

Producción de 1,2-diacetina a partir de la metanólisis de triacetina utilizando
biocatalizadores de lipasas inmovilizadas

Vayolet Viñas Fontalvo

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniera Química

Directora

Claudia Cristina Ortiz López

Microbióloga, PhD

Codirectores

Liliana del Pilar Castro Molano

Ingeniera química, PhD

John Jairo Castillo León

Químico, PhD

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ingenierías Físicoquímicas
Escuela de Ingeniería Química
Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A mia madre Diana e alle mie sorelle Francis e Ilona, per tutto l'amore e il supporto che mi hai portato. Per la fiducia che hanno riposto in me.

Agradecimientos

A mi madre Diana, por todo el amor que me ha brindado y por toda esa admiración que me impulsa a ser mejor cada día.

A mi hermana Francis, por apoyarme y confiar en mí.

A Gladys Barajas y Yovanny Durán, quienes me brindaron su mano incondicionalmente.

A la Dra. Claudia Ortiz y al Dr. John Castillo, por darme la oportunidad de participar en su proyecto, por guiarme y ayudarme a culminar mi trabajo de grado.

A Mónica Ruiz, por enseñarme en el laboratorio y estar pendiente siempre del avance de mi investigación.

A los integrantes de Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología por la amabilidad y colaboración prestada.

Al laboratorio de Instrumental de Análisis Químico por la prestación de servicios que permitieron desarrollar una parte importante de este proyecto.

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

Tabla de contenido

Introducción	12
1. Objetivos	16
1.1 Objetivo General	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Cuerpo del Trabajo	16
2.1 Estado del arte.....	16
2.1.1 Método	22
2.1.1.1 Materiales y reactivos.	23
2.1.1.2 Metodología	24
2.1.1.2.1 Determinación de la concentración de proteína.....	24
2.1.1.2.2 Determinación de la actividad hidrolítica.....	24
2.1.1.2.3 Inmovilización de las lipasas sobre el soporte Octil-sefarosa (OC) y Octil-Glioxil-Sefarosa (OCGLX).	24
2.1.1.2.4 Análisis SDS-PAGE.	25
2.1.1.2.5 Metanólisis de Triacetina.	26
2.1.1.2.6 Análisis y determinación de los productos de reacción mediante HPLC.	26
2.1.2 Resultados y discusión.....	27
2.1.2.1 Determinación de la concentración de proteína y la actividad hidrolítica.....	27

2.1.2.2 Inmovilización de las lipasas de CALB y RML en los soportes OC y OCGLX.....	27
2.1.2.3 Análisis SDS-PAGE.	30
2.1.2.4 Metanólisis de triacetina	32
2.2.1.4.1 Efecto de la concentración de metanol en la hidrólisis/metanólisis de triacetina.....	32
2.2.1.4.2 Reusabilidad de los biocatalizadores en las reacciones de hidrólisis/metanólisis de Triacetina al 75 % de metanol.	37
2.2.1.4.3 Reacciones de metanólisis de triacetina.....	39
2.2.1.4.4 Efecto del uso de hexano como cosolvente en la metanólisis de triacetina catalizada por CALB-OC y CALB-OCGLX.	40
3. Conclusiones	44
4. Recomendaciones	45
Referencias Bibliográficas	46
Apéndices.....	66

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Actividad enzimática de los derivados inmovilizados en OC y OCGLX utilizando p-NPB como sustrato y porcentaje de inmovilización.	30
Tabla 2. Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanólisis de Triacetina 100mM y 25% de Metanol.	33
Tabla 3. Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanólisis de Triacetina 100mM y 50% de Metanol.	33
Tabla 4. Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanólisis de Triacetina 100mM y 75% de Metanol.	36
Tabla 5. Composición de los productos en la metanólisis de Triacetina 100mM y 100% de Metanol utilizando n-hexano como cosolvente. 3 h de reacción.	40
Tabla 6. Gradiente de elución para cromatografía en HPLC a 1mL/min y 24 °C.	69

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Representación de la producción de 1,2-diacetina a partir de triacetina.	14
Figura 2. Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas.	19
Figura 3. Metodología Experimental.	23
Figura 4. Cursos de Inmovilización de CALB en OC y OCGLX.	28
Figura 5. Curso de Inmovilización de RML en OC y OCGLX.	29
Figura 6. Análisis mediante SDS-PAGE de los biocatalizadores inmovilizados.	31
Figura 7. Fragmentación y apelmazamiento de los biocatalizadores en la reacción.	35
Figura 8. Actividad relativa de los biocatalizadores en 5 ciclos de reacción.	38
Figura 9. Actividad relativa del sobrenadante en la metanólisis al 75%.	42
Figura 10. Composición porcentual de los productos con 100% metanol y n-hexano.	43
Figura 11. Actividad relativa del sobrenadante en 100% metanol y n-hexano.	46
Figura 12. Curva de calibración para la cuantificación de proteína.	66
Figura 13. Ejemplo de cromatogramas de la reacción de hidrólisis/metanólisis.	70

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Curva de Calibración para la concentración de proteína.	66
Apéndice B. Cálculo de la actividad hidrolítica de las lipasas.....	67
Apéndice C. Cálculo de la composición porcentual de los productos de reacción.....	69
Apéndice D. Método para determinación de compuestos mediante HPLC.....	69

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CALB-OC	Lipasa B de <i>candida antarctica inmovilizada</i> en octil sefarosa
CALB-OCGLX	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada en octil glioxil sefarosa
DAG	Diacetina o Diacilglicerol
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (siglas en inglés)
MAG	Monoacetina o Monoacilglicerol
<i>p</i>-NPB	<i>para</i> -nitrofenil butirato
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RML-OC	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> inmovilizada en Octil sefarosa
RML-OCGLX	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> inmovilizada en Octil glioxil sefarosa
TAG	Triacetina o triacilglicerol

Resumen

Título: Producción de 1,2-diacetina a partir de la metanólisis de triacetina utilizando biocatalizadores de lipasas inmovilizadas *

Autor: Vayolet Viñas Fontalvo **

Palabras Clave: 1,2-diacetina, metanólisis de triacetina, lipasas inmovilizadas, adsorción hidrofóbica, unión covalente.

Descripción:

La producción de 1,2-diacetina a partir de triacetina, es un proceso tentativo para dar solución al exceso de glicerol obtenido como subproducto del biodiesel. Este compuesto es de difícil obtención mediante síntesis química debido a su alta probabilidad de migración e hidrólisis. En esta investigación se utilizaron la lipasa *B. candida antarctica* y la lipasa de *Rhizomucor miehei*, inmovilizadas por activación interfacial y unión covalente en soportes Octil-sefarosa y Octil-glioxil-sefarosa y los biocatalizadores comerciales Novozyme 435 FG y Lipozyme RM IM. Las reacciones de metanólisis de triacetina hacia la producción específica de 1,2-DAG se llevaron a cabo utilizando diferentes concentraciones de metanol para facilitar la solubilidad del sustrato. Todos los biocatalizadores produjeron 1,2-DAG. Los inmovilizados de RML y Novozyme 435 FG presentaron bajos rendimientos y mayor migración, por lo que fueron descartados para las reacciones de metanólisis. No se obtuvieron buenos resultados empleando 100% metanol, por lo que se probó la adición de n-hexano. CALB-OCGLX fue el biocatalizador óptimo para llevar a cabo las reacciones hasta concentraciones de 75% metanol, debido a su alta estabilidad en presencia los reactivos y los productos de la reacción, que permite su utilización en varios ciclos. CALB-OC presentó el mejor desempeño en 100% metanol y n-hexano, ya que presentó mayor velocidad de reacción y el cosolvente logró proteger a la lipasa de la agresividad del medio. Finalmente, en las composiciones del producto se obtuvo entre 40 - 50% de 1,2-DAG; los porcentajes de 1,3-DAG y monoacetinas fueron bajos, siendo el acetato de metilo el principal subproducto de las reacciones. La utilización de biocatalizadores regio-específicos en condiciones de pH ácido (5.5) a altas concentraciones de metanol y añadiendo n-hexano, puede establecer las bases de un proceso con miras al escalamiento industrial para la obtención de un compuesto de alto valor agregado como lo es 1,2-DAG.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Claudia Cristina Ortiz López, Microbióloga, PhD., Codirectores: Liliana del Pilar Castro Molano. Ingeniera química, PhD., Jhon Jairo Castillo León, Químico, PhD.

Abstract

Title: Production of 1,2-diacetin from triacetin methanolysis using immobilized lipase biocatalysts*

Author: Vayolet Viñas Fontalvo**

Key Words: 1,2-diacetin, triacetin methanolysis, immobilized lipases, hydrophobic adsorption, covalent binding.

Description: Production of 1,2-diacetin from triacetin is a tentative process to solve the excess glycerol obtained as a by-product of biodiesel. 1,2-DAG is difficult to obtain by chemical synthesis due to its high probability of migration and hydrolysis. In this research, *Candida antarctica* lipase B and *Rhizomucor miehei* lipase were immobilized by interfacial activation and covalent binding on Octyl-sepharose and Octyl-glyoxyl-sepharose beads. Commercial biocatalysts Novozyme 435 FG and Lipozyme RM IM were used too. Triacetin methanolysis reactions towards specific 1,2-DAG production were carried out using different concentrations of methanol to facilitate substrate solubility. All biocatalysts produced 1,2-DAG. RML biocatalysts and Novozyme 435 FG showed low yields and higher acyl migration, so they were discarded for the methanolysis reactions. Results were not good using 100% methanol, so the addition of n-hexane was tried. CALB-OCGLX was the optimal biocatalyst to carry out reactions up to concentrations of 75% methanol, due to its high stability in the presence of reagents and reaction products, which allows its use in several cycles. CALB-OC presented the best performance in 100% methanol and n-hexane since it presented a higher reaction speed and the cosolvent managed to protect the lipase from the aggressiveness of the medium. Finally, product compositions between 40-50% of 1,2-DAG were obtained; the percentages of 1,3-DAG and monoacetins were low, and methyl acetate was the main by-product of the reactions. The use of regiospecific biocatalysts under acidic pH conditions (5.5) at high concentrations of methanol and adding n-hexane, can establish the bases of a process with a view to industrial scaling to obtain a compound with high added value such as is 1,2-DAG.

* Bachelor Thesis

** Physical-chemist Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Claudia Cristina Ortiz López, Microbiologist, PhD., Co-directors: Liliana del Pilar Castro Molano, Chemical Engineer, PhD., Jhon Jairo Castillo León, Químico, Chemist, PhD.

Introducción

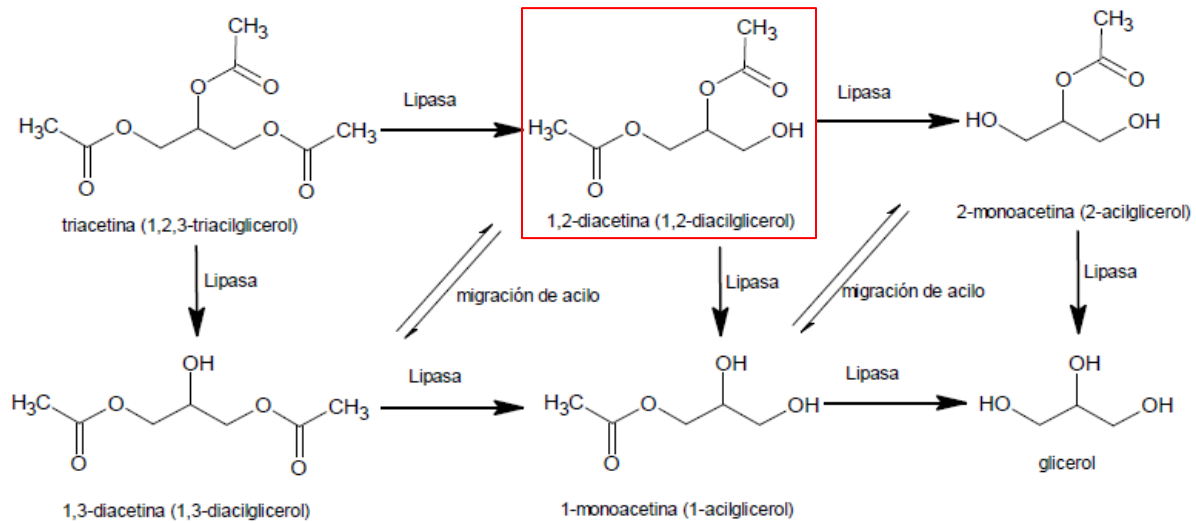
El desarrollo tecnológico acelerado de la sociedad contemporánea ha incrementado la demanda mundial de energía, causando el agotamiento de los combustibles fósiles y agudizando el cambio climático por su uso extensivo. Por ello, la búsqueda de energías más limpias y renovables se ha vuelto necesaria para desacelerar los posibles eventos climáticos catastróficos, asociados a las grandes emisiones de los GEI (gases efecto invernadero) (Ferreira-Leitão *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2015; Mallesham *et al.*, 2014; Pourzolfaghar *et al.*, 2016; Sudarsanam *et al.*, 2013). El desarrollo de biocombustibles ha generado interés por las ventajas que éstos presentan respecto a los combustibles tradicionales. Uno de estos productos es el biodiesel, que se produce a partir de fuentes de biomasa renovables, menos tóxicas que su homólogo fósil; el Diésel (Singh *et al.*, 2020; T. Tan *et al.*, 2010; Vasudevan y Briggs, 2008). Existen en Colombia 11 plantas productoras de biodiesel con capacidad instalada aproximada de 844.000 Ton/año (Fedebiocombustibles, 2021). Estas empresas producen el biocombustible a partir de la palma de aceite, una abundante materia prima en Colombia (Ramírez Camacho y Rodríguez Pava, 2019). Como subproducto principal de este proceso se obtiene glicerol en una relación aproximada del 10 (%p/p) y debido a que su demanda se ha mantenido constante, el exceso de oferta ha desplomado su valor comercial (DANE, 2019). Además, su acumulación se ha convertido en un problema de tipo ambiental. Por ello, es indispensable revalorizarlo a partir de la síntesis de nuevos productos (Karinen y Krause, 2006; Orozco-Núñez *et al.*, 2019).

El glicerol es una fuente importante de biomasa renovable con múltiples usos en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos (Gomes *et al.*, 2020). Se emplea como materia prima en reacciones de esterificación (Karinen y Krause, 2006), hidrogenólisis, deshidratación y acetilación (Sánchez *et al.*, 2011). Algunos productos obtenidos del glicerol que han adquirido mucha atención son los ésteres de glicerol o acetinas, que pueden ser monoacetinas (MAGs), diacetinas (DAGs) y triacetina (TAG). Estos compuestos son de gran atractivo comercial, debido a la diversidad de aplicaciones que tienen, principalmente en aditivos criogénicos, alimentos, medicamentos, cosméticos y biocombustibles (Konwar *et al.*, 2015; Aghbashlo *et al.*, 2018).

En el caso de la triacetina es una grasa simple, transparente y de sabor amargo, que se encuentra naturalmente en el aceite de hígado de bacalao, la mantequilla y otras grasas. A pesar de que este compuesto tiene diversas aplicaciones, su precio comercial disminuye al mismo ritmo que el del glicerol, por lo que la búsqueda de nuevas rutas para la valorización de los gliceril derivados es apremiante (Alvarez, 2019; Bonet *et al.*, 2009). Diversas investigaciones han demostrado que a partir de reacciones catalíticas selectivas utilizando triacetina pueden producirse compuestos quirales multifuncionales con alto valor agregado como el regioisómero puro 1,2-DAG (Figura 1.): un sustrato apto para la obtención de compuestos con posible actividad biológica, que incrementa el interés de producirlo (Alvarez, 2019; Hernandez *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2011).

Figura 1.

Representación esquemática de la producción de 1,2-diacetina a partir de triacetina



Adaptado de (Hernandez *et al.*, 2011).

La diacetina, o diacilglicerol (DAG) es un diglicérido resultante de la condensación de cualquiera de los dos grupos hidroxilos del glicerol con los grupos carboxilo de dos moléculas de agentes acetilantes como el ácido y el anhídrido acético. Es un líquido transparente, incoloro, higroscópico algo aceitoso, de olor levemente graso (FAO, 2008). Se produce naturalmente por la actividad hidrolítica de las lipasas durante la maduración de frutas y semillas oleaginosas, por lo que puede encontrarse en bajas concentraciones en aceites comestibles. La diacetina se encuentran en dos formas isoméricas, 1,3-DAG y 1,2-DAG. Es muy utilizada como aditivo alimentario y en la industria farmacéutica, ya que su consumo se asocia con beneficios en la salud relacionados con el peso corporal (Lee *et al.*, 2020; Nicholson y Marangoni, 2018). Además, la

utilización de 1,2-DAG puede optimizar los mecanismos farmacocinéticos de adsorción, distribución y metabolización de algunos profármacos (Dhaneshwar *et al.*, 2011). Las diacetinas normalmente son producidas por síntesis química; sin embargo, los productos obtenidos presentan problemas en la utilización a nivel farmacéutico. Sin embargo, debido a que durante su producción no hay control de la regio especificidad, ni de la enantioselectividad, factores claves en la síntesis de medicamentos (Laszlo *et al.*, 2008). Por este motivo, el uso de biocatalizadores regio-específicos y enantioselectivos como las lipasas puede ser prometedor para obtener 1,2-DAG a la pureza que la industria necesita.

Las lipasas constituyen uno de los tipos de enzimas más utilizadas en reacciones de hidrólisis enantioselectiva de ésteres racémicos en medios acuosos, porque naturalmente catalizan la hidrólisis de los tri-, di- y mono- glicéridos en ácidos grasos y glicerol (Jaeger *et al.*, 1999; Orlando *et al.*, 2005; Fernández-Lorente, *et al.*, 2002; Sudarsanam *et al.*, 2013) . Además, son activas frente a un amplio rango de sustratos y reacciones (Barbosa, 2009).

En virtud de lo señalado en los párrafos anteriores, es posible revalorizar la triacetina y a su vez el glicerol a partir de la síntesis selectiva de 1,2-diacilgliceroles mediante reacciones de metanólisis que mejoran la solubilidad del sustrato e incrementan el interés de su aplicación en la industria, partiendo de la implementación de una ruta de síntesis verde utilizando biocatalizadores de lipasas microbianas. Con base en lo anterior, a través de esta investigación se determinaron cuáles fueron las mejores condiciones para producir 1,2-DAG a partir de la metanólisis de triacetina haciendo uso de las lipasas de *candida antarctica B* (CALB) y *Rhizomucor Miehei* (RML) inmovilizadas mediante diferentes técnicas en soportes Octil (OC), Octil-Glioxil (OCGLX) y sus versiones comerciales Novozyme 435 FG y Lipozyme RM IM.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Obtener 1,2-DIACETINA a partir de la metanólisis de TRIACETINA catalizada por lipasas inmovilizadas de origen microbiano.

1.2 Objetivos Específicos

Realizar la inmovilización covalente de lipasas microbianas de *Candida antarctica* B y *Rhizomucor miehei*.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1 Estado del arte

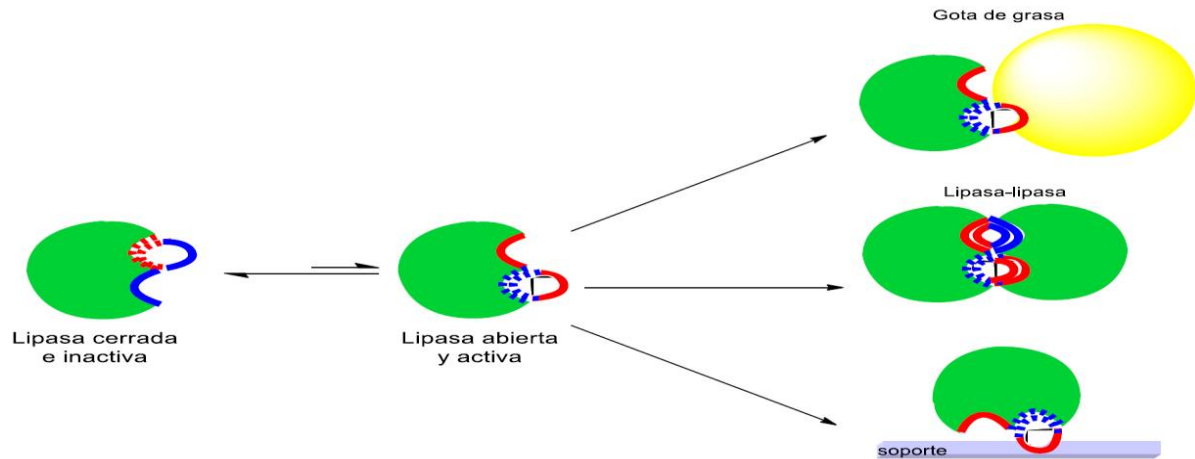
En los últimos años, la producción de biodiésel ha ganado mucha atención como alternativa frente a la disminución de las reservas de petróleo. Se espera que su demanda mundial incremente de 1660 billones de litros en 2017 a 1834 billones de litros en 2040 (Aghbashlo *et al.*, 2021; Mateos *et al.*, 2020). El glicerol obtenido como subproducto es una de las principales desventajas de los procesos actuales para su producción, por lo que en las últimas décadas la glicerina, como también se le conoce, ha sido objeto de investigación para revalorizarla y encontrar alternativas de síntesis rentables y sostenibles a largo plazo (Rodrigues *et al.*, 2017). Algunas de las rutas prometedoras para la revalorización del glicerol se basan en su transformación a partir de carbonatación, reformación para producción de hidrógeno y acetilación (He *et al.*, 2010; Okoye y Hameed, 2016;

Tan *et al.*, 2013). Mediante esta última reacción se obtiene la Triacetina (Karnjanakom *et al.*, 2018) de la que se pueden obtener monoacetinas y diacetinas por hidrólisis y alcoholólisis (Pecha *et al.*, 2016). Todos estos compuestos son de gran valor para la industria, pero en la actualidad se busca obtener sólo uno de estos productos quirales multifuncionales según fuera el caso (Hirata, *et al.*, 2016). Respecto a las diacetinas, las investigaciones sugieren que el regioisómero 1,2- posee un carbono como centro quiral que puede ser muy útil para la producción de O- (1,2-di-O-acetil-glicero-3-fosforil) etanolamina, un compuesto terapéutico, coadyuvante del tratamiento de la arteriosclerosis cerebral, dislipemia e hiperlipoproteinemia. Sin embargo, las reacciones involucradas en este proceso presentan migración de acilos y racemización que puede producir una mezcla de enantiómeros y regioisómeros que afectan la pureza del producto y dificultan su obtención (Hernandez *et al.*, 2011). Una de las rutas más innovadoras para mejorar la pureza de estos procesos es la catálisis enzimática, específicamente mediante el uso de lipasas en su mayoría de origen microbiano (Arana-Peña *et al.*, 2020a; Hirata, *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2019).

Las lipasas cumplen su función en la interfaz de las gotas de sustratos hidrofóbicos (Figura 2.). Este importante mecanismo se denomina activación interfacial; durante este la lipasa sufre una reorganización estructural en presencia de una interfaz hidrofóbica, donde la cadena polipeptídica móvil o *lid* del centro activo es sometida a un cambio conformacional (pasa de la conformación cerrada a la abierta) que aumenta la actividad al exponer la cavidad catalítica al medio. Así, la *lid* controla el acceso del sustrato al centro activo y determina la conformación abierta y cerrada, que dependen a su vez de las condiciones del medio de reacción (Arana-Peña *et al.*, 2020a; López-Gallego *et al.*, 2012; Manoel *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019). Estas enzimas incrementan las velocidades de las reacciones químicas sin consumirse y sin cambiar el equilibrio entre los reactivos y los productos (Mohamad *et al.*, 2015), pero son sensibles a

cualquier tipo de variación en las condiciones del proceso que pueden comprometer su estabilidad e inhibir su actividad (Guisan, 2006; Hernandez y Fernandez-Lafuente, 2011). Es por ello que, se han desarrollado diversas estrategias que incluyen el uso de técnicas de ingeniería conformacional como la modificación química, mutagénesis sitio dirigida, ingeniería del medio de reacción, inmovilización (preparación de derivados), entre otras (Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2020; Palomo *et al.*, 2003). Estas inmovilizaciones se realizan en soportes de diversos materiales orgánicos (Rodríguez-Restrepo y Orrego, 2020; Zdarta *et al.*, 2018) que deben mejorar y facilitar el acoplamiento del sitio activo de la lipasa a las moléculas del sustrato y deben tener distinta morfología para minimizar los problemas de difusión (Wong *et al.*, 2009). De esta forma los derivados o inmovilizados mejoran la utilización de las enzimas frente a su estado libre, además, facilitan su recuperación y reutilización, reduciendo así el costo de las enzimas muy valiosas utilizadas en el proceso (Choi *et al.*, 2015; Hernandez *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020).

Uno de los métodos de inmovilización más empleado es la adsorción física o activación interfacial, en la cual la lipasa es adsorbida físicamente en la superficie del soporte por diferentes fuerzas como las de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlace iónico (Jegannathan *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2020). En este método, la configuración molecular de la lipasa no sufre cambios importantes, lo que permite mantener una alta actividad después de la inmovilización (Brena *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2015). Además, el procedimiento es sencillo y de bajo costo, pero tiene algunas desventajas como la susceptibilidad a condiciones específicas de pH, temperatura y alta fuerza iónica del buffer (Brena *et al.*, 2013; Mohamad *et al.*, 2015).

Figura 2*Adsorción de lipasas sobre estructuras hidrofóbicas*

Tomado de (Rueda, 2016).

Por otro lado, el método de inmovilización mediante unión covalente, a diferencia de la adsorción, es un método irreversible que implica la adhesión a través de las cadenas laterales de lisina, cisteína, ácidos aspártico y glutámico, y los grupos funcionales en la superficie de la proteína, los cuales no son necesarios en la actividad catalítica de la lipasa (Godoy *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2007; Soleimani *et al.*, 2012; Tardioli *et al.*, 2011). Este método, ofrece un enlace muy fuerte entre la lipasa y el soporte, por lo que minimiza la probabilidad de desorción, permite la reutilización de la enzima cuando no ha perdido su actividad y mejora la estabilidad térmica y catalítica, incluso en condiciones severas de reacción (Hanefeld *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2020; Mehrasbi *et al.*, 2017).

Entre los soportes más comúnmente utilizados en la actualidad para adsorber las enzimas se encuentra la agarosa (y sus derivados). Debido a su estructura morfológica y sus propiedades de adsorción sirve como base para la generación de materiales que permiten uniones enzima-

soporte más fuertes, empleando grupos funcionales como el butilo, fenilo, hexilo y octilo (Jesionowski *et al.*, 2014). El soporte octil-agarosa (OC) permite la inmovilización, purificación, hiperactivación y estabilidad de la lipasa en un solo paso (Manoel *et al.*, 2015). A partir de este soporte se prepara el soporte OCGLX utilizado para inmovilizaciones covalentes irreversibles. Entre sus ventajas está el hecho de que no sufre alteraciones significativas respecto al OC (Bastida *et al.*, 1998; Fernandez-Lorente *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2006; Rueda, 2016).

Respecto a las lipasas, Una de las más utilizadas en química fina y en procesos a escala industrial es la lipasa de *Candida antarctica B* (CALB), debido a la robustez de los biocatalizadores preparados a partir de esta (Basso y Serban, 2019; Muñoz Solano *et al.*, 2012). CALB es estable ante un amplio rango de pH (Kirk y Christensen, 2002). Además, posee una *lid* pequeña que no recubre completamente el sitio activo en su conformación cerrada. Esta enzima es resistente a muchos solventes apolares como el hexano y el octano; también, es estable y activa en solventes polares como el acetonitrilo, la acetona y el dioxano (Skjøt *et al.*, 2009). CALB ha sido empleada industrialmente por la empresa BASF en la producción de dimetenamida-p, un herbicida de naturaleza quirál, reemplazando su antigua síntesis química, pues la utilización de la lipasa permitió la utilización equimolar de sustratos, la obtención de un exceso enantiomérico >99% y el uso de temperaturas inferiores a 60°C (Ditrich *et al.*, 1996).

Otra enzima muy estudiada en las investigaciones y utilizada industrialmente es la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) debido a su alta estabilidad, actividad y especificidad bajo diferentes condiciones. En la industria de alimentos se emplea en la modificación del sabor de los alimentos y en la hidrólisis parcial de acilgliceroles de los aceites vegetales. Además, es capaz de atacar las grasas provenientes de fuentes animales y vegetales. Su uso favorece el empleo de condiciones suaves de reacción (temperaturas y presiones más bajas) en comparación a los métodos

convencionales (Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010; Taylor *et al.*, 2007). Así mismo, se ha reportado su utilización en la obtención de compuestos de valor agregado, como los ésteres de isoamilo, ésteres de terpenos, biodiesel y compuestos enantioméricos puros (Fernandez-Lopez, *et al.*, 2016; Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010).

La acción de las lipasas inmovilizadas sobre diferentes sustratos ha sido ampliamente estudiada en la última década (Ismail y Baek, 2020). En el 2011, Hernández y colaboradores (Hernandez *et al.*, 2011) obtuvieron 1,2-DAG mediante reacciones de hidrólisis de triacetina catalizadas por lipasas de CALB y RML inmovilizadas en soportes hidrofóbicos Octil por activación interfacial y en soportes modificados con glutaraldehído mediante unión covalente. En el artículo se demostró que los biocatalizadores empleados fueron efectivos y mejoraron el rendimiento cuando se empleó la ingeniería del medio, obteniéndose los mejores resultados a pH 5,5 debido a una disminución en la migración de grupos acilo que favoreció la producción de 1,2-DAG.

Así mismo, Álvarez (Alvarez, 2019), estudió las reacciones de hidrólisis de triacetina en medios acuosos de buffer 100mM pH 5 (acetato y MES) para minimizar la migración de grupos acilo, luego adicionando metanol al 50% como cosolvente y reactivo, catalizando la reacción con biocatalizadores de CALB-OC, RML-OC, sus modificaciones con glutaraldehído y versiones comerciales de las dos lipasas, Novozyme 435 y Lipozyme RM IM, obteniendo como mejor resultado para las inmovilizaciones por activación interfacial a CALB-OC, con una conversión máxima a 1,2-DAG del 33%. De igual manera, cuando se realizó la modificación de los soportes con glutaraldehído se logró aumentar la estabilidad de las enzimas y al minimizar la desorción se logró un aumento en los porcentajes de conversión.

Adicionalmente, Arana-Peña y colaboradores (Arana-Peña *et al.*, 2020a) realizaron la inmovilización de lipasas de CALA, CALB, *candida rugosa* (CRL) y RML en soportes OC en 16 condiciones distintas (composición del medio, pH y temperatura) para analizar la actividad catalítica de las lipasas en diferentes sustratos, entre ellos la triacetina y producir una librería de biocatalizadores, los cuales, reportaron diferencias (menores al 30% entre los valores) en su actividad al hidrolizar la triacetina en 1,2-DAG y 1,3-DAG.

A partir de estos estudios puede establecerse que, los biocatalizadores enzimáticos poseen una amplia versatilidad a la hora de emplearse en medios de distinta naturaleza, que pueden ser orgánicos, acuosos y otros medios poco convencionales (Choi *et al.*, 2015; Hernandez *et al.*, 2011; Sharma & Kanwar, 2014). La inmovilización de las lipasas puede incrementar la productividad del biocatalizador y mejorar las propiedades catalíticas, haciendo las lipasas más atractivas para distintas aplicaciones (Guisan, 2006; Saifuddin *et al.*, 2013; Sears, 2020; Sheldon, 2011; Xie *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2005). Esta investigación evaluó distintas condiciones de operación para las reacciones de metanólisis de triacetina, empleando biocatalizadores de lipasas inmovilizadas en el laboratorio e inmovilizados comerciales, con el fin de establecer las condiciones más favorables para la producción del regioisómero 1,2-DAG.

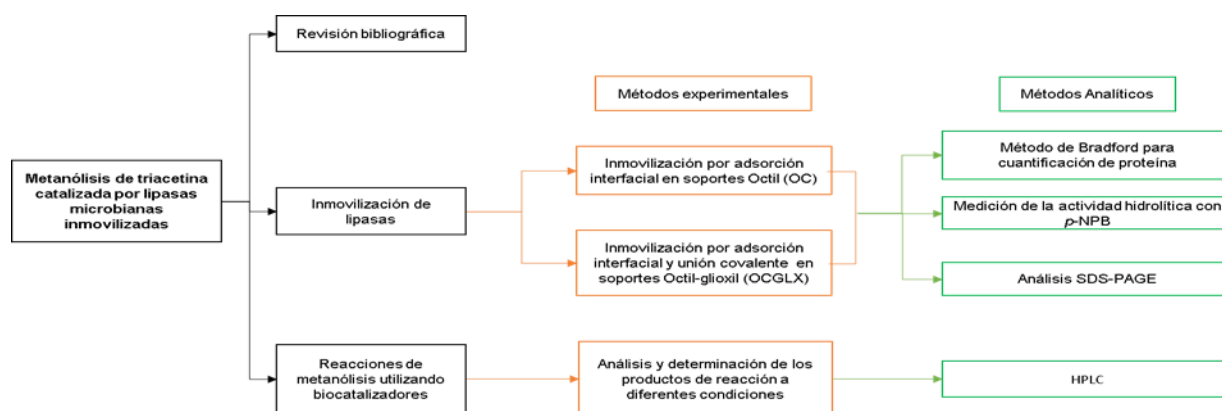
2.1.1 Método

La metodología desarrollada (figura 3.) Se compone de dos etapas principales: i) La inmovilización de las lipasas elegidas para la investigación y ii) La biotransformación por metanólisis de la triacetina a 1,2-DAG catalizada por las lipasas inmovilizadas en la primera etapa y los inmovilizados comerciales. Ambas etapas se llevaron a cabo mediante métodos experimentales que abarcan la inmovilización por adsorción física en el soporte Octil-sefarosa (OC) de las lipasas de CALB y RML, la inmovilización por adsorción y luego por unión covalente

en el soporte heterofuncional Octil-Glioxil (OCGLX) de las mismas dos lipasas mencionadas anteriormente, el montaje de las reacciones de metanólisis y la determinación de los productos de reacción. Además, fue necesario implementar métodos analíticos en la investigación que permitieran cuantificar y cualificar los resultados obtenidos en los experimentos. Los análisis requirieron la utilización del método de Bradford para la cantidad de proteína, el ensayo de p-NPB para la actividad hidrolítica, el análisis SDS-PAGE (electroforesis) y el análisis de muestras por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Figura 3.

Procedimiento empleado en la biotransformación por metanólisis de Triacetina a 1,2-diacetina utilizando biocatalizadores de lipasas microbianas.



2.1.1.1 Materiales y reactivos.

Las lipasas de *Candida antarctica* B (CALB), *Rhizomucor miehei* (RML), soporte Octil-sefarosa CL-4B (OC), triacetina, metanol, para-nitrofenilbutirato (p-NPB), acetonitrilo (ACN) (grado HPLC), acetato de metilo y demás solventes y reactivos de grado analítico fueron obtenidos de Sigma Aldrich. Los biocatalizadores Novozyme 435 FG y Lipozyme RM IM fueron donados por Coldaenzimas S.A.

El soporte heterofuncional Octil-glioxil por ser una modificación del soporte octil fue tomado de un preparado del laboratorio del Grupo de Investigación en Bioquímica y microbiología GIBIM de la Universidad Industrial de Santander.

2.1.1.2 Metodología.

2.1.1.2.1 Determinación de la concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína de las lipasas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976; Zor y Selinger, 1996). Se realizó una curva de calibración (Apéndice A) utilizando 1mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) como estándar y realizando diluciones (0.1-1 mg/mL) en buffer fosfato 5mM pH7. La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu 1800 UV-Vis ajustando la longitud de onda a 595 nm.

2.1.1.2.2 Determinación de la actividad hidrolítica.

La determinación de actividad hidrolítica de las lipasas se llevó a cabo midiendo el aumento en la absorbancia a 348 nm producido por la hidrólisis de p-NPB 0.4 mM a p-nitrofenol. Inicialmente se depositaron en la celda de medida 25 μ L de la solución lipásica, 1 mL de buffer fosfato de sodio 25 mM, pH 7 y 25 μ L de p-NPB (Arana-Peña et al., 2018).

En el caso de los derivados inmovilizados se resuspendieron 10 mg en 500 μ L de buffer fosfato de sodio 25 mM a pH 7. Se tomaron 100 μ L de suspensión, 1 mL de buffer, 25 μ L de p-NPB, y se midió la actividad. Las ecuaciones para el cálculo de las actividades están contempladas en el (Apéndice B).

2.1.1.2.3 Inmovilización de las lipasas sobre el soporte Octil-sefarosa (OC) y Octil-Glioxil-Sefarosa (OCGLX).

La inmovilización en OC y OCGLX mediante activación interfacial de las lipasas de CALB y RML se llevó a cabo usando 10 mg de proteína por g de soporte húmedo. Luego, el soporte fue

adicionado manteniendo una relación de 1 g de soporte por 10 mL de solución enzimática (extracto enzimático y Buffer fosfato 5 mM pH 7) utilizando un vial de 20 mL. La inmovilización se realizó a 25 °C en un agitador rotatorio de rodillos a 210 rpm. Se determinó la actividad hidrolítica del sobrenadante y la suspensión durante 1 h según el apartado 2.2.2. Una vez terminada la inmovilización de los derivados en OC, los biocatalizadores se filtraron, lavaron con abundante agua y se almacenaron a 4 °C para su posterior uso (Fernandez-Lorente et al., 2008).

Para la inmovilización por unión covalente, los biocatalizadores inmovilizados en OCGLX una vez lavados y filtrados, se resuspendieron en buffer Bicarbonato de sodio 50 mM, pH 10 durante 12 h para favorecer la unión covalente de la enzima en el soporte (Torres et al., 2005), finalizada la incubación a pH 10 se adicionó 1 mg/ml de borohidruro de sodio (NaBH_4) a la solución anterior. Luego, se llevó a un agitador orbital (Shaker) Thermo Scientific SHKA 4000-7 MaxQ a 150 rpm durante 30 min en baño de hielo. Después de la incubación, reducción, lavado y filtrado se almacenaron los derivados a 4°C (Rueda et al., 2015). En algunos casos el biocatalizador fue lavado con Triton X-100 a 4%(v/v) para retirar la enzima que no se inmovilizó covalentemente (Rios et al., 2019).

2.1.1.2.4 Análisis SDS-PAGE.

Con el fin de verificar las inmovilizaciones entre las moléculas de las enzimas y el soporte (Virgen-Ortíz et al., 2017) se realizó la electroforesis de SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli y Kang (Kang et al., 2002; Laemmli, 1970), utilizando un gel de concentración (stacking) 4% y un gel de separación 12%. Previo a la preparación de los geles, se disolvieron 5 mg de cada uno de los derivados preparados en 30 μL de buffer de carga o ruptura (Buffer Laemli 2X) y 5 μL de extracto enzimático en 20-30 μL del mismo buffer. Las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos, se centrifugaron y se sirvieron 10 μL -15 μL de sobrenadante en los pozos del gel. Para

la identificación se utilizaron 4 μ L del marcador de peso molecular S8445 SigmaMarker (6,500-200,000 Da). Seguido, se hizo el montaje del gel en la cámara de electroforesis (sistema Miniprotean de Biorad, Hercules, USA), a un voltaje de 100 V por 1 h. Una vez terminada la corrida, se analizó el gel mediante tinción con el método de azul de coomasie.

2.1.1.2.5 Metanólisis de Triacetina.

Las reacciones de metanólisis se llevaron a cabo con 100 mg de biocatalizador empleando una concentración 100 mM de Triacetina en soluciones compuestas por metanol/ buffer fosfato de sodio 500 mM pH 5.5 (25%, 50%, 75%) y metanol (100%) a 25 °C y 250 rpm empleando un agitador orbital Thermo Scientific SHKA4000-7 MaxQ. Se tomaron muestras periódicas durante 3 h y se analizaron por duplicado en un Cromatógrafo Líquido de Alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés). A partir de los cromatogramas se calculó la composición porcentual para la triacetina, diacetinas y monoacetinas, según la fórmula mostrada en el (Apéndice C).

2.1.1.2.6 Análisis y determinación de los productos de reacción mediante HPLC.

La triacetina y los productos de la reacción de metanólisis (1,2- y 1,3-diacetina, 1 y 2-monoacetina, acetato de metilo y ácido acético) se analizaron en un Cromatógrafo Líquido de Alta eficiencia marca Agilent 1100 , utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) y longitud de onda de 210 nm, usando una columna C-18 (5 μ m, 250 x 4.6 mm) y una temperatura de columna de 24 °C (Hernandez *et al.*, 2011). Se inyectaron 10 μ L de muestra a un flujo de 1 mL/min utilizando como fase móvil un gradiente de agua/acetonitrilo (ACN) (Apéndice D).

2.1.2 Resultados y discusión

2.1.2.1 Determinación de la concentración de proteína y la actividad hidrolítica.

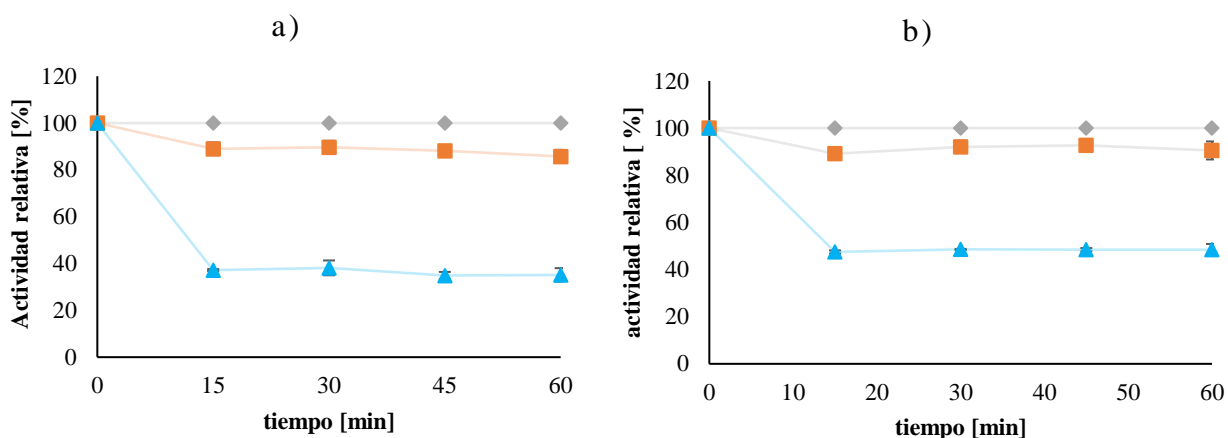
Se calculó la concentración de proteína de los extractos enzimáticos de CALB y RML, siendo 6.3 mg/mL y 2.9 mg/mL. La cantidad de proteína presente en los extractos enzimáticos suele estar condicionada por factores como el proveedor y el volumen de solución en el frasco al momento de tomar el extracto. Normalmente, en la literatura se encuentran concentraciones similares a las reportadas en este trabajo para las soluciones lipásicas más comerciales (Arana-Peña *et al.*, 2020c). A partir de los datos anteriores, se añadieron 1.6 mL de extracto de CALB y 3.6 mL de extracto de RML según el biocatalizador que se deseaba preparar. Esto con el fin de proporcionar 10 mg de proteína a 1 g de soporte OC u OCGLX para obtener un derivado con alta carga de enzima (La capacidad máxima de carga de este tipo de soportes ha sido estudiada por algunos autores (Fernández-López *et al.*, 2017; Tacias-Pascacio *et al.*, 2016)).

2.1.2.2 Inmovilización de las lipasas de CALB y RML en los soportes OC y OCGLX.

Durante el proceso de inmovilización de CALB en Octil (CALB-OC) (figura 4a.) y en Octil-Glioxil (CALB-OCGLX) (figura 4b.) se observó una disminución en su actividad respecto a la enzima libre. La razón por la que disminuye la actividad durante la inmovilización es probablemente debido a una distorsión en la conformación más activa de la CALB por efecto de las fuerzas hidrofóbicas generadas durante la adsorción al soporte (Khan *et al.*, 2017; Skjøt *et al.*, 2009). Adicionalmente, la velocidad de inmovilización fue rápida, ya que pasados 15 minutos cerca del 70% de la lipasa se había adsorbido al soporte. Este resultado del curso de inmovilización en los soportes hidrofóbicos OC y OCGLX concuerda con reportes anteriores, donde se hace énfasis en que la mayor parte de la lipasa logra inmovilizarse en pocos minutos (Arana-Peña, *et al.*, 2019a; Hirata, *et al.*, 2016a; Hirata *et al.*, 2016b; Rueda *et al.*, 2015).

Figura 4

Cursos de Inmovilización de CALB en OC y OCGLX

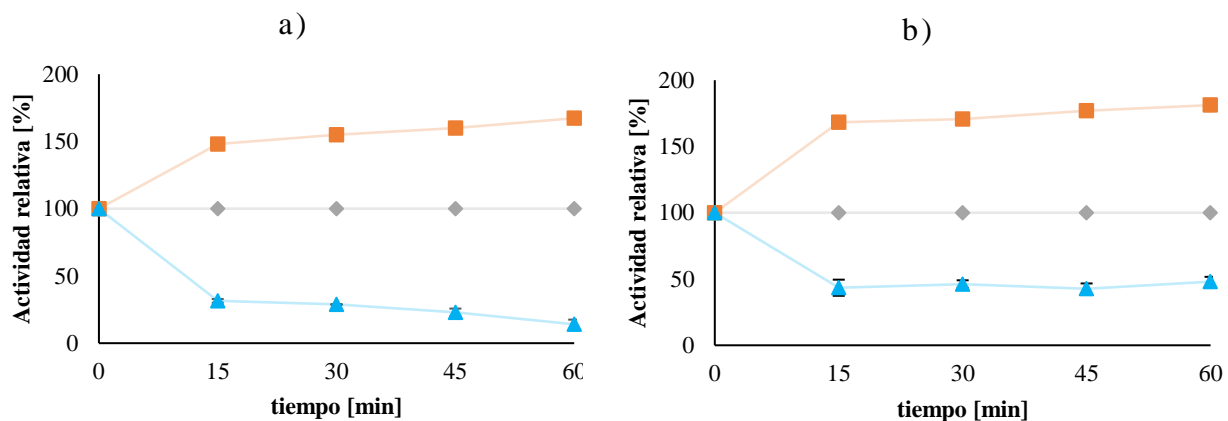


Curso de Inmovilización de CALB (10mg proteína/g de soporte) en buffer Fosfato 5mM a pH 7, 210rpm y 25 °C utilizando p-NPB 0,4 mM como sustrato. a) soporte OC b) Soporte OCGLX. Rombos: muestra de referencia; cuadrados: muestra de suspensión; triángulos: muestra de sobrenadante.

Por el contrario, cuando se inmovilizó RML en Octil (RML-OC) (figura 5a.) y en Octil-Glioxil (RML-OCGLX) (figura 5b.) la enzima se hiperactivó rápidamente, la actividad relativa de la suspensión fue aproximadamente 170% respecto a la de la enzima libre. La hiperactivación de RML en este tipo de soporte coincide con varios estudios realizados por otros autores (Arana-Peña *et al.*, 2020b; Hirata, *et al.*, 2016a), y ocurre porque la *lid* en las condiciones de inmovilización a baja fuerza iónica permite que el sitio activo de la enzima quede expuesto al medio de reacción, favoreciendo la interacción entre la enzima y el sustrato (Chaniotakis, 2004; Z. S. Derewenda y Derewenda, 1991; Fernandez-Lopez, *et al.*, 2016; Grochulski *et al.*, 1994; Vassel *et al.*, 1993).

Figura 5

Cursos de inmovilización de RML en OC y OCGLX



Curso de Inmovilización de RML (10mg proteína/g de soporte) en buffer Fosfato 5mM a pH 7, 210 rpm y 25 °C. utilizando p-NPB 0,4 mM como sustrato. a) OC b). OCGLX. Rombos: muestra de referencia; cuadrados: muestra de suspensión; triángulos: muestra de sobrenadante.

Respecto a la actividad específica para CALB y RML en los soportes OC y OCGLX, se observó que ambas lipasas inmovilizadas en OC presentaron mayor actividad que las inmovilizadas en OCGLX (Tabla 1.). Algunos autores han reportado comportamientos similares para las lipasas de *Candida antarctica A* (CALA) y *Candida Rugosa* (CRL) (Suescun *et al.*, 2015) y sugieren que esta ligera diferencia en la actividad de las lipasas inmovilizadas ocurre debido a la incubación a pH alcalino al que se someten los derivados de OCGLX, que suele ser un factor inhibidor de la actividad enzimática; sin embargo esta pérdida es muy pequeña gracias a la alta estabilización que se alcanza inicialmente debido a la inmovilización por activación interfacial (Liang *et al.*, 2000; Palomo, *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 1996).

Tabla 1

Actividad enzimática de los derivados inmovilizados en OC y OCGLX utilizando p-NPB como sustrato y porcentaje de inmovilización.

Biocatalizador	CALB-OC	RML-OC	CALB-OCGLX	RML-OCGLX
Actividad [U/g de soporte]	87.0 ± 6.4	53.7 ± 2.0	51.7 ± 0.5	37.2 ± 0.7
Actividad Específica [U/mg proteína]	13.2 ± 1.0	10.5 ± 0.4	8.4 ± 2.9	9.2 ± 0.2
Porcentaje de inmovilización [%]	75.6 ± 2.6	73.7 ± 0.9	55.8 ± 0.2	61.1 ± 3.3

2.1.2.3 Análisis SDS-PAGE.

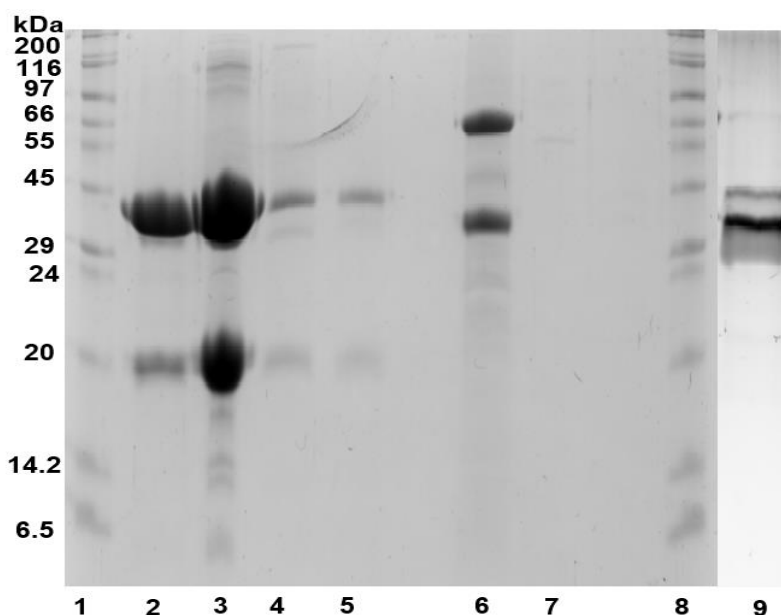
El análisis por electroforesis (Figura 6.) permitió identificar claramente la presencia de CALB (Línea 3) y RML (línea 7) en los extractos enzimáticos con pesos moleculares aproximados de 33 kDa y 31 kDa, los cuales corresponden a las lipasas de CALB y RML (Derewenda y Derewenda, 1991; Patkar et al., 1993). Adicionalmente, se identificaron estas mismas bandas ligeramente menos intensas en los derivados de CALB-OC (línea 2) y RML-OC (Línea 9) lo cual corrobora la inmovilización por activación interfacial de las enzimas en el soporte, que se desorben a causa del tratamiento con el buffer de ruptura.

Por otro lado, CALB-OCGLX sin lavado (Línea 4) y lavada con Tritón X-100 para eliminar la enzima no inmovilizada covalentemente (Línea 5) exhiben unas bandas mucho más delgadas y claras, lo cual implica que la cantidad de enzima que se desorbe es poca, indicando que la mayoría de las moléculas permanecen unidas covalentemente al soporte (Arana-Peña, et al., 2019). Además, CALB-OCGLX que se sometió al lavado con detergente (que tiene un efecto desorbedor en las

inmovilizaciones) da un indicio de la fuerte adsorción que presenta esta lipasa sobre los soportes hidrofóbicos al exhibir aún una pequeña banda, que representa aproximadamente un 10% de las moléculas presentes en el soporte (Rueda *et al.*, 2015). Finalmente, RML-OCGLX (línea 7) no exhibe ninguna banda lo que implica que para esta lipasa el lavado con agua, la incubación y la reducción fueron suficientes para eliminar toda la enzima no inmovilizada covalentemente.

Figura 6.

Análisis mediante SDS-PAGE de los biocatalizadores inmovilizados



Análisis mediante SDS-PAGE de los biocatalizadores inmovilizados. Línea 1: Marcador de peso molecular (200-6,5 kDa SigmaMarker), Línea 2: CALB-OC, Línea 3: Extracto de CALB, Línea 4: CALB-OCGLX, Línea 5: CALB-OCGLX lavado con Tritón X-100 4%(v/v), Línea 6: Extracto de RML, Línea 7: RML-OCGLX, Línea 8: Marcador de Peso molecular (200-6,5 kDa SigmaMarker), Línea 9:RML-OC.

2.1.2.4 Metanólisis de triacetina.

2.2.1.4.1 Efecto de la concentración de metanol en la hidrólisis/metanólisis de triacetina.

En la hidrólisis/metanólisis de triacetina en presencia de 25% y 50% de metanol, los resultados de la conversión de la TAG hacia los productos de reacción (1,2-DAG, 1,3-DAG, 2-MAG, 1-MAG) se resumen en las Tabla 2. y Tabla 3. Además de los di- y monoacilgliceroles, se obtuvieron otros productos como son: acetato de metilo y ácido acético. La presencia de este último compuesto en el medio propició la caída del pH de la reacción de 5.5 hasta casi 4.

CALB-OC (Tabla 2. y Tabla 3.) mostró el mejor rendimiento en ambas condiciones de reacción (25 y 50%); sin embargo, se observó que la velocidad de reacción fue diferente, debido a que la composición porcentual máxima hacia 1,2-DAG se obtuvo casi a una hora del inicio de la reacción para 25% de metanol y a los 30 min para 50% de metanol. Por otro lado, en la preparación covalente (CALB-OCGLX) se obtuvieron porcentajes menores de conversión respecto a CALB-OC, debido a que la actividad reportada para este biocatalizador fue menor. Por otro lado, la producción de 1,3-DAG fue menor para CALB-OC y CALB-OCGLX con la concentración más alta de metanol, debido a que a medida que disminuye la cantidad de agua en el medio y aumenta la cantidad de metanol, aumenta la polaridad de la mezcla que refuerza la asociación entre las dos cadenas acilo, desfavoreciendo la migración del isómero 1,2- al 1,3 (Serdarevich, 1967; Sjursnes y Anthonsen, 1994). Cabe anotar que, entre los experimentos realizados con las enzimas inmovilizadas en el laboratorio (CALB-OC, CALB-OCGLX, RML-OC y RML-OCGLX) y las comerciales (Novozyme 435 y Lipozyme RM IM) se observaron ligeras diferencias en la regio especificidad frente a los productos de reacción, lo que se atribuye a la diferencia morfológica de los soportes sobre los que se inmovilizaron las enzimas, ya que esto puede ocasionar mayor

probabilidad de variación en las propiedades de la lipasa al generar cambios conformacionales significativos (Cabrera *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2007).

Tabla 2.

Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanólisis de Triacetina 100mM y 25% de Metanol

Biocatalizador	t [min]	2-MAG [%]	1-MAG [%]	1,3-DAG [%]	1,2-DAG [%]	Otros [%]
CALB-OC	60	7.87 ±0.28	0.81 ±0.24	1.05 ±0.02	47.70 ±0.61	40.87 ±0.40
CALB-OCGLX	180	4.63 ±0.21	3.50 ±0.04	7.80 ±0.05	39.41 ±0.09	33.83 ±1.05
Novozyme 435 FG	60	5.81 ±0.21	2.38 ±0.23	15.16 ±0.32	38.68 ±1.21	71.75 ±0.70
RML-OC	180	1.48 ±0.11	0.21 ±0.22	4.00 ±0.11	12.87 ±0.42	11.82 ±0.70
RML-OCGLX	60	4.63 ±0.21	0.45 ±0.30	10.13 ±0.50	21.42 ±0.54	52.90 ±0.44
Lipozyme RM IM	180	1.48 ±0.05	1.26 ±0.12	11.33 ±0.30	13.98 ±0.15	55.42 ±0.15

Tabla 3.

Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanólisis de Triacetina 100mM y 50% de Metanol

Biocatalizador	t [min]	2-MAG [%]	1-MAG [%]	1,3-DAG [%]	1,2-DAG [%]	Otros [%]
CALB-OC	30	4.23 ±0.21	0.65 ±0.31	0.44 ±0,12	49.87 ±0.60	37.92 ±0.82
CALB-OCGLX	180	3.46 ±0.21	2.37 ±0.05	2.09 ±0,11	40.56 ±0.91	39.66 ±0.70
Novozyme 435 FG	60	7.38 ±0.33	2.77 ±0.14	8.03 ±0,53	44.42 ±0.80	19.37 ±0.24
RML-OC	180	0.21 ±0.02	0.83 ±0.14	1.82 ±0,10	1.49 ±0.23	2.30 ±0.22
RML-OCGLX	180	0.48 ±0.15	0.73 ±0.42	2.90 ±0,14	2.31 ±0.11	1.71 ±0.22
Lipozyme RM IM	180	34.02 ±0.52	4.65 ±0.21	4.05 ±0,11	2.57 ±0.33	2.34 ±0.12

En el caso de la versión comercial de CALB inmovilizada (Novozyme 435 FG), la composición máxima porcentual de 1,2-DAG obtenida a 25% y 50% de metanol fue 38.68% y 44.2% respectivamente, pero su comportamiento fue distinto al de las enzimas de CALB inmovilizadas en el laboratorio (Tabla 2. y Tabla 3.), ya que pasada 1 h de reacción decayó la composición porcentual de 1,2-DAG, y se produjo una mayor cantidad de 1,3-DAG, por lo que la tasa de migración fue mayor. Además, los diacilgliceroles se hidrolizaron rápidamente hacia su respectivo monoglicérido. En la metanólisis al 50%, Novozyme tuvo un notable cambio en su apariencia original (figura 7b.), pues su color blanco brillante se opacó, mostró signos de hinchazón y apelmazamiento, además de un aparente fraccionamiento mecánico que dejó la lipasa expuesta al metanol causando su inactivación, ya que la CALB se caracteriza por ser muy sensible a este tipo de alcohol de cadena corta (Chen y Wu, 2003; Shimada *et al.*, 1999). Además, el soporte que se utiliza para esta inmovilización (Lewatit VP OC 1600) tiende a disolverse en algunos medios orgánicos con presencia de compuestos polares como el metanol que pueden afectar la estructura morfológica de la enzima, causando distorsión y dificultad para controlar sus propiedades (José *et al.*, 2017; Ortiz *et al.*, 2019). Otros autores, atribuyen esta afectación al hecho de que la resina acrílica de la que está hecha el soporte es capaz de absorber el metanol que termina bloqueando la entrada del triglicérido y deteniendo la reacción (Chen y Wu, 2003), por lo que en esta investigación se estableció que no es viable usar el biocatalizador Novozyme bajo las condiciones de reacción empleadas.

Para RML-OC (Tabla 2. y Tabla 3.) las reacciones fueron más lentas y no se obtuvieron resultados tan favorables. La composición máxima porcentual de 1,2-DAG con 25% de metanol en las 3 h fue de 12.87% y hacia la 1,3-DAG fue del 4%; esta proporción entre los diacilgliceroles puede indicar que hubo mayor migración entre los isómeros o se favoreció la naturaleza 1,3-

específica de la lipasa. Respecto al derivado heterofuncional RML-OCGLX (Tabla 2.), se obtuvo una mayor composición de 1,2-DAG (21.42%) en comparación a RML-OC (12.87%) e incluso que para Lipozyme RM IM (13.98%) que está inmovilizado en un soporte Duolite ES 562 mediante intercambio iónico (Cao y Schmid, 2006; Eigved, 1989). El desempeño de este biocatalizador pudo verse alterado por la caída del pH (4) hasta un valor cercano al del punto isoeléctrico de la lipasa (3.8), que pudo ocasionar una competencia en la interacción iónica entre soporte-enzima y enzima-sustrato (Derewenda *et al.*, 1992).

Figura 7

Cambio físico de los biocatalizadores comerciales en las reacciones de hidrólisis/metanólisis.



Fragmentación y apelmazamiento de los biocatalizadores al final de la hidrólisis/metanólisis de 100 mM de triacetina (50% metanol, 250 rpm, 25 °C). a) Lipozyme RM IM, b). Novozyme 435 FG.

Con la concentración de metanol al 50%, la composición porcentual de 1,2-DAG fue aún menor (Tabla 3.), por lo que se cree que el bajo rendimiento de la lipasa se debe a una inactivación de RML-OC y de RML-OCGLX, causada por la alta concentración de metanol (Lotti *et al.*, 2015; Su y Wei, 2008). Para el caso de Lipozyme, el biocatalizador presentó un cambio en la apariencia al igual que Novozyme (figura 7a.), observándose una fragmentación mecánica del biocatalizador probablemente por efecto de la agitación; las partículas se aglomeraron y otras partes del soporte

quedaron en el fondo del vial. Tal y como se ha reportado en otros trabajos, en este caso puede deducirse que el metanol actúa como un sustrato inhibitor para este biocatalizador. Además, la disminución de la velocidad inicial es causada por un “efecto arrastre” por parte del alcohol que “deshidrata” a la enzima inmovilizada en el soporte y disminuye la actividad de la lipasa (Chulalaksananukul *et al.*, 1990).

Posteriormente, se evaluó el aumento de la concentración de metanol en el medio a 75% para probar el rendimiento de los biocatalizadores de CALB-OC y CALB-OCGLX que fueron los que tuvieron los mejores resultados a 25 y 50% de alcohol. Tal y como se observa en la Tabla 4. La composición de 1,2-DAG aumentó ligeramente en ambos biocatalizadores. En este caso, el pH de la reacción disminuyó en menor proporción que las reacciones anteriores, probablemente porque la cantidad de ácido acético producido disminuyó; esto se comprobó porque el pico correspondiente a este compuesto fue casi imperceptible en los cromatogramas (no se muestran los resultados), obteniéndose prácticamente como único subproducto acetato de metilo. Hasta el momento los preparados CALB-OC y CALB-OCGLX presentaron estabilidad a altas concentraciones de metanol, a temperatura ambiente, lo cual han sido reportados por otros autores empleando esta lipasa en este tipo de soportes hidrofóbicos (Rios *et al.*, 2019; Virgen-Ortíz *et al.*, 2017).

Tabla 4.

Composición porcentual máxima de los productos de reacción en la hidrólisis/metanolisis de Triacetina 100mM y 75% de Metanol.

Biocatalizador	t [min]	2-MAG [%]	1-MAG [%]	1,3-DAG [%]	1,2-DAG [%]	Otros [%]
CALB-OC	120	1.60 ±0.03	0.01 ±0.01	0.43 ±0.54	55.21 ±0.52	36.80 ±0.22
CALB-OCGLX	180	1.08 ±0.01	0.02 ±0.01	2.37 ±0.51	41.07 ±0.73	32.97 ±0.41

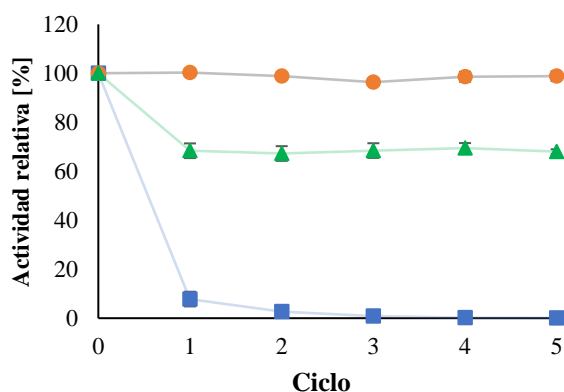
2.2.1.4.2 Reusabilidad de los biocatalizadores en las reacciones de hidrólisis/metanólisis de Triacetina al 75 % de metanol.

Una de las mayores limitantes de la implementación de los biocatalizadores en la industria es muchas veces la imposibilidad de reutilización de estos, que conlleva a gastos mayores y reduce la viabilidad del proceso. Por ello se probó la reutilización de CALB-OC y CALB-OCGLX en la metanólisis al 75% (Figura 8.). Para ello, se sometieron los dos biocatalizadores a 5 ciclos de reacción (3 h), después de cada ciclo los derivados se filtraron, lavaron con agua y se les midió la actividad residual con el ensayo de p-NPB. En el caso de CALB-OC, la actividad decayó drásticamente hasta un 10% de su actividad inicial después del primer ciclo reacción y a partir del segundo su actividad fue prácticamente nula. Por otro lado, CALB-OCGLX perdió cerca de un 30% de su actividad luego del primer ciclo, pero luego mantuvo el mismo porcentaje de actividad durante los siguientes 4 ciclos de reacción. También se empleó un segundo biocatalizador de CALB-OCGLX, lavado con Tritón X-100 que conservó plenamente su actividad en todos los ciclos. Luego, para establecer la causa de la pérdida de actividad en los biocatalizadores, se probaron 100 mg de derivado fresco de CALB-OC en un ciclo de reacción adicional bajo las mismas condiciones (75% metanol, 250 rpm, 25 °C), se tomaron muestras del sobrenadante cada hora y se midió la actividad con respecto al p-NPB (Figura 9.). La actividad en el sobrenadante que en un inicio era nula, aumentó significativamente cada hora y al final de la reacción alcanzó un 49.2% de actividad respecto a la que poseía el biocatalizador antes de iniciar la reacción. Generalmente la desorción de las lipasas de los soportes se atribuye al medio de reacción cuando hay alta concentración de solventes, en especial cuando presentan alta polaridad. Sin embargo, los sustratos o productos que están involucrados en la reacción pueden tener un efecto detergente sobre

las lipasas. En este caso se presenta un efecto sinérgico entre metanol, triacetina, 1,2-DAG y en menor proporción 1,3-DAG y monoacetinas, que favorece la desorción de las enzimas unidas por adsorción hidrofóbica en el derivado de CALB-OC y CALB-OCGLX no lavado. Es por ello por lo que CALB-OCGLX lavado no presentó disminución en su actividad, ya que al haber sido sometido a una incubación con detergentes antes de iniciar la reacción se consiguió eliminar las moléculas que sólo estaban adsorbidas al soporte manteniendo solo aquellas unidas covalentemente. Algunos autores han encontrado comportamientos similares en la hidrólisis de aceites, donde los ácidos grasos de cadena larga actúan como detergentes aniónicos y los di y monoglicéridos presentan propiedades surfactantes (Maag, 1984; Murty et al., 2002). También se ha reportado que los triglicéridos como la tributirina tienen propiedades detergentes cuando se usan como sustrato y que aún los monoglicéridos son capaces de desorber ligeramente las enzimas de los soportes hidrofóbicos (Virgen-Ortíz et al., 2017).

Figura 8

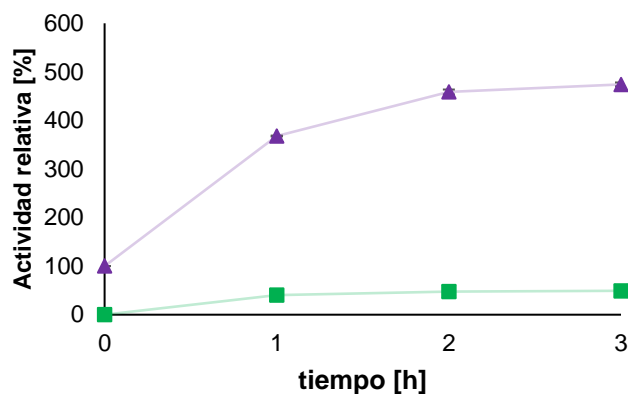
Reusabilidad de los biocatalizadores en 5 ciclos de reacción



Actividad relativa de los biocatalizadores en 5 ciclos de reacción de metanólisis/hidrólisis de 100 mM de triacetina (75% metanol, 250 rpm, 25°C). círculos: CALB-OCGLX lavado con Tritón X-100 4%(v/v); Triángulos: CALB-OCGLX sin lavar; Cuadrados: CALB-OC.

Figura 9

Actividad relativa del sobrenadante en la hidrólisis/metanólisis catalizada por CALB-OC



Actividad relativa del sobrenadante en la metanólisis/hidrólisis de 100 mM de triacetina catalizada por 100mg de CALB-OC (75% metanol, 250 rpm, 25°C). Triángulos: Actividad del sobrenadante en el tiempo respecto a su actividad inicial; cuadrados: Actividad del sobrenadante respecto a la actividad del biocatalizador antes de iniciar la reacción.

2.2.1.4.3 Reacciones de metanólisis de triacetina.

Los resultados favorables obtenidos con altas concentraciones de metanol permitieron establecer la posibilidad de realizar la reacción en un medio prácticamente anhidro donde sólo se adicionó Triacetina, metanol y los biocatalizadores de CALB-OC y CALB-OCGLX (Tabla 5.). En este caso, fue posible obtener 1,2-DAG, pero su composición porcentual para las mismas 3 h de reacción fue extremadamente baja en comparación a los estudios anteriores. Para CALB-OC la composición máxima fue del 2.5%, mientras que para CALB-OCGLX fue de 8.9%; lo que significa que el biocatalizador inmovilizado covalentemente es ligeramente más eficiente bajo estas condiciones drásticas de reacción. Además, en ambos casos se presentó una migración significativa de 1,2- a 1,3-DAG en relación con el porcentaje de producto principal obtenido. La

disminución en la actividad de los biocatalizadores se debe a que la concentración de metanol es tan alta, que aún con la presencia del soporte, el alcohol tiende a quitar la monocapa de agua que rodea las moléculas de la enzima. Esta monocapa es esencial para mantener la estructura tridimensional de la lipasa y es requerida para que sea catalíticamente activa (Abdul Rahman et al., 2005; Basri et al., 1996).

Tabla 5

Composición porcentual de los productos de reacción en la metanólisis de Triacetina 100mM y 100% de Metanol puro y utilizando n-hexano como cosolvente. 3 h de reacción.

Biocatalizador	2-MAG [%]	1-MAG [%]	1,3-DAG [%]	1,2-DAG [%]	Otros [%]
CALB-OC	1.90 ±0.05	0.37 ±0.13	2.28 ±0.50	2.50 ±0.42	5.83 ±0.41
CALB-OCGLX	0.21 ±0.05	0.15 ±0.11	5.37 ±0.12	8.91 ±0.21	8.07 ±0.13
CALB-OC (n-hex)	1.90 ±0.11	0.08 ±0.01	0.24 ±0.01	41.29 ±0.53	24.73 ±0.22
CALB-OCGLX (n-hex)	0.41 ±0.10	0.05 ±0.01	0.37 ±0.01	24.95 ±0.91	13.18 ±0.70

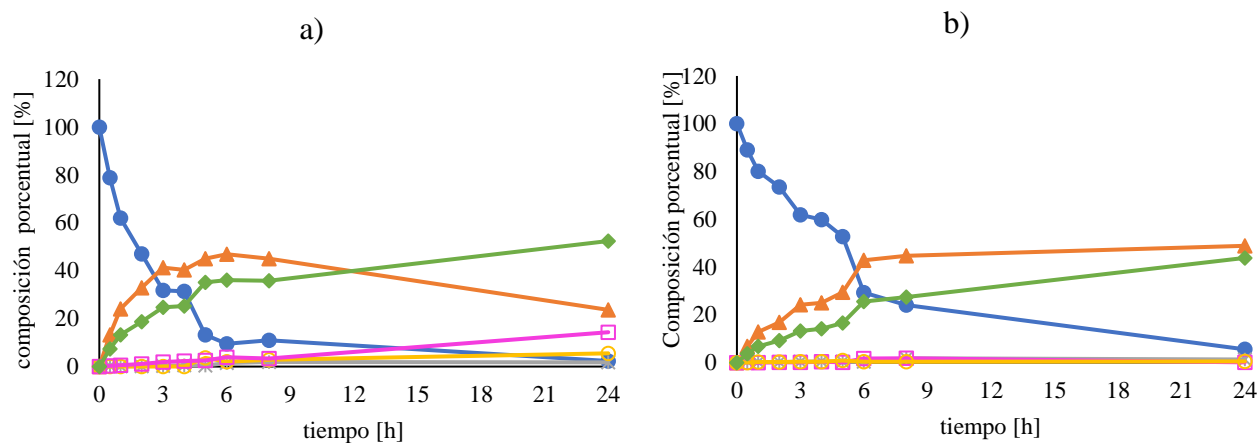
2.2.1.4.4 Efecto del uso de hexano como cosolvente en la metanólisis de triacetina catalizada por CALB-OC y CALB-OCGLX.

Para mejorar el rendimiento de las reacciones de metanólisis al 100% se evaluó la posibilidad de emplear n-hexano como cosolvente y mirar su efecto sobre la estabilidad de las lipasas en un medio con alta concentración de metanol. Para estos experimentos se estableció un tiempo de reacción de 24 h, el curso de las reacciones se muestra en la Figura 10. y la composición porcentual de los productos a 3 h de reacción se resume en la Tabla 5. En la reacción no se produjo

ácido acético y el pH se mantuvo en 5.5. Ambas lipasas tuvieron un buen comportamiento al adicionar n-hexano; en el caso de CALB-OC (Figura 10a.) la reacción alcanzó la composición máxima porcentual de 1,2-DAG (46.9 %) a las 7 h, siendo el tiempo límite de reacción para este biocatalizador, ya que al extenderse por más tiempo la reacción debido al agotamiento de la triacetina, incrementaba la producción de acetato de metilo y de 2-MAG. Para CALB-OCGLX (Figura 10b.) la máxima composición porcentual de 1,2-DAG se logró a las 8 h y se mantuvo constante hasta las 24 h debido a que la velocidad de reacción fue más lenta, obteniéndose como porcentaje de composición final 48.86%. Se ha reportado el uso de cosolventes muy hidrofóbicos como el hexano en procesos de transesterificación de aceites con alcoholes para reducir el efecto negativo de estos últimos en la actividad enzimática (Lara y Park, 2004; Nelson et al., 1996; Soumanou y Bornscheuer, 2003). La utilización del hexano incluso ha ayudado a reducir ligeramente la tasa de migración en la hidrólisis de diglicéridos (Sjursnes y Anthonsen, 1994). El principal problema de la adición de n-hexano a reacciones de metanólisis es la baja solubilidad entre el metanol y el solvente (Ghamgui et al., 2004); Este fenómeno se presentó en las reacciones de este trabajo, sin embargo, bajo las condiciones de agitación empleada (Orbital 250 rpm) la mezcla se mantuvo homogénea durante la reacción.

Figura 10

Curso de las reacciones de metanólisis de triacetina catalizadas por CALB-OC y CALB-OCGLX en presencia de *n*-hexano



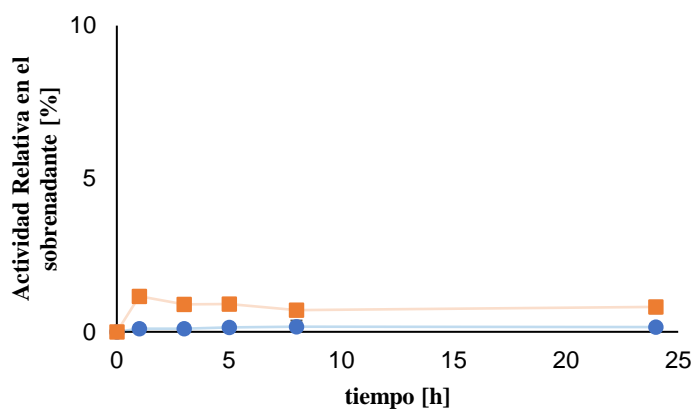
Composición porcentual en el tiempo de la metanólisis de 100mM de triacetina catalizada por 100 mg de biocatalizador empleando *n*-hexano como cosolvente (100% metanol, 250 rpm, 25 °C). a) CALB-OC. b) CALB-OCGLX.

El efecto favorable causado por el hexano fue crítico respecto a la actividad enzimática con una concentración de metanol al 100%. Este efecto es producido por los grupos funcionales del alcano que sólo tienen interacción hidrofóbica con la enzima, por lo que no cambian significativamente la estructura global ni el sitio activo de la lipasa (Mattos *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2004). En este caso, las moléculas del solvente se localizan cerca del sitio activo o las regiones hidrofóbicas de la lipasa ocasionando la reorientación de las cadenas laterales de algunos de los aminoácidos que no necesariamente alteran el sitio activo de la enzima, pero sí su actividad al cambiar la afinidad y especificidad hacia el sustrato, así como también, se presenta un efecto protector en la hidratación de la enzima (Lousa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Yennawar *et al.*, 1994). Este efecto, se vio reflejado en la actividad despreciable existente en el sobrenadante comparada con la actividad inicial de CALB-OC y CALB-OCGLX (Figura 11.), la cual se midió

respecto al sustrato modelo p-NPB a medida que avanzaba la reacción. De esta forma, se demostró que el n-hexano no sólo protegió a la enzima de la alta concentración de metanol, sino que también evitó que se desorbiera por el efecto detergente de triacetina y 1,2-DAG principalmente.

Figura 11

Actividad relativa del sobrenadante en la metanólisis de triacetina catalizada por CALB-OC y CALB-OCGLX en presencia de n-hexano.



Actividad relativa del sobrenadante respecto a la lipasa inmovilizada en la metanólisis de 100 mM de triacetina catalizada por 100mg de biocatalizador utilizando n-hexano como cosolvente (100% metanol, 250 rpm, 25°C). Cuadrados: CALB-OC, Círculos: CALB-OCGLX.

3. Conclusiones

Es posible obtener 1,2-diacetina por medio la metanólisis de triacetina utilizando biocatalizadores de lipasas microbianas. Sin embargo, la composición final y la pureza regioisomérica del producto obtenido está condicionada por el tipo de lipasa utilizada, los protocolos de inmovilización y las condiciones de reacción.

La inmovilización covalente de RML y CALB en OCGLX se vio favorecida por la incubación alcalina y la reducción con borohidruro de sodio. Estos enlaces covalentes tienen un efecto positivo marginal en la actividad catalítica y en la inactivación causada por el metanol en las reacciones. Sin embargo, estos inmovilizados pueden ser utilizados por lo menos en 5 ciclos de reacción conservando toda la actividad de la lipasa unida covalentemente. De esta forma, este tipo de inmovilización puede resolver el problema de la desorción causada por los efectos detergentes y surfactantes de algunos compuestos como TAG, DAGs y MAGs.

Los biocatalizadores RML-OC, RML-OCGLX, Lipozyme RM IM y Novozyme 435 FG se consideran no aptos para la producción de 1,2-DAG a partir de la metanólisis de triacetina, debido a que presentaron alteraciones significativas en su actividad por la presencia del metanol en el medio. Además, en el caso de los derivados de RML produjeron bajos porcentajes de composición final de 1,2-DAG (1.49-21.42%) e incluso, se llegó a producir una mayor composición porcentual de 1,3-DAG.

CALB-OCGLX parece ser apropiado para catalizar las reacciones de metanólisis libres de solventes empleando hasta 75% de metanol, gracias a su alta actividad específica y resistencia a las condiciones drásticas de reacción. Con este biocatalizador se logró obtener una composición de 41.07% de 1,2-DAG en 3 h. Mientras que, CALB-OC se presenta como una opción favorable

cuando se utiliza n-hexano como cosolvente. Pues una vez que se logró proteger el biocatalizador de la desorción e inactivación, la composición a las 3 h de 1,2-DAG utilizando este derivado llegó a ser 41.29%.

4. Recomendaciones

Se deja a consideración la posibilidad de utilizar el soporte OCGLX para realizar co-inmovilización de la lipasa de CALB con otras lipasas como la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) o la fosfolipasa de *Lecitasa ultra* (LEU). Se recomienda la inmovilización por activación interfacial y unión covalente según los rangos de estabilidad de cada lipasa. lo cual, en términos operacionales puede ser más complejo, pero podría llegar a ser más rentable para el escalamiento a nivel industrial. De esta manera, se puede reutilizar la enzima más rentable y costosa aprovechando también las propiedades de otras enzimas más económicas.

De igual forma, se recomienda explorar otro tipo de soportes en los que se pueda lograr la unión covalente de un mayor porcentaje de las moléculas de la enzima, como los soportes vinil- y divinilsulfona. De esta manera, la actividad final de este tipo de biocatalizadores no se verá afectado por la pérdida de lipasa durante el protocolo de inmovilización o en el mismo proceso, por lo que se esperaría un incremento en la velocidad de la reacción.

Finalmente, es importante encontrar el mejor método de separación de 1,2-DAG del acetato de metilo obtenido como subproducto de la reacción, y darle a este último compuesto una disposición o utilización apropiada que optimice el proceso y lo haga viable para la industria. El acetato de metilo es empleado como disolvente, e incluso puede ser utilizado en reacciones con aceite bajo condiciones super críticas para obtener biodiésel y triacetina.

Referencias Bibliográficas

- Abdul Rahman, M. B., Tajudin, S. M., Hussein, M. Z., Abdul Rahman, R. N. Z. R., Salleh, A. B., & Basri, M. (2005). Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Applied Clay Science*. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2004.12.001>
- Aghbashlo, M., Peng, W., & Tabatabaei, M. (2021). Machine learning technology in biodiesel research: A review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 85, 100904. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2021.100904>
- Aghbashlo, M., Tabatabaei, M., Jazini, H., & Ghaziaskar, H. S. (2018). Exergoeconomic and exergoenvironmental co-optimization of continuous fuel additives (acetins) synthesis from glycerol esterification with acetic acid using Amberlyst 36 catalyst. *Energy Conversion and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.054>
- Alvarez, J. D. (2019). *Biotransformación de la triacetina en 1,2-diacetina mediante reacciones de hidrólisis/metanólisis haciendo uso de lipasas inmovilizadas*. (p. 141). Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
- Arana-Peña, S., Lokha, Y., & Fernández-Lafuente, R. (2018). Immobilization of eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. *Catalysts*. <https://doi.org/10.3390/catal8110511>
- Arana-Peña, S., Lokha, Y., & Fernández-Lafuente, R. (2019a). Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida*

- antarctica (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. *Biotechnology Progress*. <https://doi.org/10.1002/btpr.2735>
- Arana-Peña, S., Mendez-Sanchez, C., Rios, N. S., Ortiz, C., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2019b). New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.163>
- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Carballares, D., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2020a). Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. *Catalysis Today, March*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.059>
- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Carballares, D., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2020b). Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. *Catalysis Today, November 2019*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.059>
- Arana-Peña, S., Rios, N. S., Mendez-Sanchez, C., Lokha Y., Gonçalves, L. R. B., y Fernandez-Lafuente, R. (2020c). Use of polyethylenimine to produce immobilized lipase multilayers biocatalyst with very high volumetric activity using octyl-agarose beads: Avoiding enzyme release during multilayer production. *Enzyme and Microbial Technology, October 2019*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109535>
- Barbosa Jaimes, L. O. (2009). *Resolución cinética de (r/s)-propranolol y (r/s)-atenolol vía reacciones de acetilación mediante la utilización de lipasas inmovilizadas*. 120.

- Basri, M., Wan Yunus, W. M. Z., Yoong, W. S., Ampon, K., Razak, C. N. A., & Salleh, A. B. (1996). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199606\)66:2<169::AID-JCTB478>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199606)66:2<169::AID-JCTB478>3.0.CO;2-I)
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. En *Molecular Catalysis*. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- 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*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980605\)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9](https://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. M., Pleşu, A. E., Pleşu, V., & Bozga, G. (2009). Revalorization of glycerol: Comestible oil from biodiesel synthesis. *Food and Bioprocess Processing*. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.06.003>
- 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*. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: A literature survey. En *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.012>
- Cao, L., & Schmid, R. (2006). *Cap 2 Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design* (pp. 53-145). Wiley.
- Chaniotakis, N. A. (2004). Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2188-3>
- Chen, J. W., & Wu, W. T. (2003). Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1263/jbb.95.466>
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. En *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S., Delorme, P., & Willemot, R. M. (1990). Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80537-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80537-S)
- Costa, S., Azevedo, H., & Reis, R. (2015). Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. En *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*. <https://doi.org/10.1201/b19038-50>
- DANE. (2019). Boletín Técnico, Encuesta anual manufacturera (EAM). *Dane*.
- Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Brzozowski, A. M., & Lawson, D. M. (1992). Catalysis at the Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi00120a034>

- Derewenda, Z. S., & Derewenda, U. (1991). Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglyceride lipases and esterases. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. <https://doi.org/10.1139/o91-125>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.03.006>
- Ditrich, K., Balkenhohl, F., & Ladner, W. (1996). *Separation of optically active amides* (Patent N.º 10201A1). WO1997.
- Eigived, P. (1989). *Immobilized Rhizomucor miehei lipase for tranesterification*.
- FAO (2008). *Directiva 2008/84/CE de la Comisión por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes (versión codificada)*.fao.org. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:253:0001:0175:EN:PDF>
- Fedebiocombustibles. (2021). *Plantas productoras de Biodiésel en funcionamiento*. Plantas productoras de Biodiésel en funcionamiento. https://www.fedebiocombustibles.com/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm
- Fernandez-Lopez, L., Rueda, N., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Albuquerque, T. L., dos Santos, J. C. S., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2016). Improved immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl₂. *Process Biochemistry*, 51(1), 48-52. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.015>
- Fernandez-Lopez, L., Rueda, N., Bartolome-Cabrero, R., Rodriguez, M. D., Albuquerque, T. L., Dos Santos, J. C. S., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2016). Improved

- immobilization and stabilization of lipase from *Rhizomucor miehei* on octyl-glyoxyl agarose beads by using CaCl_2 . *Process Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.015>
- Fernandez-Lorente, G., Cabrera, Z., Godoy, C., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., & Guisan, J. M. (2008). Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.009>
- Ferreira-Leitão, V. S., Cammarota, M. C., Aguiéiras, E. C. G., de Sá, L. R. V., Fernandez-Lafuente, R., & Freire, D. M. G. (2017). The protagonism of biocatalysis in green chemistry and its environmental benefits. En *Catalysts*. <https://doi.org/10.3390/catal7010009>
- Ghamgui, H., Karra-Chaâbouni, M., & Gargouri, Y. (2004). 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.06.002>
- Godoy, C. A., Fernández-Lorente, G., De Las Rivas, B., Filice, M., Guisan, J. M., & Palomo, J. M. (2011). Medium engineering on modified *Geobacillus thermocatenulatus* lipase to prepare highly active catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.001>
- Gomes, J. T. S., Santos, J. H. S., Abreu, C. A. M., Medeiros, E. B. M., Coelho, L. C. D., Faria, R. P. V., Rodrigues, A. E., & Lima Filho, N. M. (2020). Development and validation of analytical method for mono, di and triacetin analysis by HPLC/UV–Vis/DAD detection with ^{13}C NMR identification. *Results in Chemistry*.
<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100063>

- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., & Cygler, M. (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*. <https://doi.org/10.1002/pro.5560030111>
- Guisan, J. M. (2006). *Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_1
- Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/b711564b>
- He, L., Parra, J. M. S., Blekkan, E. A., & Chen, D. (2010). Towards efficient hydrogen production from glycerol by sorption enhanced steam reforming. *Energy and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1039/b922355j>
- Hernandez, K., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. En *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.003>
- Hernandez, K., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Hydrolysis of triacetin catalyzed by immobilized lipases: Effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.02.005>
- Hirata, D. B., Albuquerque, T. L., Rueda, N., Sánchez-Montero, J. M., Garcia-Verdugo, E., Porcar, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2016a). Advantages of Heterofunctional Octyl Supports: Production of 1,2-Dibutyryl by Specific and Selective Hydrolysis of Tributyrin Catalyzed by Immobilized Lipases. *ChemistrySelect*. <https://doi.org/10.1002/slct.201600274>
- Hirata, D. B., Albuquerque, T. L., Rueda, N., Virgen-Ortíz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., & Fernandez-Lafuente, R. (2016b). Evaluation of different immobilized lipases in

- transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.008>
- Ismail, A. R., & Baek, K. H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. En *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Review of Microbiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., & Ravindra, P. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. En *Critical Reviews in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/07388550802428392>
- Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. En *Adsorption*. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.004>
- Kang, D., Gho, Y. S., Suh, M., & Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [5]. En *Bulletin of the Korean Chemical Society*. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.11.1511>
- Karinen, R. S., & Krause, A. O. I. (2006). New biocomponents from glycerol. *Applied Catalysis A: General*. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.03.047>

- Karnjanakom, S., Maneechakr, P., Samart, C., & Guan, G. (2018). Ultrasound-assisted acetylation of glycerol for triacetin production over green catalyst: A liquid biofuel candidate. *Energy Conversion and Management*. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.086>
- Khan, F. I., Lan, D., Durrani, R., Huan, W., Zhao, Z., & Wang, Y. (2017). The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. En *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>
- Kirk, O., & Christensen, M. W. (2002). Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research and Development*. <https://doi.org/10.1021/op0200165>
- Konwar, L. J., Mäki-Arvela, P., Begum, P., Kumar, N., Thakur, A. J., Mikkola, J. P., Deka, R. C., & Deka, D. (2015). Shape selectivity and acidity effects in glycerol acetylation with acetic anhydride: Selective synthesis of triacetin over Y-zeolite and sulfonated mesoporous carbons. *Journal of Catalysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2015.05.021>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lara, P. V., & Park, E. Y. (2004). Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.015>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1202-5>

- Lee, W. J., Zhang, Z., Lai, O. M., Tan, C. P., & Wang, Y. (2020). Diacylglycerol in food industry: Synthesis methods, functionalities, health benefits, potential risks and drawbacks. En *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.032>
- Liang, Y., Medhekar, R., Brockman, H. L., Quinn, D. M., & Hui, D. Y. (2000). Importance of arginines 63 and 423 in modulating the bile salt-dependent and bile salt-independent hydrolytic activities of rat carboxyl ester lipase. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003187200>
- Liu, J., Ma, R. T., & Shi, Y. P. (2020). “Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods”-A review. En *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.11.073>
- López-Gallego, F., Abian, O., & Guisán, J. M. (2012). Altering the interfacial activation mechanism of a lipase by solid-phase selective chemical modification. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi300799v>
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., & Ferrer, P. (2015). Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. En *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.201400158>
- Lousa, D., Baptista, A. M., & Soares, C. M. (2013). A molecular perspective on nonaqueous biocatalysis: Contributions from simulation studies. En *Physical Chemistry Chemical Physics*. <https://doi.org/10.1039/c3cp51761f>
- Luo, W., Sankar, M., Beale, A. M., He, Q., Kiely, C. J., Bruijninx, P. C. A., & Weckhuysen, B. M. (2015). High performing and stable supported nano-alloys for the catalytic hydrogenation of levulinic acid to γ -valerolactone. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms7540>

- Maag, H. (1984). Fatty acid derivatives: Important surfactants for household, cosmetic and industrial purposes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.
<https://doi.org/10.1007/BF02678778>
- Mallesham, B., Sudarsanam, P., & Reddy, B. M. (2014). Eco-friendly synthesis of bio-additive fuels from renewable glycerol using nanocrystalline SnO₂-based solid acids. *Catalysis Science and Technology*. <https://doi.org/10.1039/c3cy00825h>
- Manoel, E. A., dos Santos, J. C. S., Freire, D. M. G., Rueda, N., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>
- Mateo, Cesar, Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. En *Enzyme and Microbial Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mateo, César, Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B. C. C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2006). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>
- Mateos, P. S., Navas, M. B., Morcelle, S. R., Ruscitti, C., Matkovic, S. R., & Briand, L. E. (2020). Insights in the biocatalyzed hydrolysis, esterification and transesterification of waste cooking oil with a vegetable lipase. *Catalysis Today*.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.09.027>

- Mattos, C., Bellamacina, C. R., Peisach, E., Pereira, A., Vitkup, D., Petsko, G. A., & Ringe, D. (2006). Multiple solvent crystal structures: Probing binding sites, plasticity and hydration. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.039>
- Mehrasbi, M. R., Mohammadi, J., Peyda, M., & Mohammadi, M. (2017). Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.09.022>
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. En *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Muñoz Solano, D., Hoyos, P., Hernáiz, M. J., Alcántara, A. R., & Sánchez-Montero, J. M. (2012). Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. En *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.131>
- Murty, V. R., Bhat, J., & Muniswaran, P. K. A. (2002). Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. En *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1007/BF02935881>
- Nelson, L. A., Foglia, T. A., & Marmer, W. N. (1996). Lipase-catalyzed production of biodiesel. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. <https://doi.org/10.1007/BF02523383>
- Nicholson, R. A., & Marangoni, A. G. (2018). Diglycerides. En *Encyclopedia of Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22343-3>

- Okoye, P. U., & Hameed, B. H. (2016). Review on recent progress in catalytic carboxylation and acetylation of glycerol as a byproduct of biodiesel production. En *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.08.064>
- Orlando Beys Silva, W., Mitidieri, S., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.005>
- Orozco-Núñez, S. I., Díaz-Jimenez, L., & Carlos-Hernandez, S. (2019). The glycerol's way. A brief review of opportunities. *Latin American Applied Research*.
- Ortiz, C., Ferreira, M. L., Barbosa, O., Dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Briand, L. E., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: The «perfect» lipase immobilized biocatalyst? En *Catalysis Science and Technology*. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>
- Palomo, José M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2002). Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: Kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry*. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00325-7](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00325-7)
- Palomo, Jose M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2003). General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/bm025729+>
- Palomo, José M., Muoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2002). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases.

- Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00178-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00178-9)
- Patkar, S., Bjorking, F., Zundel, M., Schuelein, M., Svendsen, A., Heldt-Hansen, H. ., & Gormsen, E. (1993). Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors. *Indian Journal of Chemistry, Section B*-(32), 76-80.
- Pecha, J., Šánek, L., Fürst, T., & Kolomazník, K. (2016). A kinetics study of the simultaneous methanolysis and hydrolysis of triglycerides. *Chemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.033>
- Peters, G. H., Olsen, O. H., Svendsen, A., & Wade, R. C. (1996). Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in *Rhizomucor miehei* lipase. *Biophysical Journal*. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79207-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79207-X)
- Pourzolfaghar, H., Abnisa, F., Daud, W. M. A. W., & Aroua, M. K. (2016). A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. En *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.03.048>
- Ramírez Camacho, J., & Rodríguez Pava, S. (2019). *Conveniencia de la Producción de Biodiesel en Colombia desde la Perspectiva del Desarrollo Sostenible*. Universidad Católica de Colombia.
- Rios, N. S., Mendez-Sanchez, C., Arana-Peña, S., Rueda, N., Ortiz, C., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.06.005>

- 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*. <https://doi.org/10.3390/en10111817>
- Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. En *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008>
- Rodrigues, R. C., Virgen-Ortíz, J. J., dos Santos, J. C. S., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A. R., Barbosa, O., Ortiz, C., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. En *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>
- Rodríguez-Restrepo, Y. A., & Orrego, C. E. (2020). Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. En *Environmental Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00988-w>
- Rueda, N. (2016). *Obtención y caracterización de lipasas microbianas inmovilizadas sobre nuevos soportes octil-agarosa heterofuncionales*. Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias. Escuela de Química.
- Rueda, N., Dos Santos, J. C. S., Torres, R., Ortiz, C., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c4ra13338b>
- Saifuddin, N., Raziah, A. Z., & Junizah, A. R. (2013). Carbon nanotubes: A review on structure and their interaction with proteins. *Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2013/676815>

- Sánchez, J. A., Hernández, D. L., Moreno, J. A., Mondragón, F., & Fernández, J. J. (2011). Alternative carbon based acid catalyst for selective esterification of glycerol to acetylglycerols. *Applied Catalysis A: General*.
<https://doi.org/10.1016/j.apcata.2011.07.027>
- Sears, P. S. (2020). thermostability of enzymes. En *Catalysis from A to Z*.
<https://doi.org/10.1002/9783527809080.cataz16617>
- Serdarevich, B. (1967). Glyceride isomerizations in lipid chemistry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. <https://doi.org/10.1007/BF02666775>
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. En *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/625258>
- Sheldon, R. A. (2011). Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Organic Process Research and Development*. <https://doi.org/10.1021/op100289f>
- Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., & Tominaga, Y. (1999). Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*.
<https://doi.org/10.1007/s11746-999-0067-6>
- Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., Kumar Sharma, P., & Jhalani, A. (2020). A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. En *Fuel*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116553>
- Sjursnes, B. J., & Anthonsen, T. (1994). Acyl migration in 1,2-dibutyryn dependence on solvent and water activity. *Biocatalysis and Biotransformation*.
<https://doi.org/10.3109/10242429408992128>

- 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>
- Soleimani, M., Khani, A., & Najafzadeh, K. (2012). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.07.011>
- Soumanou, M. M., & Bornscheuer, U. T. (2003). Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00090-5)
- Su, E., & Wei, D. (2008). Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.03.001>
- Sudarsanam, P., Mallesham, B., Prasad, A. N., Reddy, P. S., & Reddy, B. M. (2013). Synthesis of bio-additive fuels from acetalization of glycerol with benzaldehyde over molybdenum promoted green solid acid catalysts. *Fuel Processing Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.025>
- Suescun, A., Rueda, N., Dos Santos, J. C. S., Castillo, J. J., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Immobilization of lipases on glyoxyl-octyl supports: Improved stability and reactivation strategies. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.010>
- Tacias-Pascacio, V., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortíz, J. y Fernandez-Lafuente, R., 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic

- supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Advances*, 6(102), pp.100281-100294.
- Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R., & Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. En *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://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. En *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.012>
- Tardioli, P. W., Vieira, M. F., Vieira, A. M. S., Zanin, G. M., Betancor, L., Mateo, C., Fernández-Lorente, G., & Guisán, J. M. (2011). Immobilization-stabilization of glucoamylase: Chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.011>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.06.017>
- Vasel, B., Hecht, H. J., Schmid, R. D., & Schomburg, D. (1993). 3D-Structures of the lipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the

- lipase with triaurylglycerol. *Journal of Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90128-A](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90128-A)
- Vasudevan, P. T., & Briggs, M. (2008). Biodiesel production - Current state of the art and challenges. En *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0312-2>
- Virgen-Ortíz, J. J., Tacias-Pascacio, V. G., Hirata, D. B., Torrestiana-Sanchez, B., Rosales-Quintero, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>
- Wang, S., Meng, X., Zhou, H., Liu, Y., Secundo, F., & Liu, Y. (2016). Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: A mini review. En *Catalysts*. <https://doi.org/10.3390/catal6020032>
- Wong, L. S., Khan, F., & Micklefield, J. (2009). Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr8004668>
- Xie, T., Wang, A., Huang, L., Li, H., Chen, Z., Wang, Q., & Yin, X. (2009). Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. En *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9431>
- Yang, L., Dordick, J. S., & Garde, S. (2004). Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.041269>
- Ye, P., Xu, Z. K., Wu, J., Deng, H. T., & Seta, P. (2005). Covalent immobilization of lipase on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. *Chemical Research in Chinese Universities*. <https://doi.org/10.1360/142005-200>

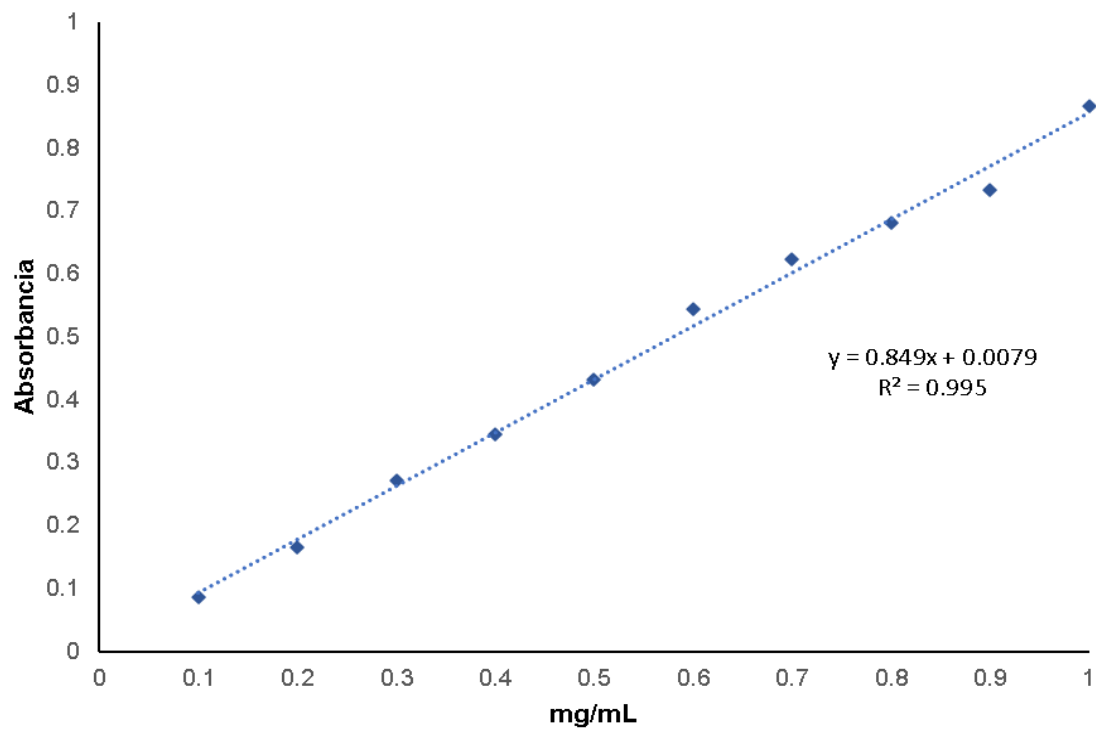
- Yennawar, N. H., Yennawar, H. P., & Farber, G. K. (1994). X-ray crystal structure of gamma-chymotrypsin in hexane. *Biochemistry*.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. En *Catalysts*. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>

Apéndices

Apéndice A. Curva de Calibración para la determinación de la cantidad de proteína empleando el método colorimétrico de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino como estándar (BSA).

Figura 12.

Absorbancia vs mg/mL siguiendo el protocolo de Bradford.



Apéndice B. Cálculo de la actividad hidrolítica de las lipasas.

- **Actividad Volumétrica (A_v)**

$$A_v = \frac{m}{\varepsilon * b} * 1000 * \frac{V_{ensayo}}{V_{enzima}} * FD \quad (\text{Ec. B1})$$

Donde:

A_v = Actividad volumétrica en $\frac{U}{mL}$.

U = Cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de *p*-NPB en 1 minuto a 25 °C.

m = pendiente que se mide en el espectrofotómetro UV-Vis en $\frac{mol}{L * min}$.

ε = 5150 $\frac{1}{M * cm}$, coeficiente de extinción molar del buffer fosfato de sodio 25 mM.

b = ancho de la celda.

V_{ensayo} = Volumen final en la celda de ensayo.

V_{enzima} = Volumen de enzima adicionada.

FD =factor de dilución del extracto enzimático.

- **Actividad específica de lipasas solubles**

$$A_e = \frac{A_v}{C} \quad (\text{Ec. B2})$$

Donde:

A_e =Actividad específica de la enzima libre en $\left[\frac{U}{mg}\right]$.

C = Concentración de enzima $\left[\frac{mg}{mL}\right]$. Este valor se calcula a partir de la curva de calibración

obtenida para determinación de la cantidad de proteína.

- **Actividad específica de lipasas inmovilizadas**

$$\text{Actividad} \left[\frac{U}{g} \right] = \frac{A_v * V_{buffer}}{m_{derivado}} \quad (\text{Ec. B3})$$

Donde:

A_v =Actividad volumétrica en $\left[\frac{U}{mL} \right]$

V_{buffer} =Volumen de buffer en el que se resuspendió el derivado en mL.

$m_{derivado}$ =cantidad de derivado resuspendido en g.

$$\text{Actividad} \left[\frac{U}{mg} \right] = \frac{\text{Actividad} \left[\frac{U}{g} \right]}{\text{Carga del derivado}} \quad (\text{Ec. B4})$$

Donde:

$$\text{carga del derivado} = \frac{\text{mg de proteína inmovilizada}}{\text{g de soporte}} \quad (\text{Ec. B4.1})$$

$$\text{mg de proteína inmovilizada} = C * V_{reacción} \quad (\text{Ec. B4.2})$$

C = Concentración de enzima $\left[\frac{mg}{mL} \right]$. Este valor se calcula a partir de la curva de calibración

obtenida para determinación de la cantidad de proteína.

$V_{reacción}$ =Volumen de reacción en mL.

Apéndice C. Cálculo de la composición porcentual de los productos de reacción en la hidrólisis de triacetina catalizada por lipasas inmovilizadas.

Para calcular la actividad hidrolítica para la triacetina si se tienen los patrones de las monoacetinas y diacetinas, se puede elaborar una curva de calibración para identificación de las muestras. En este caso se deben tomar las áreas de las muestras y extrapolarlas en la curva de calibración para monoacetinas y diacetinas.

En el caso de esta investigación, no se cuenta con patrones de trabajo, por lo que en este caso a partir de las áreas correspondientes a cada compuesto tomadas de los cromatogramas se realiza el cálculo de la composición porcentual como se describe a continuación:

$$A_{total} = 3 * A_{monoacetinas} + 1.5 * A_{diacetinas} + A_{triacetina} \quad (\text{Ec. C1})$$

$$\% \text{ composición} = \frac{A_{compuesto}}{A_{total}} * 100 \quad (\text{Ec. C2})$$

Apéndice D. Método para determinación de los productos de la metanólisis de TRIACETINA mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Tabla 6

Gradiente de elución para cromatografía en HPLC a 1mL/min y 24 °C.

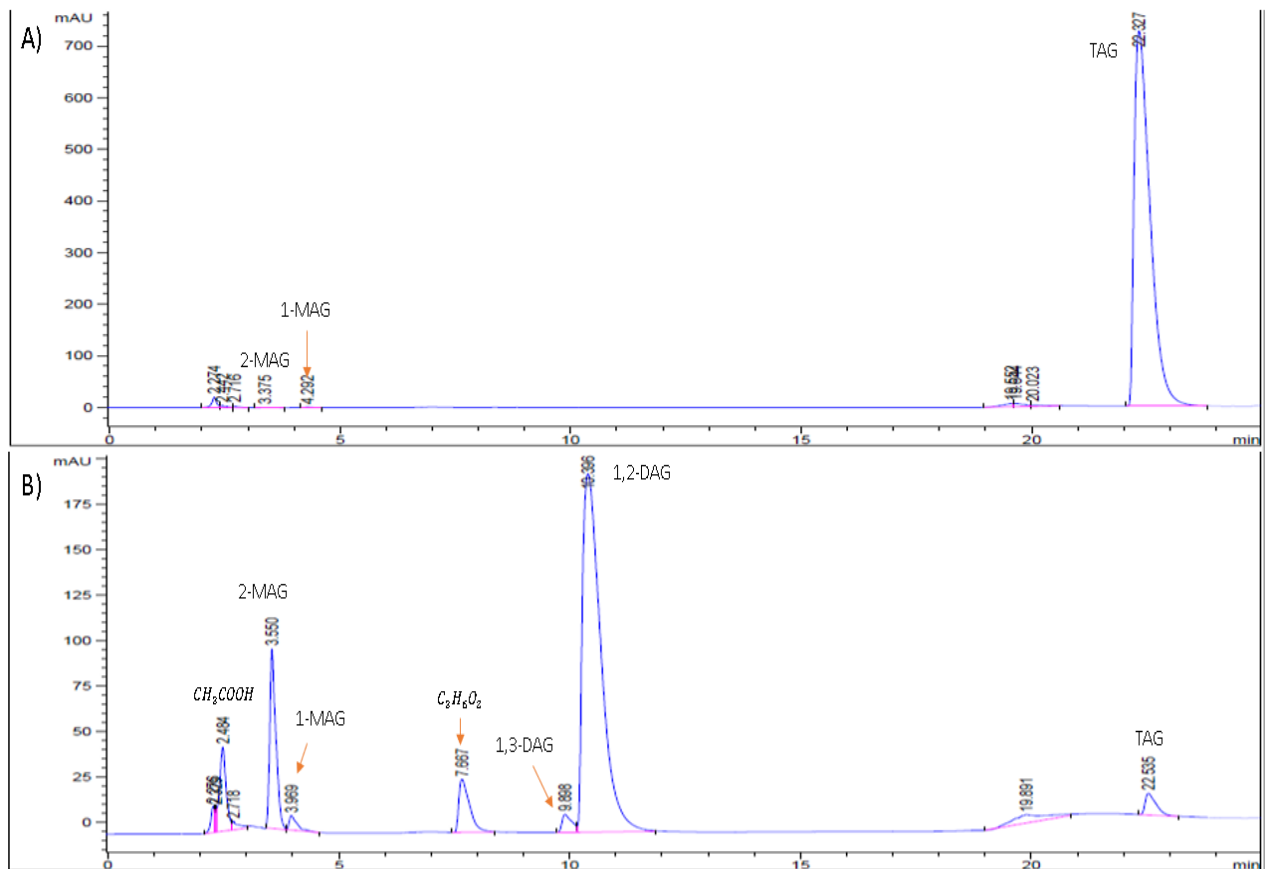
Tiempo [min]	Agua [%]	Acetonitrilo (ACN) [%]
0-2	95	5
3-15	90	10
15-25	70	30

** Los tiempos de retención con este método son aproximadamente 22.5 min para triacetina; 9.4 y 9.9 min para 1,3- y 1,2-diacetina; 3.6 y 4.0 min para 2- y 1-monoacetina; 3.9 min para ácido acético y 7.8 min para acetato de metilo. Estos tiempos pueden variar un poco, pero los picos siempre salen en el mismo orden.

A continuación, se muestran dos cromatogramas ejemplo para la identificación de picos con el método TRIACETINA empleado en el HPLC.

Figura 13.

Ejemplo de Cromatogramas de la reacción de hidrólisis/metanolisis



Cromatogramas de la reacción de hidrólisis/metanolisis (25% metanol-Buffer fosfato 500mM pH 5,5) de 100 mM de Triacetina catalizada por 100 mg de CALB-OC: A) Inicio de la reacción, B) 3h de reacción.