales en su estructura; estos involucran un gran número de interacciones mediante fuerzas intermoleculares entre residuos aminoacídicos, los cuales sirven para mantener la enzima en una conformación determinada. Al inmovilizar las enzimas se puede llegar a alterar la conformación de los residuos aminoacídicos en el sitio activo, lo que ocasiona una alteración de sus propiedades catalíticas. Por otra parte si se preparan derivados inmovilizados de las enzimas implicando zonas alejadas del sitio activo se le puede dar a la enzima una mayor o menor rigidez (cambio en su conformación) con lo que se puede aumentar la actividad e incluso su estabilidad; de esta forma se puede conseguir propiedades catalíticas diferentes para derivados de una misma lipasa (Fernández-Lorente *et al.*, 2001; Palomo *et al.*, 2002a; Torres *et al.*, 2005; Martinek & Mozhaev, 2006).

Entre los tipos de inmovilización están la unión covalente, entrecruzamiento, adsorción por intercambio iónico y adsorción física. Los métodos basados en la adsorción son muy utilizados para inmovilizar lipasas ya que funcionan muy bien para este tipo de enzimas dada la peculiaridad de presentar zonas altamente hidrofóbicas (Wilson *et al.*, 2006). La adsorción en soportes hidrofóbicos se ve favorecida por una baja fuerza iónica facilitando el movimiento del *lid* que posteriormente dejará el sitio activo expuesto, lo que conlleva en la mayoría de los casos a un aumento de la actividad (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998). En las lipasas se ha demostrado que la metodología de inmovilización por adsorción es una herramienta muy útil, ya que permite la purificación, inmovilización e hiperactivación en un único paso (Bastida *et al.*, 1998; Fernández-Lafuente *et al.*, 1998).

En 2002 Palomo *et al* utilizaron biocatalizadores preparados a partir de la lipasa de *Candida rugosa* en la hidrólisis de la mezcla racémica de mandelato de metilo, los autores observaron que mediante el uso de diferentes soportes para la obtención de biocatalizadores se lograba obtener una rigidez distinta en la enzima y por ende un microambiente diferente para cada biocatalizador preparado, lo que implicaba que estos exhibieran diferentes propiedades biocatalíticas. Haciendo uso de la ingeniería del derivado lograron aumentar la actividad en un factor de 10 y la enantioselectividad de 85 a 400, también lograron determinar que la disminución del pH de 7 a 5 permitía el aumento de la enantioselectividad de 20 a 300 (Palomo *et al.*, 2002b). Según lo anterior se puede concluir que haciendo uso de la ingeniería del medio y de la ingeniería del derivado se pueden obtener grandes cambios en las propiedades biocatalíticas de las lipasas.

2.4 Inmovilización de enzimas sobre soportes hidrofóbicos

Las enzimas en solución pueden ser un catalizador efectivo en condiciones suaves y a escala de laboratorio, si estas se quieren implementar en procesos industriales es fundamental inmovilizarlas, lo que permite una separación rápida y efectiva del biocatalizador de los productos de reacción. Cabe destacar que la inmovilización de enzimas presenta otras ventajas como la posibilidad de reutilizar el biocatalizador durante varios ciclos; además, si esta se realiza de manera adecuada, se pueden llegar a mejorar propiedades de la enzima tales como estabilidad, especificidad (regio y enantio) y actividad (Palomo *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2007).

La inmovilización de lipasas sobre soportes hidrofóbicos permite la modulación de las propiedades catalíticas de la enzima por medio de la alteración del equilibrio conformacional existente, siendo así una buena estrategia para la preparación de biocatalizadores (Manoel *et al.*, 2015). Esta metodología de inmovilización es reversible y se basa en la adsorción física de la enzima a la superficie del soporte mediante interacciones débiles (Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), lo que hace que bajo algunas condiciones este tipo de protocolos sean poco efectivos debido a la desorción de la enzima; sin embargo, las metodologías usadas para la inmovilización por adsorción en soportes hidrofóbicos son sencillas, económicas y permiten el re uso del soporte luego de que el biocatalizador se inactive, lo que hace de la

inmovilización por adsorción una de las metodologías más utilizadas industrialmente (Knezevic *et al.*, 2007).

Entre los tipos de materiales sobre los que se suelen adsorber las enzimas cabe destacar la agarosa: este compuesto es un polímero natural que comúnmente se suele utilizar para la separación de ácidos nucleicos, aunque cada vez es más común su uso para la inmovilización de enzimas, principalmente debido a su estructura morfológica y sus buenas propiedades de adsorción (Jesionowski *et al.*, 2014). Gracias a dichas propiedades la agarosa ha sido utilizada para generar nuevos materiales los cuales permiten una unión mucho más fuerte entre enzima y soporte, en el caso de las lipasas aprovechando el mecanismo de activación interfacial que estas presentan se han logrado uniones mucho más fuertes modificando la agarosa utilizada como soporte con grupos funcionales tales como butilo, hexilo, fenilo y octilo (Figura 8) lo que implica derivados más estables e incluso más activos en muchos casos. La agarosa y sus derivados son materiales muy versátiles para la preparación de soportes utilizados en la inmovilización de enzimas, ya que no solo permiten generar adsorciones hidrofóbicas sino que incluso se pueden llegar a preparar soportes para la inmovilización mediante enlaces covalentes oxidando los grupos hidroxilo de los soportes de partida a aldehídos, como es el caso de la glioxil agarosa (Bastida *et al.*, 1998; Palomo *et al.*, 2006; Fernández-Lorente *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2016).

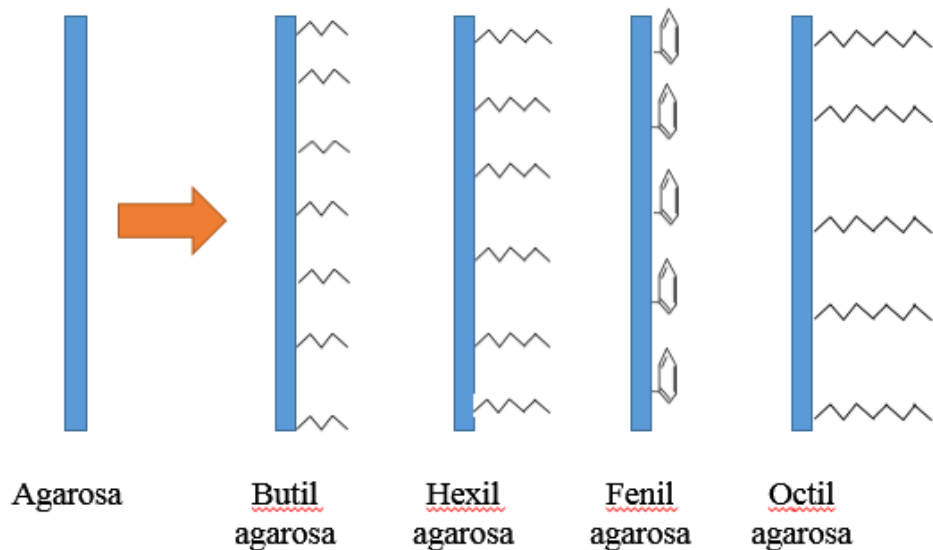


Figura 8: Soportes hidrofóbicos preparados a partir de la agarosa.

A pesar de que usando soportes altamente hidrofóbicos se consigue una mayor estabilidad en comparación con la enzima en solución, en muchos casos se genera una pérdida de actividad en el biocatalizador durante algunas reacciones donde las condiciones no son tan suaves (ej: alta temperatura, uso de solventes orgánicos, detergentes) (Rueda *et al.*, 2015). Esta pérdida de actividad se encuentra relacionada con la desorción de la enzima del soporte y se puede evitar recubriendo el biocatalizador con agentes que permitan una unión más fuerte como es el caso de la polietilenimina o el glutaraldehído (Fernández-Lorente *et al.*, 2006; Fernández-López *et al.*, 2017b).

2.5 Modificación de biocatalizadores con glutaraldehído

El glutaraldehído es uno de los compuestos más utilizados para la modificación de soportes y enzimas inmovilizadas, este puede estar presente en al menos 13 formas diferentes dependiendo de condiciones tales como pH, temperatura y concentración; dicha molécula actúa modificando los grupos amino primarios de la proteína y/o el soporte, para que eventualmente puedan reaccionar con otros grupos funcionales (Migneault *et al.*, 2004). Este modificador actúa sobre grupos amino primarios y tioles que se encuentren en la superficie de la enzima (residuos lisina y cisteína principalmente), para que eventualmente puedan reaccionar con otros grupos como tioles, imidazoles y fenoles (Barbosa *et al.*, 2012a). Haciendo uso del glutaraldehído para la modificación de biocatalizadores se puede lograr inducir una mayor estabilidad, la cual es atribuida a nuevas interacciones que se dan entre enzima-enzima o enzima-soporte (Barbosa *et al.*, 2012b).

En 2012 Barbosa *et al.* modificaron con glutaraldehído biocatalizadores preparados a partir de CALB mediante activación interfacial en soportes de octil agarosa, los autores determinaron mediante SDS-PAGE que cuando la inmovilización transcurría de manera rápida (fosfato 5 mM) se generaban agregados, los cuales están asociados a un entrecruzamiento intermolecular luego de la modificación con glutaraldehído; seguidamente al disminuir la velocidad de inmovilización haciendo uso de etanol y luego modificar los derivados obtenidos solo se detectaba la presencia de monómeros adsorbidos en el soporte, estos últimos biocatalizadores presentaron una alta estabilidad e hiperactivación lo que indica que en este caso la modificación también tuvo un efecto positivo, posiblemente por la inducción de un entrecruzamiento intermolecular (Barbosa *et al.*, 2012b). En este mismo año estos autores demostraron la versatilidad del glutaraldehído en la modificación de

biocatalizadores utilizando la lipasa de *Candida antarctica B* (CALB), ya que luego de modificado el soporte aminado MANAE-agarosa (Monoaminoetil-*N*-aminoetil-agarosa) dependiendo de las condiciones de la inmovilización se daba la unión entre la enzima y el soporte por mecanismos diferentes; por ejemplo, cuando se utilizó en la inmovilización alta fuerza iónica se demostró que la enzima se inmovilizaba por activación interfacial; cuando se preparó el biocatalizador sobre el mismo soporte en presencia de Tritón X-100 se demostró que la lipasa se inmovilizaba por intercambio iónico y cuando se preparaba el biocatalizador sobre el mismo soporte en presencia de alta fuerza iónica y Tritón X-100 los mecanismos de inmovilización anteriormente nombrados se evitaban y se daba una unión covalente tal como se puede ver en la Figura 9 (Barbosa *et al.*, 2012a). De acuerdo con lo anterior el glutaraldehído es una herramienta muy versátil para modificar tanto soportes como biocatalizadores, permitiendo mejorar la estabilidad de estos últimos bajo diferentes condiciones.

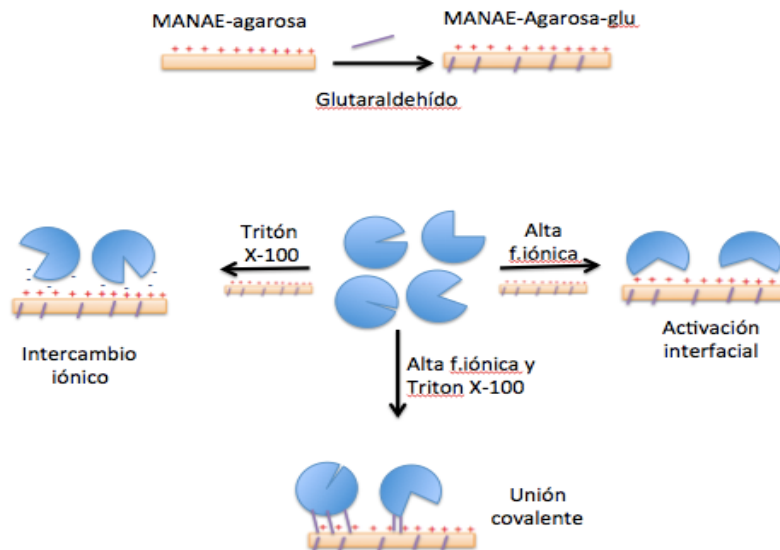


Figura 9: Versatilidad del glutaraldehído para modificar soportes preexistentes y conseguir diferentes tipos de inmovilización. Adaptado de “Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*” (Barbosa et al., 2012a).

2.5.1. Lipasa de *Rizomucor miehei* (RML): La lipasa de *Rizomucor miehei* (RML) fue descrita por primera vez en 1973 por Nagaoka et al. (Nagaoka & Yamada, 1973). Esta enzima tiene un peso de 31,6 kDa y un punto isoeléctrico de 3,8 (Derewenda & Derewenda 1991). Su estructura tridimensional fue determinada en 1990 por Brzozowski et al quienes encontraron que estaba compuesta por 269 residuos aminoacídicos entre los cuales Ser 144, His 257 y Asp 203 hacen parte de la triada catalítica de la lipasa de RML, siendo estos esenciales para su actividad catalítica (Brzozowski et al., 1990).

Inicialmente el uso de esta lipasa se limitó al campo de los alimentos, ya que pocos años después de que fue descrita se observó que usando RML era posible la modificación de

sabores en alimentos por lipólisis controlada de grasas (Pepler *et al.*, 1975). Un ejemplo de esta aplicación es el uso de esta enzima para la maduración acelerada de quesos como el queso Ligvano; este, se consume tradicionalmente en Irán y su proceso de maduración dura aproximadamente 3 meses, haciendo uso de RML se consiguen cambios en la textura, microestructura y contenido de ácidos grasos libres en un tiempo más corto (Aminifar & Emam-Djomeh, 2014).

El amplio uso de RML en la industria de los alimentos se debe a que no solo es capaz de atacar efectivamente a grasas de la leche sino también a grasas provenientes de fuentes naturales muy diversas como los aceites vegetales, el sebo de res y el aceite de manteca de cerdo, además de muchos otros sustratos sintéticos (ej: ésteres de ácidos grasos con sorbitol) (Moskowitz *et al.*, 1977). Otra de las industrias que frecuentemente usa lipasas en sus procesos es la industria de los aceites vegetales, en algunos casos se busca la hidrólisis parcial de los acilglicerol presentes en estos lo que permite modificar sus propiedades (Taylor *et al.*, 2007). En estos casos se prefiere el método enzimático de hidrólisis ya que por métodos habituales de hidrólisis de aceites para la obtención de ácidos grasos libres y glicerol se necesitan altas temperaturas y presiones, estas condiciones extremas dan lugar a la polimerización del aceite lo que conlleva a la formación de una gran cantidad de subproductos, en el caso de la hidrólisis enzimática al ser las lipasas altamente específicas se evita la formación de productos indeseados (Rodriguez & Fernández-Lafuente, 2010).

Con el paso de los años ha ido aumentando la cantidad de industrias que utilizan RML, principalmente debido a su alta estabilidad, actividad y especificidad bajo diferentes

condiciones; se ha reportado su uso como biocatalizador para la obtención de compuestos de alto valor agregado, entre estos ésteres de isoamilo, ésteres de terpenos, biodiesel y compuestos enantioméricamente puros (Turner *et al.*, 2003; Rodríguez & Fernández-Lafuente, 2010b; Guisán *et al.*, 2011; Fernández-Lafuente *et al.*, 2016b).

Una de las metodologías más sencillas para la preparación de biocatalizadores de RML es la adsorción sobre soportes hidrofóbicos: mediante este protocolo la enzima se inmoviliza por activación interfacial, mecanismo que ya ha sido ampliamente estudiado en RML (Brzozowski *et al.*, 1991). Para la unión en soportes hidrofóbicos se suelen utilizar principalmente derivados de la agarosa los cuales permiten una alta hiperactivación de la enzima; en algunas ocasiones se puede dar la formación agregados bimoleculares los cuales se evidencian con una baja actividad de la enzima inmovilizada; esta situación se pueden evitar haciendo uso de surfactantes neutros como Tritón X-100 (Palomo *et al.*, 2003). También se encuentran en la literatura muchos biocatalizadores preparados a partir de RML en otros tipos de soporte, ya que se ha demostrado que se da la hiperactivación de RML tanto en soportes hidrofóbicos como en soportes heterofuncionales y en soportes que permiten la inmovilización mediante intercambio iónico (Filice *et al.*, 2011; Manoel *et al.*, 2015; Fernández-Lafuente *et al.*, 2016a; Garmroodi *et al.*, 2016; Rueda *et al.*, 2016).

2.5.2 Lipasa de *Candida antarctica* B (CALB): CALB fue descrita por primera vez en 1989 por Michiyo *et al.* la cual proviene de la levadura *Candida antarctica* (Michiyo *et al.*, 1989). Luego de una serie de expediciones a la Antártida con la intención de encontrar enzimas con propiedades inusuales, se encontró este organismo a partir del cual se purificaron dos lipasas, la lipasa A y B (CALA y CALB). CALA es ligeramente más termoestable que CALB pero a diferencia de esta es dependiente del calcio (Anderson *et al.*, 1998). CALB tiene un peso molecular de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 6 (Patkar *et al.*, 1993). Esta enzima es estable en un amplio rango de pH pero exhibe un máximo de actividad en condiciones alcalinas (Kirk & Würtz, 2002). Esta lipasa en comparación con otras tiene un *lid* pequeño que no recubre totalmente el sitio activo cuando se encuentra en su conformación cerrada, de esta forma la activación interfacial que CALB presenta en presencia de interfaces hidrofóbicas no es tan clara (Martinelle *et al.*, 1995; Skjøt *et al.*, 2009).

La estructura tridimensional de CALB fue dilucidada en 1994 por Uppenberg *et al.* determinando que esta consta de 317 residuos aminoacídicos donde Ser 105, His 224 y Asp 187 hacen parte de su triada catalítica, adicionalmente se determinó que Gly 39 y Thr 40 son parte del agujero del oxianión siendo así fundamentales para la estabilización del IT1 (Uppenberg *et al.*, 1994). Seguidamente se encontró que CALB es bastante resistente frente a una amplia gama de solventes apolares como el hexano y el isooctano, aunque también es estable y activa en solventes más polares como acetonitrilo, acetona y dioxano permitiendo así poder utilizar CALB como catalizador en reacciones con sustratos bastante apolares, como los precursores usados en síntesis orgánica (Pastor *et al.*, 1995; Baldessari *et al.*, 1996).

La robustez que exhiben los biocatalizadores preparados a partir de CALB hacen que sea de las lipasas más utilizadas tanto para Química fina como en procesos a escala industrial (Kirk & Würtz, 2002; Solano *et al.*, 2012). En 2001 la empresa Schering-Plough implementó un proceso desarrollado por Homann *et al* donde haciendo uso de Novozyme 435 (versión comercial inmovilizada de CALB) se lograba la desimetrización del dietil 3-(3,4 – diclorofenil)glutarato a su correspondiente (S)-2 monoéster; esta molécula es un intermediario quiral para la síntesis de antagonistas de los receptores de taquicinas NK1 y NK2 los cuales tienen potencial actividad en el tratamiento de enfermedades como asma, artritis y migraña; haciendo uso de este biocatalizador se logró escalar la reacción para producir 200 kg del (S) monoéster con 80% de rendimiento y un exceso enantiomérico mayor al 99% (Homann *et al.*, 2001).

En 2006 Gill *et al* utilizaron biocatalizadores de CALB para la obtención del (S)-ter-butil 2-carbamoyl-2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-carboxilato ((S)-5) el cual es un intermediario en la síntesis de saxagliptin (agente hipoglucémico oral), este compuesto fue preparado mediante amoniólisis estereoselectiva del éster correspondiente utilizando carbamato de amonio como donador, de esta forma se consiguió un rendimiento del 98% logrando superar los obtenidos por rutas químicas tradicionales (57-64 %); la empresa Bristol–Myers Squibb utilizando este proceso a escala industrial logró transformar completamente el éster (200g/L) con 81% de rendimiento y un exceso enantiomérico mayor al 99% (Gill & Patel, 2006) .

En 2007 la compañía Lvming Co. Ltd. estableció una línea de producción de biodiesel con capacidad de 10000 toneladas, haciendo uso de una técnica desarrollada por la Universidad Tecnológica de Beijing, en esta técnica se utilizó Novozyme 435 y un aceite residual con alto índice de acidez proveniente de Shanghái como materia prima; en este proceso se lograban rendimientos del 90% usando un reactor de tanque agitado y añadiendo 0,4% del peso del aceite en biocatalizador (Tan *et al.*, 2010). Según lo anterior, el uso de CALB se encuentra ampliamente extendido en diferentes procesos industriales, principalmente los que buscan la obtención de biodiesel y compuestos farmacológicamente activos, donde en muchos casos haciendo uso de biocatalizadores los procesos funcionan mejor que cuando se emplea otro tipo de catálisis.

2.5.3 El glicerol en la industria del biodiesel: El uso de metil ésteres de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) en motores de combustión interna es una alternativa viable para la sustitución de los combustibles fósiles, estos biocombustibles a diferencia de los anteriormente mencionados son fabricados a partir de materias primas renovables (aceites provenientes de plantas) o también recicladas (aceite de cocina reutilizado) lo que hace que disminuya su precio de producción (Yu *et al.*, 2013) Los FAME al ser utilizados en motores de combustión interna generan una potencia ligeramente inferior a la que se da cuando se utilizan combustibles fósiles, la cual es compensada con una disminución en las emisiones de gases nocivos a la atmósfera (Armando *et al.*, 2015).

La obtención de biodiesel se lleva a cabo principalmente por la transesterificación de los triglicéridos (TAG) provenientes de aceites vegetales donde se forma como subproducto glicerol; dicho compuesto en su estado puro es un producto de comercio bien reconocido con una producción de entre $500 - 750 \times 10^3$ toneladas/año, lo cual se refleja en su precio relativamente alto que oscila entre \$ 0.60 - 0.90 / lb; sin embargo los países que han ido sustituyendo el uso de combustibles fósiles por biodiesel han empezado a presentar serios problemas con dicho subproducto, ya que este además de producirse en grandes cantidades se encuentra contaminado con trazas de los materiales utilizados en el proceso de producción con lo que se disminuye su valor agregado (Werpy & Petersen, 2004).

En América latina la producción de biodiesel es baja si se compara con otros países del tercer mundo, ya que es más común el uso de combustibles fósiles como fuente de energía en los países menos desarrollados. Brasil es uno de los mayores productores de biocombustibles en América, lo cual hace que el glicerol residual producto de este proceso este bastante desvalorizado llegando incluso al punto en que muchas empresas desechan este subproducto en vez de procesarlo para venderlo (Ayoub & Abdullah, 2012; Quirino *et al.*, 2014). En el año 2013 de Souza *et al.* propusieron una metodología con la que se busca darle solución a este problema; haciendo uso del biocatalizador comercial Novozyme 435 (20% w/w) llevaron a cabo la producción de acetinas mediante esterificación del glicerol a 60 °C bajo condiciones de flujo continuo utilizando diferentes agentes acilantes en razón molar 1:5 (agente acilante:glicerol). Los mejores resultados fueron obtenidos usando como agente acilante acetato de vinilo y con un tiempo de reacción de 24 h, llegando a obtener en estas condiciones un porcentaje de conversión de glicerol del 100 % y una selectividad de 98% en

la producción de diacetinas (De Souza *et al.*, 2013). La metodología de obtención de acetinas descrita por los autores puede ser una buena opción para la valorización del glicerol, sin embargo en esta se dan mezclas regioisoméricas de diacilglicerol lo que impide llegar a un producto puro el cual tendría una mayor demanda en la industria. Por ejemplo, en la industria farmacéutica y de Química fina se requiere evitar la generación de mezclas racémicas y regioisoméricas, debido a que se afecta la calidad y funcionalidad del producto deseado (Mori *et al.*, 2018).

2.5.4 Los diacilgliceroles: usos y rutas de obtención: Los diacilgliceroles (DAG) son lípidos utilizados en diferentes ramas de la industria como aditivos para mejorar la plasticidad de aceites y grasas, también como aceites comestibles y además suelen ser utilizados como base para la producción de medicamentos y cosméticos. Para la síntesis de estas moléculas se suelen utilizar medios químicos convencionales aunque recientemente se han venido implementando cada vez más las rutas enzimáticas, esto se debe al hecho de que mediante síntesis química hay problemas de regioespecificidad (Laszlo *et al.*, 2008). En muchas industrias como las de los aceites comestibles esto no es un problema, pero para la industria farmacéutica que demanda productos tanto regio como enantioisoméricamente puros puede ser muy costoso aplicar estas rutas a sus procesos, principalmente por la necesidad de proceder a través de una serie de pasos de protección y desprotección (Lok, 1978). En este caso las lipasas al ser regio y enantioselectivas son una opción mucho más efectiva para lograr la síntesis de los productos deseados con la pureza que la industria demanda.

También se ha publicado el uso de estas sustancias como profármaco para antibióticos y otras drogas que sean pobremente adsorbidas, ya que de esta forma se logra aumentar la lipofilidad de la molécula haciendo que para el cuerpo sea más fácil metabolizarla. En 2011 Dhaneshwar *et al* usaron 1,3-dipalmitina para generar un profármaco de la norfloxacin, un antibiótico de amplio espectro, entre estas dos moléculas se formó un enlace éster y se determinó que cuando se utilizaba el DAG para generar el profármaco se lograba optimizar los mecanismos farmacocinéticos de adsorción, distribución, metabolización y excreción de este (Dhaneshwar *et al.*, 2011).

Otra industria en auge en la cual se suelen utilizar lipasas para la generación de DAG son las empresas dedicadas a la producción de aceites comestibles (Di Cosimo *et al.*, 2013). Dichas industrias en los últimos años han sido de las más prosperas en la industria alimentaria, esto se debe en parte al alarmante índice de obesidad en muchos países desarrollados como Estados Unidos o Reino Unido, en este último se han invertido cerca de 240 billones de dólares en propaganda contra la obesidad (Lean *et al.*, 2010; Emmett & Chandra, 2015; Rosenthal *et al.*, 2017). Gracias al aumento de conciencia de los consumidores y a las legislaciones gubernamentales obligatorias que se han ido implementando sobre las grasas no tan saludables producto de toda esta publicidad, el mercado de aceites funcionales han logrado aumentar su volumen de ventas (Lo *et al.*, 2008).

Con la finalidad de frenar el aumento de la obesidad, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las grasas de mayor consumo por la población y su metabolismo, llegando a la conclusión de que la obesidad estaba asociada en parte a los aceites de cocina consumidos,

los cuales al ser provenientes de fuentes vegetales tienen un alto contenido en triacilgliceroles (Jensen *et al.*, 1999). A partir de 1999 la compañía Kao de Japón empezó a comercializar un aceite rico en DAG a los consumidores, este se producía por modificación de los aceites vegetales de consumo más frecuente en la población; la empresa afirmaba que luego de una serie de investigaciones se encontró que este aceite tiene características metabólicas que son distintas a las de los aceites de partida, ya que el consumo de aceite rico en DAG reduce los niveles séricos postprandiales de TAG y por lo tanto ayuda a la prevención y el tratamiento de la obesidad (Lo *et al.*, 2008). Estudios posteriores demostraron que el consumo de aceite rico en DAG era una forma eficaz de disminuir los niveles de obesidad tanto en animales como ratas y perros, como en humanos (Matsuyama *et al.*, 2006; Meng *et al.* 2004; Umeda *et al.*, 2006).

La hidrólisis de TAG contenidos en aceites vegetales para la producción de DAG inicialmente se llevaba a cabo haciendo uso de catálisis ácida, en este caso es necesario aplicar altas temperaturas y presiones para poder modificar el aceite; bajo estas condiciones tan extremas en muchas ocasiones se da la polimerización del aceite y se generan subproductos los cuales confieren un aspecto oscuro al producto final, algo muy diferente ocurre cuando se lleva a cabo la hidrólisis enzimática la cual evita todos estos problemas demostrando ser una buena opción para transformar aceites vegetales (Rodrigues & Fernández-lafuente, 2010b).

En 2007 Cheong *et al.* llevaron a cabo la hidrólisis parcial del aceite de palma haciendo uso de la lipasa de la versión comercial inmovilizada de RML (Lipozyme RM IM) en un

sistema libre de solvente, haciendo uso del biocatalizador en una proporción de 10% en peso de los sustratos a 65 °C durante 12 h en un bioreactor de lecho empacado en continuo obteniendo 9 kg de aceite rico en DAG (60% en peso) (Cheong *et al.*, 2007).

En 2011 Matos *et al.* sintetizaron DAG mediante hidrólisis parcial de aceite de palma catalizada por el biocatalizador lipásico PS Amano IM, en condiciones de flujo continuo y haciendo uso de radiación de microondas; los autores determinaron que en este caso con la radiación de microondas se obtienen conversiones moderadas en un tiempo corto (30% en 5 minutos), por otro lado haciendo uso de un reactor en flujo continuo se aumentó el porcentaje de conversión hasta 40% pero también aumentó el tiempo de operación (24 horas) (Matos *et al.*, 2011). De acuerdo con lo anterior, una de las alternativas de mayor viabilidad para la obtención de diacilgliceroles de alto valor agregado es mediante el uso de lipasas inmovilizadas, las cuales son de las enzimas más robustas que se conocen. Su uso se debe principalmente a su alta estereoespecificidad, enantioselectividad, versatilidad en la catálisis de diferentes reacciones (hidrólisis, metanólisis, esterificación, transesterificación, interesterificación) y la posibilidad de ser utilizadas en medios orgánicos, totalmente acuosos y además en medios de reacción no convencionales como líquidos iónicos (Schmid & Verger, 1998; Salihu & Alam, 2015; Barriuso *et al.*, 2016).

2.6 La triacetina y su potencial como sustrato para la obtención de moléculas con valor agregado

La triacetina es un aceite transparente derivado del glicerol, combustible y de sabor amargo, el cual se encuentra naturalmente en el aceite de hígado de bacalao, la mantequilla y otras grasas, ha sido utilizado como plastificante y solvente en formulaciones cosméticas, además de utilizarse como fijador de sabores y fragancias (Bonet *et al.*, 2009). A pesar de que este compuesto es utilizado en diferentes industrias su precio en el mercado disminuye de la misma forma que el precio del glicerol, ya que a partir de esta molécula es relativamente sencilla la producción de triacetina; de esta forma, llevando a cabo la esterificación del glicerol con ácido acético hasta su correspondiente TAG (triacetina) no se consigue un aumento considerable del valor agregado, lo que lleva a la búsqueda de nuevas rutas para la valorización de gliceril derivados.

Se ha demostrado que las lipasas funcionan bien como biocatalizadores para la producción de diacetina a partir de la triacetina, donde dicho producto se puede obtener mediante diferentes reacciones. En el 2011 Hernandez *et al.* inmovilizaron CALB y RML mediante adsorción sobre soportes altamente hidrofóbicos (octadecilsepabeads) y por unión covalente (glutaraldehídosepabeads). Los autores demostraron que los biocatalizadores probados fueron efectivos en reacciones de hidrólisis selectiva llegando a obtener los mejores rendimientos con las enzimas físicamente adsorbidas; adicionalmente, haciendo uso de la ingeniería del medio demostraron que bajo las condiciones adecuadas se minimizaba la migración de grupos acilo en el producto final y se lograba obtener un racemato de un diglicerido regioisoméricamente puro (1,2-diacetina) (Hernández *et al.*, 2011).

Haciendo uso de lipasas y mediante reacciones selectivas es posible convertir la triacetina a una mezcla racémica de 1,2-diacetina, a partir de la cual se pueden generar nuevas moléculas aumentando así su valor agregado. Por ejemplo en 1989 Puriceli basándose en el esqueleto de la 1,2-diacetina obtuvo el diacetil derivado de la α -glicerofosforil etanolamina (O-(1,2 di-O-acetil-glicero-3-fosforil)etanolamina), de esta forma se consiguió un producto con alto valor agregado ya que este compuesto es utilizado como fármaco para el tratamiento de la arteriosclerosis cerebral (Puricelli, 1989).

En 2002 Von Minden *et al* usaron 1,2-diacetina como bloque de construcción para la generación de varios glicosildiacylgliceroles los cuales al presentar propiedades de “cristal líquido” pueden ser utilizados para la fabricación de pantallas en dispositivos electrónicos y para generar vidrio inteligente, el cual es el nuevo sustituto de las cortinas, permitiendo opacar o aclarar una ventana mediante un campo eléctrico (Von Minden *et al.*, 2002). Según lo anterior haciendo uso de lipasas inmovilizadas y minimizando las probabilidades de migración de acilos es posible obtener un diglicérido regioisoméricamente puro con un centro quiral en su estructura a partir de la triacetina (1,2-diacetina), la cual se puede utilizar como bloque de construcción para la obtención de compuestos de mayor valor agregado.

3. Metodología

3.1 Materiales y reactivos

La lipasa de *Candida antarctica B* (CALB) fue adquirida a través de Coldanzimas Ltda (Bogotá, Colombia), la lipasa de *Rizomucor miehei* (RML), las versiones comerciales de la lipasa de CALB (Novozyme 435) y RML (Lipozyme RM IM), la octil agarosa, el glutaraldehído, la monoacetinas, las diacetinas y los sustratos butirato de *para*-nitrofenilo (*p*-NPB) y triacetina fueron adquiridos a través de la casa comercial Sigma Aldrich (Bogotá, Colombia). Todos los solventes fueron de grado analítico también suministrados por Sigma Aldrich.

3.2 Métodos experimentales

En la Figura 10 se muestra el esquema de la preparación de biocatalizadores y su uso en las reacciones llevadas a cabo en este estudio.

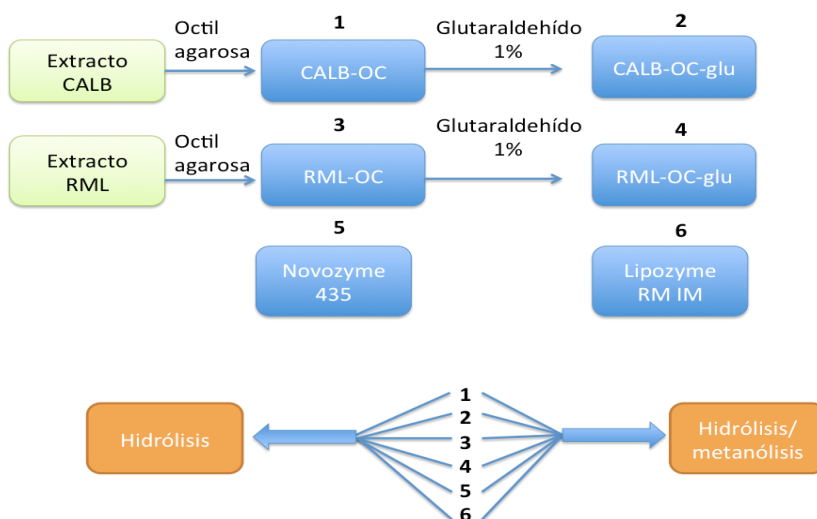


Figura 10: Biocatalizadores a utilizar en las reacciones enzimáticas. Verde: extractos, Azul: biocatalizadores, naranja: reacciones enzimáticas.

3.2.1. Inmovilización de las lipasas sobre octil agarosa: La inmovilización mediante unión hidrofóbica se realizó según el procedimiento descrito por Fernández-Lorente et al (Fernández-Lorente et al., 2008). Inicialmente se lavó el soporte previamente con agua destilada para eliminar el etanol presente en la matriz polimérica el cual se usa como agente conservante.

La adsorción sobre octil agarosa se llevó a cabo manteniendo una relación 1:10 entre solución enzimática y soporte. La dilución enzimática se preparó en buffer fosfato pH 7 y 5 mM, esta se agitó junto a la octil agarosa en un agitador de tubos (roller) a 200 RPM y 25 °C. Periódicamente se evaluó el proceso de inmovilización midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del éster *p*-NPB (butirato de *para*-nitrofenilo).

Para la recuperación del biocatalizador se filtró al vacío en un embudo de capa filtrante G3 y se lavó con 4 volúmenes de agua tipo I, el biocatalizador obtenido se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

3.2.2 Hidrólisis de triacetina: Las reacciones de hidrólisis de triacetina se realizaron según lo descrito por Hernández *et al* (Hernández *et al.*, 2011). Inicialmente se disolvió la triacetina en buffer acetato pH 5 y 100 mM hasta una concentración de 100 mM de sustrato, luego de preparado el medio se añadió el biocatalizador y se agitó durante 3 horas en un shaker a 200 RPM utilizando como reactor un vial de vidrio con tapa de 20 mL. Para catalizar la reacción se utilizaron los dos derivados preparados en el laboratorio y sus versiones comerciales inmovilizadas (Novozyme 435: CALB inmovilizada por adsorción en una resina acrílica, Lipozyme RM IM: RML inmovilizada por intercambio iónico en una resina macroporosa). Periódicamente se tomaron alícuotas de 200 µL del medio las cuales se centrifugaron a 10000 RPM durante 2 minutos para separar el biocatalizador de los productos de reacción, por último los sobrenadantes se almacenan en viales para su posterior análisis por HPLC.

3.2.3 Hidrólisis/metanólisis de triacetina: Las reacciones de hidrólisis/metanólisis se llevaron a cabo en medios acuosos compuestos de buffer 100 mM pH 5 (acetato y MES (ácido 2-etanosulfónico)) y 50% de metanol. Inicialmente se preparó el medio disolviendo la triacetina hasta una concentración 1 M ajustando el pH del medio a 5 usando de HCl diluido. Posteriormente se añadió el biocatalizador y se agitó durante 5 horas en un shaker a 200 RPM. Para catalizar la reacción se utilizaron los dos derivados preparados en el laboratorio y sus versiones comerciales inmovilizadas. Periódicamente se tomaron alícuotas del medio las cuales se centrifugaron a 10000 RPM durante 2 minutos para separar el biocatalizador de los productos de reacción, por último los sobrenadantes se almacenaron en viales para su posterior análisis por HPLC.

3.2.4 Estabilidad de los biocatalizadores en el medio de reacción: Con la finalidad de determinar la estabilidad de los biocatalizadores en los medios de reacción en los cuales era probable la desorción de la enzima, estos se incubaron en un buffer MES pH 5 y 100 mM con 50% de metanol manteniendo una relación 1:10 entre biocatalizador y medio. Periódicamente se evaluó la desorción de la enzima en el biocatalizador midiendo la actividad residual de la suspensión en la hidrólisis del éster *p*-NPB.

3.2.5 Determinación de la variación del pH en el medio de hidrólisis/metanólisis: Para determinar si en las reacciones de hidrólisis/metanólisis el pH variaba por efecto de la enzima se incubaron los biocatalizadores en soluciones de pH 5 compuestas por 50% de metanol y buffer en una concentración 100 mM, estas se pusieron en agitación a 200 RPM y 25 °C durante 24 horas. Periódicamente se llevaron a cabo mediciones del pH en el medio de reacción haciendo uso de un pHmetro.

3.2.6 Efecto de los productos de reacción en la desorción de los biocatalizadores: Con el fin de estudiar el efecto de los productos de reacción en la desorción de la enzima en el biocatalizador, durante la reacción periódicamente se tomaron alícuotas las cuales se centrifugaron a 10000 RPM durante 2 minutos para separar el biocatalizador de los productos de reacción. Finalmente se tomó el sobrenadante al cual se le midió la actividad usando *p*-NPB como sustrato.

3.2.7 Aumento de la carga enzimática en biocatalizadores preparados en octil

agarosa: Teniendo en cuenta la concentración de proteína en los extractos enzimáticos se prepararon diferentes diluciones en buffer fosfato 5 mM y pH 7 aumentando cada vez más la cantidad de proteína. Seguidamente se pusieron en contacto 0,5 g del biocatalizador con las diferentes soluciones manteniendo una relación 1:10 entre soporte y solución, estas se agitaron en un roller a 200 RPM y 25 °C durante 24 horas. Periódicamente se evaluó el proceso de inmovilización midiendo la actividad residual de la suspensión y el sobrenadante en la hidrólisis del éster *p*-NPB.

3.2.8 Modificación de los biocatalizadores con glutaraldehído:

Los biocatalizadores a modificar se trataron con glutaraldehído según lo reportado por Barbosa *et al.* (Barbosa *et al.*, 2012). Estos se incubaron junto a una solución de glutaraldehído al 1% preparada en un buffer fosfato pH 7 y 5 mM manteniendo una relación 1:10 entre biocatalizador y solución, la mezcla se agitó en un roller a 200 RPM y 25 °C durante 1 hora. Para la recuperación del biocatalizador este se filtró al vacío y se lavó primero con exceso de buffer fosfato pH 7 y 25 mM y luego con agua tipo I con la finalidad de eliminar el exceso de glutaraldehído. El biocatalizador modificado con glutaraldehído se almacenó a 4 °C para su posterior uso.

3.3 Métodos analíticos

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

Bradford: Para la determinación de la concentración de proteína presente en cada una de las preparaciones enzimáticas, se utilizó el método colorimétrico de Bradford, usando albúmina de suero de bovino (BSA) como patrón (Bradford, 1976).

3.3.2 Medición de la actividad enzimática haciendo uso de butirato de *para-*

nitrofenilo (*p*-NPB): Para la medición de la actividad enzimática se realizó el ensayo de la hidrólisis del *p*-NPB según la metodología utilizada por Fernández-Lafuente *et al.* (Fernández-Lafuente *et al.*, 2016a). El ensayo se llevó a cabo midiendo en un espectrofotómetro UV Vis el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm, producido por la formación del producto *p*-nitrofenol generado por la hidrólisis de *p*-NPB 0.4 mM, disuelto en buffer fosfato 25 mM, pH 7 y a 25 °C . Para iniciar la reacción, 25 µL de solución lipásica o suspensión se añadieron al mismo volumen de sustrato disuelto en 1 mL del buffer anteriormente mencionado. Una unidad internacional de actividad de *p*-NPB se definió como la cantidad de lipasa que es necesaria para hidrolizar 1µmol de *p*-NPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente

Luego de obtener el valor de absorbancia arrojado por el espectrofotómetro se realizó el cálculo de la actividad volumétrica (A_v) como se ve en la siguiente ecuación

$$A_v = [(m \times V_{\text{ensayo}}) / (\epsilon \times b) \times V_{\text{enzima}}] \times 1000$$

Donde:

m = pendiente que se mide en el espectrofotómetro UV Vis

$\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinción molar del *p*-NPB)

$b = 1 \text{ cm}$ (ancho de la celda)

$V_{\text{ensayo}} = 1,05 \text{ mL}$

$V_{\text{enzima}} = 0,025 \text{ mL}$

Por último, conociendo la actividad volumétrica se realizó el cálculo de actividad específica (A_e) en unidades de enzima por gramo, sabiendo previamente la concentración de la enzima medida por el método de Bradford tal como se ve a continuación.

$$A_e = A_v/C$$

C = concentración de enzima (g/mL).

3.3.3 Análisis de los productos de reacción mediante RP-HPLC: Las alícuotas de reacción se analizaron mediante RP-HPLC; para el análisis se utilizó como detector un arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 210 nm haciendo uso de una columna Zorbax C18, se inyectaron 2 μL de cada muestra las cuales se eluyeron a través de la columna cromatográfica haciendo uso de un sistema binario de agua/acetonitrilo siguiendo el gradiente de elución que se presenta a continuación:

Tabla 1: *Gradiente de elución para cromatografía RP-HPLC.*

Tiempo (min)	Agua Tipo I (%)	Acetonitrilo (%)	Flujo (mL/min)	Presión máxima (bar)
0	95	5	1	300
1	95	5	1	300
2	95	5	1	300
3	90	10	1	300
15	90	10	1	300
16	70	30	1	300
25	70	30	1	300

Para la identificación de los productos se compararon los t_R obtenidos en las alícuotas de reacción con los de patrones certificados usando el mismo método cromatográfico y para la

posterior cuantificación se usaron curvas de calibración empleando el mismo material de referencia.

4. Resultados y discusión

4.1 Inmovilización de lipasas mediante adsorción interfacial en soportes de octil agarosa

Inicialmente con el fin de determinar la concentración de proteína en cada uno de los extractos se construyó una curva de calibración desde 0,1 a 1 mg/mL haciendo uso de BSA como patrón tal como se puede ver en el Apéndice A. Utilizando esta curva se calculó la concentración de proteína de los extractos lipásicos haciendo uso del método de Bradford. De esta manera se determinó la cantidad de proteína en el extracto de RML y CALB siendo esta 6,62 y 5,84 mg/mL respectivamente.

Teniendo en cuenta la cantidad de proteína en el extracto se realizó la dilución necesaria para cargar los biocatalizadores con 6,5 y 3,3 mg/g de soporte respectivamente. Estos se inmovilizaron por adsorción en geles de octil agarosa de acuerdo con lo propuesto por Bastida *et al* (Bastida *et al.*, 1998). Mediante esta metodología de inmovilización usando baja fuerza iónica y pH neutro se ha demostrado que es posible estabilizar la enzima e incluso

lograr que algunas lipasas exhiban una mayor actividad en comparación con la enzima libre; adicionalmente, debido a que en condiciones de baja fuerza iónica solo se adsorben las lipasas en este tipo de soportes dicho protocolo se puede aplicar tanto a extractos enzimáticos puros como crudos permitiendo la purificación, inmovilización e hiperactivación de muchas lipasas en un solo paso (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998; Sabuquillo *et al.*, 1998).

4.2 Inmovilización de RML en octil agarosa

En la Figura 11 se puede observar la cinética de inmovilización de la lipasa de *Rizomucor miehei* a baja fuerza iónica y pH neutro; en estas condiciones la enzima se adsorbe muy rápidamente llegando a obtenerse un porcentaje de inmovilización del 98% en 60 minutos.

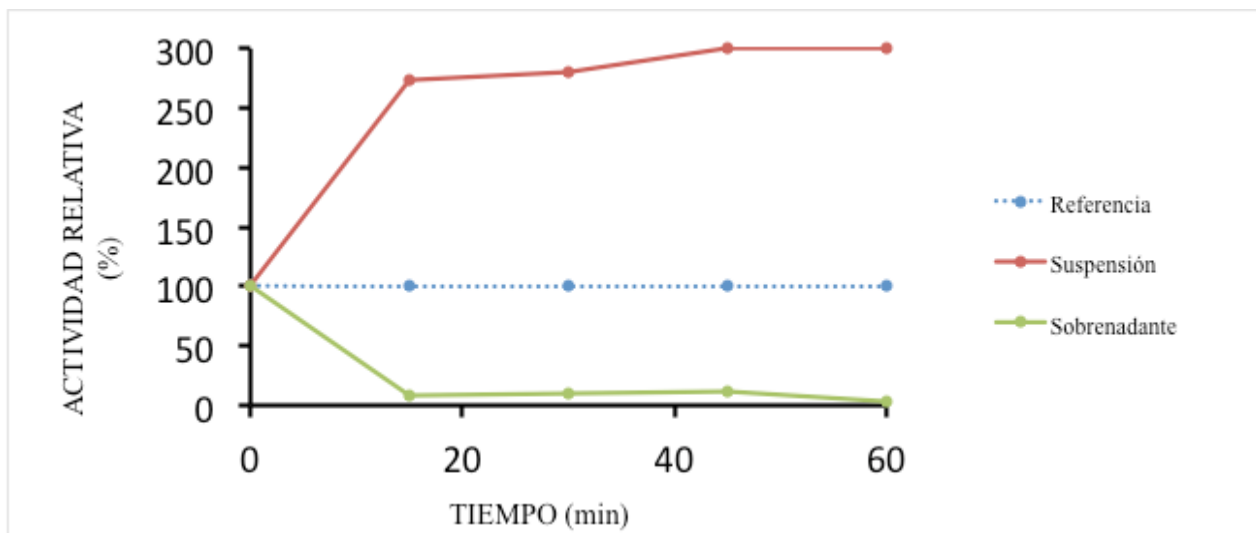


Figura 11: Cinética de inmovilización de la lipasa de *Rizomucor miehei* en geles de octil agarosa a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando *p*-NPB como sustrato.

Como se puede observar en la cinética de inmovilización la lipasa luego de ser adsorbida por el gel de octil agarosa exhibe una actividad 3 veces mayor que la enzima en solución. Este fenómeno se conoce como hiperactivación y es común para muchas lipasas como es el caso de *Rizomucor miehei* (Filice *et al.*, 2011; Palomo & Guisán, 2012; Garmroodi *et al.*, 2016). Dicho aumento de actividad se da por un mecanismo de activación mediante el cual la lipasa se une al soporte hidrofóbico; las lipasas, a diferencia de otras enzimas, exhiben actividad tanto en medio acuoso como en interfases, pero en este último caso la actividad enzimática aumenta considerablemente.

Las lipasas tienen su centro activo en un bolsillo altamente hidrofóbico el cual se encuentra excluido del medio de reacción por una cadena polipeptídica conocida como *lid* o

tapadera. Cuando las lipasas entran en contacto con una interfase como una gota de grasa o un soporte hidrofóbico mediante interacciones débiles esta tapadera se desplaza exponiendo el centro activo y quedando en una conformación abierta, por lo cual la conversión de sustrato por parte de la enzima es mucho más fácil. Algo muy diferente ocurre cuando la enzima se encuentra en solución ya que en este caso hay un equilibrio entre la conformación abierta y cerrada pero este se encuentra mayoritariamente desplazado hacia su forma cerrada (Brzozowski *et al.*, 1991a).

A pesar de que mediante la activación interfacial con soportes de octil agarosa la lipasa se une mediante fuerzas débiles cerca de su sitio activo no se da un bloqueo de este luego de la inmovilización, principalmente debido a la morfología del soporte. La octil agarosa es un sólido poroso modificado con cadenas de ocho carbonos que permiten aumentar la hidrofobicidad del soporte lo que lo hace idóneo para este tipo de inmovilizaciones. Adicionalmente, éste polímero está formado por fibras medianamente gruesas que reducen la congruencia geométrica entre el centro activo de la enzima y el soporte, reduciendo de esta forma el bloqueo del centro activo luego de la adsorción (Fernandez-lorente *et al.*, 2008).

4.3 Inmovilización de CALB en octil agarosa

En la Figura 12 se observa la cinética de inmovilización de la lipasa de *Candida antarctica B* a baja fuerza iónica y pH neutro; en el caso de esta lipasa también se da una adsorción rápida llegando a inmovilizar el 99% de la enzima en 60 minutos. Sin embargo, para esta

lipasa no se da una hiperactivación como en el caso de RML sino que por el contrario el derivado inmovilizado exhibe el 60% de la actividad que presentaba en solución.

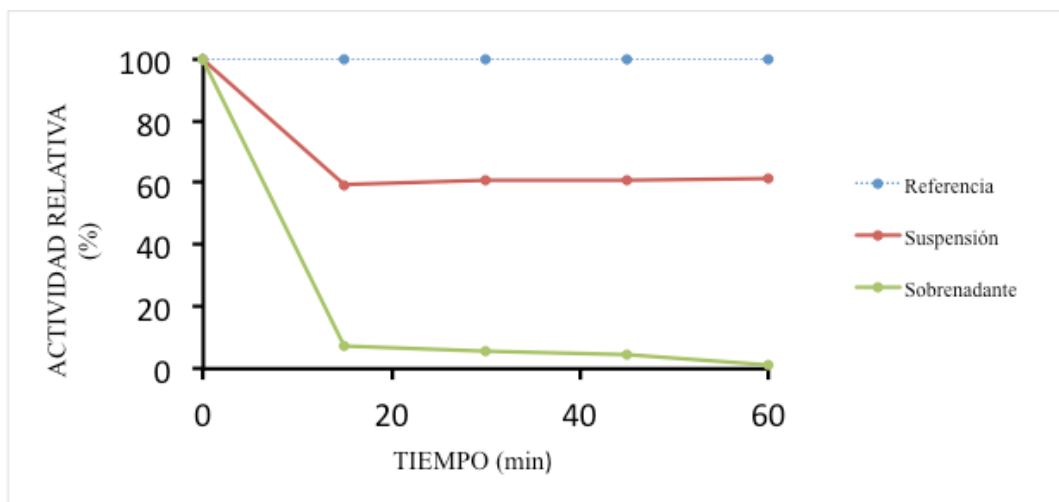


Figura 12: Cinética de inmovilización de la lipasa de *Candida antarctica B* en geles de octil agarosa a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando *p*-NPB como sustrato.

En la mayoría de las lipasas el hecho de inmovilizar sobre soportes hidrofóbicos genera efectos positivos sobre la actividad tales como la hiperactivación de la enzima; sin embargo, algo muy diferente ocurre con CALB donde por el contrario el biocatalizador preparado en octil agarosa presenta menos actividad que la enzima en solución, lo cual concuerda con estudios previos (Martinelle *et al.*, 1995; Peirce *et al.*, 2016; Rotticci, 2000). En el caso de CALB durante muchos años se discutió si la enzima presentaba o no una tapadera que excluyera el centro activo de la enzima del medio de reacción ya que esta no exhibe la

hiperactivación propia del mecanismo de activación interfacial de las lipasas (Martinelle *et al.*, 1995; Wang, 2017).

Actualmente, mediante cristalografía de rayos X y modelamiento molecular se ha concluido que CALB si presenta una cadena polipeptídica que actúa como *lid*, sin embargo la tapadera es tan pequeña que no excluye totalmente el centro activo del medio de reacción (Skjøt *et al.*, 2009). Según lo anterior, el hecho de que la lipasa inmovilizada no exprese más actividad que la enzima en solución se debe principalmente al tamaño de su tapadera; adicionalmente en este caso la pérdida de actividad de 40% después de la inmovilización puede asociarse con una distorsión de la conformación más activa de la enzima por efecto de las fuerzas hidrofóbicas que generan la adsorción sobre el soporte.

En la Tabla 2: Actividad de los biocatalizadores preparados mediante adsorción en geles de octil agarosa usando p-NPB como sustrato, carga enzimática y porcentaje de inmovilización se muestran la actividad, carga enzimática y porcentaje de inmovilización para los dos biocatalizadores preparados; como se puede observar la actividad específica del derivado CALB-OC es mayor que la del derivado RML-OC, lo cual se debe al hecho de que en el caso de CALB-OC este biocatalizador se cargó con la mitad de proteína para la inmovilización que con la que se preparó el derivado RML-OC, principalmente con el fin de evitar la formación de agregados lipasa-lipasa a la hora de la inmovilización. En el caso de CALB mediante estudios cristalográficos se ha demostrado también la formación de agregados bimoleculares incluso a baja concentración de proteína (Uppenberg *et al.*, 1994). También se ha demostrado la formación de este tipo de estructuras en otras lipasas con baja

tendencia a la hiperactivación como es el caso de la de *Pseudomona fluorescens* donde la inmovilización conlleva a alteraciones en la estabilidad y actividad (Fernández-Lorente *et al.*, 2003).

Tabla 2: Actividad de los biocatalizadores preparados mediante adsorción en geles de octil agarosa usando *p-NPB* como sustrato, carga enzimática y porcentaje de inmovilización

Biocatalizador	RML-OC	CALB-OC
Actividad (U/g soporte)	37,6 ± 3,0	33,4 ± 2,0
Actividad específica (U/mg proteína)	5,68 ± 1,3	11,4 ± 0,9
Carga enzimática en el biocatalizador (mg/g soporte)	6,46 ± 0,2	3,3 ± 0,3
Porcentaje inmovilización	98,0 ± 1,1	99,1 ± 0,2

De acuerdo con lo anterior la inmovilización mediante activación interfacial es una buena metodología para la obtención de biocatalizadores, estos soportes permiten la adsorción de cantidades bajas de proteína con buenos porcentajes de inmovilización en un tiempo corto.

Además mediante este protocolo es posible obtener actividades superiores a 30U/g de soporte frente a sustratos pequeños como el *p*-NPB.

4.4 Hidrólisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas

Inicialmente se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis haciendo uso de las versiones comerciales inmovilizadas de las lipasas de *Candida antarctica B* (Novozyme 435) y *Rizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), para efectuar dichas reacciones se usaron las condiciones de hidrólisis de triacetina previamente descritas por Hernández *et al.* (Hernández *et al.*, 2011).

Lipozyme RM IM es un biocatalizador preparado a partir de RML pero haciendo uso de un protocolo distinto al utilizado en esta investigación, por ende las propiedades finales del derivado van a ser distintas. En este caso la lipasa se encuentra inmovilizada en una resina macroporosa llamada Duolite ES 562, este soporte es un intercambiador aniónico débil basado en co-polímeros de fenol-formaldehído (Eigved, 1989; Rodrigues & Fernández-Lafuente, 2010a). En la Figura 13 se muestra el curso de reacción para la hidrólisis de triacetina catalizada por Lipozyme RM IM. En este caso durante los primeros 60 minutos la velocidad de reacción es lenta ya que hay un bajo consumo de triacetina y una producción moderada de 1,2-diacetina, seguidamente la cantidad de este producto va aumentando gradualmente hasta los 120 minutos, donde a partir de este punto la cantidad de sustrato y

producto varían muy lentamente permitiendo así obtener un máximo de conversión de 1,2-diacetina de 12 % a los 180 minutos de reacción.

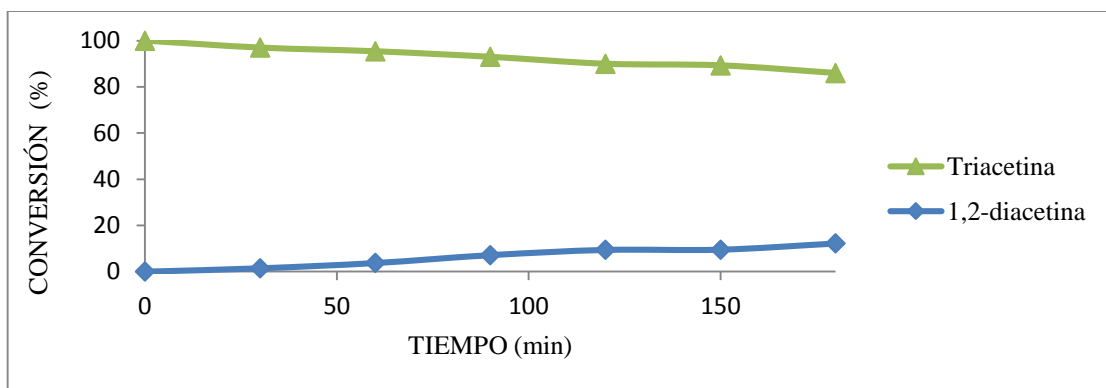


Figura 13: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por Lipozyme RM IM en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Para estas reacciones de hidrólisis es necesario ajustar el pH del medio a 5 antes de agregar el biocatalizador, ya que bajo estas condiciones se ha observado una minimización en la probabilidad de la migración de grupos acilos en diglicéridos de la triacetina (Hernández *et al.*, 2011). En este estudio, para todos los biocatalizadores utilizados en la hidrólisis de triacetina, el valor del pH del medio luego de 180 minutos de hidrólisis bajaba su valor en una unidad por efecto del ácido acético liberado al medio producto de la hidrólisis del triglicérido. En este caso al utilizar Lipozyme RM IM como biocatalizador no se observó la presencia del regioisómero 1,3 lo que infiere que valores de pH menores no generan isomerización en el producto de interés. Sin embargo, haciendo uso de este derivado se obtienen bajos porcentajes de conversión y velocidades de reacción muy lentas, los cuales pueden explicarse por la cercanía que hay entre el valor de pH final del medio y el punto

isoeléctrico de la lipasa, ya que entre más parecidos sean estos dos valores mayor es la probabilidad de la desorción de la enzima.

En el protocolo de preparación de Lipozyme RM IM se logra una inmovilización por intercambio iónico en el soporte Duolite ES 562 usando altas cargas proteicas incubando la enzima y el soporte en pH entre 5 y 7, de esta forma se consigue inmovilizar aproximadamente el 80% de la enzima ofrecida consiguiendo biocatalizadores muy activos (5000-50000 LU/g) (Eigved, 1989). Estos son obtenidos gracias a la morfología del soporte, ya que al ser Duolite ES 562 un polímero macro poroso permite una mayor área de contacto entre la enzima y el soporte logrando así aumentar la fuerza de unión multipuntual mediante intercambio iónico (Cao & Schmid, 2006).

Es bien sabido que el hecho de inmovilizar lipasas en soportes porosos permite una mayor estabilidad operacional, ya que al encontrarse la enzima inmovilizada dentro de los poros se encuentra en su microambiente protegida del medio por el soporte (Garcia-Gálan *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013). Sin embargo, en las reacciones de éste trabajo se observó poca resistencia mecánica por parte del biocatalizador, donde luego de transcurridos 30 minutos en el reactor comenzaba a aparecer una suspensión fina la cual iba aumentando a medida que avanzaba la reacción (Figura 14), lo que implica que a mayor tiempo de reacción menor tamaño de partícula y mayor área superficial del biocatalizador.

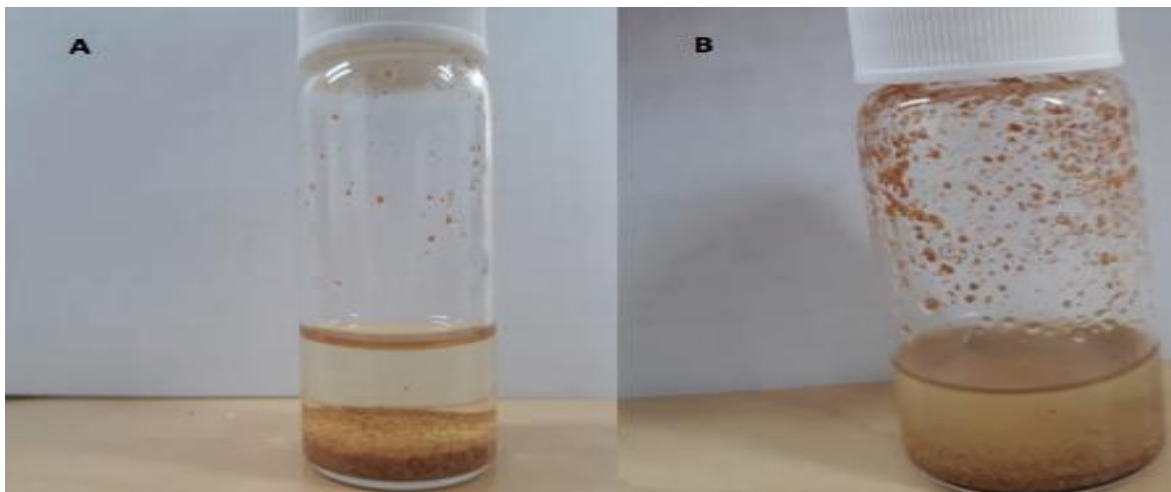


Figura 14: Fragmentación de las partículas del biocatalizador Lipozyme RM IM por efecto de la agitación. **A)** 15 minutos de reacción; **B)** 3 horas de reacción.

El valor del pH en el reactor fue 4, esto implica la minimización de interacciones electrostáticas entre enzima y soporte en este tipo de biocatalizador, ya que al estar éste valor de pH cercano al punto isoeléctrico de la lipasa esta deja de adsorberse puesto que su carga neta es cercana a cero. En este caso, a pesar de que en Lipozyme RM IM la enzima se encuentre protegida por el soporte el hecho de que este se reduzca a partículas cada vez más pequeñas hace que la lipasa se encuentre expuesta al medio.

La Figura 15 muestra la hidrólisis de la triacetina catalizada por Novozyme 435, en donde se puede apreciar la producción tanto de la 1,2 como de la 1,3-diacetina. A pesar de los porcentajes de conversión bajos obtenidos con Lipozyme RM IM esta presentó regioselectividad solo hacia la producción del DAG 1,2 a diferencia de cuando se utilizó Novozyme 435.

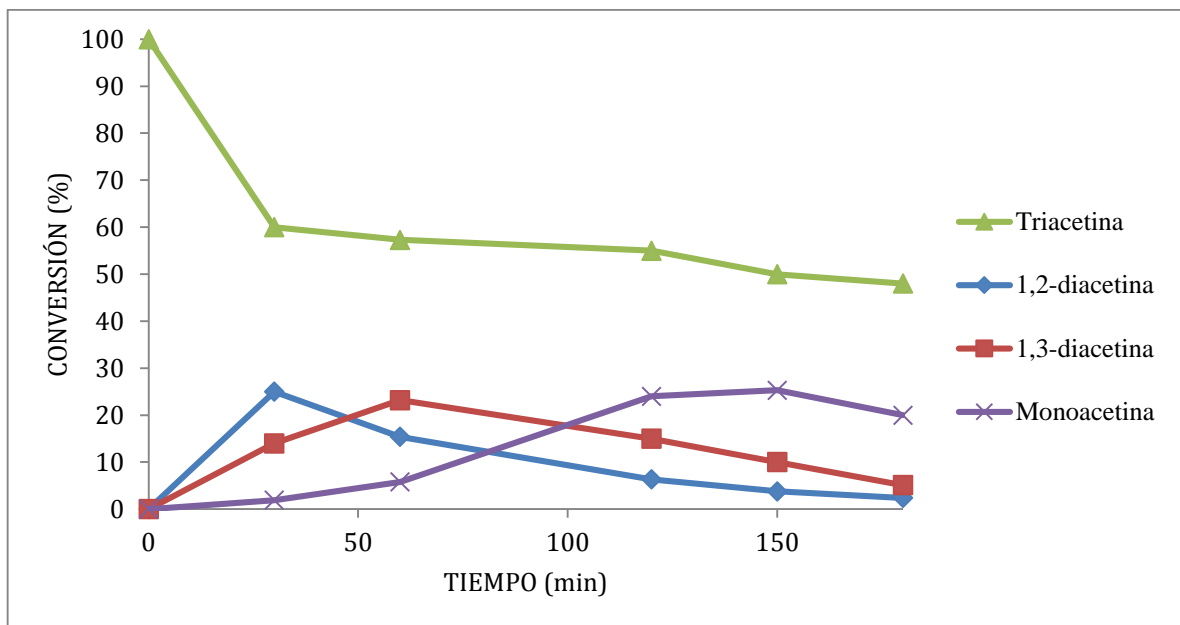


Figura 15: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por Novozyme 435 en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Utilizando Novozyme 435 como biocatalizador, se obtuvo un máximo de conversión de 25% en la producción de 1,2-diacetina en 30 minutos. Sin embargo, durante todo el curso de reacción se ve la presencia del regioisómero 1,3 el cual a partir de los 60 minutos se encuentra presente en una mayor proporción. Los resultados obtenidos haciendo uso de Novozyme 435 contrastan con los de los biocatalizadores preparados en el laboratorio, ya que en este último caso ambas lipasas fueron regioselectivas solo hacia la producción del 1,2-DAG permitiendo así obtener los mejores porcentajes de conversión, tal como se ve en la Tabla 3.

Tabla 3: *Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina (0,1 M).*

Biocatalizador	Conversión máxima	Tiempo de obtención
	1,2-diacetina	del máximo
	(%)	(min)
RML-OC	81,8±1,7	60,0
CALB-OC	71,8±1,1	30,0
Novozyme 435	25,0±2,0	30,0
Lipozyme RM IM	12,2±1,3	180

En la Figura 16 se muestra el curso de reacción para la hidrólisis de triacetina catalizada por CALB-OC. Para este caso, el porcentaje de conversión de 1,2-diacetina aumenta más de tres veces si se compara con la versión comercial de la misma lipasa. Haciendo uso de CALB-OC como biocatalizador se obtiene un 72 % de conversión en 30 minutos permitiendo la acumulación rápida del regioisómero de interés. A tiempos mayores de 30 minutos se observa la hidrólisis del 1,2-DAG a su respectivo monoglicérido, por lo que es necesario detener la reacción a los 30 minutos.

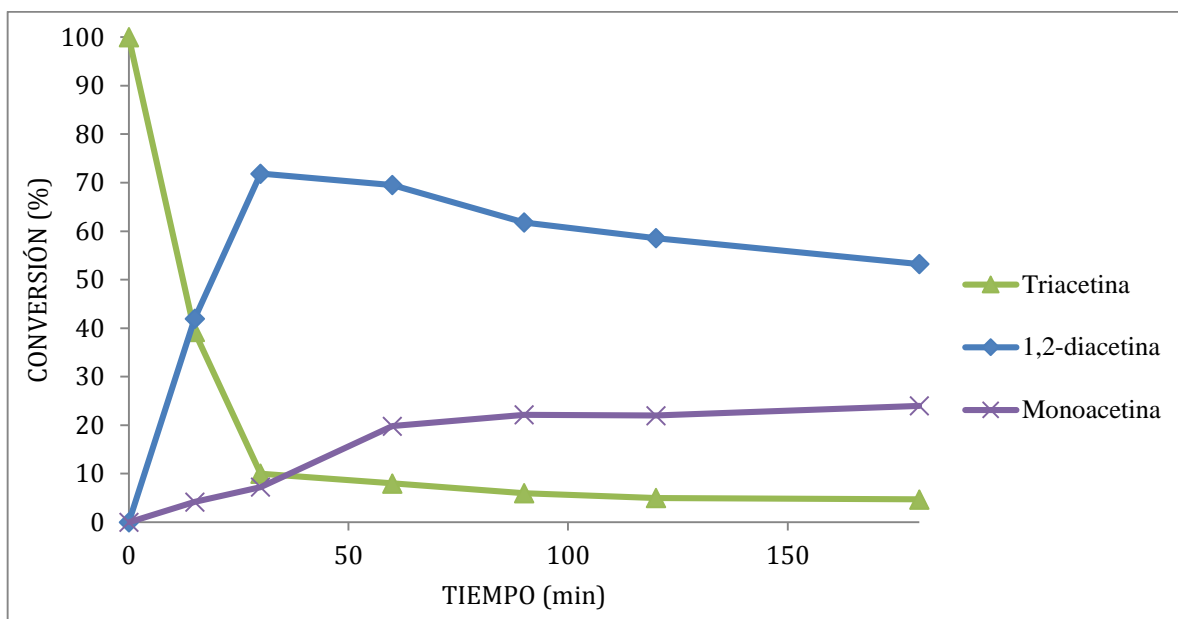


Figura 16: Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por CALB-OC (3,3 mg/g soporte) en buffer acetato a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM

A pesar de que en ambos casos se usaron biocatalizadores preparados a partir de CALB, utilizando la versión comercial inmovilizada se obtiene el regioisómero 1,3 presuntamente por migración de grupos acilo, ya que hay una disminución de DAG y un aumento de MAG en los productos finales. La migración de grupos acilo es un fenómeno intramolecular muy frecuente en la producción de aceites vegetales y productos donde es necesario obtener una de las dos formas regioisoméricas que se pueden generar a partir de diacilgliceroles (Fureby *et al.*, 1996; Laszlo *et al.*, 2008). Dichos problemas de migración de acilo son muy comunes en síntesis química tradicional, donde en muchos casos si se quiere un DAG regioisoméricamente puro es necesario una serie de pasos de protección y desprotección (Lok, 1978). Sin embargo, haciendo uso de catálisis enzimática y aprovechando la especificidad de las lipasas es posible obtener una de estas dos formas regioisoméricas

(Figura 16), con lo que se puede inferir que a pesar de que CALB es clasificada como una lipasa no específica, usando triacetina como sustrato la lipasa permite la obtención exclusivamente del regioisómero 1,2.

Estudios previos han demostrado que al inmovilizar CALB en el mismo soporte y compararlo con Novozyme 435 se obtienen diferencias en la regioespecificidad frente a algunos sustratos (Cabrera *et al.*, 2009). Adicionalmente, es bien sabido que mediante inmovilización enzimática no solo se puede mejorar la estabilidad de esta sino también en algunos casos se consigue alterar su regioespecificidad e incluso su enantioselectividad; sin embargo en este caso es necesario generar cambios conformacionales significativos en la enzima luego de inmovilizada, donde haciendo uso de soportes muy distintos y protocolos de inmovilización diferentes es mayor la probabilidad de variar estas propiedades (Mateo *et al.*, 2007). Según lo anterior a pesar de las diferencias entre la morfología del soporte en los dos biocatalizadores de CALB, en ambos casos para la inmovilización se utilizan metodologías de adsorción mediante activación interfacial, en donde es de esperarse que las fuerzas débiles que mantienen unidos la enzima y el soporte no sean suficientes para variar la regioespecificidad, por ser baja la probabilidad de alterar significativamente la conformación de la enzima. Teniendo en cuenta esto es posible deducir que cuando se utiliza Novozyme 435 en la hidrólisis de triacetina, se da la obtención de 1,3-diacetina por migración del grupo acilo, la cual no se puede minimizar haciendo uso de la ingeniería del medio (ajuste de pH) probablemente por la presencia de grupos en la estructura del soporte de Novozyme 435 que puedan actuar como centros ácidos o básicos catalizando dicho fenómeno.

En la Figura 17 se observa la comparación del porcentaje de conversión a la 1,2-diacetina haciendo uso de los diferentes biocatalizadores que se utilizaron para la hidrólisis de triacetina, según los resultados obtenidos para esta reacción los mejores biocatalizadores fueron los preparados en el laboratorio (RML-OC y CALB-OC). En el caso de los derivados de CALB se observó algo de hidrólisis en el producto de interés. Esto puede estar relacionado con el hecho de una baja especificidad de la lipasa hacia una forma regioisomérica DAG en particular, haciendo que cuando la enzima reaccione con la diacetina ambas formas regioisoméricas sean buenos sustratos para la lipasa; algo muy diferente ocurre con los derivados de RML donde es posible una mejor acumulación de la 1,2-diacetina: los bajos valores en la hidrólisis del DAG 1,2 probablemente se encuentran relacionados con la especificidad 1,3 que presenta esta enzima, la cual le permite reconocer los DAG 1,3 como mejor sustrato y por ende se minimiza la hidrólisis en el producto de interés.

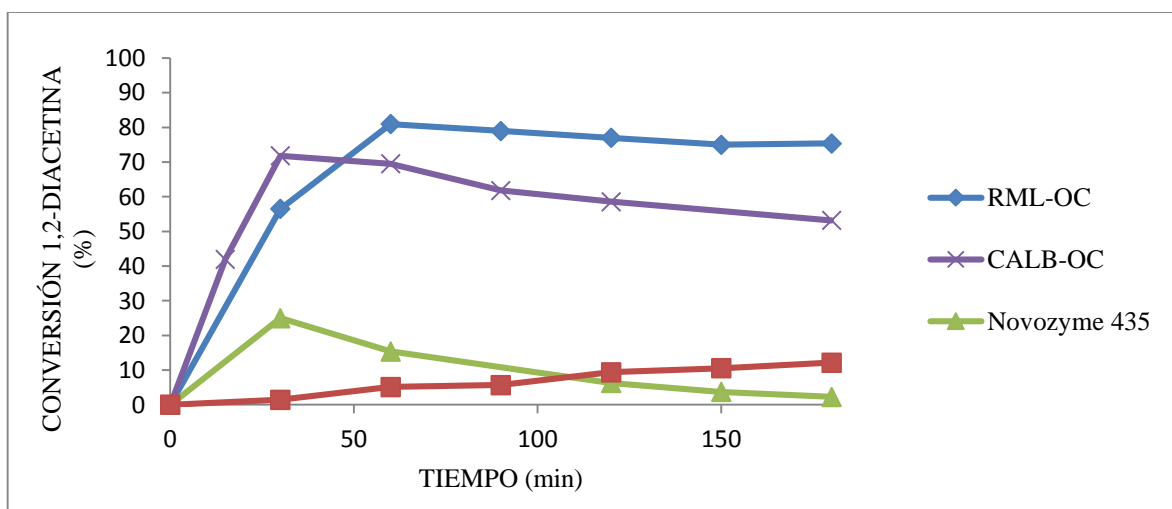


Figura 17: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina (0,1 M) en buffer acetato a 25°C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

A partir de las reacciones de hidrólisis se determinó que controlando el pH del medio es posible minimizar la migración de grupos acilo, de esta forma es posible acumular 1,2-diacetina en los productos de reacción utilizando biocatalizadores sencillos de preparar. La ventaja de los derivados que se probaron en estas reacciones es que al estar las enzimas inmovilizadas dentro de un sólido poroso, este actúa protegiendo la enzima, de esta forma disminuyen las probabilidades de inactivación. Sin embargo, al encontrarse la enzima adsorbida dentro de los poros para ella solo es posible convertir el sustrato que se encuentra soluble en el medio (Mateo *et al.*, 2007; Garcia-Galán *et al.*, 2011). Según lo anterior la producción biocatalítica de 1,2-diacetina mediante reacciones de hidrólisis está limitada por la solubilidad del sustrato, ya que a pesar de que la triacetina es un triglicérido pequeño este es parcialmente soluble en agua, lo que implica que la máxima concentración de sustrato que se le puede ofrecer a la enzima para estas reacciones es la utilizada en este trabajo (100 mM). Teniendo en cuenta esto, para generar una ruta viable de obtención de 1,2-diacetina a partir de la triacetina es necesario explorar nuevos medios que permitan aumentar la cantidad de sustrato ofrecido a la enzima de tal forma que sea posible producir una mayor cantidad de 1,2-diacetina.

4.5 Determinación del medio de reacción para la hidrólisis/metanolisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas

Una de las principales desventajas que presentan las reacciones descritas anteriormente es la dificultad de ser aplicadas a escala industrial, ya que en este caso se necesitarían muchos

reactores trabajando en simultaneo para obtener una producción significativa del regioisómero de interés lo que es inviable para muchas industrias. Por ello, con la intención de explorar nuevas rutas de producción de 1,2-diacetina en las cuales fuera posible aumentar la cantidad de triacetina en el medio se llevaron a cabo reacciones usando metanol como cosolvente y reactivo, de esta forma es posible aumentar la cantidad de sustrato ofrecido a la enzima y mantener el pH adecuado para minimizar la migración de acilo.

La concentración de triacetina a usar en estas reacciones fue de 1 M. Se llevaron a cabo pruebas de solubilidad del sustrato en buffer acetato pH 5, para determinar qué porcentaje de metanol era el adecuado para llevar a cabo estas reacciones, tal como se puede observar en la Tabla 4: Prueba de solubilidad para la triacetina en el medio de reacción usando diferentes porcentajes de metanol..

Tabla 4: *Prueba de solubilidad para la triacetina en el medio de reacción usando diferentes porcentajes de metanol.*

Cantidad de metanol (% v/v)	10	20	30	40	50
Solubilidad del sustrato	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Parcialmente soluble	Soluble

Según lo anterior solo a partir de 50% de metanol en el medio fue posible disolver todo el sustrato, por lo que se prosiguió a llevar a cabo reacciones de hidrólisis/metanólisis de la triacetina empleando 50% de metanol. Con el fin de verificar si el medio de reacción

seleccionado era el adecuado se utilizó como biocatalizador el derivado con el que se habían obtenido mejores resultados para la hidrólisis de triacetina. En la Figura 18 se muestra el curso de reacción para la hidrólisis/metanolisis de triacetina utilizando 50% de metanol catalizada por RML-OC

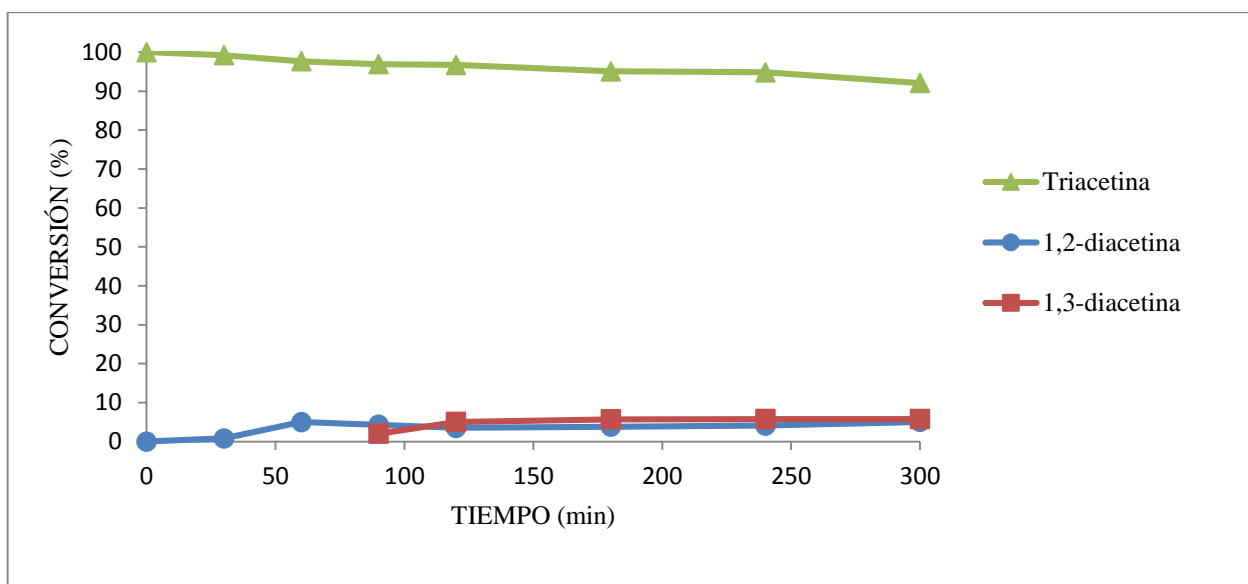


Figura 18: Hidrólisis/metanolisis de triacetina (1M) en buffer acetato catalizada por RML-OC (6,6 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

En este caso, a diferencia de los resultados obtenidos con el mismo derivado para las reacciones de hidrólisis, se observan bajos porcentajes de conversión para 1,2-diacetina, los cuales están relacionados con la obtención de 1,3-diacetina y la baja velocidad de reacción. A partir de lo observado en experimentos anteriores (Figura 17, Apéndice B) RML-OC en medio acuoso tamponado a pH 5 fue un buen biocatalizador para la producción de 1,2-diacetina, ya que al iniciar la reacción la enzima ataca al triglicérido en la posición terminal

dando como producto exclusivamente el regioisómero de interés por ser RML una lipasa 1,3-específica. Teniendo en cuenta esto cabe la posibilidad de que al llevar a cabo la hidrólisis/metanólisis de triacetina usando el mismo biocatalizador el medio de reacción favorece la migración de grupos acilo hacia el producto termodinámicamente más estable (1,3-diacetina) teniendo como consecuencia la pérdida del producto de interés (Laszlo *et al.*, 2008).

Mediante estudios previos que se han llevado a cabo sobre migración de grupos acilo en glicéridos se ha determinado que esta es afectada principalmente por ácidos, bases, temperatura y solventes (Serdarevich, 1967; Fureby *et al.*, 1996; Laszlo *et al.*, 2008). Así, es posible que con el hecho de añadir un cosolvente al medio se logre catalizar la migración de grupos acilo de 1,2-DAG a 1,3-DAG. Sin embargo, estudios anteriores sobre migración de acilo en dibutirinas han determinado que cuando se utilizan como medio de reacción diferentes solventes orgánicos se observa la migración de acilo, pero a medida que se aumenta la polaridad del solvente es posible lograr una disminución de esta migración, ya que entornos cada vez más polares fortalecen la asociación entre las dos cadenas de acilo haciendo desfavorable la migración del regioisómero 1,2 al 1,3 (Sjursnes & Anthonsen, 1994). Por esta razón es poco probable que la adición de un solvente polar como el metanol pueda ser el causante de la migración de acilo en esta reacción.

Con la finalidad de determinar si la migración de acilo en este caso también se daba por efecto del pH, se puso en contacto la solución de buffer y metanol junto con el biocatalizador para verificar si de alguna forma la enzima afectaba el buffer teniendo como consecuencia

un cambio de pH. En la Figura 19 se muestran las pruebas realizadas para el buffer utilizado en el medio de reacción y otro buffer alternativo que permite tamponar en la misma región.

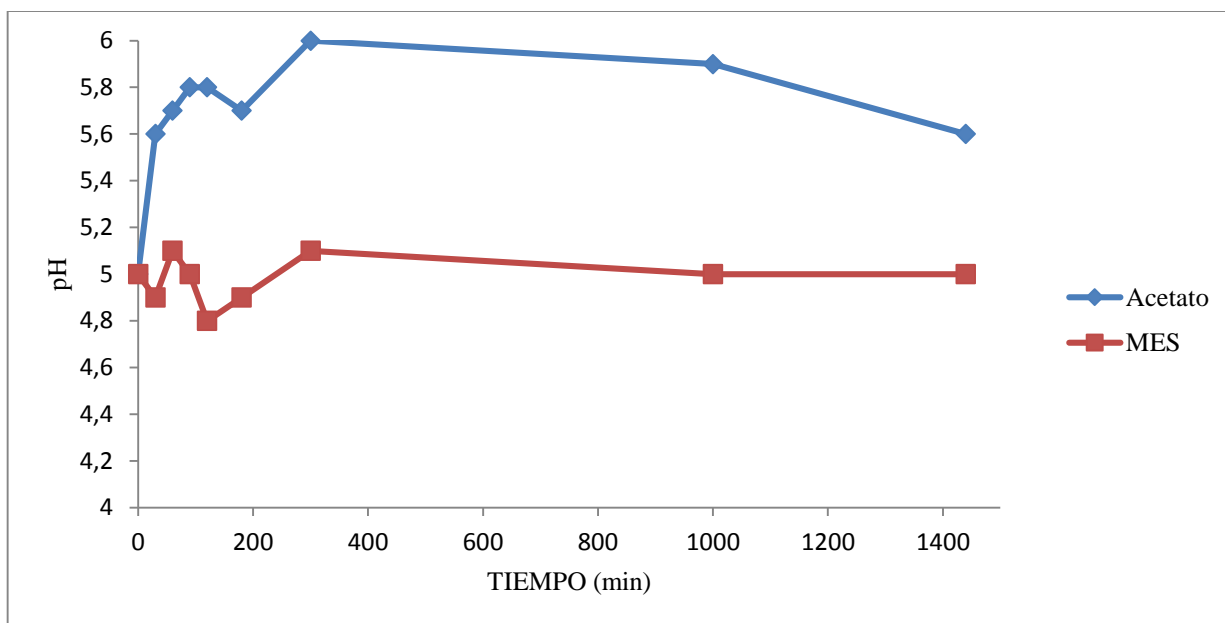


Figura 19: Determinación de la variación del pH con el tiempo en dos buffers usados como tampón en la reacción de hidrólisis/metanólisis con 50% de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento es posible atribuir la migración de acilo a interacciones entre la enzima y el buffer, las cuales comienzan a darse luego de añadir metanol como cosolvente, ya que usando buffer MES (ácido 2-etanosulfónico) el pH se mantiene estable en 5 durante 24 horas mientras que cuando se usa como tampón buffer acetato el pH rápidamente aumenta hasta 6.

Es muy probable que estas interacciones entre buffer y metanol por acción de la enzima tengan como consecuencia la formación de acetato de metilo al cual se le pueda atribuir el aumento de pH en el medio, ya que así como la enzima cataliza la hidrólisis de grupos éster puede también catalizar la reacción contraria. Para comprobar esta hipótesis se tomó una alícuota del medio luego de que el pH estuviera en 6, la cual se corrió por RP-HPLC donde se observó, además del pico correspondiente al buffer un pico en $t_R = 7,7$ (anexo 3) el cual concuerda con el tiempo de retención del acetato de metilo haciendo uso de este mismo método cromatográfico.

En la Figura 20 se muestra el curso de reacción para la hidrólisis/metanolisis con 50% de alcohol haciendo uso de RML-OC luego de haber cambiado el buffer acetato por MES, en este caso se observa la producción de solo una de las dos formas regioisoméricas de DAG con lo que se logra solucionar el problema de migración de grupos acilo en esta reacción.

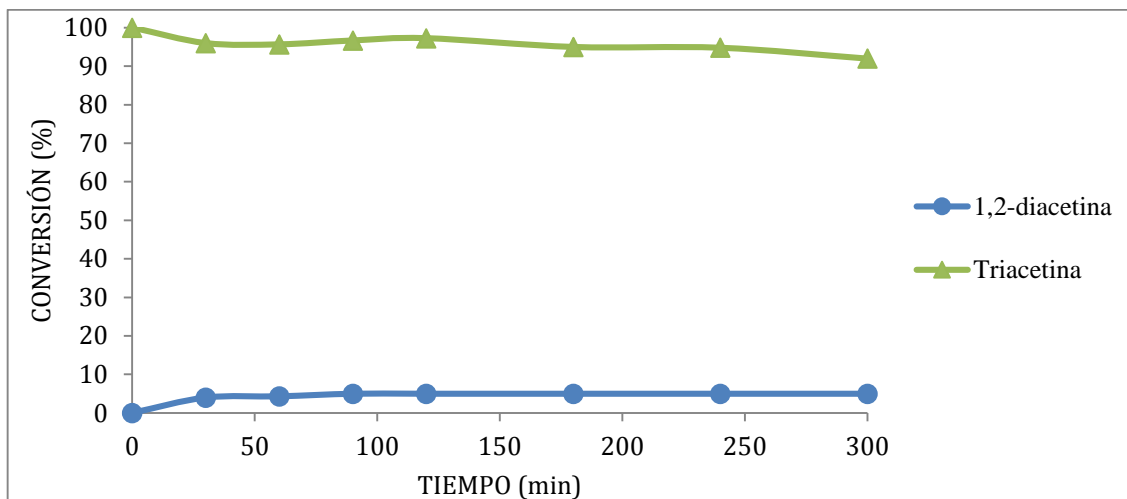


Figura 20: Hidrólisis/metanolisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por RML-OC (6,6 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

4.6 Hidrólisis/metanolisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas

Luego de haber determinado el medio adecuado que permitiera disolver todo el sustrato y minimizar la migración de acilo, se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis/metanolisis haciendo uso de los biocatalizadores preparados en el laboratorio. En la Figura 21 se observa el curso de reacción para CALB-OC donde al igual que al utilizar RML-OC se obtiene solo el regioisómero de interés pero en este caso con un 33% de conversión. Según lo anterior a diferencia de la reacción catalizada por RML-OC usando el derivado de CALB se consiguen mayores velocidades de reacción y unos porcentajes de conversión mucho más altos.

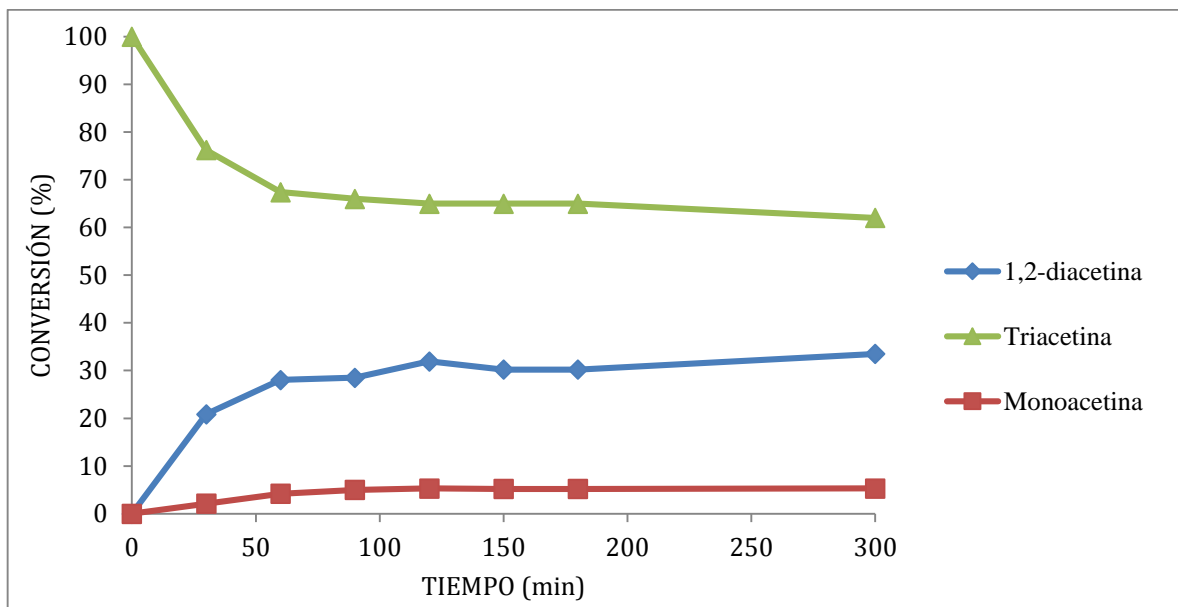


Figura 21: Hidrólisis/metanolisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por CALB-OC (3,3 mg/g soporte) usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Para contrastar los resultados obtenidos con la versión preparada en el laboratorio de CALB se llevó a cabo la misma reacción usando Novozyme 435 (Figura 22), usando esta versión comercial de CALB la cantidad de 1,2-diacetina producida es ligeramente menor, pero al igual que cuando se utiliza el mismo derivado en las reacciones de hidrólisis también se observa la presencia de 1,3-diacetina en los productos de reacción, la cual se encuentra relacionada con la migración de grupos acilo.

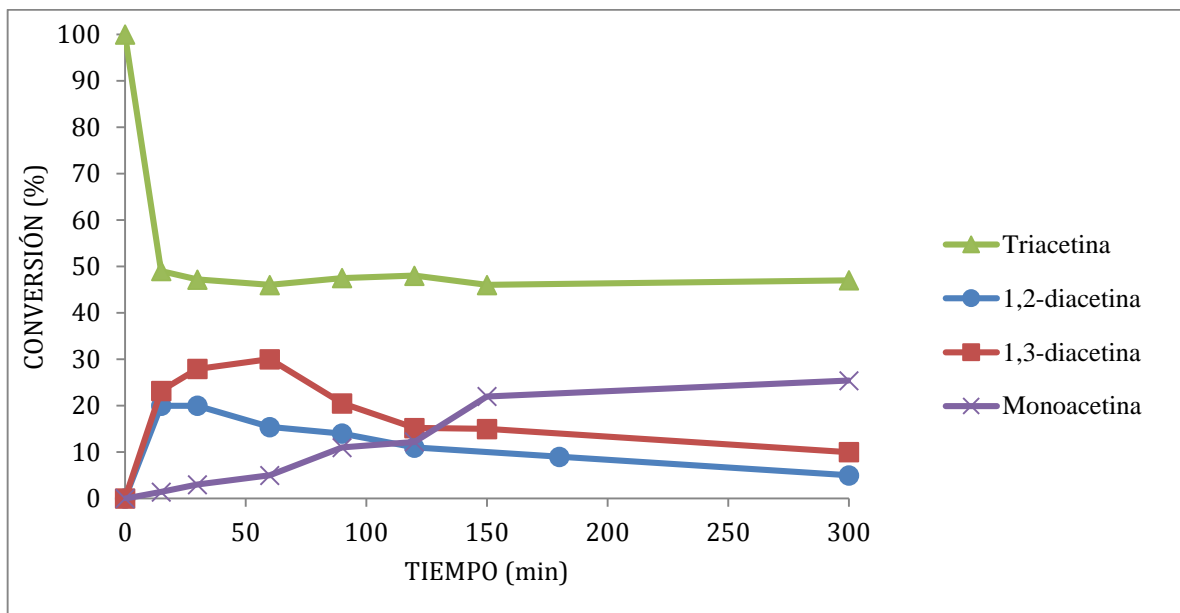


Figura 22: .Hidrólisis/metanolisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por Novozyme 435 usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Utilizando Novozyme 435 en medios totalmente acuosos para la obtención de 1,2-diacetina a partir de la triacetina se observa el regioisómero 1,3 desde el inicio de la reacción. Sin embargo, la migración de grupo acilo empieza a favorecerse luego de los 60 minutos de reacción, donde la cantidad de 1,2-diacetina acumulada comienza a disminuir. Algo muy distinto ocurre cuando se añade 50% de metanol al medio, ya que el máximo de 1,2-diacetina se obtiene antes y la cantidad de 1,3-diacetina solo es igual a la del regioisómero de interés a los 15 minutos, a partir de allí la migración de grupo acilo empieza a favorecerse llegando a acumular más del DAG 1,3 que del 1,2 el cual se hidroliza rápidamente hacia su respectivo MAG.

Estas diferencias en los resultados obtenidos usando este biocatalizador en medios acuosos y con 50% de metanol pueden explicarse por la tendencia que tiene el soporte (sobre el cual está inmovilizada CALB en Novozyme 435) de disolverse en algunos medios orgánicos, entre ellos alcoholes como el etanol (José & Briand, 2010; Ortiz *et al.*, 2019). Según la literatura, alcoholes como el etanol, ya sean puros o disueltos en agua pueden disolver el poli(metilmetacrilato) del cual está hecho Lewatit VP OC 1600 (soporte utilizado para inmovilizar CALB en Novozyme 435) de la siguiente forma: inicialmente el etanol difunde dentro de los poros del soporte alterando la textura interior de estos y aumentando la rugosidad del material, seguidamente dicho alcohol se adsorbe fuertemente teniendo como consecuencia una degradación del material gracias a cierto grado de hidrofiliidad que presenta el polímero. Además, el alcohol no solo afecta la integridad del soporte sino también puede llegar a modificar la estructura secundaria de la enzima al disminuir las contribuciones de la hélice α y aumentar la estructura de la lámina β (José *et al.*, 2017). Por las consideraciones anteriores es probable que al añadir 50% de metanol al medio algunos de los centros ácidos (o básicos) a los cuales se les atribuía la migración de grupos acilo en la hidrólisis sean liberados al medio, lo que implica un cambio de pH mucho más rápido al interior del biocatalizador y por ende una mayor tasa de migración de acilo de 1,2 a 1,3 DAG. Además, es posible explicar por qué luego de llegar al máximo de conversión de 1,2-diacetina en ambas reacciones usando Novozyme 435 la enzima transformaba lentamente la triacetina, ya que al tener los DAG y MAG mayor polaridad que su respectivo TAG es probable que estos se retengan con más fuerza en los poros del soporte siendo así más accesibles para la enzima.

En la Figura 23 se muestra el curso de reacción para la hidrólisis/metanolisis de triacetina haciendo uso de Lipozyme RM IM; como se puede observar en este caso no se dió la migración de grupos acilo con lo que se puede inferir que la resistencia de Duolite ES 562 frente al metanol es mucho mayor que la de Lewatit VP OC 1600, lo que concuerda con estudios previos donde se ha demostrado que en Lipozyme RM IM el soporte no se degrada por efecto de alcoholes incluso a altas temperaturas, a diferencia de lo que ocurre con Novozyme 435 (Aguieiras *et al.*, 2016).

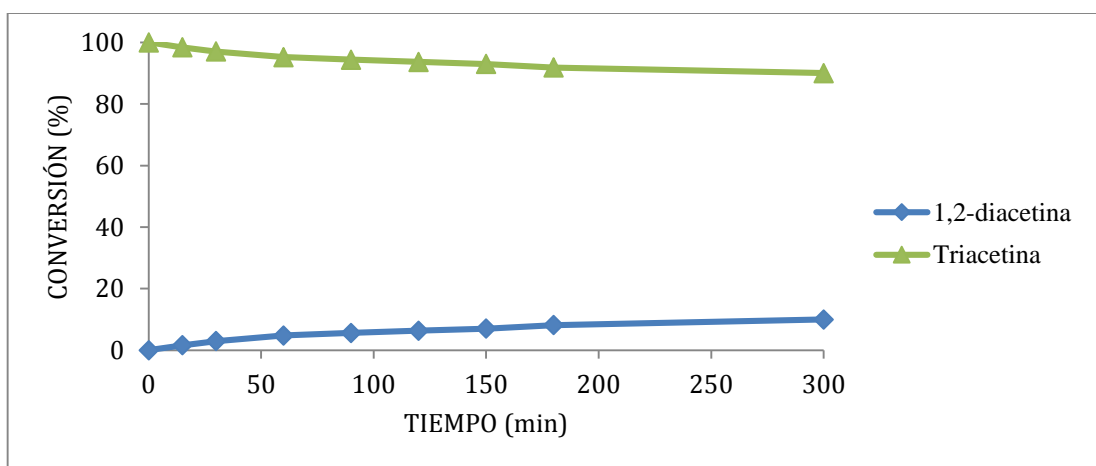


Figura 23: Hidrólisis/metanolisis de triacetina (1M) en buffer MES catalizada por Lipozyme RM IM usando 50 % de metanol a 25 °C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.

Según los resultados obtenidos, al añadir 50% de metanol como cosolvente se obtienen porcentajes de conversión muy diferentes a los obtenidos en la hidrólisis usando los mismos biocatalizadores, en este caso el mejor biocatalizador también fue una versión preparada en el laboratorio (CALB-OC), pero la diferencia entre los biocatalizadores de RML y CALB inmovilizados en octil agarosa es significativa ya que utilizando CALB-OC se obtiene 20%

de conversión para 1,2-diacetina pero utilizando RML-OC se obtienen los porcentajes de conversión más bajos para esta reacción, tal como se puede observar en la Tabla 5.

Tabla 5: *Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50% de metanol.*

Biocatalizador	Conversión	Tiempo de obtención
	Máxima 1,2-diacetina (%)	del máximo (min)
CALB-OC	33,0±1,2	300
Novozyme 435	20,0±1,0	15,0
Lipozyme RM IM	10,0±1,6	300
RML-OC	5,00±1,0	300

En la Figura 24 se muestra el porcentaje de conversión de 1,2-diacetina haciendo uso de los diferentes biocatalizadores que se probaron en la hidrólisis/metanólisis de triacetina utilizando 50% de metanol. En este caso la mayor velocidad de reacción se obtuvo con Novozyme 435, sin embargo el hecho de que empleando este biocatalizador se de la migración de grupos acilo implica que no es posible acumular el DAG de interés, a diferencia de lo que ocurre cuando se usa CALB-OC.

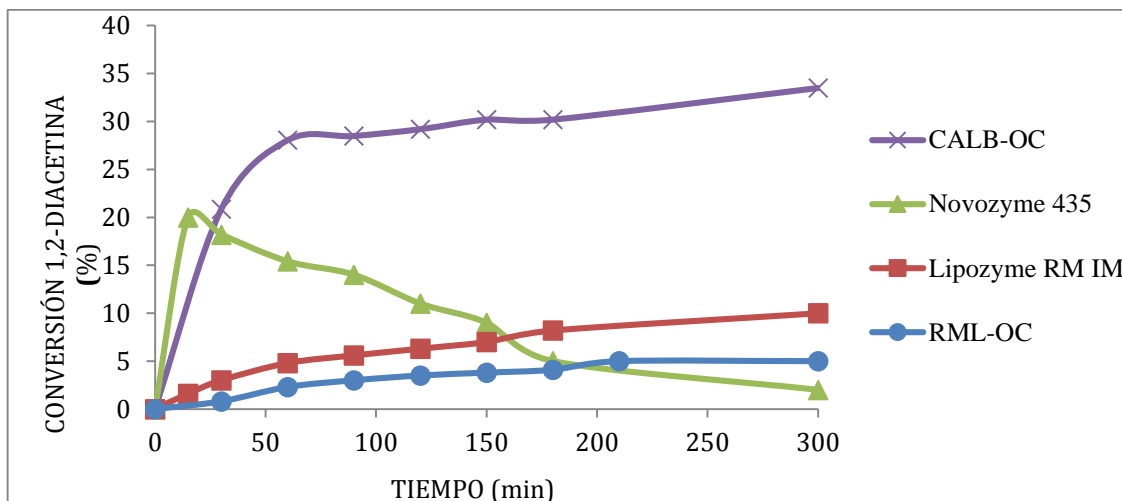


Figura 24: Comparación de diferentes biocatalizadores en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50 % de metanol y pH 5 a 25 °C y agitando a 200 RPM.

De acuerdo con lo observado, en medios totalmente acuosos usando RML-OC es posible obtener buenos porcentajes de conversión de 1,2-diacetina, pero añadiendo 50% de metanol como cosolvente y usando el mismo biocatalizador se disminuye considerablemente la velocidad de reacción y por ende los porcentajes de conversión. Posteriormente, con la finalidad de mejorar los resultados obtenidos se llevó a cabo una prueba de estabilidad térmica usando RML-OC como sistema modelo para determinar si era posible aumentar la velocidad de reacción variando la temperatura (Figura 25).

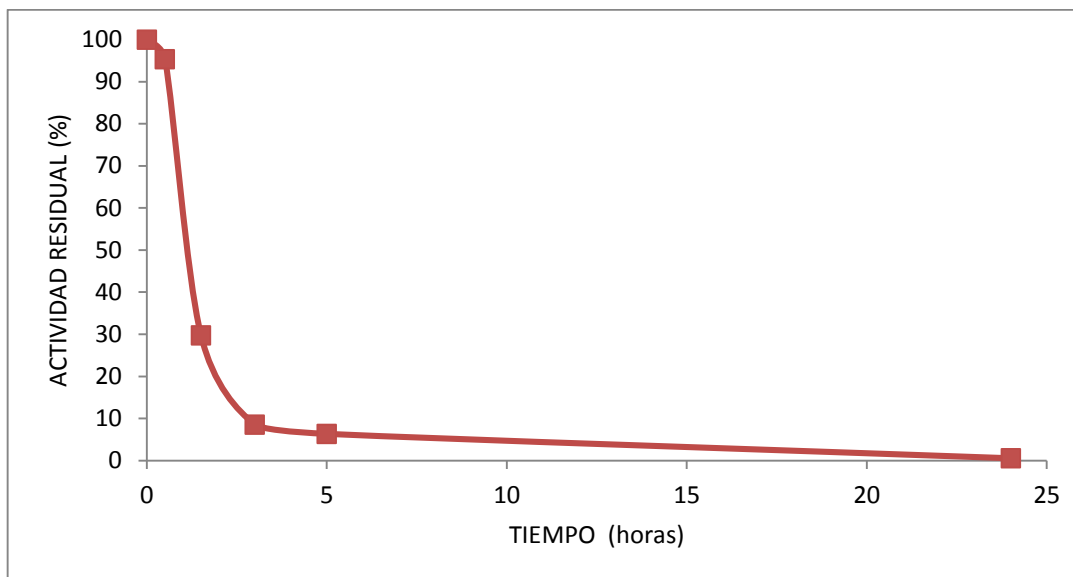


Figura 25: Prueba de estabilidad térmica para RML-OC (6,6 mg/g soporte) en medio MES 100 mM y 50% de metanol, pH 5 a 40 °C y agitando a 200 RPM.

En este caso se determinó que con los biocatalizadores preparados en soportes de octil agarosa no era viable el aumento de la temperatura para acelerar la reacción, ya que tal como se ve en la Figura 25 utilizando medio con 50% de metanol y aumentando la temperatura 15 °C la actividad de RML-OC cae rápidamente, llegando a retener solo un 30% de la actividad inicial luego de 90 minutos. Esta pérdida rápida de actividad al aumentar la temperatura es asociada con una desorción masiva de la enzima en el biocatalizador, lo que en muchos casos limita el uso de los derivados preparados mediante este tipo de protocolos en algunas reacciones donde sea necesario usar temperaturas altas (Jesionowski *et al.*, 2014; Peirce *et al.*, 2016). Según lo anterior para mejorar los resultados obtenidos no es posible aumentar la velocidad de reacción por efecto de la temperatura; sin embargo, el material de cual está hecho el soporte permite adsorber mucha más enzima de la utilizada en los derivados que se probaron en esta reacción, por lo que se prosiguió a aumentar la carga enzimática en el

derivado RML-OC para determinar si de esta forma era posible mejorar los resultados obtenidos.

4.7 Aumento de la carga enzimática en RML-OC

Con la finalidad de determinar qué carga enzimática en el biocatalizador aumentaba la velocidad de reacción en la hidrólisis/metanólisis, se probaron 5 soluciones enzimáticas a una mayor concentración de proteína que la utilizada para preparar RML-OC. Según lo observado en los experimentos, a medida que se aumentaba la cantidad de enzima adsorbida sobre el soporte disminuía la actividad relativa del biocatalizador, tal como se muestra en la Figura 26.

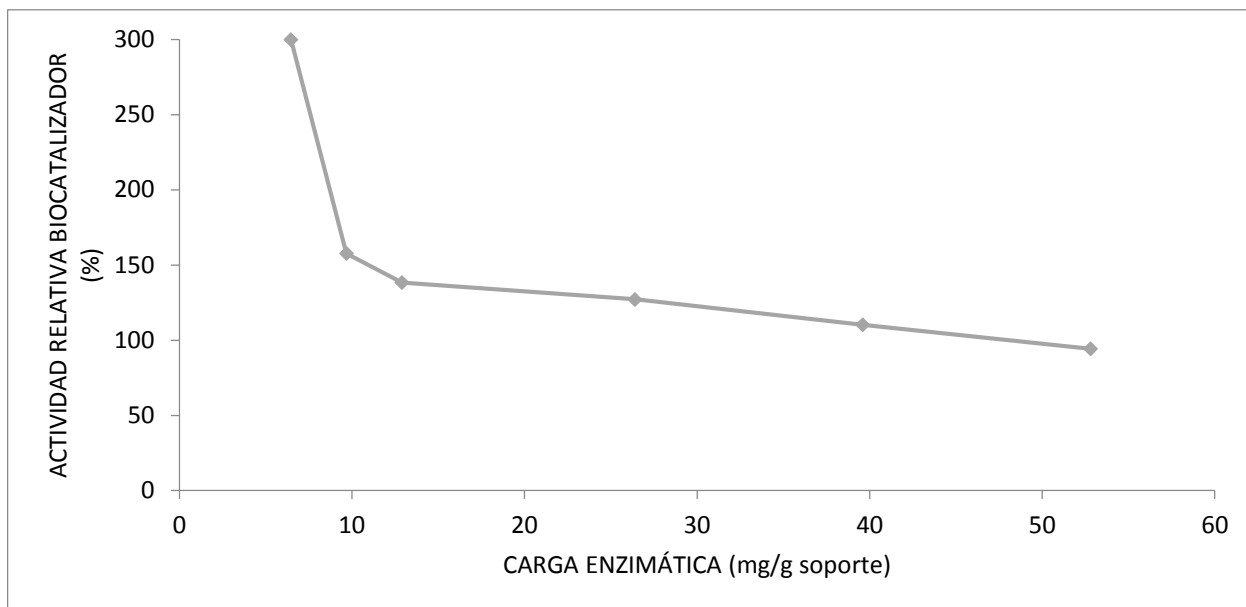


Figura 26: Relación entre la carga enzimática y la actividad relativa del biocatalizador RML-OC a las 24 h de inmovilización usando p-NPB como sustrato.

Es bien sabido que la inmovilización de lipasas sobre soportes hidrofóbicos como la octil agarosa implica la adsorción de la enzima en su conformación abierta (Manoel *et al.*, 2015). De acuerdo con lo anterior, es de esperarse que entre más enzima se encuentre inmovilizada dentro de los poros del soporte mayor será la actividad expresada por el biocatalizador, ya que van a ser más las lipasas que se encuentren en su conformación abierta; sin embargo, algo muy distinto se observó en estos experimentos.

La adsorción sobre octil agarosa es una metodología que permite la inmovilización rápida de enzimas dentro de los poros del soporte, aunque el hecho de que esta no se adsorba superficialmente implica ciertos problemas de difusión ya sea del sustrato o de la misma enzima. En el caso de presentarse problemas de difusión de la enzima a la hora de

inmovilizar, si la tasa de inmovilización es mayor que la tasa de difusión puede darse un taponamiento de los poros del soporte por acumulación de la enzima, lo que implica no poder aumentar la carga luego de cierto punto (Gutenwik *et al.*, 2004; Fernández-López *et al.*, 2017a). En este caso sólo se observaron problemas de difusión de la enzima a la hora de la inmovilización en el derivado de mayor carga (52,8 mg/g soporte) ya que, aunque se dejara la solución enzimática en contacto con el soporte durante 24 horas no toda la enzima en el sobrenadante se adsorbía sobre el soporte, tal como se puede ver en la Figura 27.

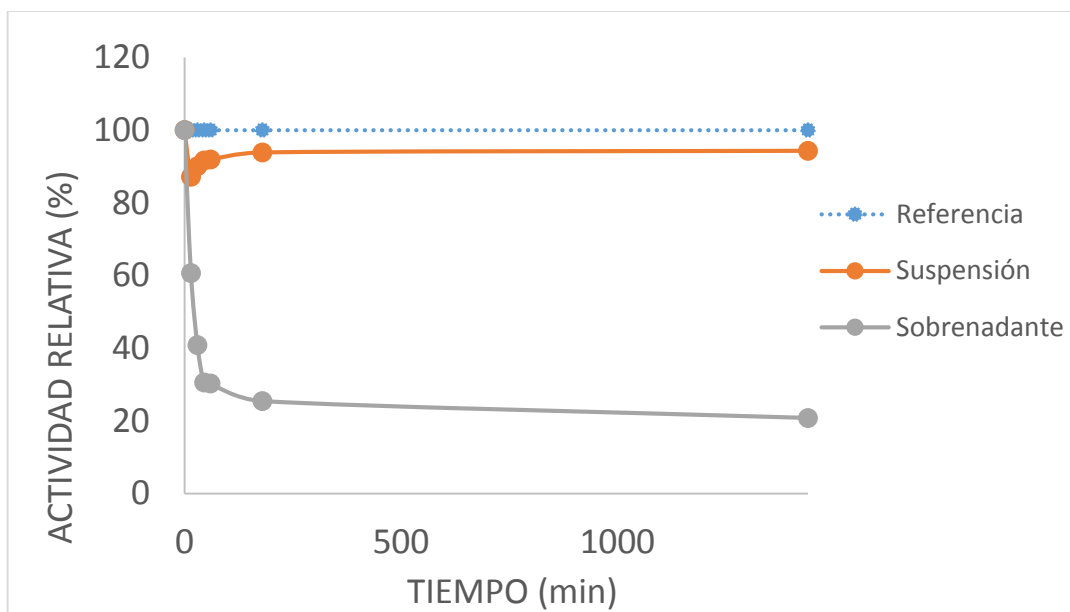


Figura 27: Cinética de inmovilización de la lipasa de *Rizomucor miehei* en geles de octil agarosa (carga: 52,8 mg/g soporte) a baja fuerza iónica (5 mM) y pH 7, agitando a 200 RPM y usando p-NPB como sustrato.

El hecho de que al aumentar la carga enzimática en el biocatalizador implique una caída en la actividad expresada por este, no significa que sea contraproducente utilizar derivados

con alta carga en la reacción, ya que en este caso la disminución en la hiperactivación del biocatalizador se da por problemas que presenta el sustrato para difundirse y llegar a la enzima, los cuales han sido anteriormente descritos en soportes porosos como los utilizados para preparar RML-OC (Rodrigues *et al.*, 2013; Zucca *et al.*, 2016).

Los problemas de difusión del sustrato dentro de los poros del biocatalizador son más notorios a medida que se va aumentando la carga enzimática, principalmente por el protocolo estándar de medición de actividad con el cual se determina si la enzima se está inmovilizando. En dicho protocolo se usa *p*-NPB como sustrato en una concentración 0,4 mM, lo que implica que al ser tan pequeña la cantidad de sustrato que se le ofrece a la enzima, si la carga es alta solo es posible medir la actividad de las lipasas que se hayan adsorbido en la parte más externa de los poros, tal como se puede ver en la Figura 28. En este caso, cuando se utilizan bajas cargas de proteína en el biocatalizador es posible medir la actividad de todas las enzimas adsorbidas, pero a medida que se aumenta la carga todo el sustrato es transformado por las enzimas que no hayan difundido hasta la parte más interna de los poros; de esta forma se obtiene un valor de actividad aparente que es diferente al valor real. Según lo anterior, para estas reacciones si es posible hacer uso de biocatalizadores preparados con alta carga enzimática en soportes de octil agarosa, ya que al ser alta la concentración del sustrato en la reacción (1 M de triacetina) estos problemas de difusión son despreciables.

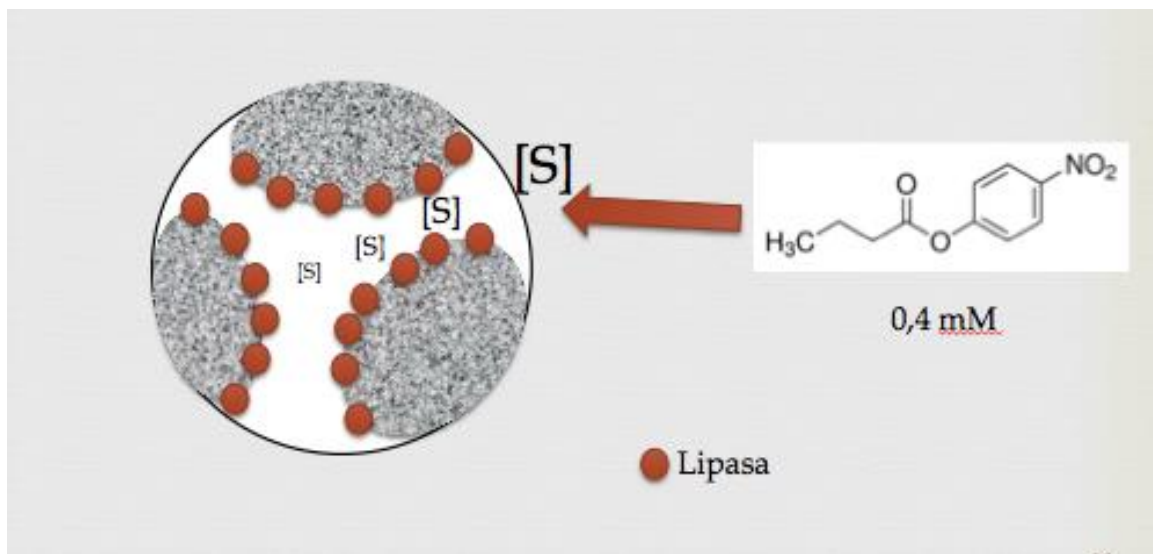


Figura 28: Problemas de difusión del sustrato empleado para la medición de actividad enzimática en sólidos porosos como la octil agarosa.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente se escogió una carga de 39,6 mg/g soporte en el biocatalizador RML-OC para aumentar la velocidad de reacción; este nuevo biocatalizador se usó en las reacciones de hidrólisis/metanólisis y los porcentajes de conversión para 1,2-diacetina se compararon con los obtenidos haciendo uso de RML-OC con baja carga enzimática tal como se puede ver en la Figura 29.

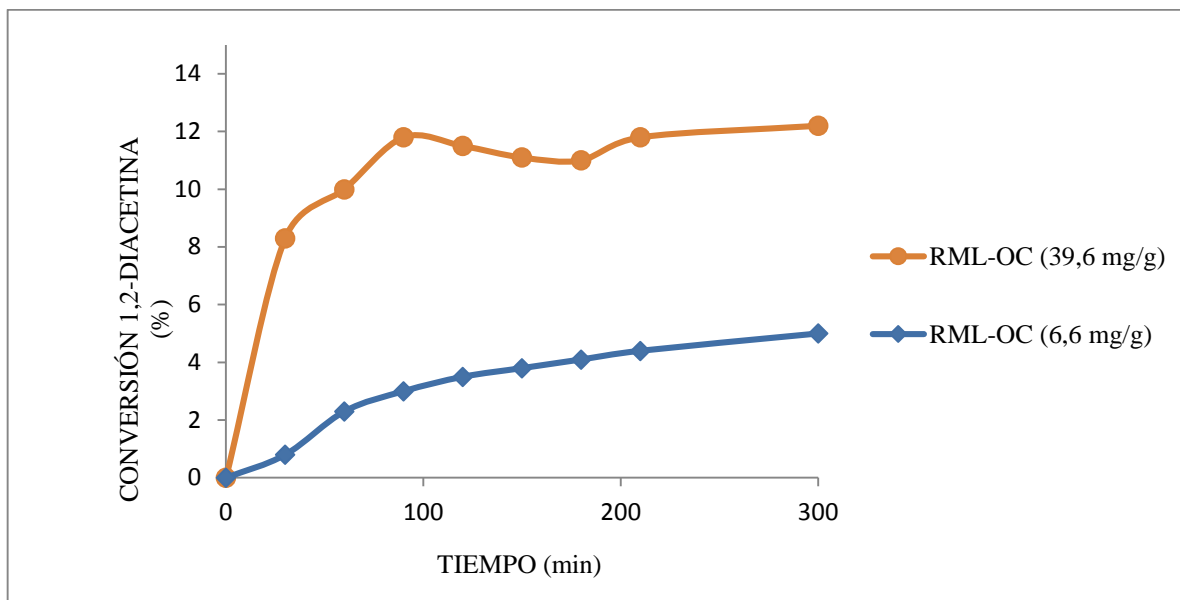


Figura 29: Efecto de la carga enzimática del biocatalizador RML-OC en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de la triacetina (1 M).

En este caso, al aumentar la carga en el biocatalizador es posible aumentar la velocidad de reacción. Sin embargo, para ambos biocatalizadores, luego de cierto tiempo esta disminuye, con lo que se puede inferir que en este caso es probable que algo en el medio este afectando la enzima.

4.8 Determinación de problemas de estabilidad operacional en biocatalizadores

Con el fin de determinar qué estaba afectando la actividad del biocatalizador, se llevaron a cabo pruebas de estabilidad de los derivados preparados en soportes de octil agarosa. En la Figura 30 se muestra la prueba de estabilidad en el medio de reacción para RML-OC.

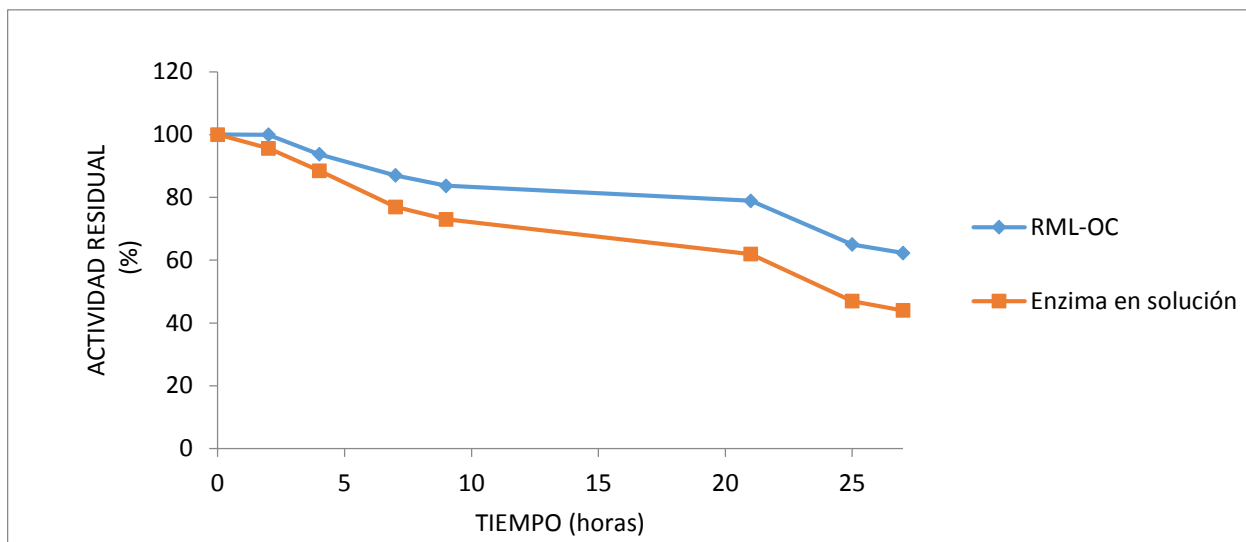


Figura 30: Prueba de estabilidad para derivados de la lipasa de *Rizomucor miehei* en medio MES (100 mM) con 50% de metanol, pH 5 y 25 °C agitando a 200 RPM.

Según lo anterior, mediante la inmovilización de la lipasa se consigue aumentar su estabilidad, adicionalmente se determinó que algo de enzima se desorbe del soporte en el biocatalizador por efecto del metanol en el medio. A pesar de ello, la cantidad de actividad residual que pierde el biocatalizador en 300 minutos no es tan alta como para explicar la baja velocidad de reacción y los porcentajes de conversión obtenidos para la hidrólisis/metanólisis de la triacetina usando RML-OC (Figura 20).

En biocatalizadores preparados mediante adsorción física una de las ventajas es la posibilidad de reutilizar el soporte luego de que la enzima se haya inactivado, todo de una forma rápida y sencilla haciendo uso de concentraciones moderadas de detergente (Bastida

et al., 1998; Rueda *et al.*, 2015). Sin embargo, la posibilidad de romper las interacciones hidrofóbicas que hay entre la enzima y el soporte haciendo uso de pequeñas cantidades de detergente implica que, en algunas reacciones donde los sustratos o productos tengan propiedades similares, se de una desorción masiva de la enzima (Virgen-Ortíz *et al.*, 2017). Para verificar si en este caso los productos de reacción aumentaban la desorción provocada por el metanol en el biocatalizador se tomaron alícuotas de la hidrólisis/metanólisis y se les determinó la actividad residual usando *p*-NPB como sustrato (Figura 31).

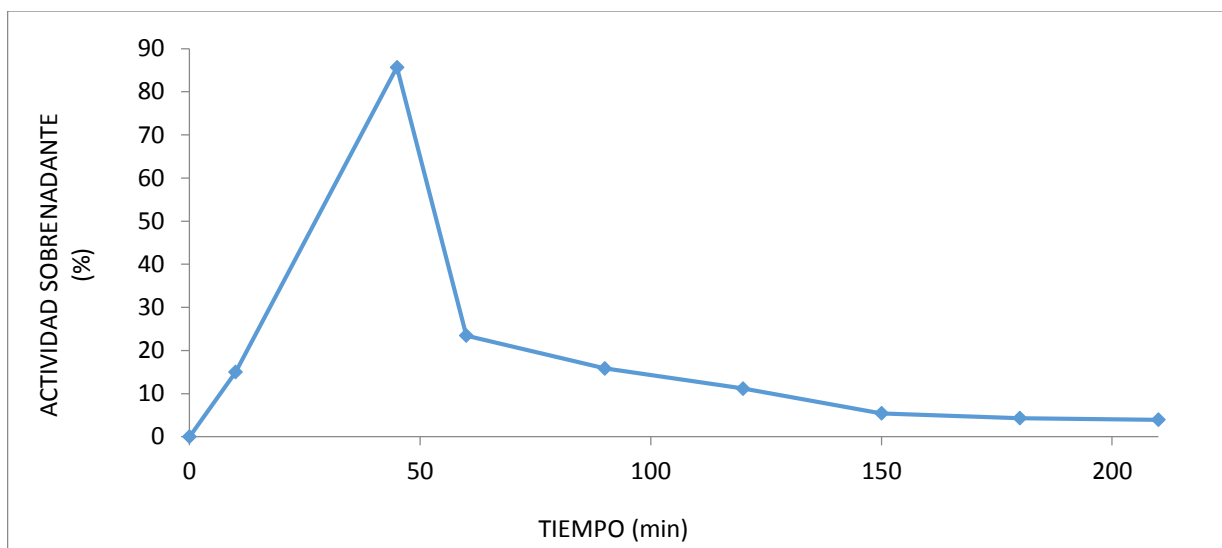


Figura 31: Desorción e inactivación de RML-OC (6,6 mg/g soporte) en hidrólisis/metanólisis de triacetina (1M) con 50% de metanol y pH 5, a 25°C y agitando a 200 RPM.

Utilizando RML-OC en estas reacciones es posible detectar algo de actividad enzimática en el medio (sobrenadante) desde los 10 minutos de reacción. Posteriormente, a los 45 minutos se observa un aumento en la actividad que puede ser relacionado con una desorción

masiva de la enzima; esta actividad con el paso del tiempo comienza a decaer hasta ser casi nula con lo que se puede inferir que se está dando una inactivación de la enzima en solución por efecto del metanol en el medio. Teniendo en cuenta esto es necesario buscar una forma de evitar la pérdida de actividad del biocatalizador en las reacciones de hidrólisis/metanólisis minimizando la desorción de la enzima.

4.9 Modificación con glutaraldehído de los biocatalizadores inmovilizados sobre octil agarosa

Una de las formas más sencillas de evitar la desorción de la enzima en el soporte es recubriendo el biocatalizador con alguna molécula que permita que la lipasa se encuentre adsorbida con una mayor fuerza sobre el soporte. Entre las moléculas que han permitido estabilizar lipasas físicamente adsorbidas cabe destacar el glutaraldehído, este puede reaccionar con grupos en el soporte o en la superficie de la enzima luego de inmovilizada tales como aminos, tioles o fenoles donde en estos casos es posible mejorar la estabilidad e incluso la actividad del biocatalizador (Rodrigues *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2014). Según lo anterior, es probable que al modificar los biocatalizadores con glutaraldehído se consigan efectos positivos como una mejora en la estabilidad de los derivados en los cuales se presentaba la desorción de la lipasa.

En la Figura 32 se muestra el efecto de la modificación de RML-OC (6,6 mg/g soporte) con glutaraldehído sobre la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina, en este caso el efecto de la modificación del biocatalizador fue positivo ya que se consiguió aumentar la velocidad de reacción y los porcentajes de conversión. Adicionalmente, luego de determinar al final de la reacción la actividad usando *p*-NPB como sustrato se confirmó que la actividad residual era superior en RML-OC-GLU, por ende es posible que en este caso se haya dado un entrecruzamiento intermolecular de tal forma que se diera una menor desorción de la enzima en el soporte aumentando así la estabilidad.

Seguidamente se evaluó el efecto de la modificación con glutaraldehído al biocatalizador de RML-OC en el cual se utilizó una carga enzimática de 39,6 mg/g soporte (Figura 33). En este caso el efecto de la modificación también fue positivo permitiendo unos mayores porcentajes de conversión, pero a diferencia de cuando se modificaba el derivado con baja carga la velocidad de reacción es mayor, esto puede asociarse con un entrecruzamiento intermolecular más fuerte, ya que a mayor carga enzimática en la inmovilización menos espacio hay entre lipasa y lipasa adsorbida dentro de los poros, por ende, es más fácil entrecruzar las moléculas de enzima en el biocatalizador.

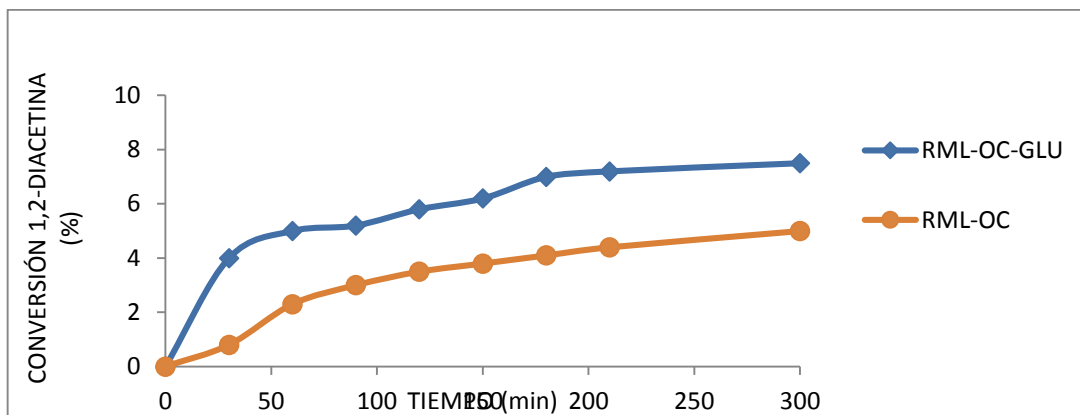


Figura 32: Efecto de la modificación de RML-OC (6,6 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina.

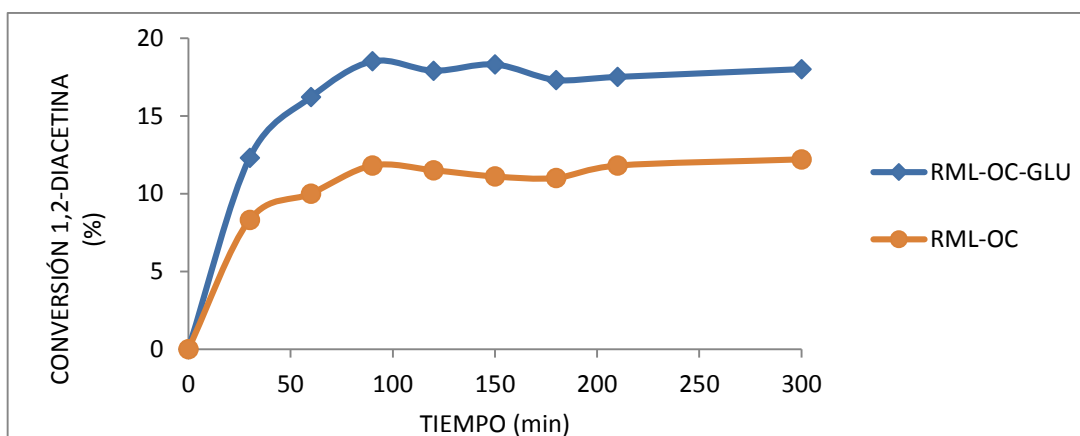


Figura 33: Efecto de la modificación de RML-OC (39,6 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina.

Haciendo uso del glutaraldehído para modificar el biocatalizador CALB-OC sucede algo muy distinto a lo descrito anteriormente, ya que luego de tratado el derivado con glutaraldehído se disminuye la velocidad de reacción llegando a obtenerse porcentajes de conversión casi 4 veces menores que con CALB-OC tal como se puede observar en la Figura

34, adicionalmente, luego de la modificación se observó una menor actividad en el biocatalizador usando *p*-NPB como sustrato. De acuerdo con lo anterior es probable que al ser menor la cantidad de enzima que en los biocatalizadores preparados a partir de RML en octil agarosa haya ocurrido un entrecruzamiento intramolecular al encontrarse las enzimas adsorbidas con un mayor espacio entre sí, de esta forma la lipasa se fija en una conformación distinta lo que conlleva una pérdida de actividad.

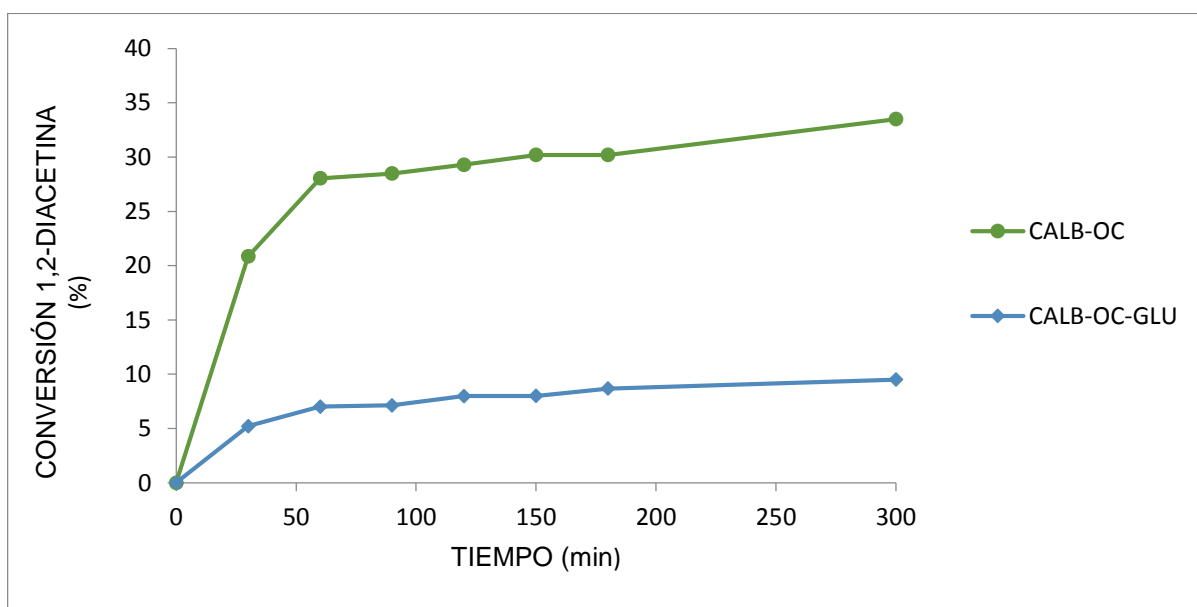


Figura 34: Efecto de la modificación de CALB-OC (3,3 mg/g soporte) con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis (50%) de triacetina.

Por último, los biocatalizadores modificados se utilizaron en la reacción de hidrólisis para verificar si se conseguía alguna mejora en las propiedades del biocatalizador; en el caso de RML-OC no se observa ninguna diferencia luego de la modificación, pero en el biocatalizador CALB-OC-GLU hay una ligera disminución en la velocidad de reacción y por

ende en el máximo de conversión, aunque en ambos casos luego de cierto tiempo la cantidad de 1,2-diacetina producida es la misma (Figura 35). Según lo anteriormente expuesto es posible inferir que cuando se utiliza CALB-OC-GLU en la reacción de hidrólisis, el efecto sobre la obtención de 1,2-diacetina observado era producto de la pérdida de actividad por entrecruzamiento intramolecular, pero para el caso de las reacciones de hidrólisis/metanólisis probablemente se genera algún efecto adicional producto de la modificación como una mayor exposición de la enzima al metanol del medio. Sin embargo, a pesar de que luego de la modificación disminuye la cantidad de 1,2-diacetina producida el efecto del glutaraldehído en este caso no fue del todo negativo ya que cuando se usa CALB-OC-GLU en la hidrólisis de triacetina es posible una mayor acumulación del producto de interés.

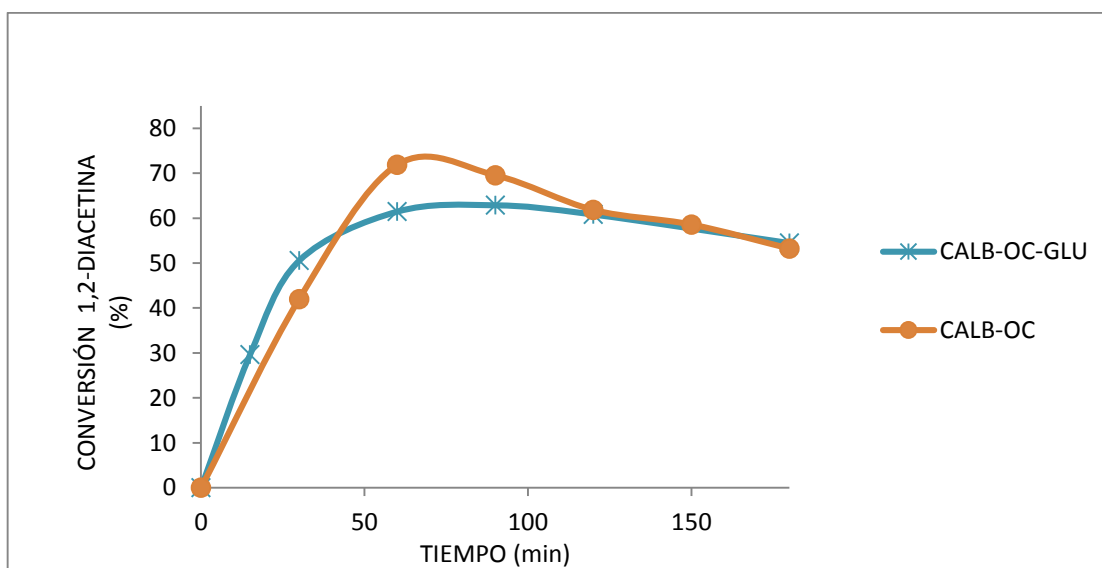


Figura 35: Efecto de la modificación de CALB-OC con glutaraldehído (1%) en la producción de 1,2-diacetina mediante hidrólisis de triacetina.

Cabe destacar que luego de modificados los biocatalizadores no se detectó la presencia del regioisómero 1,3 en los productos cuando estos derivados catalizaban la reacción, en este caso es posible afirmar que la modificación con glutaraldehído tuvo efecto sobre la estabilidad de los biocatalizadores pero no sobre su regioselectividad, ya que solo se produce el regioisómero 1,3 cuando se favorece la migración de acilo, ya sea con un cambio de pH o cambiando el biocatalizador por Novozyme 435.

5. Conclusiones

La inmovilización de lipasas sobre octil agarosa es una metodología rápida y sencilla para la preparación de biocatalizadores, donde en muchos casos es posible conseguir la hiperactivación de la enzima.

Es posible la obtención exclusiva de 1,2-diacetina haciendo uso de biocatalizadores preparados mediante la inmovilización de lipasas por adsorción interfacial en soportes de octil agarosa, siempre y cuando se minimice la migración de acilos manteniendo el medio tamponado a pH 5.

Cuando se utilizan lipasas inmovilizadas sobre octil agarosa para la obtención de 1,2-diacetina mediante hidrólisis/metanólisis de triacetina no es posible obtener porcentajes de conversión altos, ya que el hecho de que las uniones entre enzima y soporte sean reversibles implica que la enzima se desorba del biocatalizador.

La modificación de RML-OC con glutaraldehído generó efectos positivos cuando se utilizó para las reacciones de hidrólisis/metanólisis de triacetina usando 50% de metanol, ya que de esta forma se logró aumentar la estabilidad al minimizar la desorción de la enzima en el biocatalizador, teniendo como consecuencia un aumento en los porcentajes de conversión.

RML-OC fue el mejor biocatalizador para la obtención de 1,2-diacetina en las reacciones de hidrólisis de triacetina, permitiendo llegar a un 81% de conversión en 60 minutos, de esta forma es posible obtener más de 5 veces la cantidad de 1,2-diacetina que la que se obtiene cuando se usa la versión comercial inmovilizada de esta lipasa, ya que en este último caso las condiciones del medio minimizan las interacciones electrostáticas que se utilizan para unir enzima y soporte en el biocatalizador.

Los mejores porcentajes de conversión para 1,2-diacetina en las reacciones de hidrólisis/metanólisis con 50% de metanol se obtuvieron utilizando CALB-OC, en este caso es posible obtener un porcentaje de conversión del 33% a diferencia de cuando se usa la versión comercial inmovilizada de esta lipasa donde también se produce la 1,3-diacetina.

6. Recomendaciones

Se recomienda utilizar soportes mucho más hidrófobos para la preparación de biocatalizadores a usar en este tipo de reacciones como octadecilsephabeads, en este caso los biocatalizadores obtenidos presentarían un mayor factor de hiperactivación y sería posible disminuir la probabilidad de desorción de la enzima sin perder la irreversibilidad del proceso.

Se recomienda probar en estas reacciones otro tipo de biocatalizadores en los cuales la inmovilización sea irreversible como los preparados mediante unión covalente, de esta forma no hay posibilidad alguna de desorción de la enzima en el biocatalizador permitiendo obtener mejores porcentajes de conversión.

Se recomienda hacer uso de la química del glutaraldehído para la obtención de más biocatalizadores, alterando variables en las condiciones de modificación tales como el pH, el tiempo de incubación y la concentración de glutaraldehído, de esta forma es mayor la posibilidad de alterar las propiedades de la enzima.

Se recomienda probar otro tipo de modificadores para los biocatalizadores preparados como polietilenimina o dextran sulfato para determinar si es posible alterar más la estabilidad y regioselectividad que cuando se utiliza glutaraldehído.

Se recomienda al finalizar la reacción aislar el producto de interés para determinar mediante polarimetría si este se encuentra enriquecido en un enantiómero en particular o si por el contrario se da la mezcla racémica de 1,2-diacetina

Bibliografía

- Aguieiras, E. C. G., Ribeiro, D. S., Couteiro, P. P., Bastos, C. M. B., de Queiroz, D. S., Parreira, J. M., & Langone, M. A. P. (2016). Investigation of the Reuse of Immobilized Lipases in Biodiesel Synthesis: Influence of Different Solvents in Lipase Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(3), 485–496. <http://doi.org/10.1007/s12010-016-2008-9>
- Ahmed, M., Kelly, T., & Ghanem, A. (2012). Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemisation. *Tetrahedron*, 68(34), 6781–6802. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.049>
- Aminifar, M., & Emam-Djomeh, Z. (2014). Changes of Texture , Microstructure and Free Fatty Acid Contents of Lighvan Cheese during Accelerated Ripening with Lipase. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(1), 113–123.
- Anderson, E. M., Larsson, K. M., & Ole, K. (1998). One biocatalyst many applications: the use of *Candida antarctica B* lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 181–204.

- Armando, P.-S., Gisela, M.-A., Ramón, A.-B., Marcos Alberto, C.-O., Héctor Enrique, C.-R., & Conrado, G.-G. (2015). Simulación en Aspen de la combustión de mezclas diesel-biodiesel. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 16(1), 83–92. [http://doi.org/10.1016/S1405-7743\(15\)72109-8](http://doi.org/10.1016/S1405-7743(15)72109-8)
- Ayoub, M., & Abdullah, A. Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 2671–2686. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.054>
- Baldessari, A., Bruttomesso, A. C., & Gros, E. G. (1996). Lipase-Catalysed Regioselective Deacetylation of androstane derivatives. *Helvetica Chimica Acta*, 79(4), 999–1004. <http://doi.org/10.1002/hlca.19960790408>
- Barbosa, O., Fernández-Lafuente, R., Torres, R., & Ortiz, C. (2012a). Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*, 47(8), 1220–1227. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019>
- Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., & Fernández-Lafuente, R. (2012b). The slow-down of the CALB immobilization rate permits to control the inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. *Process Biochemistry*, 47(5), 766–774. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.009>

Barbosa, O. (2013). *Obtención de nuevos derivados de lipasa B de Candida antarctica (CALB) por técnicas de modificación químico estructural en fase sólida*. Universidad Industrial de Santander.

Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernández-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, 4(4), 1583–1600. <http://doi.org/10.1039/c3ra45991h>

Barriuso, J., Vaquero, M. E., Prieto, A., & Martínez, M. J. (2016). Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), 874–885. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.004>

Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., & Guisán, J. M. (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5), 486–493. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980605\)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9)

Bonet, J., Costa, J., Sire, R., Reneaume, J., & Elena, A. (2009). Revalorization of glycerol : Comestible oil from biodiesel synthesis. *Food and Bioproducts Processing*, 87, 171–178. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.06.003>

- Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20774–20840. <http://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Bosley, J. A., & Clayton, J. C. (1994). Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(10), 934–938. <http://doi.org/10.1002/bit.260431006>
- 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. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brocca, S., Secundo, F., Ossola, M., Alberghina, L., Carrea, G., & Lotti, M. (2003). Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Science*, 2312–2319. <http://doi.org/10.1110/ps.0304003.active>
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Patkar, S. A & Thim, L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/351491a0>
- Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G. G., Tolley, S., Tukenburg, J., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Menge U & Brady, L. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 245(1), 118–143. [http://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90501-9](http://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90501-9)

- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., & Guisan, J. M. (2009). Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1–4), 171–176. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.012>
- Cao, L., & Schmid, R. D. (2006). Cap 2 *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Wiley (pp 53-145). Delf The Nehterlands: Strauss GmbH.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., & Marty, A. (2012). Lipases: An Overview. *Methods Mol Biol*, 861, 3-30. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_1
- Casas, A., Ruiz, J. R., Ramos, M. J., & Pérez, A. (2010). Effects of Triacetin on Biodiesel Quality. *Energy & Fuels*, 24(8), 4481–4489. <http://doi.org/10.1021/ef100406b>
- Castillo, E., Pezzotti, F., Navarro, A., & López-Munguía, A. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: Solvent engineering approach. *Journal of Biotechnology*, 102(3), 251–259. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00050-6](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00050-6)
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J., Comeau, L., & Sarda, L. (2002). Distinction Between Esterases and Lipases : A Kinetic Study with Vinyl Esters and TAG. *Lipids*, 37(7), 653–662.
- Chapus, C., Sémériva, M., Bovier-lapierre, C., & Desnuelle, P. (1975). Mechanism of pancreatic lipase action: Interfacial activation of pancreatic lipase. *Biochemistry* , 15(23). <http://doi.org/10.1021/bi00668a006>

- Cheong, L.-Z., Tan, C.-P., Long, K., Affandi Yusoff, M. S., Arifin, N., Lo, S.-K., & Lai, O.-M. (2007). Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, *105*(4), 1614–1622. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.03.070>
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, *33*(7), 1443–1454. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Cyler, M., & Schrag, J. D. (1997). Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods in Enzymology*, *284*(1992), 3–27. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)84003-7](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)84003-7)
- Cyler, M., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Serreq, A. N., ... Rubin, B. (1994). A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(8), 3180–3186. <http://doi.org/10.1021/ja00087a002>
- De Caro, J., Boudouard, M., Bonicel, J., Guidoni, A., Desnuelle, P., & Rovey, M. (1981). Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, *671*, 129–138. [http://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90126-4](http://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90126-4)
- De Souza, R. ., Costa, I. C. R., Itabaiana, I., Flores, M. C., Lourenço, A. C., Leite, S. G. F., Miranda, L. S. M & Leal, I. C. R. (2013). Biocatalyzed Acetins Production under Continuous-Flow Conditions: Valorization of Glycerol Derived from Biodiesel Industry. *Journal of Flow Chemistry*, *3*(2), 41–45. <http://doi.org/10.1556/JFC-D-13-00001>

- Derewenda, Z. S., & Derewenda, U. (1991). Relationships among serine hydrolases : evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochem Cel Biol*, 69. <http://doi.org/10.1139/o91-125>
- Dhake, K. P., Thakare, D. D., & Bhanage, B. M. (2013). Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(2), 71–83. <http://doi.org/10.1002/ffj.3140>
- Dhaneshwar, S., Tewari, K., Joshi, S., Godbole, D., & Ghosh, P. (2011). Diglyceride prodrug strategy for enhancing the bioavailability of norfloxacin. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164(4), 307–313. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.03.006>
- Di Cosimo, R., Mc Auliffe, J., Poulouse, A. J., & Bohlmann, G. (2013). Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6437–6474. <http://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Eigived, P. (1989). Immobilized *Mucor miehei* lipase for transesterification. United States of America.
- Emmett, D., & Chandra, A. (2015). Understanding Obesity Perceptions in America: An Exploratory Study of Public Perceptions of the Problem and Possible Actions for Health Product Marketers. *Hospital Topics*, 93(4), 92–98. <http://doi.org/10.1080/00185868.2015.1120100>
- Fernández-Lafuente, R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., & Guisán, J. M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports.

Chemistry and Physics of Lipids, 93(1–2), 185–197. [http://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00042-5](http://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00042-5)

Fernández-Lafuente, R., Albuquerque, T. L. D., Rueda, N., Dos Santos, J. C. S., Barbosa, O., Ortiz, C., Binay, B., Özedmir & Gonçalves, L. R. B. (2016). Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochemistry*, 51(7), 865–874. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.002>

Fernández-Lafuente, R., Hirata, D. B., Albuquerque, T. L., Rueda, N., Virgen-Ortíz, J. J., & Tacias-Pascacio, V. G. (2016). Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 133, 117–123. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.008>

Fernández-López, L., Pedrero, S. G., Lopez-Carrobles, N., Gorines, B. C., Virgen-Ortíz, J. J., & Fernández-Lafuente, R. (2017). Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 98, 18–25. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.002>

Fernández-López, L., Pedrero, S. G., Lopez-Carrobles, N., Virgen-Ortíz, J. J., Gorines, B. C., Otero, C., & Fernández-Lafuente, R. (2017). Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. *Process Biochemistry*, 54, 81–88. <http://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.12.018>

Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J. M., Mateo, C., Bastida, A., Coca, J., Haramboure, T., Hernández-Justiz, O., Terreni, M & Guisán, J. M. (2001). Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4–6), 649–656. [http://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00080-1](http://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00080-1)

Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Fuentes, M., Mateo, C., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2003). Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(2), 232–237. <http://doi.org/10.1002/bit.10560>

Fernández-Lorente, G., Palomo, J. M., Mateo, C., Munilla, R., Ortiz, C., Cabrera, Z., ... Fernández-Lafuente, R. (2006). Glutaraldehyde Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Aminated Supports in the Presence of Detergents Leads to Improved Performance. *Biomacromolecules*, 7(9), 2610–2615. <http://doi.org/10.1021/bm060408+>

Fernández-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J. M., & Guisán, J. M. (2008). Interfacially activated lipases against hydrophobic supports : Effect of the support nature on the biocatalytic properties, 43, 1061–1067. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.009>

Filice, M., Marciello, M., Betancor, L., Carrascosa, A. V., Guisán, J. M., & Fernández-Lorente, G. (2011). Hydrolysis of fish oil by hyperactivated *Rhizomucor miehei* lipase immobilized by multipoint anion exchange. *Biotechnology Progress*, 27(4), 961–968. <http://doi.org/10.1002/btpr.635>

Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase : A novel structural approach. *Biochimie*, 82, 1033-1041.

Fureby, A. M., Virto, C., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1996). Acyl group migrations in 2-monoolein. *Biocatalysis and Biotransformation*, 14(2), 89–111.
<http://doi.org/10.3109/10242429609106879>

García-Galán, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernández-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353(16), 2885–2904.
<http://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

Garmroodi, M., Mohammadi, M., Ramazani, A., Ashjari, M., Mohammadi, J., Sabour, B., & Yousefi, M. (2016). Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 208–215. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.076>

Gill, I., & Patel, R. (2006). Biocatalytic ammonolysis of (5S)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-5-ethyl ester: Preparation of an intermediate to the dipeptidyl peptidase IV inhibitor Saxagliptin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(3), 705–709. <http://doi.org/10.1016/J.BMCL.2005.10.021>

Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., & Cygler, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, 3, 82–91.

Guisan, J M, Acosta, A., Filice, M., Fernandez-lorente, G., & Palomo, J. M. (2011). Kinetically controlled synthesis of monoglyceryl esters from chiral and prochiral acids

- methyl esters catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Bioresource Technology*, 102, 507–512. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.095>
- Gutenwik, J., Nilsson, B., & Axelsson, A. (2004). Effect of hindered diffusion on the adsorption of proteins in agarose gel using a pore model. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 161–172. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.052>
- Habeeb, A. F. S. A., & Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 126(1), 16–26. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90554-7](http://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90554-7)
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34. [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6)
- Hernández, K., Fernández-Lafuente, R., Garcia-Verdugo, E., & Porcar, R. (2011). Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(6–7), 510–517. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.005>
- Homann, M. J., Vail, R., Morgan, B., Sabesan, V., Levy, C., Dodds, D. R., & Zaks, A. (2001). Enzymatic Hydrolysis of a Prochiral 3-Substituted Glutarate Ester, an Intermediate in the Synthesis of an NK 1 /NK 2 Dual Antagonist. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 343(6–7), 744–749. [http://doi.org/10.1002/1615-4169\(200108\)343:6/7<744::AID-ADSC744>3.0.CO;2-E](http://doi.org/10.1002/1615-4169(200108)343:6/7<744::AID-ADSC744>3.0.CO;2-E)

Información Estadística Sector Biocombustibles en Colombia. (2017).

http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm

Jensen, J., Bysted, A., Dawids, S., Hermansen, K., & Hølmer, G. (1999). The effect of palm oil, lard, and puff-pastry margarine on postprandial lipid and hormone responses in normal-weight and obese young women. *British Journal of Nutrition*, 82(6), 469–479.

<http://doi.org/10.1017/S0007114599001725>

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20(5–6), 801–821. <http://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>

Johnson Duane, T. K. (2014). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 33(2), 482–489. <http://doi.org/10.1002/ep>

José, C., Bonetto, R. D., Gambaro, L. A., Guauque Torres, M. D. P., Foresti, M. L., Ferreira, M. L., & Briand, L. E. (2017). Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(3–4), 95–107. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.004>

José, C., & Briand, L. E. (2010). Deactivation of Novozym® 435 during the esterification of ibuprofen with ethanol: Evidences of the detrimental effect of the alcohol. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 99(1), 17–22. <http://doi.org/10.1007/s11144-009-0103-4>

- Karinen, R. S., & Krause, A. O. I. (2006). New biocomponents from glycerol. *Applied Catalysis A: General*, 306, 128–133. <http://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.03.047>
- Kazlauskas, R. J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends in Biotechnology*, 12(11), 464–472. [http://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90022-1](http://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90022-1)
- Kirk, O., & Würtz, M. (2002). Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development*, 6, 446–451. <http://doi.org/10.1021/op0200165>
- Knezevic, Z., Siler-Marinkovic, S., & Mojovic, L. (2007). Immobilized lipases as practical catalysts. *Acta Periodica Technologica*, (35), 151–164. <http://doi.org/10.2298/apt0435151k>
- Kumar, D. S., & Ray, S. (2014). Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation: An Overview. *Analytical & Bioanalytical Techniques*, 6(1), 1–10. <http://doi.org/10.4172/2155-9872.1000230>
- Lacerda, C. V., Carvalho, M. J. S., Ratton, A. R., Soares, I. P., & Borges, L. E. P. (2015). Synthesis of Triacetin and Evaluation on Motor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(8), 1625–1631. <http://doi.org/10.5935/0103-5053.20150133>
- Laszlo, J. A., Compton, D. L., & Vermillion, K. E. (2008). Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(4), 307–312. <http://doi.org/10.1007/s11746-008-1202-5>

Lean, M., Gruer, L., Alberti, G., & Sattar, N. (2010). Obesity — can we turn the tide ? Whose responsibility ? The real goal : prevention Changing the obesogenic environment. *Obesity*, 1261–1264.

Leoneti, A. B., Aragão-Leoneti, V., & de Oliveira, S. V. W. B. (2012). Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, 45, 138–145. <http://doi.org/10.1016/j.renene.2012.02.032>

Lo, S. K., Tan, C. P., Long, K., Yusoff, M. S. A., & Lai, O. M. (2008). Diacylglycerol oil-properties, processes and products: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 1(3), 223–233. <http://doi.org/10.1007/s11947-007-0049-3>

Lok, C. M. (1978). Versatile methods for the synthesis of mixed-acid 1,2-diacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 22(4), 323–337. [http://doi.org/10.1016/0009-3084\(78\)90020-8](http://doi.org/10.1016/0009-3084(78)90020-8)

Manoel, E. A., dos Santos, J. C. S., Freire, D. M. G., Rueda, N., & Fernández-Lafuente, R. (2015). Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 53–57. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>

Martinek, K., & Mozhaev, V. V. (2006). Immobilization of Enzymes: An Approach to Fundamental Studies in Biochemistry. In *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 57, 179–249 <http://doi.org/10.1002/9780470123034.ch3>

- Martinelle, M., Holmquist, M., & Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biophysica BB*, *1258*, 272–276.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(6), 1451–1463. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Matos, L. M. C., Leal, I. C. R., & De Souza, R. O. M. A. (2011). Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *72*(1–2), 36–39. <http://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2011.04.021>
- Matsuyama, T., Shoji, K., Watanabe, H., Shimizu, M., Saotome, Y., Nagao, T., Matsuo, N., Jase, T., Tokimitsu, I & Nakaya, N. (2006). Effects of diacylglycerol oil on adiposity in obese children: Initial communication. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *19*(6), 795–804. <http://doi.org/10.1515/JPEM.2006.19.6.795>
- Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungal lipases : a review. *Journal of Biotech Research*, *8*, 58–77.
- Meng, X., Zou, D., Shi, Z., Duan, Z., & Mao, Z. (2004). Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, *39*(1), 37–41. <http://doi.org/10.1007/s11745-004-1199-1>

- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802. <http://doi.org/10.2144/3705A0790>
- Mohapatra, S. C., & Hsu, J. T. (1999). Optimizing lipase activity, enantioselectivity, and stability with medium engineering and immobilization for β -blocker synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(2), 213–220. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990720\)64:2<213::AID-BIT10>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990720)64:2<213::AID-BIT10>3.0.CO;2-U)
- Mori, T., Ito, T., Liu, S., Ando, H., Sakamoto, S., Yamaguchi, Y., ... Hakoshima, T. (2018). Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Scientific Reports*, 8(1), 1294. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-19202-7>
- Moskowitz, G. J., Cassaigne, R., West, I. R., Shen, T., & Feldman, L. I. (1977). Hydrolysis of Animal Fat and Vegetable Oil with *Mucor miehei* Esterase . Properties of the Enzyme. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 25(5), 1146–1150. <http://doi.org/10.1021/jf60213a045>
- Mufrodi, Z., Rochmadi, S., & Budiman, A. (2012). Chemical Kinetics for Synthesis of Triacetin from Biodiesel Byproduct. *International Journal of Chemistry*, 4(2), 101–107. <http://doi.org/10.5539/ijc.v4n2p101>
- Mufrodi, Z., Rochmadi, Sutijan, & Budiman, A. (2014). Synthesis acetylation of glycerol using batch reactor and continuous reactive distillation column. *Engineering Journal*, 18(2), 29–39. <http://doi.org/10.4186/ej.2014.18.2.29>

- Nagaoka, K., & Yamada, Y. (1973). Purification of *Mucor* lipases and their properties. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(12), 2791–2796. <http://doi.org/10.1080/00021369.1973.10861078>
- Norin, M., Haeffner, F., Achour, A., Norin, T., & Hult, K. (1994). Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Science*, 3(9), 1493–1503. <http://doi.org/10.1002/pro.5560030915>
- Octave, S., & Thomas, D. (2009). Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, 91(6), 659–664. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.015>
- Ortiz, C., Ferreira, Ma. L., Barbosa, O., Dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Briand, L & Fernández-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catalysis Science & Technology*. <http://doi.org/10.1039/C9CY00415G>
- Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2002a). Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: Kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*, 13(12), 1337–1345. [http://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00325-7](http://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00325-7)
- Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Ortiz, C., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2002b). Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters.

Enzyme and Microbial Technology, 31(6), 775–783. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00169-2](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00169-2)

Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2003). General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, 4(1), 1–6. <http://doi.org/10.1021/bm025729+>

Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2004). Enzymatic resolution of (\pm)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques. *Tetrahedron Asymmetry*, 15(7), 1157–1161. <http://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.03.003>

Palomo, M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., Fernando, L., Pessela, B. C. C., Fern, G & Fern, R. (2006). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins, 39, 274–280. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>

Palomo, J. M., & Guisán, J. M. (2012). Different Strategies for Hyperactivation of Lipase Biocatalysts. In *Lipases and Phospholipases: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 861, pp. 329–341). <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>

Pastor, E., Otero, C., & Ballesteros, A. (1995). Enzymatic Preparation of Mono- and Di-Stearin by Glycerolysis of Ethyl Stearate and Direct Esterification of Glycerol in the

- Presence of a Lipase from *Candida Antarctica* (Novozym 435). *Biocatalysis and Biotransformation*, 12(2), 147–157. <http://doi.org/10.3109/10242429508998159>
- Patkar, S. A., Björkling, F., Zyndel, M., Schulein, M., Svendsen, A., Heldt-Hansen, H. ., & Gormsen, E. (1993). Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian J. Chem.*, 32, 76–80.
- Peirce, S., Tacias-Pascacio, V., Russo, M., Marzocchella, A., Virgen-Ortíz, J., & Fernández-Lafuente, R. (2016). Stabilization of *Candida antarctica* Lipase B (CALB) Immobilized on Octyl Agarose by Treatment with Polyethyleneimine (PEI). *Molecules*, 21(6), 751. <http://doi.org/10.3390/molecules21060751>
- Peppler, H. ., Dooley, J. ., & Huang, H. . (1975). Flavor development in Fontina and Romano cheese by fungal esterase. *Journal of Dairy Science*, 59(5), 859–862. [http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(76\)84288-9](http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(76)84288-9)
- Puricelli, L. (1989). O-(1,2 di-O-acetyl-glycero-3-phosphoryl)ethanolamine, a process for its preparation and its therapeutic use. European Patent Office.
- Quirino, B. F., Brasil, B. S. A. F., Laviola, B. G., Mendonça, S., & Almeida, J. R. M. (2014). Cap 15 *Biofuels in Brazil: Fundamental Aspects, Recent Developments, and Future Perspectives* (pp. 331–350).
- Rodrigues, R. C., & Fernández-Lafuente, R. (2010a). Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 66(1–2), 15–32. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008>

- Rodrigues, R. C., & Fernández-Lafuente, R. (2010b). Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(1–2), 1–22. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.02.003>
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6290–6307. <http://doi.org/10.1039/c2cs35231a>
- Rodrigues, A., Bordado, J. C., & Dos Santos, R. G. (2017). Upgrading the glycerol from biodiesel production as a source of energy carriers and chemicals - A technological review for three chemical pathways. *Energies*, 10(11). <http://doi.org/10.3390/en10111817>
- Rosenthal, R. J., Morton, J., Brethauer, S., Mattar, S., De Maria, E., Benz, J. K., Tittus, J & Sterrett, D. (2017). Obesity in America. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 13(10), 1643–1650. <http://doi.org/10.1016/J.SOARD.2017.08.002>
- Rotticci, D., Norin, T, Hult, K & Martinelle, M. (2000). *Biochimica et Biophysica Acta*. An active-site titration method for lipases, 1483, 132–140.
- Rueda, N., dos Santos, J. C. S., Torres, R., Ortiz, C., Barbosa, O., & Fernández-Lafuente, R. (2015). Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Adv.*, 5(15), 11212–11222. <http://doi.org/10.1039/C4RA13338B>
- Rueda, N., Fernández-Lafuente, R., Fernández-López, L., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Albuquerque, T. L., Dos Santos, J. C. S & Barbosa, O. (2016). Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-

glyoxyl agarose beads by using CaCl_2 . *Process Biochemistry*, 51(1), 48–52.

<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.015>

Ruíz Camacho, M. I. (2012). *Desarrollo de nuevos biocatalizadores de lipasas microbianas para la resolución cinética de propanolol y atenolol*. Universidad Industrial de Santander.

Sabuquillo, P., Reina, J., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (1998). “Interfacial affinity chromatography” of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1388(2), 337–348. [http://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00183-6](http://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00183-6)

Salihi, A., & Alam, M. Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, 50(1), 86–96. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>

Santaniello, E., Casati, S., & Ciuffreda, P. (2006). Lipase-Catalyzed Deacylation by Alcoholysis: A Selective, Useful Transesterification Reaction. *Current Organic Chemistry*, 10(10), 1095–1123. <http://doi.org/10.2174/138527206777698110>

Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12), 1608–1633. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V)

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M & Eggert, T. (2006). The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity, 39, 166–170. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.01.018>

- Serdarevich, B. (1967). Glyceride isomerizations in lipid chemistry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44(7), 381–393. <http://doi.org/10.1007/BF02666775>
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 3, 178-182. <http://doi.org/10.1155/2014/625258>
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R., & Van Langen, L. M. (2005). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatalysis and Biotransformation*, 23(3–4), 141–147. <http://doi.org/10.1080/10242420500183378>
- Sheldon, R., & Pereira, P. (2017). Biocatalysis engineering: The big picture. *Chemical Society Reviews*, 46(10), 2678–2691. <http://doi.org/10.1039/c6cs00854b>
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2014). Overview of Fungal Lipase: A Review. *Analytica y Bioanalytical Techniques*, 6, 486–520. <http://doi.org/10.4172/2155-9872.1000230>
- Sjursnes, B. J., & Anthonsen, T. (1994). Acyl migration in 1,2-dibutyryn dependence on solvent and water activity. *Biocatalysis*, 9, 285–297.
- Skjøt, M., Maria, L. De, Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S. A., Østergaard, P. R., & Brask, J. (2009). Understanding the Plasticity of the α / β Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties, *Chem Bio Chem*, 10, 520–527. <http://doi.org/10.1002/cbic.200800668>

- Smaniotto, A., Skovronski, A., Rigo, E., Tsai, S. M., Durrer, A., Foltran, L. L., & Treichel, H. (2014). Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 294–301. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100043>
- Solano, D. M., Hoyos, P., Hernáiz, M. J., & Alcántara, A. R. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology*, 115, 196–207. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.131>
- Sugiura, M., & Isobe, M. (1975). Studies on the mechanism of the lipase reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 397(2), 412–417. [http://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90130-8](http://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90130-8)
- Szczęśna-Antczak, M., Szelağ, J., Stańczyk, Ł., Borowska, A., & Antczak, T. (2016). Engineering of lipase-catalyzed transesterification reaction media using water and diethylamine. *Biocatalysis and Biotransformation*, 34(6), 253–264. <http://doi.org/10.1080/10242422.2016.1247825>
- Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R., & Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 118–127. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28(5), 628–634. <http://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.05.012>

- Tanaka, K., Mecca, S. P., & Yu, H. (2000). Lipase catalysis on monolayers at the air/water interface. 2. Diffusion-controlled kinetics on quasi-two-dimension. *Langmuir*, *16*(6), 2672–2676. <http://doi.org/10.1021/la990925w>
- Taylor, P., Gupta, R., Rathi, P., & Bradoo, S. (2007). Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils Lipase Mediated Upgradation of Dietary. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(6), 635–644. <http://doi.org/10.1080/10408690390251147>
- Torres, R., Pessela, B., Fuentes, M., Munilla, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2005). Stabilization of enzymes by multipoint attachment via reversible immobilization on phenylboronic activated supports. *Journal of Biotechnology*, *120*(4), 396–401. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.017>
- Turner, C., He, X., Nguyen, T., Lin, J. T., Wong, R. Y., Lundin, R. E., ... McKeon, T. (2003). Lipase-Catalyzed Methanolysis of Triricinolein in Organic Solvent to Produce 1,2(2,3)-Diricinolein. *Lipids*, *38*(11), 1197–1206. <http://doi.org/10.1007/s11745-003-1179-5>
- Umeda, T., Bauer, J. E., & Otsuji, K. (2006). Weight loss effect of dietary diacylglycerol in obese dogs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *90*(5-6), 208–215. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00592.x>
- Uppenberg, J., Morgens, H., Shamkant, P., & Alwyn, J. T. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, *2*(4), 293–308. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00031-9](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9)
- Uppenberg, J., Ohmer, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., & Jones, T. A. (1995). Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida*

- antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry*, 34(51), 16838–16851. <http://doi.org/10.1021/bi00051a035>
- Vieira, M. G. A., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <http://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Virgen-Ortiz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., Hirata, D. B., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., & Fernández-Lafuente, R. (2017). Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 96, 30–35. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>
- Von Minden, H. ., Morr, M., Milkereit, G., Heinz, E., & Vill, V. (2002). Synthesis and mesogenic properties of glycosyl diacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 114(1), 55–80. [http://doi.org/10.1016/S0009-3084\(01\)00202-X](http://doi.org/10.1016/S0009-3084(01)00202-X)
- Wang, Y. (2017). The Lid Domain in Lipases : Structural and Functional Determinant of enzymatic Properties, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5, 1–13. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) National Renewable Energy Laboratory (NREL) Office of Biomass Program (EERE) (2004). Cap 9 Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I, United States of America: Werpy, T., & Petersen, G.
- Wilson, L., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Illanes, A., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2006). Improvement of the functional properties of a thermostable lipase

from *alcaligenes sp.* via strong adsorption on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 975–980. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.032>

Yu, C. Y., Huang, L. Y., Kuan, I. C., & Lee, S. L. (2013). Optimized production of biodiesel from waste cooking oil by lipase immobilized on magnetic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24074–24086. <http://doi.org/10.3390/ijms141224074>

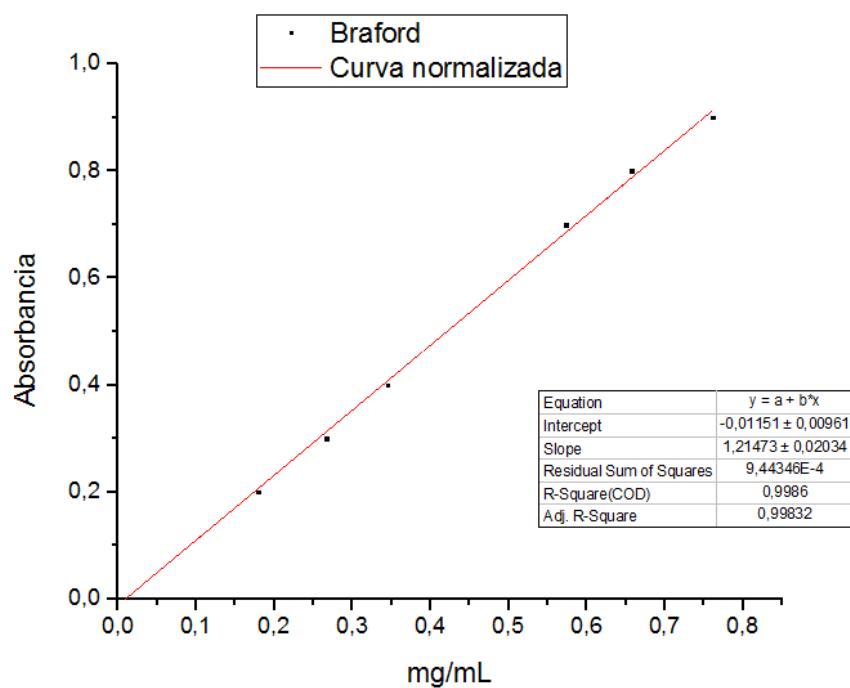
Zare, A., Nabi, M. N., Bodisco, T. A., Hossain, F. M., Rahman, M. M., Ristovski, Z. D., & Brown, R. J. (2016). The effect of triacetin as a fuel additive to waste cooking biodiesel on engine performance and exhaust emissions. *Fuel*, 182(2), 640–649. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.06.039>

Zhu, J., Li, X., Huang, C., Chen, L., & Li, L. (2013). Plasticization effect of triacetin on structure and properties of starch ester film. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 874–881. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.020>

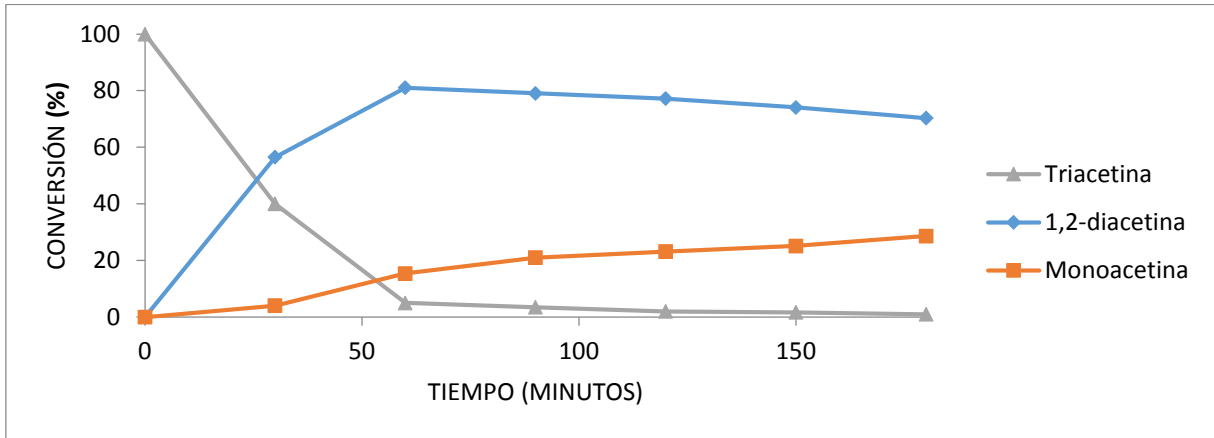
Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R., & Sanjust, E. (2016). Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. *Molecules*, 21(11), 1–25. <http://doi.org/10.3390/molecules21111577>

Apéndices

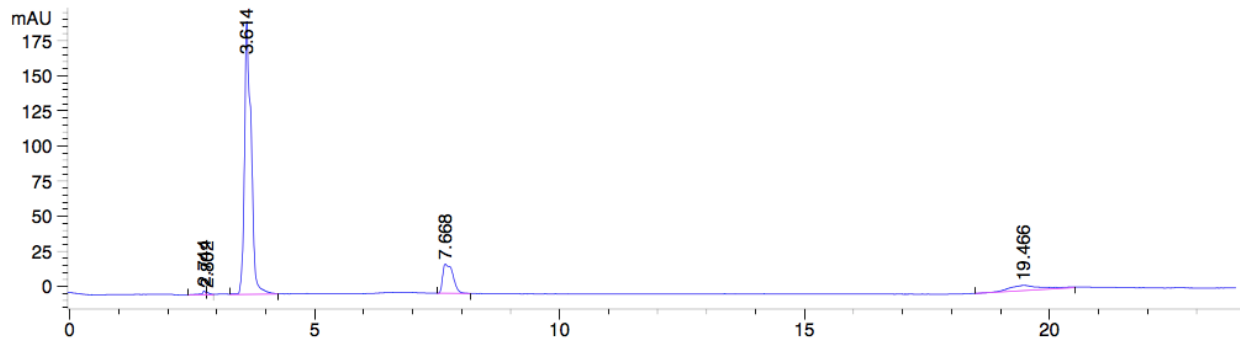
Apéndice A. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Bradford.



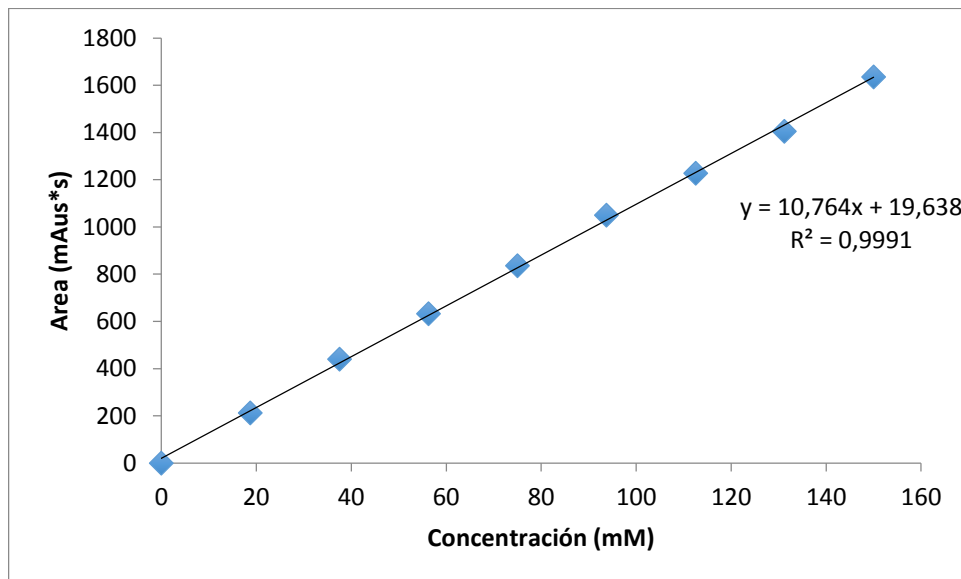
Apéndice B. Hidrólisis de triacetina (0,1 M) catalizada por RML-OC (6,6 mg/g) en buffer acetato a 25°C, pH 5 y con agitación a 200 RPM.



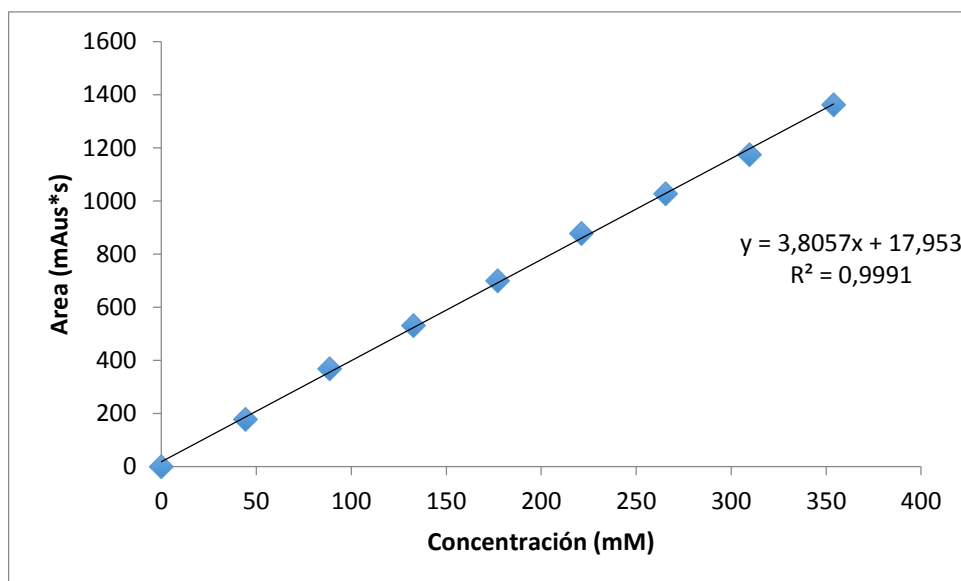
Apéndice C. Cromatograma obtenido luego de incubar RML-OC en buffer acetato pH 5 con 50% de metanol durante 300 minutos.



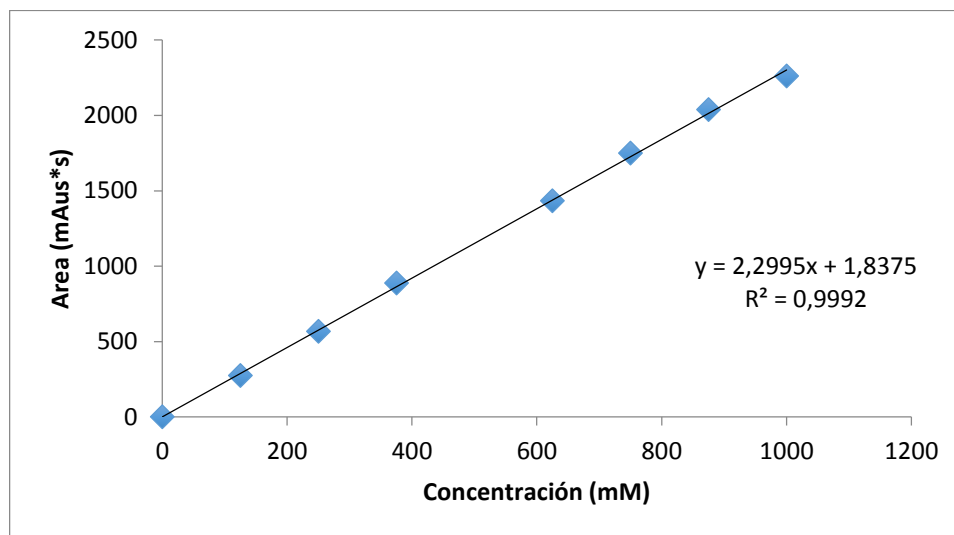
Apéndice D. Curva de calibración para la cuantificación de 1,2-diacetina obtenida en las reacciones.



Apéndice E. Curva de calibración para la cuantificación de 1,3-diacetina obtenida en las reacciones.



Apéndice F. Curva de calibración para la cuantificación de 2-monoacetina obtenida en las reacciones.



Apéndice G. Curva de calibración para la cuantificación de triacetina usada como sustrato en las reacciones.

