



Universitat Autònoma
de Barcelona



ESCUELA DE INGENIERÍA

Departamento de Ingeniería Química

**Caracterización, inmovilización y aplicación en
biocatálisis de la lipasa de *Rhizopus oryzae*
expresada en *Pichia pastoris***

Memoria para optar al Grado de Doctor
por la Universitat Autònoma de Barcelona
bajo la dirección de
Dr. Francisco Valero Barranco y
Dra. Maria Dolors Benaiges Massa

Marina Guillén Montalbán

Bellaterra, 2012

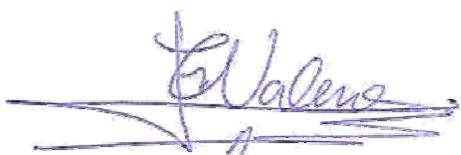
El Dr. FRANCISCO VALERO BARRANCO, catedrático del Departamento de Ingeniería Química y la Dra. MARIA DOLORS BENAIGES MASSA, profesora titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAMOS:

Que la ingeniera química Marina Guillén Montalbán ha llevado a cabo, bajo nuestra dirección, en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, el trabajo con el título “Caracterización, inmovilización y aplicación en biocatálisis de la lipasa de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*” que se presenta en esta memoria, la cual constituye su Tesis para optar al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para su conocimiento y para los efectos que se consideren oportunos, presentamos ante la Escuela de Ingeniería y la Escuela de Posgrado de la Universidad Autónoma de Barcelona la nombrada Tesis, firmando esta certificación.

Bellaterra, febrero de 2012,



Dr. Francisco Valero Barranco



Dra. Maria Dolors Benaiges Massa

“Sólo sé que no sé nada”

Sócrates

Con Xavi (que pudo comprobar la precisión colomense) y Jose, aprendí a fermentar (como para no aprender, íbamos a 3 fermentaciones por semana)...pero que bien lo pasamos. ¡Muchos besos a vosotros también! (Ah, Xavi, recuerdo nuestro pacto: cuando sea una alto cargo de una supermultinacional utilizaré mis influencias para incorporarte a la empresa para darte las gracias por venir a buscarme a la entrevista).

Con Carol pasé una “aventura/marronazo” con los anticuerpos, ¡al final para no usarlos! Gracias por enseñarme a fermentar. Fuiste la que me explicó el primer día de laboratorio a medir actividad en el Cary. Quien me iba a decir que pasaría horas y horas con ese “maravilloso” equipo futurista. Siempre has tenido una sonrisa para todas las preguntas que te he hecho mientras fermentaba. ¡¡¡Muchas gracias!!!

Y a Martina, que tenemos gustos musicales tan similares (¿¿¿Dónde encontraré yo a alguien que le gusten esas canciones???), también le doy las gracias. ¡Muchos besitos!

Joel y Margot (los de los acentos catalanes raros) y Anna, ¡¡No me olvido de ellos!! Gracias por vuestra ayuda y por los buenos momentos!

Ayy, los nuevos Albert, Marcel·la y Dani...¡¡¡lo que os espera!!! (sobretudo a ti Albert). ¡Mucha suerte en esta aventura del doctorado!

También quisiera agradecer a la Universidad Autónoma de Barcelona por concederme la beca PIF, así como al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme la beca FPU. También doy las gracias a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España y a la Generalitat de Catalunya por la concesión de los proyectos y las becas de investigación al grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada. Además agradezco a la Dra. M^a Jesús Martínez, a la Dra. Marisa Rúa y al Dr. Jose M. Palomo sus colaboraciones en esta tesis. También agradezco a la Dra. Suzana Ferreira y a la Dra. Alicia Baldessari el haber podido colaborar en sus proyectos de investigación.

En resumen, me llevo muy buenos recuerdos de estos años y me llevo conmigo a muy buenos amigos. ¡Eso ha sido lo mejor de estos cuatro años, sin duda!

No me olvido de ti, César. Dejo para el final lo mejor que tengo. Lo mejor que he conseguido estos diez años de estudio eres tú y no los títulos. Nunca hubiera hecho el doctorado si tú no me hubieras animado. Has aguantado todos mis malos días y has conseguido siempre sacarme una sonrisa. Me gustaría pasar el resto de mi vida contigo porque ya no me imagino sin ti. ¡Te quiero mucho!

Finalmente, muchas gracias a todos aquellos que hayáis colaborado en esta tesis.

¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!



ÍNDICE

ÍNDICE

0. Resumen	3
1. Introducción	9
1.1. Las lipasas	9
1.1.1 Aplicaciones industriales de las lipasas.....	12
1.1.2 La lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	12
1.2 Producción recombinante de enzimas	16
1.2.1 <i>Pichia pastoris</i> como huésped de producción de proteínas heterólogas.....	17
1.2.2 Producción recombinante de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>	18
1.3 Inmovilización enzimática.....	19
1.3.1 Inmovilización de lipasas.....	20
1.3.2 Soportes potenciales para la inmovilización de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> ..	20
1.4 La producción enzimática de aromatizantes como aplicación de las lipasas en la industria	22
1.5 Bibliografía.....	24
2. Objetivos	33
3. Materiales y métodos	37
3.1. Lipasas.....	37
3.2. Ensayo de actividad lipolítica.....	37
3.3. Determinación de proteína total	39
3.4. SDS-PAGE	40
3.5. Zimograma	40
3.6. Western Blot	41
3.7. Secuenciación del N-terminal.....	42
3.8. Detección mediante anticuerpos de proteínas glicosiladas.....	42
3.9. Gel 2D	43
3.10. Especificidad frente a ésteres de <i>p</i> -nitrofenol	43
3.11. Especificidad frente a triacilglicéridos	45
3.12. Inmovilización en EP100 y Eupergit [®] C y CM	46

3.13. Estudios de equilibrio de adsorción en EP100.....	47
3.14. Reacción de síntesis de propionato de butilo mediante lipasa inmovilizada	48
3.15. Estudio de estabilidad.....	49
3.16. Reacción de síntesis de butirato de etilo mediante lipasa inmovilizada.....	50
3.17. Actividad residual y reactivación de inmovilizados frente a disolventes orgánicos .	52
3.18. Análisis de desorción en medio orgánico de las lipasas inmovilizadas	53
3.19. Reutilización de los biocatalizadores en reacciones de síntesis de butirato de etilo	53
3.20. Estudio del efecto de la concentración de sustratos y relación entre ellos en reacciones de síntesis de butirato de etilo.....	54
3.21. Bibliografía	55
4. Resultados y discusión.....	61
4.1. Caracterización bioquímica y comparación de rROL y nROL	61
4.1.1. Masa molecular	62
4.1.2 Punto isoeléctrico	65
4.1.3. Efecto de la fuerza iónica, temperatura y pH sobre la actividad lipolítica.....	67
4.1.3.1 Fuerza iónica	67
4.1.3.2 Temperatura.....	69
4.1.3.3 pH	71
4.1.4 Especificidad frente a triacilglicéridos.....	74
4.1.5. Especificidad frente a ésteres de <i>p</i> -nitrofenol	76
4.1.6 Conclusiones.....	79
4.1.7. Bibliografía.....	81
4.2. Estudios de inmovilización y estabilidad de rROL y nROL	85
4.2.1. Inmovilización en EP100	86
4.2.2. Estudio de los equilibrios de adsorción de las lipasas sobre EP100.....	90
4.2.3. Inmovilización en Eupergit [®] C	94
4.2.4. Estabilidad frente a pH y temperatura de la lipasa en solución e inmovilizada	96
4.2.5. Inmovilización de rROL en Eupergit [®] CM.....	104

4.2.6. Conclusiones	106
4.2.7. Bibliografía	107
4.3. Aplicación de rROL inmovilizada en una reacción de interés industrial: Síntesis de butirato de etilo.....	111
4.3.1. Efecto de diferentes parámetros sobre la conversión y velocidad de reacción de la síntesis de butirato de etilo	112
4.3.1.1 Efecto de la presencia de agua en el biocatalizador	113
4.3.1.2. Efecto de la temperatura	115
4.3.1.3. Efecto de la velocidad de agitación.....	117
4.3.1.4. Efecto de la carga enzimática.....	119
4.3.1.5. Efecto del solvente	121
4.3.1.6. Efecto de la relación molar ácido:alcohol.....	123
4.3.2. Análisis de las limitaciones difusionales internas.....	127
4.3.3. Estabilidad en disolventes orgánicos de rROL-EP100, rROL-Eupergit [®] CM y rROL-Sepabeads	130
4.3.4. Estabilidad operacional de rROL-EP100, rROL-Eupergit [®] CM y rROL-Sepabeads en reacciones en discontinuo en la síntesis de butirato de etilo.....	134
4.3.5. Conclusiones	137
4.3.6. Bibliografía	138
4.4. Efecto de la concentración y relación de sustratos en la síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada en Octadecil-Sepabeads	143
4.4.1. Diseño de experimentos y resultados obtenidos	144
4.4.1.1. Efecto sobre la velocidad inicial de reacción	146
4.4.1.2. Efecto sobre la conversión	149
4.4.1.3. Efecto sobre la producción y determinación de los valores óptimos de reacción	151
4.4.2. Evaluación de la producción en las condiciones óptimas	153
4.4.3. Conclusiones	154
4.4.4. Bibliografía	156

4.5. Aplicaciones de rROL en reacciones de interés industrial. Colaboraciones internacionales	161
4.5.1. Acetilación de la cortexolona	162
4.5.2. Producción de lípidos estructurados de tipo MLM	169
4.5.3. Producción de sustitutivos de leches maternas	171
4.5.4. Conclusiones	172
4.5.5. Bibliografía	173
5. Conclusiones generales	177
6. Contribuciones científicas.....	181
7. Anexos.....	185



0. RESUMEN

0. Resumen

En el presente trabajo se han determinado las propiedades de la lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* contenida en un extracto proteico obtenido mediante el cultivo de *Pichia pastoris* (rROL). Posteriormente, se ha estudiado la inmovilización de la lipasa recombinante en soportes de diferente naturaleza, como son el polvo de polipropileno (EP100) y el Eupergit®. Con el objetivo de realizar una comparación, se realizaron los mismos estudios de caracterización e inmovilización con la lipasa nativa contenida en un extracto proteico obtenido del cultivo de *Rhizopus oryzae* (nROL),.

Los análisis de caracterización revelaron dos isoformas de la lipasa recombinante con idéntico N-terminal y con masas muy similares, cercanos a 34 kDa. Una proteína de 45.5 kDa fue reconocida como ROL, identificándola como un dímero proteico, aunque no pudo definirse su estructura de forma exacta. Por otra parte, el extracto nativo mostró tres isoformas de nROL alrededor de 34kDa. Una cuarta proteína, no reconocida como lipasa, mostró actividad hidrolítica. Esta última enzima fue identificada como una esterasa tras analizarse diversos extractos comerciales de *Rhizopus oryzae*, los cuales contenían esterasa de *R. oryzae*.

La caracterización funcional determinó una alta dependencia de la actividad catalítica de las lipasas en función de la fuerza iónica y un efecto en los valores óptimos de temperatura y pH. Es por ello que, en el caso de rROL, al doblarse la concentración del tampón de análisis de actividad lipásica, la temperatura óptima cambió de 40°C a 30°C, mientras que el pH óptimo se modificó de 8 a 7.25. Sin embargo, nROL no cambió su temperatura óptima al variar la fuerza iónica, mientras que sí ocurrió en el caso del pH óptimo, el cual varió de igual modo que rROL.

Cabe destacar que rROL presenta una actividad específica superior a nROL, llegando a alcanzar valores 40 veces superiores.

En cuanto a los análisis de especificidad, los resultados de nROL y rROL frente a triacilglicéridos fueron equivalentes, obteniéndose una mayor capacidad catalítica con los Tri-C8 y Tri-C10. Por el contrario, en la especificidad enzimática frente a ésteres de *p*-nitrofenol, nROL mostró una mayor especificidad frente a ésteres de cadena corta, mientras que rROL mostró preferencia por los de cadena larga. Esta diferencia fue atribuida básicamente a la presencia de la esterasa en el extracto nativo.

En los estudios de inmovilización, tanto nROL como rROL fueron hiperactivadas a ciertas relaciones de actividad ofrecidas por miligramo de soporte, mientras que se obtuvieron bajos porcentajes de actividad retenida a bajas relaciones de actividad ofrecida.

También se ha determinado la estabilidad en función de la temperatura y el pH, encontrándose que nROL es más estable que rROL tanto inmovilizada como en solución. En el caso de rROL, los porcentajes de actividad residual mejoraron al inmovilizarse la enzima tanto en EP100 como en Eupergit[®]C, aunque este efecto se apreció de forma más evidente a bajo pH.

La finalidad de este trabajo ha sido la aplicación de la lipasa recombinante en una reacción de interés industrial. La síntesis de butirato de etilo, utilizado como aromatizante, fue la reacción escogida para estudiar la aplicabilidad de la lipasa. En la síntesis se utilizaron tres derivados inmovilizados: rROL-EP100, rROL-Eupergit[®]CM y rROL-Sepabeads. Se analizó el efecto de diversas variables (contenido en agua, temperatura, agitación, carga enzimática, solvente, relación de sustratos) sobre la velocidad inicial de reacción y conversión final. El derivado que mostró unos mejores resultados fue el obtenido a partir del EP100. Sin embargo, al estudiar la estabilidad de los biocatalizadores éste mostró una capacidad muy baja de reutilización, siendo el rROL-Sepabeads el derivado inmovilizado más estable y por tanto, se seleccionó para continuar con los estudios de la biocatálisis de butirato de etilo.

Mediante la metodología de la superficie de respuesta y un diseño de experimentos, pudo analizarse el efecto de la concentración de ácido butírico y la relación molar butírico:etanol sobre la velocidad inicial de síntesis, la conversión y la producción. Los resultados de velocidad inicial mostraron un claro efecto inhibitorio a elevadas concentraciones de butírico superiores a 380mM. De igual modo un exceso de etanol también resultaba inhibitorio. Los estudios de conversión revelaron un efecto de desactivación enzimática muy acusado a valores de concentración de ácido butírico superiores a 68mM.

Las condiciones óptimas se determinaron en base a un modelo para maximizar la producción de butirato de etilo. Los valores encontrados fueron una concentración de butírico de 54.6 mM y una relación ácido:alcohol de 1.42, prediciendo un valor de producción de 0.118 mmol/h. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de síntesis a la concentración de ácido butírico y a la relación ácido:alcohol predicha como óptimas, encontrándose que el valor de producción experimental difirió únicamente en un 0.78%, validándose de este modo el modelo matemático de producción de butirato de etilo en las condiciones determinadas.

Finalmente, rROL mostró capacidad catalítica en otras reacciones de interés industrial como son, la síntesis de la cortexolona-21-acetato, lípidos estructurados de baja carga calórica además de triacilglicéridos sustitutivos de las grasas presentes en leches maternas.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las lipasas

Las enzimas se definen como biocatalizadores de naturaleza proteica que tienen como función llevar a cabo la catálisis de las reacciones biológicas. Cada clase de enzima cataliza un tipo específico de reacción química, necesiándose una gran variedad de biocatalizadores en el metabolismo de cualquier tipo de célula.

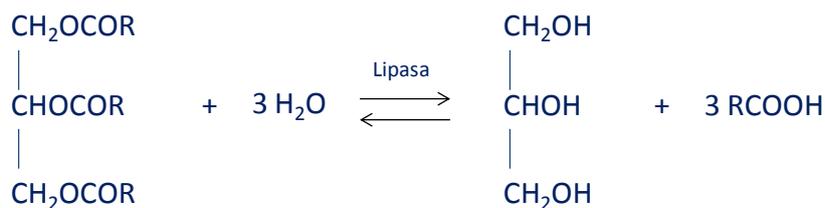
La clasificación de estos biocatalizadores se realiza de acuerdo con el tipo de reacción de transferencia, el grupo dador y el aceptor, reconociéndose seis grupos principales descritos en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Clasificación enzimática

Código	Grupo	Función
EC1	Oxidoreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción
EC2	Transferasas	Transfieren grupos
EC3	Hidrolasas	Llevan a cabo reacciones de hidrólisis
EC4	Liasas	Añaden grupos a dobles enlaces
EC5	Isomerasas	Transfieren grupos en el interior de la molécula para originar formas isoméricas
EC6.	Ligasas	Forman diversos enlaces acoplados a la ruptura de ATP

Las enzimas se utilizan ampliamente en la industria biotecnológica, ya que pueden catalizar reacciones a temperatura ambiente y a presión atmosférica, reduciendo los costes energéticos del proceso y de tratamiento de residuos, ya que de realizarse mediante síntesis química, requerirían condiciones más drásticas (Koeller *et al.*, 2001).

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) son un tipo de enzimas hidrolíticas cuya función natural es catalizar la hidrólisis de triacilglicéridos aunque, en medios orgánicos, son capaces de catalizar la reacción inversa (esquema 1.1). Los productos de la reacción de hidrólisis, además de los ácidos grasos, pueden ser tanto el glicerol como los mono- o di-glicéridos correspondientes.



Esquema 1.1. Esquema general de la reacción de hidrólisis de triacilglicerol catalizada por lipasa.

El mecanismo de las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo por lipasas, se basa en la actuación de una triada catalítica típica de estas enzimas, la cual se compone de serina, aspártico o glutámico, e histidina. Estos tres aminoácidos son los que conforman el llamado centro activo.

En las lipasas se ha descrito un incremento de la actividad catalítica en presencia de interfases lípido-agua, nombrándose a este fenómeno “activación interfacial” (Verger, 1997). Este efecto de las interfases en la actividad es la principal diferencia entre las lipasas y otras enzimas de tipo hidrolítico, como las esterasas, las cuales catalizan la hidrólisis únicamente de ésteres que se encuentran en solución. La actividad esterásica depende de la concentración de sustrato según una cinética de tipo Michaelis-Menten. Sin embargo, las lipasas aumentan de forma muy acusada su actividad cuando el sustrato se encuentra en concentraciones por encima del nivel de saturación formando una emulsión y por consiguiente, en presencia de una interfase (figura 1.1).

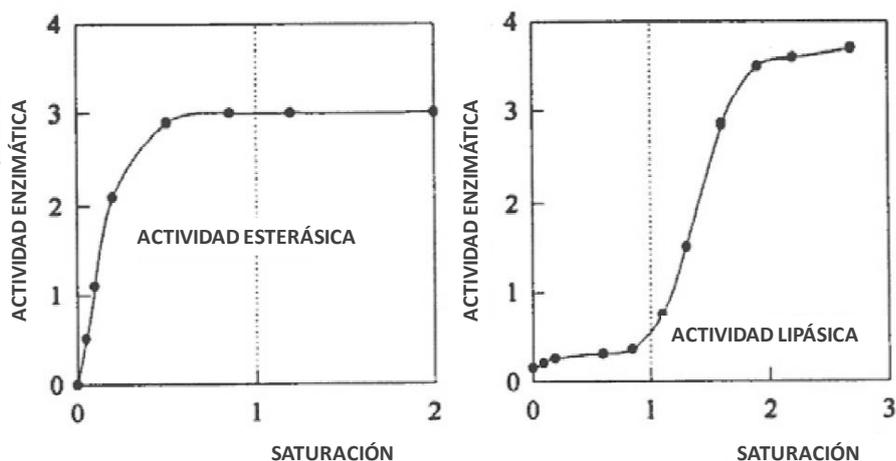


Figura 1.1. Actividad enzimática en función de la concentración de sustrato

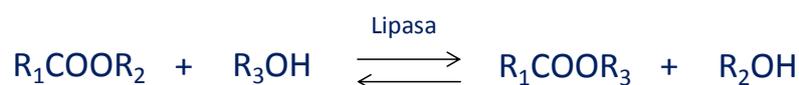
Una de las explicaciones para esta activación interfacial en las lipasas se centra en la presencia de un “loop” anfifílico superficial que cubre el centro catalítico, denominado “lid”. Esta estructura está presente en la mayoría de lipasas y se ha descrito que, en presencia de interfases, esta tapa se retira cambiando la configuración de la lipasa de cerrada a abierta dejando el centro activo accesible y exponiendo una gran superficie hidrofóbica, la cual facilita la unión de la lipasa a la interfase. Sin embargo, se ha visto que ciertas lipasas, como la de *Candida antarctica B* o la de *Pseudomonas aeruginosa*, presentan esta “lid” pero no muestran una activación interfacial (Jaeger *et al.*, 1998).

Además de las reacciones de hidrólisis o las síntesis directas de ésteres, estos biocatalizadores pueden llevar a cabo distintos tipos de reacción, los cuales se resumen a continuación:

- Transesterificación: es una reacción de síntesis en la cual el acil donador es un éster.

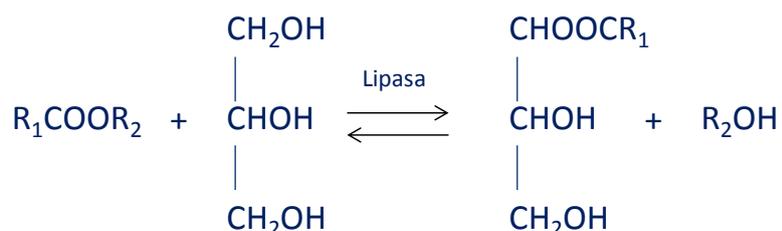
Existen dos tipos de transesterificación:

- Alcohólisis.



Esquema 1.2. Esquema general de la reacción de alcohólisis catalizada por lipasa.

- Glicerólisis.



Esquema 1.3. Esquema general de la reacción de glicerólisis catalizada por lipasa.

- Interesterificación: es una reacción en la cual se produce un cambio en la composición de ácidos grasos de un éster, ya que el grupo acil se intercambia entre dos ésteres.



Esquema 1.4. Esquema general de la reacción de interesterificación catalizada por lipasa.

- Acidólisis: es un tipo de interesterificación en que el grupo acil se intercambia entre un éster y un ácido graso libre.



Esquema 1.5. Esquema general de la reacción de acidólisis catalizada por lipasa.

1.1.1 Aplicaciones industriales de las lipasas

Las lipasas se han utilizado de forma exitosa en una gran variedad de reacciones de interés industrial, especialmente en el sector farmacéutico (López *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Hasan *et al.*, 2006; Won *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2010).

Un aspecto que cabe resaltar es la alta especificidad y/o selectividad que muestran algunas de ellas de forma que pueden utilizarse, por ejemplo, en la resolución de mezclas racémicas o en la modificación de aceites y grasas para la industria alimentaria (Santaniello *et al.*, 1993; Schoffers *et al.*, 1996; Hasan *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Yadav *et al.*, 2007). Otros ejemplos de aplicaciones de las lipasas son: aditivos para detergentes (Jaeger *et al.*, 1998), producción de biosurfactantes para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Dossat *et al.*, 2002; Plou *et al.*, 2002), la producción de biodiesel (Matsumoto *et al.*, 2001, Bajaj *et al.*, 2010, Da Rós *et al.*, 2010), la síntesis de antitumorales, antioxidantes y compuestos fluororgánicos y también en la construcción de biosensores (Hasan *et al.*, 2006).

Inicialmente, la obtención de estas enzimas para su posterior aplicación, comportaba su extracción del páncreas de ciertos mamíferos, pero actualmente las lipasas pueden ser obtenidas por fermentación a partir de ciertos microorganismos productores (nativos o recombinantes), como bacterias, hongos y levaduras. Entre las especies de hongos productoras encontramos *Rhizopus oryzae*, la lipasa del cual se estudia en el presente trabajo.

1.1.2 La lipasa de *Rhizopus oryzae*

Rhizopus oryzae es un hongo filamentoso y lipolítico, que crece en los frutos de la palmera (figura 1.2). Las especies del género *Rhizopus* se encuentran divididas en tres grupos principales:

Rhizopus microsporus, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus stolonifer*. En el caso de *Rhizopus oryzae*, se realizó una reclasificación en los años ochenta en la cual se combinaron bajo este mismo nombre los conocidos anteriormente como *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* y *Rhizopus javanicus*, considerándose el mismo organismo: *Rhizopus oryzae* (Schipper, 1984).



Figura 1.2. *Rhizopus oryzae*

Sin embargo, las lipasas producidas por estos microorganismos, presentan ciertas sustituciones en algunas posiciones de la secuencia madura (Figura 1.3). También se ha descrito que pueden encontrarse diferencias en ciertos aminoácidos de la secuencia entre lipasas producidas por diferentes cepas del propio *Rhizopus oryzae* (Ben Salah *et al.*, 2006).

La lipasa producida por este hongo de forma extracelular (ROL) posee un elevado interés en biotecnología y en investigación académica ya que es muy utilizada en la resolución de mezclas racémicas debido a su elevada regioespecificidad. Esta enzima actúa hidrolizando de manera preferente las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos, ya que pertenece a un grupo de lipasas que son activas frente a ésteres de alcoholes primarios (Ben Salah *et al.*, 1994; Hiol *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2006; Méndez *et al.*, 2007). Esta lipasa ha sido aplicada en diversas reacciones de interés industrial como en la producción de ésteres de cadena corta (aromatizantes) (Ghamgui *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004; Ben Salah *et al.*, 2007), en la resolución de mezclas racémicas (Palomo *et al.*, 2004), en la producción de biodiesel (Ban *et al.*, 2001) y en la producción de lípidos estructurados (Nunes *et al.*, 2011) entre otras aplicaciones.

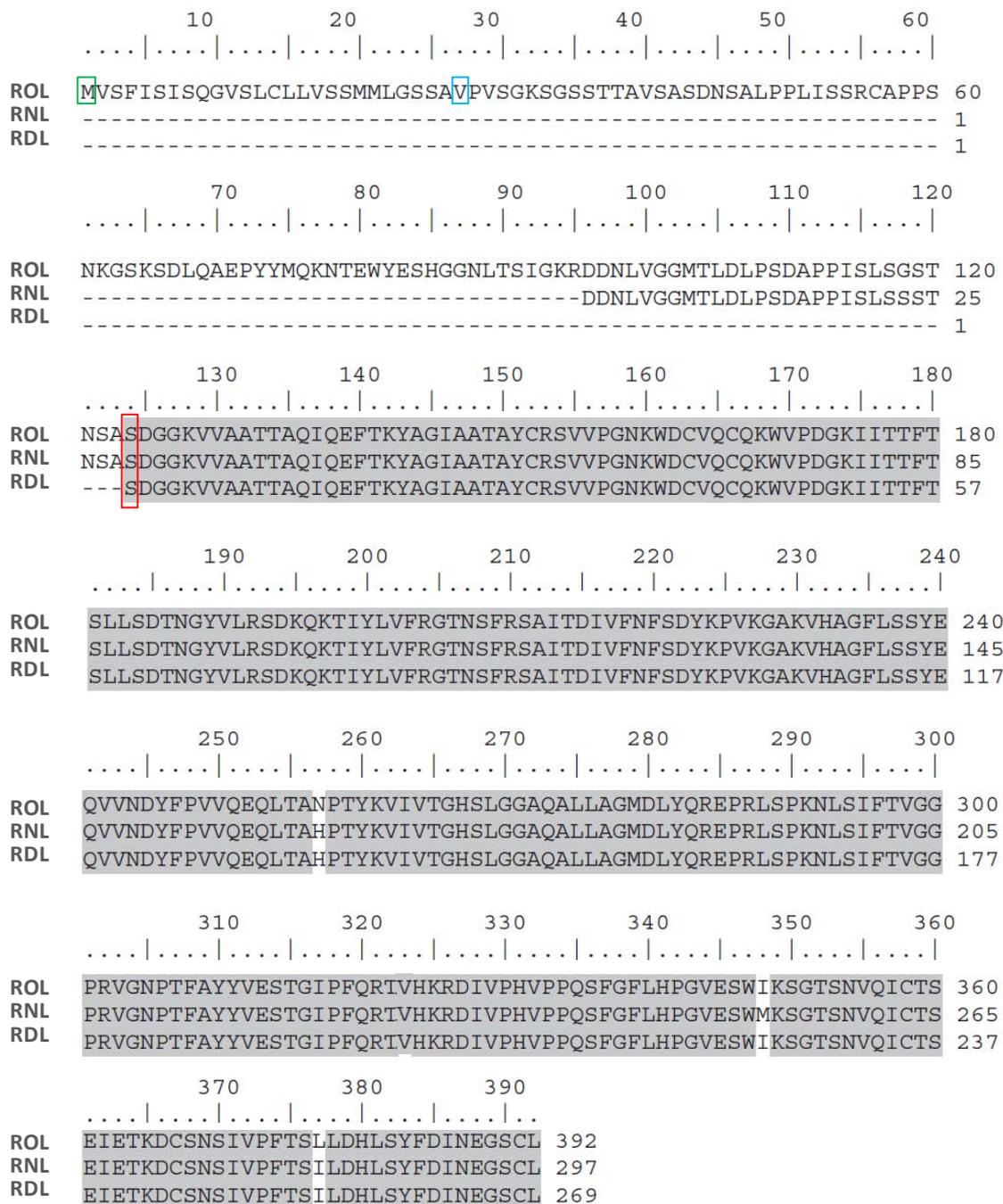


Figura 1.3. Alineación de la secuencia aminopeptídica completa de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL), con la secuencia de la lipasa secretada de *Rhizopus niveus* (RNL) y *Rhizopus delemar* (RDL). Los cuadros en blanco indican las posiciones en las que los aminoácidos son diferentes y el fondo gris indica la coincidencia en las tres secuencias. El recuadro verde, azul y rojo indican el inicio de la pre-secuencia, pro-secuencia y secuencia madura respectivamente.

La estructura nativa de esta enzima se compone de 392 aminoácidos, los primeros 26 corresponden a una secuencia señal (pre-secuencia); los 97 aminoácidos siguientes conforman la pro-secuencia y, los 269 restantes constituyen la secuencia madura de la proteína (figura 1.3) (Beer *et al.*, 1998).

La pre-secuencia tiene la función de péptido señal con la finalidad de que la proteína sea secretada. La pro-secuencia permite, por un lado, disminuir los niveles de toxicidad de esta proteína mientras se encuentra en el interior de la célula y por otro, facilita el plegamiento correcto de la proteína (Beer *et al.*, 1996) (figura 1.4).

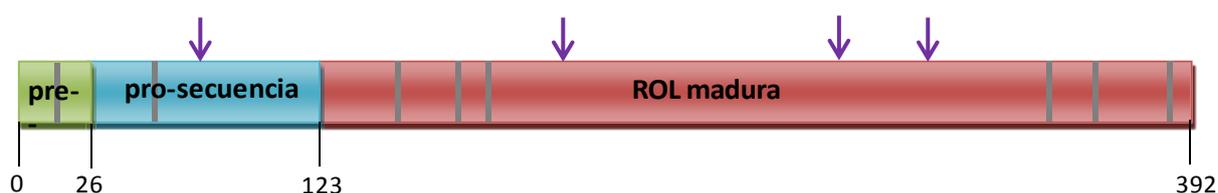


Figura 1.4. Representación esquemática de la lipasa de *Rhizopus oryzae*. En flechas se marcan los posibles puntos de N-glicosilación y en líneas grises las cisteínas.

Teóricamente, tanto la pre-secuencia como la pro-secuencia deberían ser eliminadas de manera que la forma secretada fuera la compuesta únicamente por la secuencia madura. Sin embargo, en la bibliografía se encuentra que *R. oryzae* secreta la lipasa unida a 28 aminoácidos de la pro-secuencia (Beer *et al.*, 1996; Ben Salah *et al.*, 2001, Sayari *et al.*, 2005). Éste hecho también fue descrito para la lipasa de *Rhizopus niveus* (Salah *et al.*, 2001).

En esta lipasa se pueden encontrar cuatro posibles puntos de N-glicosilación que siguen la pauta Asn-X-Ser/Thr (siendo X cualquier aminoácido excepto prolina), localizándose una de estas secuencias en la zona de la pro-secuencia. Esta lipasa presenta además, tres puentes disulfuro entre las cisteínas 152 y 391, 163 y 166 y entre la 358 y 367. Cabe destacar, que al igual que la mayoría de las lipasas, ésta presenta la típica “lid” amfilílica que cubre su centro activo (Derewenda *et al.*, 1994).

En la figura 1.5 se muestra la estructura tridimensional de la lipasa de *Rhizopus oryzae* desde dos perspectivas diferentes.

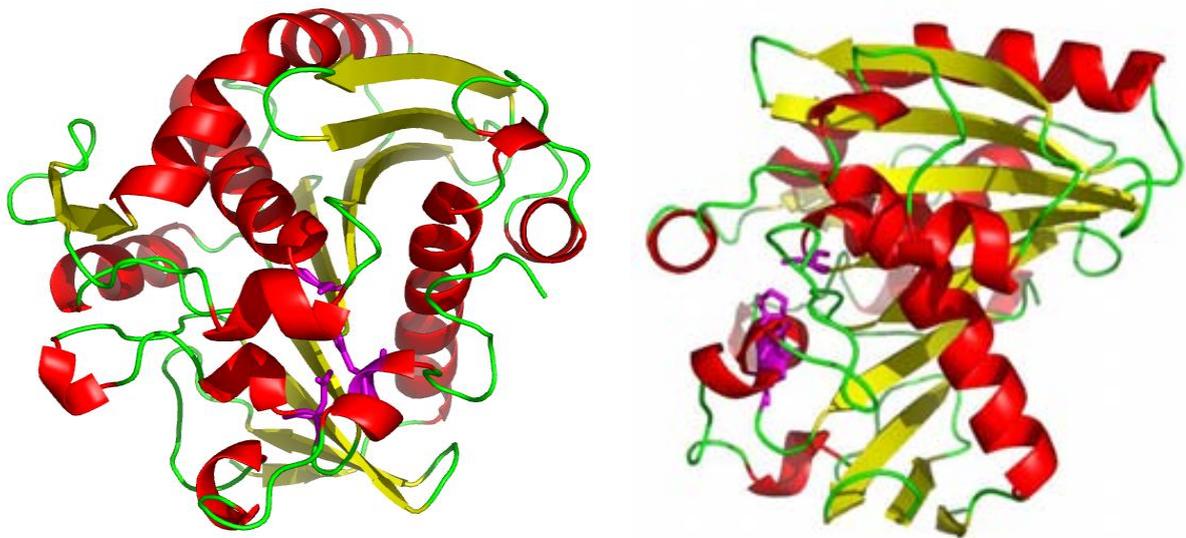


Figura 1.5. Representación tridimensional de la lipasa de *Rhizopus oryzae*. En color morado se marcan los aminoácidos del centro activo.

1.2 Producción recombinante de enzimas

Cuando una proteína tiene interés industrial se inicia el desarrollo de los mecanismos y procedimientos necesarios para su producción. De manera intuitiva podría pensarse que el modo más sencillo para obtener la proteína es el cultivo de aquel organismo que la produce de forma natural. Sin embargo, en la mayoría de casos, este procedimiento presenta ciertos inconvenientes que pueden hacerlo inviable, como por ejemplo: bajas productividades, dificultades de cultivo, bioseguridad, alta sensibilidad de las células ante cambios en variables de cultivo, complejidad del proceso de purificación, etc.

La expresión génica puede definirse como el proceso por el cual todos los organismos, procariotas o eucariotas, transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Actualmente el clonaje y la expresión del correspondiente gen de interés en un organismo huésped se presenta como una estrategia eficiente para incrementar la productividad de un proceso de producción enzimática y, en muchos casos, para simplificar el proceso de purificación. Gracias a los avances en ingeniería genética, es posible modificar las propiedades

de un organismo para adecuarlo a las necesidades de una investigación o ponerlo al servicio de un proceso productivo. En la actualidad, la utilización en la industria de proteínas recombinantes es muy común, en especial en la industria farmacéutica.

Para producir una proteína recombinante es primordial escoger el organismo huésped, o sistema de expresión que se utilizará (Yin *et al.*, 2007), el cual puede ser procariota o eucariota.

Los sistemas procariotas son fácilmente manipulables y se utilizan en muchas aplicaciones pero presentan dificultades cuando se quieren usar para la expresión de proteínas de células eucariotas. Esto es debido a las modificaciones post-traduccionales que requieren algunas proteínas eucariotas, tales como glicosilación, fosforilación o formación de puentes disulfuro entre otras (Valero, 2012). De hecho, cada uno de los sistemas de expresión presentan ventajas e inconvenientes, pero su elección depende de múltiples factores, que deben analizarse para cada proteína de interés (Rai *et al.*, 2001).

1.2.1 *Pichia pastoris* como huésped de producción de proteínas heterólogas

Las levaduras como sistema de expresión comparten con los sistemas procariotas la simplicidad del cultivo, las altas velocidades de crecimiento y bajo coste, con la disponibilidad de un sistema que permite que las proteínas expresadas intracelularmente sean secretadas al medio. Al ser sistemas eucariotas tienen la posibilidad de producir proteínas solubles que hayan experimentado las modificaciones post-traduccionales necesarias para su funcionalidad. Por otra parte, las levaduras son células más fácilmente manipulables genéticamente que las células animales y pueden ser cultivadas a altas densidades celulares. Otra de sus ventajas es que suelen presentar promotores fuertes que permiten controlar la expresión de la proteína de interés y facilitar la obtención de grandes cantidades.

Pichia pastoris se considera una levadura metilotrófica, capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono, y es ampliamente utilizada hoy día como huésped para la producción de proteínas recombinantes (Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Su elevado uso se debe, entre otras razones, a la presencia de un promotor fuertemente regulado, correspondiente al gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) (Cereghino *et al.*, 2000), así como a la elevada productividad y a la simplicidad del sistema de expresión y fermentación. *Pichia pastoris*, además, permite crecer a muy altas densidades celulares en medio mínimo, secretando

la proteína heteróloga y simplificando de este modo la recuperación del producto. Además posee la capacidad de realizar muchas de las modificaciones post-transcripcionales propias de las células eucariotas superiores.

1.2.2 Producción recombinante de la lipasa de *Rhizopus oryzae*

La lipasa de *R. oryzae* ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli* (Beer *et al.*, 1996, Minning *et al.*, 1998; Di Lorenzo *et al.*, 2005); *Sacharomyces cerevisiae* (Takahashi *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999) y en *Pichia pastoris* (Minning *et al.*, 1998; Minning *et al.*, 2001; Niu *et al.*, 2006; Ben Salah, 2009). La producción de esta lipasa en *E. coli* en su forma activa comporta un proceso de purificación y repliegamiento, debido a que ésta se encuentra en forma de cuerpos de inclusión (Beer *et al.*, 1996; Minning *et al.*, 1998), excepto cuando se expresa en la cepa *E. coli* Origami (DE3), la cual produce la enzima activa y correctamente plegada (Di Lorenzo *et al.*, 2005). Utilizando *S. cerevisiae* como organismo huésped, se han aplicado construcciones genéticas diferentes, involucrando la fusión de la pre-secuencia del α -factor de *S. cerevisiae* (péptido señal) con la proforma de ROL, o directamente con la secuencia madura de la lipasa (Takahashi *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999) con la que no se detecta actividad ni en el medio de cultivo ni en las células.

En cuanto a la producción de ROL en *P. pastoris*, la secuencia madura de esta lipasa ha sido expresada en esta levadura bajo el promotor de la alcohol oxidasa (PAOX) y secretada al medio de cultivo utilizando la pre-pro-secuencia del α -factor de *S. cerevisiae*, llegándose a obtener hasta 60 mg/L de enzima activa (Minning *et al.*, 1998). Éste sistema ha sido ampliamente estudiado en el grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona, lográndose que la productividad enzimática fuera quintuplicada utilizando una estrategia de alimentación basada en el monitoraje y control de la concentración de metanol en cultivos discontinuos alimentados (Cos *et al.*, 2006; Cos *et al.*, 2005; Arnau *et al.*, 2010).

1.3 Inmovilización enzimática

La aplicación de enzimas como biocatalizadores en reacciones de interés industrial está muy extendida en la actualidad. Por tanto, la necesidad de aumentar y facilitar la capacidad de reutilización del biocatalizador se presenta como un pilar esencial en el estudio de la aplicabilidad enzimática. De esta necesidad surge la inmovilización como proceso fundamental para conseguir un proceso de biocatálisis enzimática rentable.

La inmovilización de un biocatalizador consiste en su localización en una región definida del espacio y ésta presenta ciertas ventajas:

- La reutilización del biocatalizador, ya que al quedar inmovilizado en un soporte sólido su recuperación del medio de reacción resulta sencilla.
- Un posible incremento de la actividad y/o estabilidad enzimática (Mateo *et al.*, 2007; Mozhaev *et al.*, 1990).

Existen diferentes métodos de inmovilización, que pueden dividirse en cinco grupos en función del mecanismo en que se basan (figura 1.6):

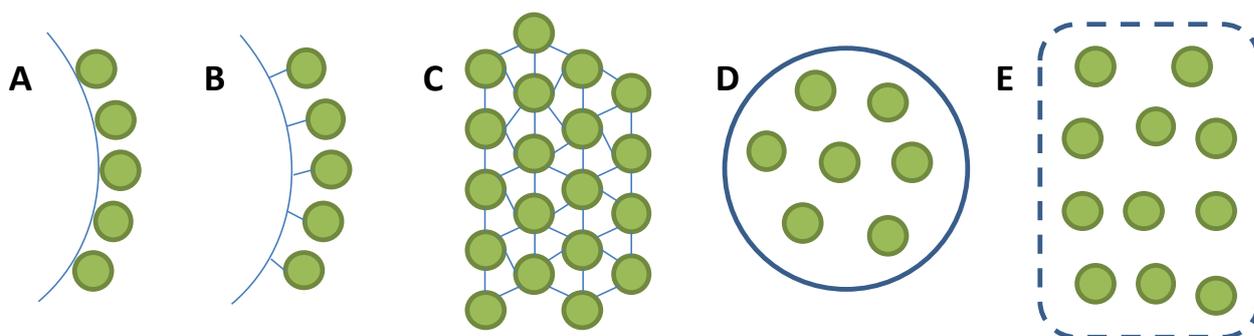


Figura 1.6. Principales tipos de inmovilización. A) Adsorción, B) Enlace covalente, C) Entrecruzamiento, D) Encapsulación y E) Retención en membrana.

- Adsorción. La inmovilización se realiza por interacción iónica o por atracción sobre la superficie del soporte (ej. atracción hidrofóbica).
- Enlace covalente. Se basa en la formación de enlaces covalentes entre el soporte y las enzimas.

- Entrecruzamiento. Las moléculas de enzimas se entrelazan entre ellas constituyendo una “red” polienzimática.
- Inclusión. Se consigue mediante la formación de una estructura tridimensional en la que las moléculas de enzima quedan retenidas de forma uniforme en su interior.
- Retención en membrana. El biocatalizador se inmoviliza en el interior de un espacio delimitado por una membrana.

La selección del método de inmovilización adecuado depende de una gran variedad de factores. Entre ellos están aquellos relacionados con la naturaleza del biocatalizador. Por otro lado, la selección también depende de la facilidad de preparación, la posibilidad de regenerar el soporte, la estabilidad y el coste (Casablanco *et al.*, 2005).

1.3.1 Inmovilización de lipasas

Debido a la utilidad de las lipasas en aplicaciones industriales, éstas han sido inmovilizadas en un amplio tipo de soportes (Ivanov *et al.*, 1997; Paiva *et al.*, 2000; Plou *et al.*, 2002; Mateo *et al.*, 2007). Los métodos más utilizados para inmovilizar estas enzimas están basados en métodos de adsorción, haciendo uso de soportes hidrofóbicos (Al-Duri *et al.*, 1997; Gitlesen *et al.*, 1997; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). La amplia utilización del método de inmovilización de lipasas mediante adsorción sobre soportes hidrofóbicos es debido a que estas enzimas quedan adsorbidas en su conformación “abierta” de modo que pueden obtenerse derivados hiperactivados (Mateo *et al.*, 2007). Otro método utilizado para inmovilizar lipasas se basa en la formación de enlaces covalentes sobre soportes sólidos (Knezevic *et al.*, 2006; Mateo *et al.*, 2007).

1.3.2 Soportes potenciales para la inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae*

Como ejemplos de soportes potenciales para la inmovilización de la lipasa de *R. oryzae* se puede nombrar al EP100 así como al Eupergit®.

El polvo de polipropileno (EP100) es un ejemplo de soporte hidrofóbico que puede utilizarse para la adsorción de lipasas. Presenta una elevada porosidad y una alta área superficial. Estas

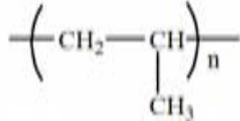
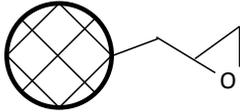
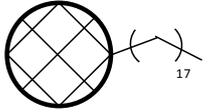
propiedades le confieren una alta potencialidad como soporte de inmovilización. La adsorción de lipasas sobre EP100 se presenta como una interesante oportunidad, no solo para inmovilizar, sino para purificar lipasas en un proceso de un solo paso, ya que la adsorción de estas enzimas sobre este tipo de soporte hidrofóbico se ha descrito como selectiva debido a sus propiedades moleculares (Al-Duri *et al.*, 1997; Gitlesen *et al.*, 1997; Sabbani *et al.*, 2006).

En el mercado se encuentran los soportes Eupergit[®], obtenidos mediante copolimerización de N,N'-metilen-bis-metacrilamida), glicidil metacrilato, alil glicidil éter y metacrilamida. Este compuesto se presenta como un soporte interesante para la inmovilización de enzimas mediante enlace covalente, ya que es muy resistente tanto a estrés mecánico como químico. Además, es adaptable a una gran variedad de configuraciones y de procesos específicos llevados a cabo en reactores (Hernaiz *et al.*, 2000; Katchalski-Katzir *et al.*, 2000). En la bibliografía se encuentran resultados exitosos al inmovilizar lipasas en este soporte, donde los derivados inmovilizados mostraron estabilidades 18 veces superiores a las determinadas para la enzima soluble (Katchalski-Katzir *et al.*, 2000; Knezevic *et al.*, 2006).

Cabe destacar la potencialidad de un tercer soporte que ha sido descrito en estudios previos como un buen material para la obtención de biocatalizadores muy estables: el Octadecil-Sepabeads (Palomo *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2011). Los soportes Sepabeads están compuestos de una matriz de polímero metacrílico y en el caso del Octadecil-Sepabeads, esta matriz presenta como grupos funcionales cadenas alifáticas de dieciocho carbonos. Los mecanismos implicados en la inmovilización de las enzimas sobre este soporte son básicamente de atracción hidrofóbica, produciéndose de este modo una inmovilización por adsorción.

En la tabla 1.2 se muestran las características de estos tres soportes.

Tabla 1.2. Soportes utilizados en la obtención de biocatalizadores de rROL.

Soporte	Estructura del soporte	Tipo de inmovilización	Tamaño de partícula (μm)
EP100		Adsorción	200-1000
Eupergit		Enlace covalente	C: 150 CM: 50-300
Octadecil Sepabeads		Adsorción	300-600

1.4. La producción enzimática de aromatizantes como aplicación de las lipasas en la industria

Los aromatizantes son compuestos que aportan olor y/o sabor y son ampliamente utilizados en la industria cosmética y farmacéutica. Además, estos compuestos representan un cuarto de la producción mundial de aditivos alimentarios (Hassan *et al.*, 2010).

La naturaleza química de estos compuestos es muy variada, encontrándose hidrocarburos, cetonas, pirazinas, fenoles, sulfuros y ésteres entre otros.

La producción de estos compuestos puede llevarse a cabo mediante la extracción directa de frutos o mediante síntesis química. El primer proceso comporta un alto coste debido a los caros tratamientos a los que debe someterse los materiales naturales, al proceso de purificación posterior y a la escasez de ciertos materiales naturales. No obstante, los compuestos obtenidos mediante extracción directa pueden etiquetarse como “naturales”.

Por otro lado, la síntesis química conlleva la aplicación de altas temperaturas y catalizadores inorgánicos. Además, los compuestos obtenidos bajo este procedimiento no pueden etiquetarse como “naturales”, reduciéndose de este modo su precio en el mercado (Abbas *et al.*, 2003; Ozyilmaz *et al.*, 2010).

La utilización de enzimas en la síntesis surge como una gran solución, ya que los compuestos obtenidos pueden etiquetarse como “naturales”, además de obtenerse productos con mejor

olor y color (Abbas *et al.*, 2003; Ozyilmaz *et al.*, 2010). Este método también puede comportar una reducción del coste del proceso en comparación con la extracción directa de los frutos.

Las lipasas, como ya se ha comentado anteriormente, son enzimas capaces de catalizar reacciones de síntesis de ésteres, transesterificación e interesterificación (Matsumoto *et al.*, 2001; Dossat *et al.*, 2002; Plou *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2006; Naik *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2010). Así, muchos de los ésteres de cadena alifática corta, que representan un alto porcentaje de todos los aromatizantes, han sido sintetizados mediante aplicación de lipasas de diferentes organismos (Talon *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2004; Pires-Cabral *et al.*, 2007; Cheol Park *et al.*, 2009; Ozyilmaz *et al.*, 2010; Bayramoğlu *et al.*, 2011; Grace Tan *et al.*, 2011).

1.5 Bibliografía

Abbas H, Comeau L, Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.*, *Enzyme. Microb. Tech.* 32 (2003) 589-595.

Al-Duri B, Yong YP, Characterization of the equilibrium behaviour of lipase PS (from *Pseudomonas*) and lipolase 100L (from *Humicola*) onto Accurel EP100. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 3 (1997) 177-188.

Arnau C, Ramón R, Casas C, Valero F, Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess, *Enzyme. Microb. Tech.* 46 (2010) 494-500.

Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. Biodiesel production through lipase catalyzed a transesterification. An overview, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 62 (2010) 9-14.

Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, Fukuda H, Whole cell biocatalyst for biodiesel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochem. Eng. J.* 8 (2001) 39-43.

Bayramoğlu G, Hazer B, Altıntaş B, Arica M Y, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochem.* 46 (2011) 372-378.

Beer HD, McCarthy JEG, Bornscheuer UT, Schmid RD, Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1299 (1998) 173-180.

Beer HD, Wohllfahrt G, Schmid RD, McCarthy JEG, The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence, *Biochem. J.* 319 (1996) 351-359.

Ben Salah A, Fendri K, Gargoury Y, La lipase de *Rhizopus oryzae* : production, purification et caractéristiques biochimiques, *Rev. Fr. Corps. Gras.* 5/6 (1994) 133-137.

Ben Salah A, Sayari A, Verger R, Gargouri Y, Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique, *Biochimie.* 83 (2001) 463-469.

Ben Salah R, Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2009) 1375-1384.

Ben Salah R, Ghamghui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y, Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*, J. Biosci. Bioeng. 4 (2007) 368-372.

Ben Salah R, Mosbah H, Fendri A, Gargouri A, Gargouri Y, Mejdoub H, Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*, FEMS. Microbiol. Lett. 260 (2006) 241-248.

Casablanco F, López Santín J, Casas C, González G, Lafuente FJ, Lema JM, Montesinos JL, Roca E, Solà C, Valero F, Ingeniería bioquímica, Editorial síntesis, 2005.

Cereghino JL, Cregg JM, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* FEMS Microbiol. Rev. 24 (2000) 45-66.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16 (2000) 23-52.

Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F, A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess, Biotechnol. Bioeng. 95 (2006) 145-154.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F, Combined effect of methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-batch cultures, J. Biotechnol. 116 (2005) 321-335.

Cheol Park Y, Horton Shaffer C E, Microbial formation of esters, Appl Microbiol Biotechnol. 85 (2009) 13-25.

Da Rós P, Silva G, Mendez A, Santos J, de Castro H. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. Bioresource Technol. 101 (2010) 5508-5516.

Derewenda ZS, Structure and function of lipases, Adv. Protein Chem. 45 (1994) 1-54.

Di Lorenzo M, Hidalgo A, Haas M, Bornscheuer UT, Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microb. 12 (2005) 8974-8977.

Dossat V, Combes D, A. Marty, Efficient lipase catalysed production of a lubricant and surfactant formulation using continuous solvent-free-process, J. Biotechnol. 97 (2002) 117-24.

- Fernandez-Lafuente R, Armisén P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 185-197.
- Ghamgui H, Karra-Chaâbouni M, Gargouri Y, 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system, *Enzyme Microb. Tech.* 35 (2004) 335-363.
- Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1997) 188-196.
- Gotor-Fernández V, Brieva R, Gotor V, Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 40 (2006) 111-120.
- Grace Tan HS, Yu B, Curran P, Quan Liu S, Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream, *Food Chem.* 124 (2011) 80-84.
- Hernaiz M, Crout D. Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Tech.* 27 (2000) 26-32.
- Hernandez K, Fernandez-Lafuente R, Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide, *Process Biochem.* 46 (2011) 873-878.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A A, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme. Microb. Tech.* 39 (2006) 235-251.
- Hassan Ahmed E, Raghavendra T, Madamwar D, An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter sp. EH28*: Application for ethyl caprylate synthesis, *Bioresource Technol.* 101 (2010) 3628-3634.
- Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC, Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit, *Enzyme. Microb. Tech.* 26 (2000) 421-430.
- Ivanov AE, Schneider MP, Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 3 (1997) 3003-309.
- Jaeger K, Reetz M, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Tibtech* 16 (1998) 396-403.

Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, J. Mol. Catal B-Enzym. 10 (2000) 157-176.

Knezevic Z, Milosavic N, Bezbradica D, Jakovljevic Z, Prodanovic R, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment. Biochem. Eng. J. 30 (2006) 269-278.

Koeller KM, Wong C, Enzymes for chemical synthesis, Nature 409 (2001) 232-240.

Long WS, Kow PC, Kamaruddin AH, S. Bhatia, Comparison of kinetic resolution between two racemic ibuprofen esters in an enzymic membrane reactor, Process. Biochem. 40 (2005) 2417-2425.

López N, Pérez R, Vázquez F, Valero F, Sánchez A, Immobilization of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters, J. Chem. Technol. Biot. 77 (2002) 175-182.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM, Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, Yeast 22 (2005)249-270.

Macedo GA, Pastore GM, Rodrigues MI, Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus oryzae* lipase with a central composite rotatable design, Process Biochem. 39 (2004) 687-692.

Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microb. Tech. 40 (2007) 1451-1463.

Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, Ueda M, Tanaka A, Fukuda H, Kondo A, Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production, Appl. Microbiol. Biot. 57 (2001) 515-520.

Méndez J, Oromi M, Cervero M, Balcells M, Torres M, Canela R, Combining Regio- and Enantioselectivity of lipases for the preparation of (R)-4-Chloro-2-butanol, Chirality 19 (2007) 44-50.

Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD, Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties, J. Biotechnol. 66 (1998) 147-156.

Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solà C, Schmid RD, Valero F, Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*, J. Biotechnol. 86 (2001) 59-70.

Mozhaev VV, Melik-Nubarov NS, Sergeeva MV, Sikrnis V, Martionek K. Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support. *Biocatalysis* 3 (1990) 179-187.

Naik S, Basu A, Saikia R, Madan B, Paul P, Chatterjee R, Brask J, Svendsen A, Lipases for use in industrial Biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 65 (2010) 18-23.

Niu W, Li Z, Tan T, Secretion of pro- and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins, *Mol. Biotechnol.* 32 (2006) 73-81.

Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S, Production of MLM-Type structured lipids catalyzed by immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* lipase *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 473-480.

Oliveira P, Jares F, Ikegaki M, Enzymatic resolution of (R,S)-Ibuprofen an (R,S)- Ketopren by microbial lipases from native and commercial sources, *Braz. J. Microbiol.* 37 (2006) 329-337.

Ozyilmaz G, Gezer E, Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 64 (2010) 140-145.

Paiva AL, Balcão V-M-, Malcata F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Tech.* 27 (2000) 187-204.

Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisan JM, Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 19-20 (2002) 279-286.

Palomo JM, Segura RL, Fernandez-Lorente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R, Enzymatic resolution of (±)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of lipase from *Rhizopus oryzae* via immobilization techniques, *Tetrahedron-Asymmetr.* 15 (2004) 1157-1161.

Pires-Cabral P, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Modeling the production of ethyl butyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, *Biochem. Eng. J.* 33 (2007) 148-158.

Plou FJ, Cruces MA, Ferrer M, Fuentes G, Pator E, Bernabé M, Christensen M, Comelles F, Parra JL, Ballesteros A, Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, *J. Biotechnol.* 96 (2002) 55-66.

Rai M, Padh H, Expression systems for production of heterologous proteins, *Curr Sci India* 80 (2001) 1121-1128.

Rodrigues R C, Fernandez-Lafuente R, Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 64 (2010) 1-22.

Sabbani S, Hedenström E, Nordin O. The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilizing support material *Acurel*. *J. Mol. Catal B-Enzym.* 42 (2006) 1-9.

Santaniello E, Ferraboschi P, Gisenti P, Lipase-catalized transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds, *Enzyme. Microb. Tech.* 15 (1993) 367-382.

Sayari A, Frikha F, Miled N, Mtibaa H, Ali YB, Verger R, Gargouri Y, N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties, *FEBS. Lett.* 579 (2005) 976-982.

Schipper MAA, A revision of the genus *Rhizopus*. The *Rhizopus stolonifer* group and the *Rhizopus oryzae*, *Stud. Mycol.* 25 (1984) 1-19.

Schoffers E, Golebiowski A, Johnson CR, Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization, *Tetrahedron.* 15 (1996) 367-382.

Shin G, Lee K, Kim T, Shin H, Lee Y, Lipase-catalyzed production of optically active (S)-flurbiprofen in aqueous phase reaction system containing chiral succinyl β -cyclodextrin, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 33 (2005) 93-98.

Takahashi S, Ueda M, Atomi H, Beer HD, Bornscheuer UT, Schmid RD, Tanaka A, Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Bioeng.* 86 (1998) 164-168.

Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biot.* 52 (1999) 534-540.

Talon R, Montel MC, Berdague JL, Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*, *Enzyme. Microb. Tech.* 19 (1996) 620-622.

Valero F, Lipases and phospholipases: Methods and protocols, Methods in Molecular Biology, 861, Chapter 11, Springer Science + Business Media, 2012.

Verger R, Interfacial activation of lipase: facts and artifacts, Trends Biotechnol. 15 (1997) 32-38.

Won K, Hong J, Kim K, Moon S, Lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic ibuprofen coupled with pervaporation, Process. Biochem. 41 (2006) 264-269.

Yadav JS, Subba BV, Padmavani B, Venugopal CH, Bhaskar A, Enzymatic kinetic resolution of racemic 4-tetrahydropyrans by *Candida rugosa* lipase, Tetrahedron. Lett. 48 (2007) 4631-4633.

Yin JC, Li GX, Ren XF, Herrler G, Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, J. Biotechnol. 127 (2007) 335-347.

www.uniprot.org

www.ncbi.nlm.nih.gov



2. OBJETIVOS

2. Objetivos

En el grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada de la UAB se ha investigado la optimización del proceso de producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*, siendo la lipasa de *Rhizopus oryzae* su proteína modelo.

Hasta ahora esta proteína no se encontraba caracterizada ni se utilizaba en biotransformaciones. Por tanto, el objetivo general de esta tesis se centra en la caracterización y aplicación de dicha lipasa recombinante en biocatálisis.

Éste objetivo general puede desglosarse en los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización bioquímica de la lipasa recombinante contenida en el extracto proteico parcialmente purificado obtenido a partir de cultivos de *P. pastoris*.
- Comparación de las propiedades de ésta lipasa con las que presenta la enzima nativa contenida en extractos proteicos de liofilizados comerciales.
- Estudio de la inmovilización de la lipasa recombinante, así como de la nativa, sobre soportes de diferente naturaleza, con el fin de aplicar los derivados inmovilizados obtenidos en reacciones de interés industrial.
- Análisis de la estabilidad enzimática de los derivados inmovilizados.
- Aplicación de la lipasa recombinante inmovilizada en la síntesis de aromatizantes, concretamente en la síntesis del butirato de etilo. Estudio de las mejores condiciones de reacción de los diferentes derivados inmovilizados utilizados en dicha reacción.
- Prospección de la aplicación de la lipasa recombinantes en otras biotransformaciones de interés industrial.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1. Lipasas

Los principales extractos de lipasas que se utilizaron para el estudio fueron: el extracto comercial de la lipasa de *R. oryzae* (nROL) de AMANO Pharmaceuticals CO., LTD (ref. F-AP15) producida mediante un cultivo sumergido de una cepa seleccionada de *Rhizopus oryzae*; y el extracto con lipasa recombinante (rROL) expresada en *Pichia pastoris*, fenotipo Mut^s, utilizando metanol como inductor y sorbitol como co-sustrato durante el crecimiento en bioreactor. Este último extracto es producido en el grupo de Ingeniería de Bioprocesos y Biocatálisis Aplicada del departamento de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Barcelona (Cos *et al.*, 2006; Cos *et al.*, 2007; Arnau *et al.*, 2010). Al finalizar el cultivo, el medio es centrifugado y filtrado para separar la biomasa. Posteriormente, el sobrenadante se concentra mediante ultrafiltración con un sistema Centracassete© Pall filtron (Filtron, Moreno, Buenos Aires) equipado con una membrana Omega (Pall, Washington, USA) que retiene las moléculas superiores a 10 kDa. Tras este procedimiento la muestra es dializada con un tampón Tris-HCl 10mM a pH 7.5 para ser posteriormente liofilizada (Ferrer *et al.*, 2009).

Por otro lado también se analizaron dos extractos comerciales de Sigma Aldrich: el extracto con esterasa de *R. oryzae* (Esterasa-Sigma; ref. 9016-18-6) y el extracto con lipasa (ROL-Sigma; ref. F-AP15). En todos los casos los extractos, tanto comerciales como recombinantes, se presentaban en forma de polvo liofilizado.

3.2. Ensayo de actividad lípólítica

El ensayo enzimático de actividad lipásica se lleva a cabo según el método colorimétrico descrito por la empresa Roche (Mannheim, Alemania) haciendo uso de un kit comercial (*lipase colorimetric assay* Roche kit 11821792). Este método, esquematizado en la figura 3.1, se basa en el seguimiento de la formación de metilresorufina, debido a la reacción enzimática, a partir de la hidrólisis del éster cromático 1,2-O-dialuril-rac-glicero-3-ácido glutámico – (6'-metilresorufina). La intensidad cromática del colorante rojo formado es directamente proporcional a la actividad lipásica, de manera que el seguimiento de la absorbancia de la mezcla de ensayo con el tiempo, nos permite determinar la actividad.

La mezcla de ensayo se realiza en cubetas de 1.5 mL (Brand GMBH, Wertheim, Germany) siguiendo el siguiente protocolo:

- 300 μ L de sustrato
- 500 μ L de tampón Tris-HCl (200 mM) + CaCl_2 (5 mM), pH=7.25
- 500 μ L de muestra (disolución de proteína en agua destilada)

La medida de la absorbancia con el tiempo se realiza mediante un espectrofotómetro Cary 300, a 30°C y 580 nm. La determinación de la pendiente de la recta absorbancia frente a tiempo está directamente relacionada con las unidades de actividad por mililitro de muestra (Anexo 7.1), definiéndose una unidad de actividad como la cantidad de enzima necesaria para producir un μ mol de producto por minuto, bajo las condiciones descritas.

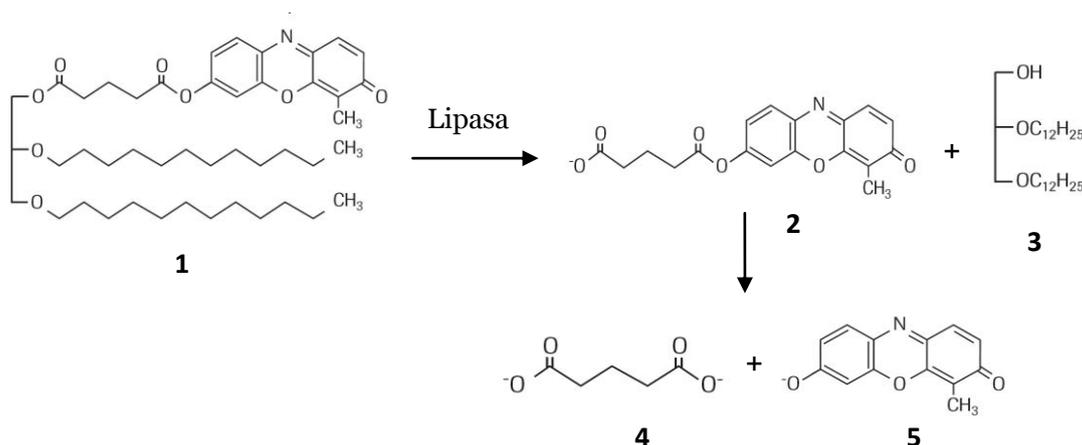


Figura 3.1. Método colorimétrico de estimación de actividad lipásica. (1) 1,2-O-dialuril-*rac*-glicero-3-ácido glutárico – (6'-metilresorufina) éster, (2) ácido glutárico- (6'-metilresorufina) éster, (3) 1,2-O-dialuril-*rac*-glicerol, (4) ácido glutárico, (5) Metilresorufina

Para el estudio de la dependencia de la actividad lipásica frente a la temperatura, los ensayos fueron realizados a pH constante de 7.25 y aplicando un rango de temperaturas de trabajo entre 25-50°C, tal como indica el protocolo; mientras que los ensayos para el estudio de la actividad frente al pH se realizaron a una temperatura constante de 30°C haciendo uso del tampón de ensayo al pH correspondiente, fijados dentro del rango 6.2-9. En la tabla 3.1, se indica el tipo de tampón utilizado y el pH. Cabe destacar que este método de análisis no

permite realizar ensayos por debajo de pH 6.2, ya que la reacción 2 descrita en la figura 3.1 no se realiza de forma completa.

Tabla 3.1. Tampones utilizados para el estudio de actividad vs pH.

Tampón utilizado (+CaCl ₂)	pH
Citrato	6
Tris-HCl	7.25-9

Los ensayos de actividad lipásica realizados a suspensiones durante los experimentos de inmovilización se llevaron a cabo haciendo una ligera modificación del procedimiento explicado anteriormente. Las cubetas de espectrofotómetro utilizadas fueron de 4.5 mL (Brand GMBH, Wertheim, Germany) para poder utilizar miniagitadores magnéticos. Al utilizar estas cubetas el volumen de mezcla tuvo que aumentarse al doble (manteniéndose las proporciones de los tres componentes) para conseguir que el haz de luz atravesara el fluido. La mezcla fue la siguiente:

- 600 µL de sustrato
- 1000 µL de tampón Tris-HCl (200 mM) + CaCl₂ (5 mM), pH=7.25
- 1000 µL de muestra (disolución de proteína en agua destilada)

En las muestras analizadas que contenían fosfatos, el tampón de análisis se aplicó sin calcio para evitar la precipitación de fosfatos cálcicos y se corrigieron los valores obtenidos con el factor encontrado experimentalmente de 0.91 UA analizadas con Ca⁺²/ UA analizadas sin Ca⁺².

3.3. Determinación de proteína total

La concentración de proteína total de cada muestra se determinó por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) usando un kit de Pierce Coomassie Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Éste método se basa en la reacción de los aminoácidos aromáticos con el colorante Coomassie G-250 generándose un complejo que puede medirse a 595 nm mediante un espectrofotómetro (Miltiskan FC, Thermo Scientific Waltham, USA). Estos ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos (Microtiter plate flat from individually

wrapped, Sudelab, Chile) mezclándose 200 μL de colorante con 7 μL de muestra en cada pocillo. Los ensayos se realizaron por duplicado y se utilizó como patrón albumina de sérum bobino (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) para realizar los patrones en un rango de concentraciones de 1g/L a 0.03125 g/L. Como blanco se utilizó agua destilada.

3.4. SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% (tabla 3.2) se realizó en un Mini-Protean II (BioRad, CA, USA) siguiendo el procedimiento estándar recomendado por el fabricante y de acuerdo con el protocolo de Laemli (Laemli, 1970). La muestra fue tratada con tampón reductor (Tris-HCl 125mM pH6.8, SDS 4% w/v, azul de bromofenol 10% w/v y 2- β -mercaptoetanol 10% v/v) y mantenida a unos 98°C durante 15 min. El marcador de masa molecular utilizado fue el Low range protein marker (BioRad, CA, USA) y los geles fueron teñidos incubando durante 24h con una solución coloidal de Coomassie G250 (34% v/v etanol, 2% v/v H_3PO_4 , 17% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.066% Coomassie G250).

Tabla 3.2. Composición gel de poliacrilamida para SDS-PAGE

Compuesto	Gel Acrilamida Separador 12%	Gel Acrilamida Apilador 12%
Agua destilada	3.35 mL	6.1 mL
Tris HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 mL	
Tris HCl 0.5 M, pH 6.8		2.5 mL
SDS 10% (w/v)	100 μL	100 μL
Acrilamida 30%	4.0 mL	1.33 mL
TEMED	5 μL	10 μL
Persulfato de Amonio 10% (w/v)	50 μL	50 μL

3.5. Zimograma

Para realizar el zimograma, se procedió a llevar a cabo la separación proteica mediante SDS-PAGE según se describe en el apartado 3.4. La muestra fue tratada con tampón reductor (Tris-

HCl 125mM pH6.8, SDS 4% w/v, azul de bromofenol 10% w/v y 2- β -mercaptoetanol 10% v/v) y mantenida a unos 98°C durante 5 min.

Tras la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se procedió a la separación del SDS del gel impregnándolo con una solución al 2.5% de Triton X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente, con el objetivo de renaturalizar las enzimas. A continuación el gel fue lavado con tampón Tris-HCl 20mM a pH 7 durante 15 minutos 2 veces y fue incubado con una solución 100 μ M de MUF-butirato (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en el mismo tampón. Tras 30 segundos los geles fueron iluminándolos con UV con el fin de detectar las bandas que emitían fluorescencia. Tras la detección se realizó una tinción con Coomassie coloidal G250 para detectar el masa molecular de la proteína activa (Díaz *et al.*, 1999).

En el caso del zimograma realizado en el gel 2D, simplemente se incubó con una solución 100 μ M de MUF-butirato, ya que dicho procedimiento no se realiza en condiciones desnaturalizantes.

3.6. Western Blot

El Western Blot se llevó a cabo tras una transferencia de las proteínas desde un SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Hybond™-ECL (Ge Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) usando un Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la transferencia proteica, las membranas fueron incubadas con un tampón bloqueante (NaH₂PO₄ 1.42 g/L, KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8g/L, Tween 20 1 mL/L, 5% w/w skim milk powder) y con una solución del anticuerpo primario (NaH₂PO₄ 1.42 g/L, KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8g/L, Tween 20 1 mL/L, 3% w/w skim milk powder 1:100 de anticuerpo policlonal producido en ratón) según el procedimiento descrito por otros autores (Resina *et al.*, 2009), aumentando el tiempo de incubación del anticuerpo primario de 1h a 90 minutos. Tras esto, se realizó la incubación con una solución del anticuerpo secundario (NaH₂PO₄ 1.42 g/L, KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8g/L, Tween 20 1 mL/L, 3% w/w leche desnatada en polvo y molécula completa de IgG anti-ratón con fosfatasa alcalina producida en cabra, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluido 1:5000 en tampón bloqueante durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron lavadas tres veces con 25 mL de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 1.42 g/L, KCl 0.2 g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 8g/L, Tween 20 1 mL/L) y las señales se revelaron usando Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (BioRad, CA, USA). La membrana

fue incubada en una solución de revelado (2 mL 25XAP color development buffer, 48mL agua destilada, 500 μ L AP color reagent A y 500 μ L AP color reagent B) hasta que se visualizaron las señales. La reacción terminó lavando la membrana con agua destilada.

3.7. Secuenciación del N-terminal

Tras un SDS-PAGE, las muestras fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) de BioRad (CA, USA) usando un Mini Trans Blot (BioRad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana de PVDF fue lavada con 50mL de agua MilliQ durante 10 minutos, teñida durante 5 minutos con Coomassie Brilliant Blue R-250 (metanol 50% v/v, Coomassie 0.025%) y desteñida con una solución al 50% v/v de metanol. Las proteínas de interés fueron recortadas y su N-terminal fue secuenciado mediante una degradación automatizada de Edman usando un Applied Biosystems Procise 494 sequencer (Romero *et al.* 2009). Las secuencias obtenidas se contrastaron mediante la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.8. Detección mediante anticuerpos de proteínas glicosiladas

La detección de proteínas glicosiladas mediante el uso de anticuerpos se realizó mediante el kit comercial DIG Glycan Detection Kit (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras realizar un SDS-PAGE de las muestras proteicas, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon P, Millipore, Bedford, USA) usando un Mini Trans Blot (BioRad, CA, USA) a 400mA durante 90 minutos. Seguidamente la membrana fue incubada en diferentes soluciones proporcionadas en el kit, consiguiendo una oxidación de los hidroxilos de los azúcares y una unión de estos a digoxigenin para luego ser detectado mediante anti-digoxigenin fosfatasa alcalina (anticuerpo) generando de este modo color en aquellas proteínas que presentan azúcares.

3.9. Gel 2D

Debido a que las muestras no se componen únicamente de lipasa purificada, sino que corresponden a un extracto proteico, la detección de los puntos isoeléctricos se realizó mediante un gel 2D, en el cual las proteínas quedan separadas tanto por masa molecular como por punto isoeléctrico.

Las muestras deben ser desaladas previamente para que la presencia de sales no interfiera en la determinación del pI. Para ello las muestras fueron tratadas con una columna de desalado (Hi-Trap desalting column 5mL, GE Helthcare, Chalfont ST. Giles, Reino Unido) en un FPLC (AKTA Purifier, GE Helthcare, Chalfont ST. Giles, Reino Unido). Tras esto, las muestras desaladas fueron aplicadas a un gel de IEF de BioRad (CA, USA) de pH 3-10 al igual que unos marcadores de IEF de la misma casa comercial siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras separar la primera dimensión por pI se realizó la separación de masa molecular en un Mini-Protean (BioRad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la separación proteica se realizó un zimograma previamente a la tinción con una solución Gel Code Blue Safe Protein Stain (Thermo Scientific Walthman, USA) durante 2 horas. Fue necesaria una destinción para eliminar el exceso de colorante con agua MilliQ.

3.10. Especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol

Los *p*-nitrofenoles son compuestos nitrofenólicos con un ácido graso en la posición *para* unido mediante enlace éster al nitrofenol. Para analizar la especificidad de las lipasas ante distintos sustratos, aplicada a la degradación de ésteres de *p*-nitrofenol, se optó por determinar la actividad catalítica de la enzima ante ésteres de diferente longitud de cadena. Dicho método se basa en determinar la velocidad inicial de hidrólisis del compuesto fenólico (*figura 3.2*) mediante el seguimiento del incremento de la concentración del producto de la reacción, en concreto del *p*-nitrofenol, el cual absorbe a una longitud de onda de 348nm. Bajo estas condiciones el coeficiente de extinción molar se estimó como $4.93 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Anexo 7.2). Para poder seguir los cambios de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Cary 300 (Agilent Technologies, USA).

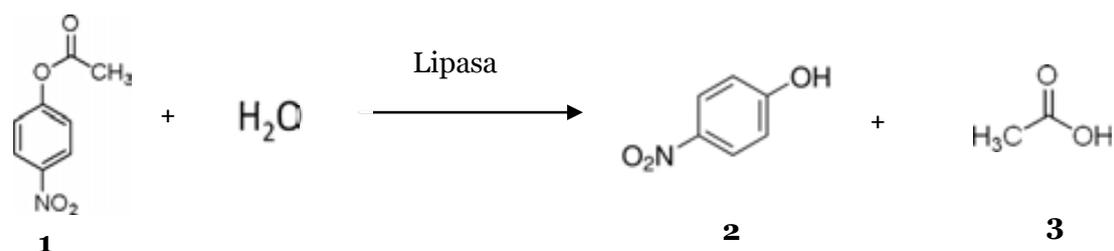


Figura 3.2. Método colorimétrico de estimación de especificidad de sustrato ante ésteres de *p*-nitrofenoles. Ejemplo de *p*-nitrofenil acetato como sustrato. (1) *p*-nitrofenil acetato, (2) *p*-nitrofenol (3) ácido acético.

Las mezclas de reacción constaron de 3mL de la siguiente composición: 50mM tampón fosfato a pH 7,0, Tritón X-100 a 0,32% p/v (2,5 % p/v en el caso del éster de C12 Y C10), acetona al 4% y el sustrato a estudio en una concentración de 1 mM. El ensayo se realiza a 30°C y tiene una duración de 15 min, añadiéndose 30µL de solución de enzima a los 5 minutos de haberse iniciado las medidas de absorbancia. Estos 5 minutos son necesarios para detectar la autohidrólisis del éster de *p*-nitrofenol utilizado en cada reacción. En la tabla 3.3 se detalla el listado de ésteres de *p*-nitrofenol utilizados.

Tabla 3.3. Ésteres de *p*-nitrofenol utilizados para el estudio de especificidad.

Éster de <i>p</i> -nitrofenol	Longitud de Cadena del ácido	Proveedor y referencia
<i>p</i> -nitrofenil acetato	C2	Sigma N8130
<i>p</i> -nitrofenil propionato	C3	Sigma N3377
<i>p</i> -nitrofenil butirato	C4	Sigma N9876
<i>p</i> -nitrofenil hexanoato	C6	Sigma N0502
<i>p</i> -nitrofenil octanoato	C8	Sigma 21742
<i>p</i> -nitrofenil decanoato	C10	Sigma N0252
<i>p</i> -nitrofenil dodecanoato	C12	Sigma 61716

3.11. Especificidad frente a triacilglicéridos

Los triacilglicéridos son un tipo de lípidos saponificables compuestos por una molécula de glicerol unida a tres ácidos grasos mediante enlace éster. Los diferentes triacilglicéridos utilizados en los ensayos de especificidades se muestran en la tabla 3.4:

Tabla 3.4. Triacilglicéridos utilizados para el estudio de especificidad.

Triacilglicérido	Longitud de Cadena del ácido	Proveedor y referencia
Triacetina	C2	Sigma W200700
Tripropionina	C3	Sigma W328607
Tributirina	C4	Sigma T8626
Tricaprina	C6	Sigma T0888
Tricaprilina	C8	Sigma 91039
Tricaprina	C10	Sigma T7517
Tristearina	C18	Sigma T5016
Trioleina	C18:1	Sigma T7140

La actividad se midió haciendo uso de un pH-stato (Methrom, Suiza) a 30°C y con una emulsión de 20 mM (también de 1.2M en el caso de la triacetina) del triacilglicérido a estudio en Tris-HCl a pH 7 conteniendo CaCl₂ 0.1 M y goma arábiga 0.5% w/v. La mezcla final de 100mL se emulsionó con un Ultra-turrax T25 (IKA Labortechnik, Germany) a 11000 rpm durante 7 minutos. La determinación de actividad se realiza mediante el seguimiento de los ácidos grasos liberados a causa de la hidrólisis catalizada por la lipasa. Para ello se mantuvo el pH constante de la reacción a pH 7 mediante la adición de NaOH 0.01 N. En la figura 3.3 se esquematiza la reacción de hidrólisis de triacilglicéridos.

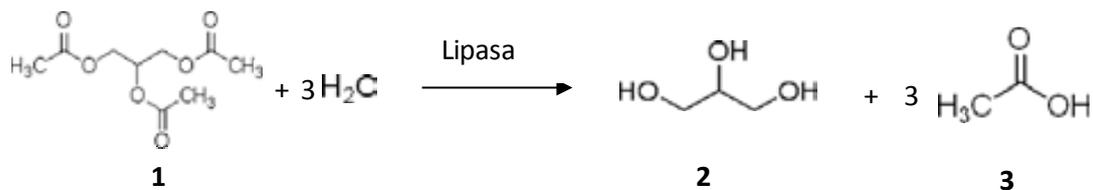


Figura 3.3. Método de estimación de especificidad de sustrato ante triacilglicéridos. Ejemplo de *triacetina* como sustrato. (1) *triacetina*, (2) glicerol (3) ácido acético.

3.12. Inmovilización en EP100 y Eupergit® C y CM

Diferentes soluciones de tampón 200mM Tris-HCl a pH 7.5 de diferentes cargas de actividad lipásica ($119\text{-}4174 \text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ para rROL y $12\text{-}850 \text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$ para nROL se agitaron durante 1 hora en un agitador magnético. Las soluciones se centrifugaron durante 20 minutos a 12000 rpm en una centrífuga Biofuge Fresco Heraeus (Waltham, USA). Cada solución se mezcló con el soporte en un MoviROL (P-selecta, Abrera, Spain) durante 24 horas a 4°C. El pretratamiento del soporte consistió en la incubación de éste con etanol a una relación de $10\text{ mL etanol}\cdot\text{mg}^{-1}$ soporte durante 30 minutos y una eliminación del etanol sobrante mediante filtración al vacío. Finalmente, el soporte con la lipasa inmovilizada fue separado de la disolución mediante filtración al vacío con un filtro de vidrio poroso de tamaño 3 (Alco, Terrassa, España) y lavado tres veces con 20mL de Tris-HCl 200mM a pH 7.5. Por último fue almacenado seco a -20°C . En cada experimento, una solución control sin soporte fue realizada bajo las mismas condiciones considerándose ésta como blanco.

El mismo procedimiento descrito para EP100 fue seguido en el caso de las inmovilizaciones en Eupergit C y CM con ciertas diferencias. El soporte no fue pretratado y el tampón utilizado para la inmovilización fue fosfato 0.1M a pH 7.5 en lugar de Tris-HCl 200mM. Finalmente, el tiempo de inmovilización fue de 96 horas en lugar de 24. Los lavados del soporte se realizaron con 20 mL de tampón fosfato 0.1M a pH 7.5 tres veces y con 20mL NaCl 1M también en tres ocasiones. Las cargas en el caso de Eupergit C fueron $70\text{-}1700 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ para rROL y $20\text{-}972 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ para nROL y en el caso de Eupergit CM éstas variaron entre $75\text{-}2893 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ para rROL.

En cada experimento, tanto la actividad lipásica como la proteína del sobrenadante así como la actividad de la suspensión (sobrenadante + soporte) fueron analizadas al inicio y al final de cada ensayo, calculándose los siguientes parámetros:

$$\%Inmovilización = \frac{Actividad\ blanco - Actividad\ final\ sobrenadante}{Actividad\ blanco} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$\% Actividad\ total = \frac{Actividad\ final\ suspensión}{Actividad\ blanco} \cdot 100 \quad (3.2)$$

$$\% Prot.\ inmovilizada = \frac{Prot.\ inicial\ sobrenadante - Prot.\ final\ sobrenadante}{Prot.\ inicial\ sobrenadante} \quad (3.3)$$

$$\%Actividad\ retenida = \frac{Actividad\ final\ suspensión - Actividad\ final\ sobrenadante}{Actividad\ blanco} \cdot 100 \quad (3.4)$$

3.13. Estudios de equilibrio de adsorción en EP100

Se realizaron estudios de equilibrio de adsorción en el caso de las inmovilizaciones sobre EP100. Para ello se siguió la ecuación de Langmuir a la hora de ajustar los datos obtenidos:

$$C_S = \frac{A_{MAX} \cdot C_L}{K_L + C_L} \quad (3.5)$$

C_S = Actividad lipásica o proteína total adsorbida sobre el soporte en el equilibrio (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mg soporte}^{-1}$)

C_L = Actividad lipásica o proteína total en solución en el equilibrio (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mL}^{-1}$)

A_{MAX} = Máxima actividad lipásica o proteína total adsorbida en el soporte (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mg soporte}^{-1}$)

K_L = Constante de Langmuir (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mL}^{-1}$)

El programa Sigma Plot 11.0 (Systat software, Illinois, USA) fue utilizado para ajustar los datos obtenidos experimentalmente al modelo matemático de equilibrio de Langmuir.

3.14. Reacción de síntesis de propionato de butilo mediante lipasa inmovilizada.

Para llevar a cabo la reacción de síntesis del propionato de butilo en medio orgánico, concretamente en ciclohexano, se hizo uso de pequeños recipientes de vidrio, de unos 10mL cerrados herméticamente (10mL-HeadSpace Vial, Ingeniería Analítica, Barcelona, España), manteniéndose la temperatura a 40°C en un agitador termostatzado VWR Incubating Orbital Shaker (Radnor,USA) a 200rpm. El volumen de reacción se fijó en 10mL de solución de ácido propiónico y butanol en ciclohexano, con una concentración de 100mM de ambos reactivos. A esta solución se añadió el soporte con la lipasa inmovilizada y se siguió la evolución del ácido propiónico durante 24 horas mediante cromatografía de gases (tabla 3.5) de muestras filtradas previamente por un filtro de PVDF 0.45 µm (Millipore, Bedford,USA). Las velocidades de reacción fueron calculadas ajustando los resultados experimentales utilizando el programa Sigma Plot 11.0 (Systat software, Illinois, USA). Éstas se calcularon mediante el ajuste de las evoluciones de la concentración de ácido propiónico con el tiempo a una ecuación del modo:

$$[Propiónico] = \frac{A \cdot tiempo}{B + tiempo} \quad (3.6)$$

Tras dicho ajuste, se realizó la derivada de la concentración de reactivo con respecto al tiempo y se evaluó la ecuación obtenida para tiempo cero. El resultado obtenido correspondía a la velocidad inicial de reacción.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en el método de seguimiento de la reacción se detallan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Condiciones cromatográficas para el seguimiento de reacciones de síntesis de propionato de butilo

Modelo del cromatógrafo de gases	6850N Agilent Technologies
Modelo del inyector	7683B Agilent Technologies
Columna	INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30m x 0,35mm x 0,25 μ m
Detector	Ionizador de llama
Temperatura del Horno	140°C
Caudal detector	10 mL/min
Presión en cabezas	30 KPa
Temperatura final	150°C
Rampa	10°C/min
Tiempo inicial	1 min
Temperatura del inyector	280°C
Temperatura del detector	300°C
Tiempo final	3min
Integración	Empower Pro
Purga	ON

Para llevar a cabo el calibrado del método, se construyó una recta patrón a partir de 5 soluciones de propiónico y butanol en ciclohexano de concentraciones entre 5mM y 100mM de cada reactivo (Anexo 7.3).

3.15. Estudio de estabilidad

El efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad lipásica fue evaluado mediante la aplicación de un diseño de experimentos de tipo Box-Hunted (Box *et al.*, 1998) y una metodología de superficie de respuesta. El diseño aplicado es un diseño central y rotatable compuesto de 12 experimentos con dos variables y 5 niveles. El valor de α (factor de rotabilidad) se escogió como 1.41 y se llevaron a cabo cuatro replicas del punto central. Los valores de ambas variables se codificaron entre -1.41 y 1.41 y las superficies de respuesta fueron construidas en

base a los valores de porcentaje de actividad residual obtenidos tras someter a la proteína (en solución o inmovilizada) 1h en un tampón 200mM Tris-HCl bajo las condiciones de temperatura y pH seleccionadas. La actividad se determinó mediante el método previamente descrito en el apartado 3.2 asegurando que la muestra fuera diluida antes de añadirla a la mezcla de reacción con el fin de no variar el pH de reacción a causa del tampón contenido en la muestra. Posteriormente los datos experimentales fueron ajustados al modelo empírico escogido, el cual ya ha sido utilizado previamente para describir la estabilidad de otras lipasas frente a temperatura y pH (Lopez *et al.*, 2004). Los valores de las variables independientes fueron utilizados según sus valores codificados:

$$\% \text{ Actividad residual} = a + b \cdot T + c \cdot pH + d \cdot T^2 + e \cdot pH^2 + f \cdot T \cdot pH \quad (3.7)$$

El software utilizado para el análisis de datos así como para la construcción de las superficies fue Sigma Plot 11.0 (Systat Software, IL). Los valores del parámetro estadístico p fueron determinados para cada uno de los parámetros del modelo. Dicho parámetro estadístico muestra el peso de cada factor sobre la variable dependiente, siendo no significativo para valores de $p > 0.05$. El ajuste del modelo fue evaluado mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}). El valor de R^2 ofrece una medida de cómo puede ser explicada la variabilidad de los valores de la respuesta observada mediante los factores experimentales y sus interacciones. Sin embargo, la R^2 siempre se incrementa con la adición de una nueva variable al modelo, aunque la implementación de esta nueva variable no comporte una mejora. El uso de R^2_{aj} (expresión modificada de R^2) es preferible ya que penaliza la incorporación de una nueva variable y sólo incrementa su valor si el nuevo término mejora el modelo. En la práctica, R^2 debe ser como mínimo 0.75 o mayor, mientras que valores sobre 0.90 son considerados muy buenos (Haaland, 1989)

3.16. Reacción de síntesis de butirato de etilo mediante lipasa inmovilizada.

Para llevar a cabo la reacción de síntesis del butirato de etilo en medio orgánico, se usaron pequeños recipientes de vidrio, de unos 10mL, cerrados herméticamente (10mL-HeadSpace Vial, Ingeniería Analítica, Barcelona, España), manteniéndose la temperatura y la agitación constantes en un agitador termostatzado (Optic Ivymen System). El volumen de reacción se fijó en 10mL de

solución con una concentración de butírico y etanol deseadas. Tanto los disolventes orgánicos utilizados como el etanol y el ácido butírico se desecaron previamente durante 48 horas con Molecular sieve UOP Type 3 (Sigma Aldrich, St Louis, USA). En el caso de utilizarse el biocatalizador desecado, éste se mantuvo durante 24 horas en un desecador con silica gel.

La solución inicial fue añadida al soporte con la lipasa inmovilizada, pesado previamente en el recipiente donde se realiza la reacción; y se siguió la evolución del butirato de etilo y el ácido butírico durante 24-48 horas mediante cromatografía de gases. Previamente al análisis cromatográfico, las muestras tomadas fueron filtradas por un filtro de PVDF de 0.45 μm (Millipore, Bedford, USA) y 50 μL de éstas fueron mezcladas con igual volumen de patrón interno siendo éste una solución 0,4 M de 4-metil 2-pentanol en hexano.

Las velocidades de reacción fueron calculadas ajustando los resultados experimentales utilizando el programa Sigma Plot 11.0 (Systat software, Illinois, USA). Se ajustaron las evoluciones de la concentración de producto con el tiempo a una ecuación del modo:

$$[\text{Éster}] = \frac{A \cdot \text{tiempo}}{B + \text{tiempo}} \quad (3.8)$$

Tras dicho ajuste, se realizó la derivada de la concentración de éster con respecto al tiempo y se evaluó la ecuación obtenida para tiempo cero. El resultado obtenido correspondía a la velocidad inicial de reacción.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en el método de seguimiento de la reacción se detallan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Condiciones cromatográficas para el seguimiento de reacciones de síntesis de butirato de etilo.

Modelo del cromatógrafo de gases	7890A Agilent Technologies
Modelo del inyector	G4513A
Columna	INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol) 30m x 0,35mm x 0,25 μ m
Detector	Ionizador de llama
Temperatura del Horno	60°C
Factor Split	70
Presión en cabezas	15 psi
Temperatura final	180°C
Rampa	30°C/min
Tiempo inicial	6 min
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector	270°C
Tiempo final	2 min
Integración	Agilent Chemstation
Purga	ON

Para llevar a cabo el calibrado del método, se construyó una recta patrón a partir de 7 soluciones de butírico, etanol y butirato de etilo en hexano de concentraciones entre 7mM y 800mM (Anexo 7.4).

3.17. Actividad residual y reactivación de inmovilizados frente a disolventes orgánicos

Los inmovilizados fueron pesados en un vial de 10mL y desecados 24 horas. Después se añadieron 3mL del disolvente orgánico a estudio (hexano, heptano o isooctano) y se cerró herméticamente. Los viales se incubaron a 30°C durante 1 y 24 horas en un incubador termostatzado (Optic Ivymen System) tras lo cual se filtraron al vacío con un filtro de vidrio poroso y se analizó su actividad residual mediante el análisis de actividad lipásica.

En el caso de los inmovilizados expuestos a hexano, tras 1h y 24 horas fueron incubados en agua, glucosa 30g/L o lactosa 30 g/L durante 24 horas a 4°C en un MoviROL (P-selecta, Abrera, Spain) con el fin de reactivar las enzimas. Tras estas incubaciones se determinó la actividad lipásica residual.

3.18 Análisis de desorción en medio orgánico de las lipasas inmovilizadas.

Se tomaron muestras de unos 100mg de biocatalizador inmovilizado y se incubó en hexano a 30°C y 250 rpm en un orbital termostatzado (Optic Ivymen System) en viales de 10mL cerrados herméticamente. Tras 24 horas de incubación el vial fue abierto para evaporar el hexano y se añadieron 200 µL de agua para disolver las proteínas que se hubieran desadsorbido del soporte. Tras esto el soporte fue eliminado por filtración y las muestras acuosas fueron sometidas a ensayos de proteína total (Apartado 3.3) y SDS-PAGE (Apartado 3.4).

3.19. Reutilización de los biocatalizadores en reacciones de síntesis de butirato de etilo.

Los biocatalizadores fueron utilizados en reacciones de síntesis de butirato de etilo en las condiciones óptimas obtenidas para cada uno de ellos siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.16. Tras cada batch, el soporte fue filtrado al vacío con un filtro de vidrio poroso de tamaño 3 (Alco, Terrassa, España) y lavado con 20 mL del disolvente orgánico utilizado como medio de reacción. Tras el filtrado, el soporte fue recogido para determinar el peso recuperado y reutilizarlo en un nuevo batch de iguales condiciones que el primero. Con el fin de estudiar el efecto del agua en la reacción se realizaron duplicados de las reacciones en las cuales, en un caso el soporte era reutilizado directamente tras el filtrado y en otra éste era desecado 24 horas previamente al nuevo batch.

Las reacciones fueron seguidas durante 24 horas según se describe en el apartado 3.16.

3.20. Estudio del efecto de la concentración de sustratos y relación entre ellos en reacciones de síntesis de butirato de etilo.

El efecto de la concentración de butírico y la relación molar de butírico y etanol sobre la velocidad inicial, la conversión y la producción en las reacciones de síntesis de butirato de etilo usando rROL-Sepabeads fue analizado mediante la aplicación de un diseño de experimentos de tipo Box-Hunted (Box *et al.*, 1998) y una metodología de superficie de respuesta, ya comentado en el apartado 3.15. Los valores de ambas variables se codificaron entre -1.41 y 1.41 y las superficies de respuesta fueron construidas en base a los valores de velocidad inicial de reacción y porcentaje de conversión obtenidos llevando a cabo las reacciones según se ha descrito en el apartado 3.16. Las condiciones de reacción fueron aquellas encontradas como óptimas: 35°C, 250 rpm, isooctano como disolvente y utilizando el soporte previamente desecado. La actividad inicial cargada fue de 5500 UA.

Los valores de las variables independientes obtenidas fueron utilizados según sus valores codificados y ajustados al siguiente modelo:

$$\text{Velocidad inicial (mmol/mL} \cdot \text{min)} \cdot 10^4 = a + b \cdot [\text{Butírico}] + c \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) + d \cdot [\text{Butírico}]^2 + e \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol})^2 + f \cdot [\text{Butírico}] \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) \quad (3.9)$$

$$\% \text{Conversión} = a + b \cdot [\text{Butírico}] + c \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) + d \cdot [\text{Butírico}]^2 + e \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol})^2 + f \cdot [\text{Butírico}] \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) \quad (3.10)$$

$$\text{Producción (mmol/h)} = a + b \cdot [\text{Butírico}] + c \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) + d \cdot [\text{Butírico}]^2 + e \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol})^2 + f \cdot [\text{Butírico}] \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) \quad (3.11)$$

El software utilizado para el análisis de datos así como para la construcción de las superficies fue Sigma Plot 11.0 (Systat Software, IL). Los valores del parámetro estadístico p fueron determinados para cada uno de los parámetros del modelo. Dicho parámetro estadístico muestra el peso de cada factor sobre la variable dependiente, siendo no significativo para valores de $p > 0.05$. El ajuste del modelo fue evaluado mediante el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), tal y como se ha descrito en el apartado 3.15.

3.21. Bibliografía

Arnau C, Ramón R, Casas C, Valero F, Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess, *Enzyme. Microb. Tech.* 46 (2010) 494-500.

Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

Box G, Hunter WG, Hunter JS, *Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*, Reverté, Barcelona, 1998.

Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F, A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess, *Biotechnol. Bioeng.* 95 (2006) 145-154.

Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F, Combined effect of methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *P. pastoris* fed-batch cultures, *J. Biotechnol.* 116 (2005) 321-335.

Díaz P, Prim N, Pastor J, Direct fluorescence-based lipase activity assay, *BioTechniques.* 27 (1999) 696-700.

Haaland PD, *Experimental design in biotechnology, statistics: textbooks and monographs*, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1989.

Ferrer P, Alarcón M, Ramón R, Benaiges MD, Valero F, Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter, *Biochem. Eng. J.* 43(2009)271–277.

Haaland, *Experimental design in biotechnology*, Marcel Dekker, 1989.

Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage ta, *Nature.* (1970) 227-680.

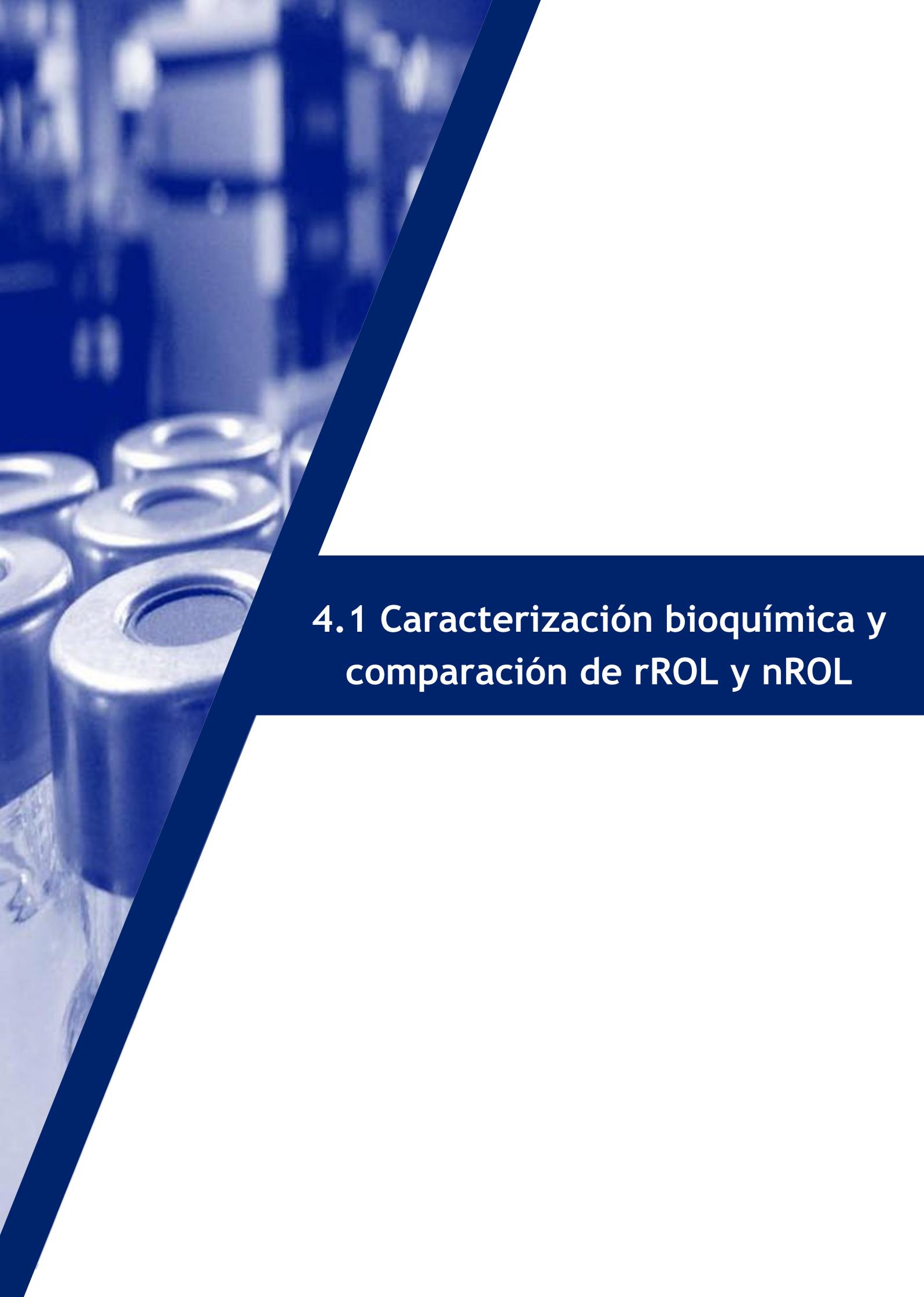
Lopez N, Pernas MA, Pastrana LM, Sánchez A, Valero F, Rúa ML. Reactivity of pure *Candida rugosa* isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. *Biotechnol. Prog.* 2004;20:65-73

Resina D, Mauer M, Cos O, Arnau C, Carnicer M, Marx H, Gasser B, Valero F, Mattanovich D, Ferrer P, Engineering of bottlenecks in *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter, *New. Biotechnol.* 25(6) (2009) 396-403.

Romero E, Ferreira P, Martínez AT, Martínez MJ, New oxidase from *Bjerkandera arthroconidial* anamorph that oxidises both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols, *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (2009) 689-697.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 Caracterización bioquímica y comparación de rROL y nROL

4. Resultados y discusión

4.1 Caracterización bioquímica y comparación de rROL y nROL

El objetivo de este capítulo es estudiar las propiedades bioquímicas de la lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* producida en *Pichia pastoris* contenida en el liofilizado proteico obtenido (rROL), así como las de la lipasa nativa contenida en el liofilizado proteico comercial (nROL). Aunque usualmente se realizan las caracterizaciones bioquímicas de las enzimas purificadas, en muchos procesos biocatalíticos el uso de extractos proteicos resulta de gran utilidad ya que conllevan una reducción del coste del proceso, evitando la purificación completa del biocatalizador; por lo tanto resulta interesante estudiar las propiedades de las enzimas contenidas en extractos parcialmente purificados para poder implementarlos en procesos a gran escala. Así, se estudiarán y compararán varias características de las lipasas, contenidas en extractos proteicos parcialmente purificados, como son: masa molecular, N-terminal, glicosilación, punto isoeléctrico, temperatura óptima, pH óptimo y especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol y triacilglicéridos. De este modo se podrán describir las principales diferencias que se pueden encontrar entre los dos productos.

4.1.1 Masa molecular.

Un método sencillo y ampliamente utilizado en la determinación de la masa molecular de proteínas es el SDS-PAGE. Sin embargo, al utilizar extractos proteicos es necesario aplicar otras técnicas complementarias, ya que es necesaria una diferenciación de la proteína de estudio con respecto a las demás presentes en la muestra. Es por esto que para determinar la masa molecular de las lipasas presentes en los extractos a analizar, se llevaron a cabo tres tipos de análisis:

- Western Blot
- SDS-PAGE
- Zimograma

Los datos obtenidos se analizaron en conjunto para determinar con la mayor seguridad posible el valor de masa molecular de las lipasas. En la figura 4.1.1 se muestran los resultados obtenidos.

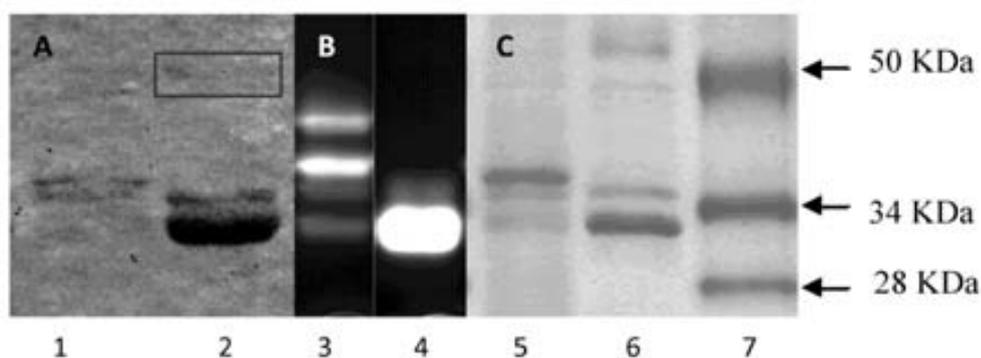


Figura 4.1.1. A. Western Blot (1) nROL (2) rROL. B. Zimograma (3) nROL (4) rROL (C) SDS-PAGE (5) nROL (6) rROL. (7) Marcador de masa molecular

La inmunodetección de la lipasa se llevó a cabo mediante el Western Blot (figura 4.1.1A), mientras que las masas moleculares de las formas activas se determinaron mediante SDS-PAGE (figura 4.1.1C) y zimograma, utilizando MUF-Butirato como sustrato (figura 4.1.1B).

En la bibliografía está referenciado que *R. oryzae* sólo produce una forma de lipasa de 32 kDa (Ben Salah *et al.*, 1994; Hiol *et al.*, 2000) compuesta por la secuencia madura de la proteína unida a los últimos 28 aminoácidos de la pro-secuencia (Sayari *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos para nROL por el Western Blot revelaron la presencia de tres bandas

positivas. La masa molecular de estas tres bandas se encontró alrededor de 34 kDa, estando la predominante ligeramente por debajo de los 34 kDa, siendo este valor algo superior comparado con los 32kDa descritos en la bibliografía (Ben Salah *et al.*, 1994; Hiol *et al.*, 2000). El hecho de que tres proteínas fueran reconocidas por el anticuerpo podría deberse a diferentes grados de glicosilación de la lipasa. Para comprobar esta hipótesis se realizó un tratamiento de tinción de proteínas glicosiladas (figura 4.1.2) en el cual no se detectó, ni en nROL ni rROL, color en las proteínas reconocidas como ROL por el anticuerpo.

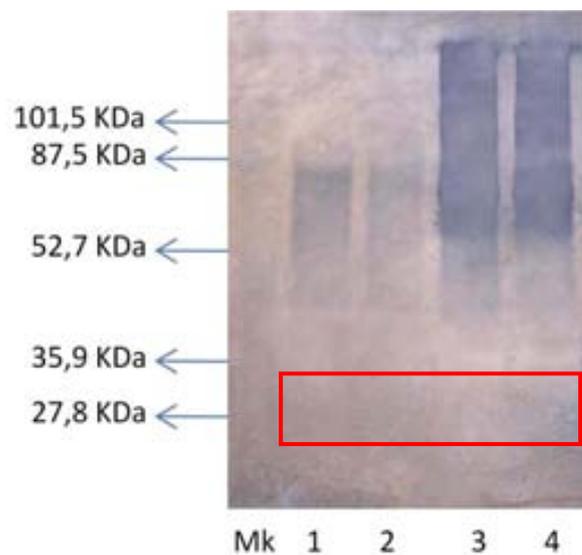


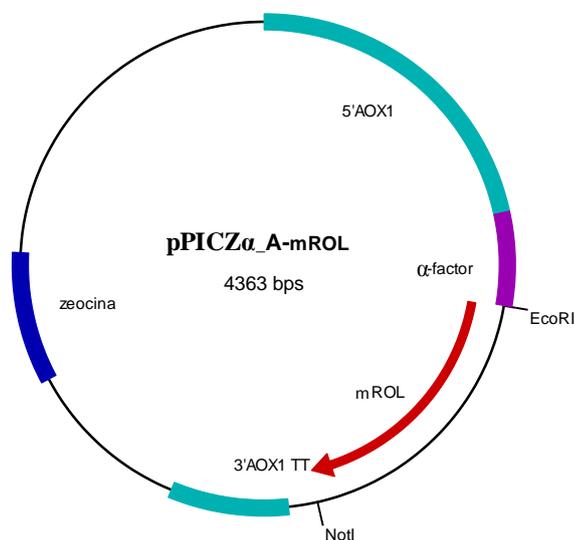
Figura 4.1.2. Tinción de proteínas glicosiladas en muestras de nROL (1,2) y rROL (3,4)

Otros autores también han obtenido resultados negativos en cuanto a glicosilación (Takahashi *et al.*, 1999; Hiol *et al.*, 2000), aunque sí se ha descrito que estas proteínas podrían diferir en la secuencia aminoacídica debido a una acción proteolítica sobre la pro- o pre-pro-enzima (Uyttenbroeck *et al.*, 1993; Sayari *et al.*, 2005) o bien debido a otras modificaciones post-traduccionales de las proteínas secretadas, como lipidificación o fosforilación (Ben Salah, 2009].

El zimograma realizado (figura 4.1.1B) mostró cuatro proteínas activas en nROL, correspondiéndose tres de ellas con las detectadas en el inmunoensayo. La cuarta proteína activa, no detectada como ROL en el Western Blot, presentaba una masa molecular de 40 kDa. El hecho de que esta proteína no fuera ROL, pero presentara capacidad hidrolítica frente al MUF-butirato, podría indicarnos la presencia de una esterasa en el liofilizado comercial.

Analizando los resultados de rROL se observó que fueron reconocidas tres bandas por el anticuerpo (figura 4.1.1 A). Sin embargo, a diferencia de nROL, sólo dos de ellas se encontraron alrededor de 34kDa (siendo la predominante ligeramente inferior a 34 kDa) mientras que la tercera se situó sobre los 45.5 kDa (marcada con un recuadro en la figura 4.1.1 A). Las diferencias en masa molecular podrían deberse a diferentes grados de glicosilación pero, como se aprecia en la figura 4.1.2, no se detectaron azúcares.

Para determinar si la diferencia entre estas isoformas de lipasa se debía a diferentes procesamientos proteolíticos, estas tres proteínas fueron aisladas y tratadas con el fin de obtener su secuencia N-terminal. Las dos formas de ROL encontradas alrededor de 34 kDa mostraron la misma secuencia: EAEFSDGGKVVA. Los primeros dos aminoácidos correspondían al final de la secuencia del α -factor de *S. cerevisiae* y los dos siguientes a los aminoácidos codificados cerca de la zona de restricción donde ROL fue clonada en el vector pPICZ α A (Beer *et al.*, 1998) (esquema 4.1). Los siguientes nueve aminoácidos secuenciados constituyen la primera parte de la secuencia madura de ROL. Por tanto, las diferencias en masas moleculares deben atribuirse a modificaciones post-traduccionales de estas enzimas.



Esquema 4.1 Representación simplificada del vector de expresión de la secuencia de ROL madura (mROL) clonado en *Pichia pastoris*.

En el caso de la proteína de 45.5 kDa detectada por el anticuerpo como ROL, los resultados del N-terminal no fueron clarificadores, ya que esta banda no pudo purificarse de forma completa. Sin embargo, el hecho de que esta proteína fuera detectada en el Western Blot podría indicar que se debía a algún heterodímero formado por rROL unida a alguna proteína nativa de *P. pastoris*.

Haciendo referencia al zimograma de rROL (figura 4.1.1 B), éste muestra tres bandas activas correspondiéndose éstas con las tres detectadas en el Western Blot como ROL. Sin embargo, la actividad de la proteína de 45.5 kDa únicamente fue detectada tenuemente a mayores de tiempos de exposición a UV.

4.1.2. Punto isoelectrico

El punto isoelectrico de una proteína se define como el valor del pH al cual la carga total de la molécula es nula. En el caso de nROL y rROL, no se parte de la enzima purificada, así que se realizó un gel 2D en el cual las proteínas de los liofilizados se separan tanto por masa molecular como por punto isoelectrico (pI).

En la siguiente tabla se muestran los puntos isoelectricos teóricos según el N-terminal de la proteína.

Tabla 4.1.1. Puntos isoelectricos teóricos. Cálculos realizados en www.expasy.org

Secuencia N-terminal	pI teórico
DDNLVGGMTLDLPSDAPPISLSSSTNSA*SDGGKVVA	6.40
EAEFSDGGKVVA	7.23
SDGGKVVA	8.14

*28 últimos aminoácidos de la pro-secuencia.

En la siguiente figura se muestran los geles 2D para rROL (figura 4.1.3 A) y nROL (figura 4.1.3 B).

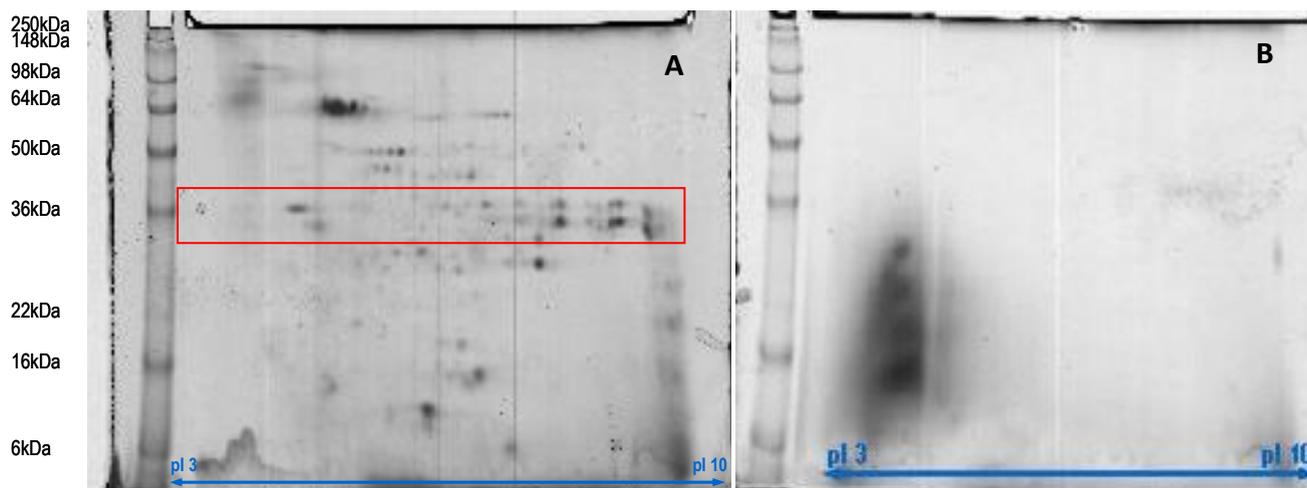


Figura 4.1.3. A. Gel 2D rROL B. Gel 2D de nROL. Realizado con muestras de los liofilizados desalados.

Como se aprecia en la figura 4.1.3, para el caso de la muestra de nROL (figura 4.1.3 B) no se obtuvieron resultados con una buena resolución ya que no se apreciaba una separación correcta de las proteínas por su masa molecular o pI. Esto puede deberse a que las muestras comerciales, aún estando desaladas mediante cromatografía, aún llevaban algún excipiente que dificultó su separación, provocando la aparición de una única zona de señal en un pH ácido.

En el caso de rROL (figura 4.1.3 A) se observaron varias proteínas bien definidas. De las dos proteínas detectadas en el inmunoensayo a 34 kDa se aprecian hasta cinco isoformas, casi idénticas (recuadradas en la figura 4.1.3 A). Según el N-terminal hallado para las dos lipasas de rROL, encontradas alrededor de los 34 kDa, el pI teórico debería ser de 7.23 (tabla 4.1.1). Sin embargo, en la de masa molecular ligeramente superior a 34 kDa, la isoforma predominante presenta un pI ácido alrededor de 4.5-5 y en la de masa inferior las bandas predominantes mostraron pI básico entre 7 y 9. Estos resultados podrían indicar que la lipasa con masa molecular ligeramente superior a 34 kDa tiene más tendencia a fosforilarse que la de menor masa. Por otro lado, la de 45.5 kDa presentaba dos isoformas, ambas con pI muy cercano y en la zona ácida.

En la literatura se encuentran valores que oscilan en la zona básica de pH. Se han observado valores experimentales de 6.9 o 7.6 para la ROL nativa (Hiol *et al.*, 2000; Ben Salah *et al.*, 2001) y un valor de 9 para ROL producida en *P. pastoris* (Minning *et al.*, 1998).

4.1.3 Efecto de la fuerza iónica, temperatura y pH sobre la actividad lipolítica

La actividad enzimática es fuertemente dependiente de la fuerza iónica, la temperatura y el pH, por lo tanto es importante llevar a cabo una caracterización de la enzima con respecto a estos parámetros para establecer los valores óptimos que conllevan su mayor actividad.

4.1.3.1 Fuerza iónica

Estudios preliminares demostraron un efecto importante de la fuerza iónica sobre la actividad lipolítica. Esto es debido a que la concentración de sales del medio es crucial para una óptima velocidad de reacción. Una elevada concentración o una ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya que las enzimas precisan de una adecuada fuerza iónica para mantener su carga y su estructura. La fuerza iónica está relacionada con la conductividad del medio y ésta, a su vez, con la concentración de sales (figura 4.1.4).

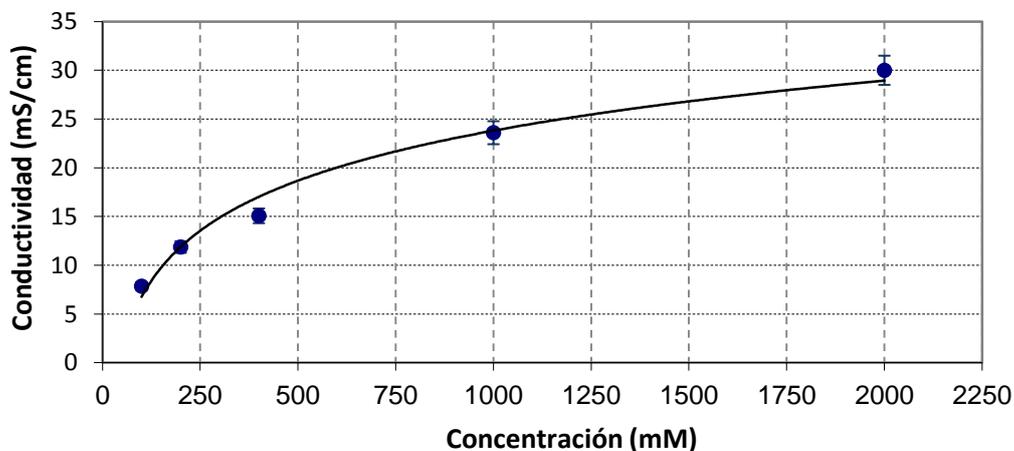


Figura 4.1.4. Conductividad en función de la concentración del tampón Tris-HCl, pH = 7.25

En un principio la conductividad aumenta a medida que se incrementa la concentración molar, tal como se aprecia en la figura anterior, ya que el número de iones que permiten la conducción aumenta hasta llegar a un valor máximo. Sin embargo, cabe mencionar que a concentraciones elevadas la conductividad comenzaría a disminuir debido a que las interacciones asociativas de los iones dificultarían el paso de corriente.

El efecto de esta variable sobre la actividad enzimática específica fue estudiado variando la concentración de tampón Tris-HCl de entre 50mM y 2M, manteniendo un pH de 7.25 (figura 4.1.5) y observándose su efecto sobre el porcentaje de actividad relativa, considerándose el 100% de actividad como el obtenido a una concentración de tampón de 400mM, el cual se corresponde al valor de la concentración de tampón utilizado para seguir la evolución de la actividad lipolítica en los cultivos de *P. pastoris* (Resina *et al.*, 2004).

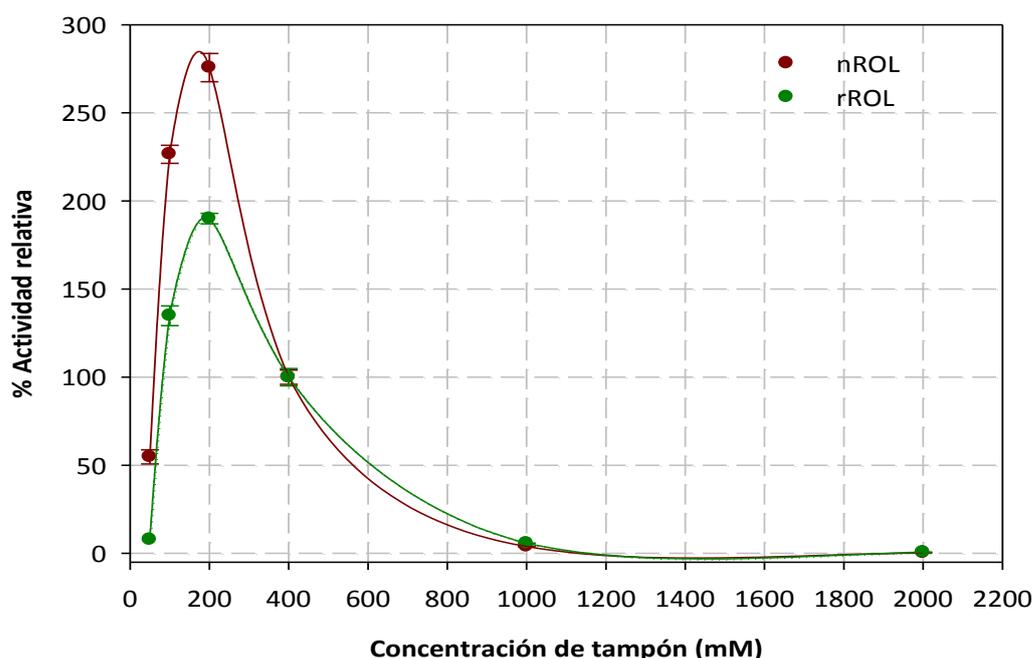


Figura 4.1.5. Efecto de la fuerza iónica en la actividad lipolítica, expresada como porcentaje relativo de actividad. El valor de actividad lipolítica obtenido a 400mM de tampón Tris-HCl para rROL y nROL a 30°C y pH 7.25 fue escogido como el 100%.

Los resultados revelaron comportamientos similares en los dos extractos. La actividad específica ($\text{UA} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$) alcanzó su máximo valor cuando el tampón de análisis utilizado era de 200mM, apreciándose un decrecimiento muy pronunciado al disminuir la concentración utilizada de Tris-HCl. También se observó el efecto era mayor sobre la actividad de nROL .

Debido al fuerte efecto de la concentración salina en la actividad lipolítica, el estudio de los valores óptimos de temperatura y pH se realizó para dos valores de fuerza iónica: el valor óptimo encontrado de 200mM y el valor de 400mM.

4.1.3.2 Temperatura

Como es sabido, la temperatura es un parámetro que se encuentra estrechamente relacionado a la capacidad catalítica de la enzima. Esta variable provoca dos efectos contrapuestos. Por un lado, un aumento térmico lleva consigo un incremento de la constante cinética de la reacción catalítica, provocando así un aumento de la velocidad de reacción. Por otro lado, dicho aumento, también conlleva un incremento de la constante de desactivación enzimática, la cual está relacionada con el proceso de desnaturalización del biocatalizador y, por consiguiente, con la disminución de la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo. A partir de la combinación de ambos efectos se obtiene que mediante una subida de temperatura se alcanza un valor máximo de actividad, a partir del cual, un mayor incremento provocaría que el efecto de la desnaturalización superara al del aumento de la velocidad de reacción, con lo que la actividad se vería mermada.

En la figura 4.1.6 se muestra el comportamiento de la actividad lipolítica frente a la temperatura para las dos fuerzas iónicas analizadas.

Del estudio de las curvas obtenidas, se observa que ambas enzimas presentan comportamientos similares en cuanto a la dependencia de la actividad con esta variable. Al situarse en el punto de menor temperatura, se aprecia un incremento de la actividad a medida que la variable independiente aumenta debido al efecto positivo de la constante cinética. Sin embargo, llegados al valor de máxima actividad, un incremento de temperatura resulta contraproducente ya que la cantidad de sustrato transformada por unidad de tiempo disminuye por efecto de la desnaturalización térmica; la lipasa pierde su configuración terciaria, la cual le confiere su capacidad catalítica, explicando así este decrecimiento. Este comportamiento se corresponde a lo predicho teóricamente.

Con los resultados de la figura 4.1.6 se pudo comprobar que el valor óptimo de temperatura para nROL correspondía a 40°C, independientemente del valor de fuerza iónica empleado. Sin embargo, en el caso de rROL, el valor óptimo de temperatura se modificó de 40°C a 30°C al incrementar la concentración de tampón de análisis de 200 a 400mM.

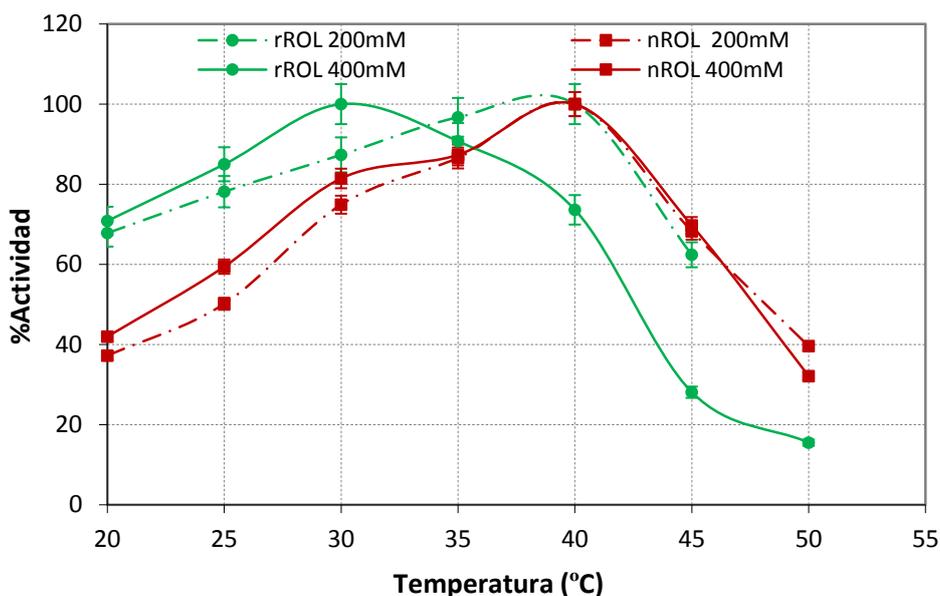


Figura 4.1.6. Efecto de la temperatura en la actividad lipolítica de nROL y rROL a pH 7.25 y concentración de tampón de análisis 200 y 400mM. El valor máximo de actividad para cada condición experimental fue escogido como el 100%.

Este valor de temperatura ha sido descrito anteriormente para la ROL nativa (Ben Salah *et al.*, 1994), sin embargo otros autores reportan un valor de 35°C (Hiol *et al.*, 2000). Por otro lado, el valor de 30°C también se encuentra descrito en la bibliografía como valor óptimo para la ROL pura producida tanto en *P. pastoris* como en *E. coli* (Minning *et al.*, 1998), así como para la lipasa intracelular de *R. oryzae* (Essamri *et al.*, 1998).

El hecho de que el valor óptimo de temperatura no se vea modificado para nROL al variar la fuerza iónica del medio, al contrario que en caso de rROL, puede deberse al efecto de ciertos estabilizantes presentes en el extracto comercial así como a ciertas modificaciones post-traduccionales, diferentes a las de rROL, las cuales podrían otorgarle una estabilidad conformacional más favorable frente a cambios de temperatura y fuerza iónica. Otro hecho que podría explicar estas desigualdades de comportamiento, sería la diferencia en el N-terminal de las enzimas. La presencia de cierta parte de la pro-secuencia en la enzima nativa, la cual no posee rROL, también podría proporcionarle ciertas propiedades, tales como una modificación de la actividad específica, especificidad y estereoselectividad comparada con la rROL (Beer *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1999; Sayari *et al.*, 2005;).

En las figuras 4.1.7 A y 4.1.7 B, se han representado los valores absolutos de actividad de ambas lipasas para cada temperatura y fuerza iónica analizadas.

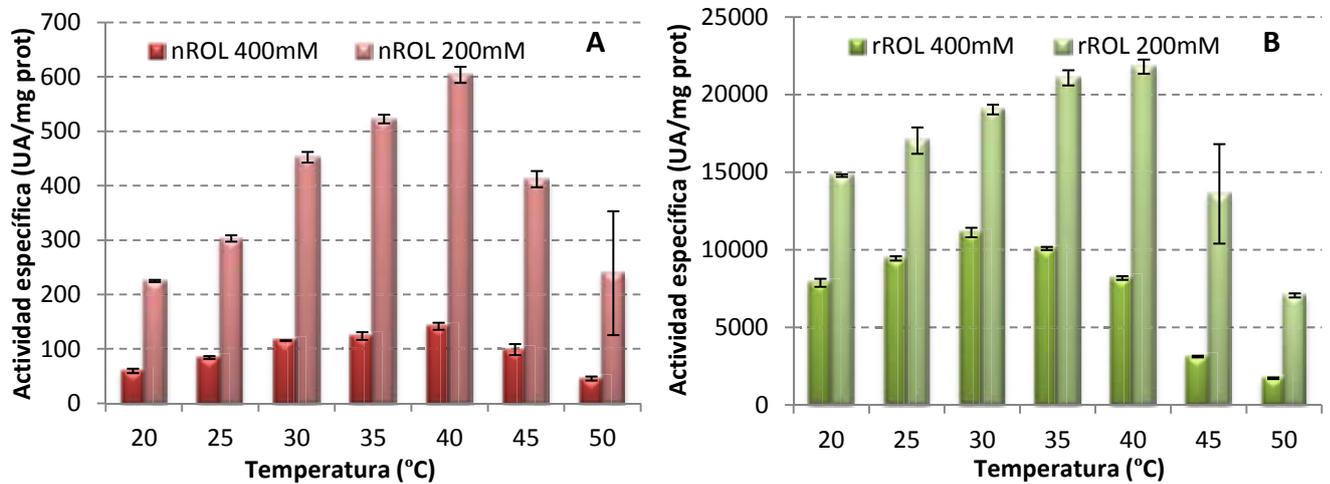


Figura 4.1.7. Actividad específica en función de la temperatura para (A) nROL y (B) rROL a pH 7.25 y concentración de tampón de análisis 200 y 400mM.

En las representaciones anteriores se aprecia claramente que rROL presenta una actividad específica mucho mayor que la obtenida por nROL para cualquier temperatura y fuerza iónica. Por tanto, las unidades de actividad conseguidas haciendo uso de un miligramo de polvo de rROL, serán muy superiores a las conseguidas haciendo uso de la misma cantidad de nROL. Cabe destacar que la actividad específica de ambas enzimas decreció (en un factor superior a 2 en el caso de rROL y de 4 en nROL) para cada de temperatura analizada, al aumentar la concentración de tampón de 200 a 400mM.

4.1.3.3 pH

La concentración de protones del medio es un factor que influye notablemente en la capacidad catalítica de las enzimas. Una variación del pH provoca cambios en la actividad del biocatalizador debido a que ciertos aminoácidos que constituyen estas proteínas contienen grupos ionizables. Estos grupos presentan cargas positivas o negativas en función de la concentración de protones del medio. Es posible que dichos aminoácidos formen parte del centro activo de modo que la

carga de éstos afecte a la capacidad catalítica, provocando que haya una concentración de enzima activa mayor o menor en función del pH del medio.

Como se aprecia en la figura 4.1.8, las dos lipasas presentan un comportamiento prácticamente idéntico respecto a la concentración de protones. Esto nos indica que para una variación de pH determinada se produce un cambio en la actividad de proporción igual en ambas lipasas. De igual modo se aprecia como las curvas de dependencia con el pH a 400 mM son fuertemente dependientes de la acidez del medio. Si nos encontramos en las condiciones de acidez óptimas, una pequeña variación del pH provoca una pérdida notable de la capacidad catalítica de la enzima. Sin embargo, se aprecia un ensanchamiento de las curvas, para ambas lipasas, al disminuirse la fuerza iónica de 400mM a 200mM.

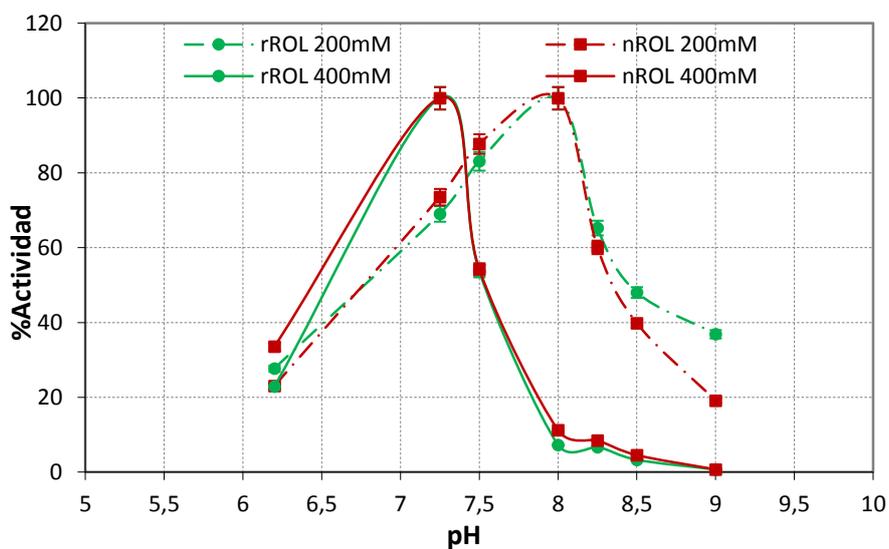


Figura 4.1.8. Efecto del pH en la actividad lipolítica de nROL y rROL a 30°C y concentración de tampón de análisis 200 y 400mM. El valor máximo de actividad para cada condición experimental fue escogido como el 100%.

El valor óptimo de pH varió en ambas enzimas de 8 a 7.25 cuando el tampón utilizado aumentó de 200 a 400mM. Este cambio puede ser explicado por el efecto de la fuerza iónica sobre la conformación tridimensional de la proteína, alterando los equilibrios ácido-base de los aminoácidos que la conforman.

Algunos autores han descrito el valor óptimo de 8 para la lipasa nativa purificada (Ben Salah *et al.*, 1994), así como para la ROL recombinante expresada tanto en *E. coli* como en *P. pastoris*

(Minning *et al.*, 1998). Un valor de 7.5 también fue referenciado para la enzima nativa purificada (Hiol *et al.*, 2000) y el pH de 8.5 fue el valor óptimo encontrado para la lipasa intracelular de *R. oryzae* (Essamri *et al.*, 1998).

En las figuras 4.1.9 A y 4.1.9 B se han representado los valores de actividad específica para nROL y rROL obtenidos para cada pH y para cada concentración de tampón de análisis.

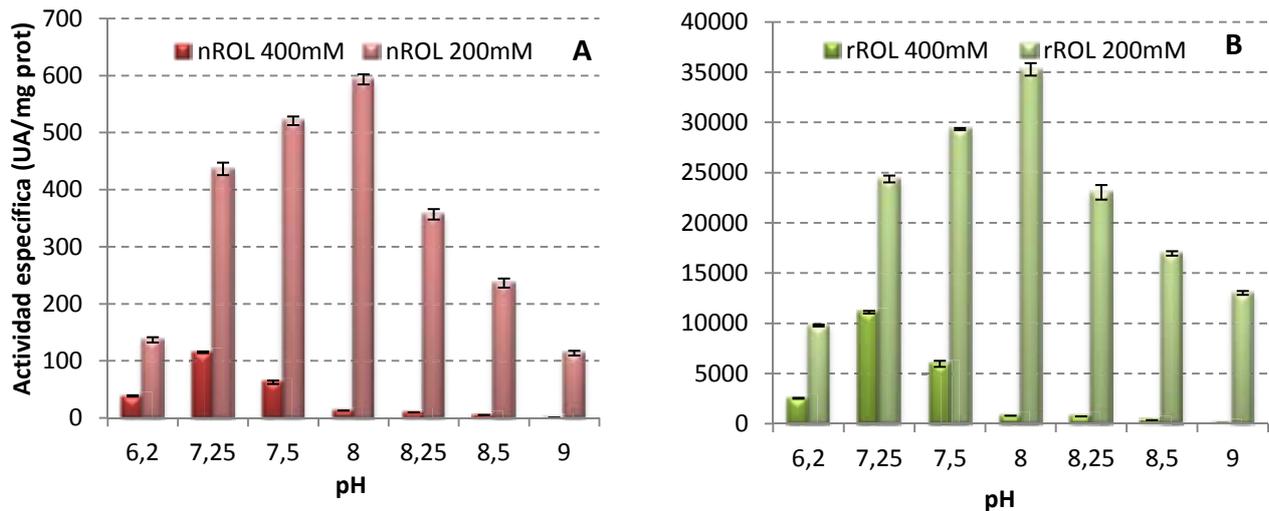


Figura 4.1.9. Actividad específica en función del pH para (A) nROL y (B) rROL a 30°C y concentración de tampón de análisis 200 y 400mM.

En este caso se aprecia, de igual forma que se demuestra en la figura 4.1.7, que rROL presentó valores de actividad específica superiores en gran medida a los presentados por nROL. También se observó que ambas proteínas mostraban valores de actividad específica superiores utilizando el tampón de actividad de 200mM en lugar de 400mM.

Cabe destacar que los incrementos de actividad específica al cambiar de tampón son similares para ambas proteínas, aunque puede apreciarse que el aumento de actividad fue más acusado a pH más elevados. Comparando con los resultados obtenidos en la figura 4.1.7, puede apreciarse que el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad específica es más acusado para una variación de pH que para una variación de temperatura, ya que, manteniendo el pH constante, el incremento de actividad no difiere de modo elevado para el rango de

temperaturas aplicado. Por el contrario, manteniendo la temperatura constante, el incremento de actividad obtenido varía en gran medida en función del pH del medio.

Los valores óptimos de temperatura y pH así como la actividad lipolítica específica de ambos extractos se encuentra en la tabla resumen 4.1.2. Los valores óptimos de temperatura obtenidos fueron determinados manteniendo un valor de pH constante de 7.25, mientras que para la determinación de los pH óptimos, la temperatura fue fijada a 30°C.

Tabla 4.1.2. Valores óptimos de temperatura, pH y actividad específica para rROL y nROL a dos concentraciones de tampón de análisis Tris-HCl.

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

Como se muestra en la tabla anterior, y tal como se había comentado anteriormente, independientemente de la fuerza iónica utilizada, la actividad específica de rROL fue superior a la de nROL, llegando a alcanzar valores cuarenta veces superiores.

4.1.4 Especificidad frente a triacilglicéridos

Los triacilglicéridos son los substratos naturales de las lipasas, con lo que las reacciones de hidrólisis de éstos permiten evaluar la actividad lipásica de la enzima. En la figura 4.1.10 se muestran los resultados obtenidos para nROL y rROL frente a triacilglicéridos naturales de diferente cadena. Dependiendo del triacilglicérido empleado y de la longitud de cadena, se puede determinar la diferencia de especificidad frente a estos sustratos.

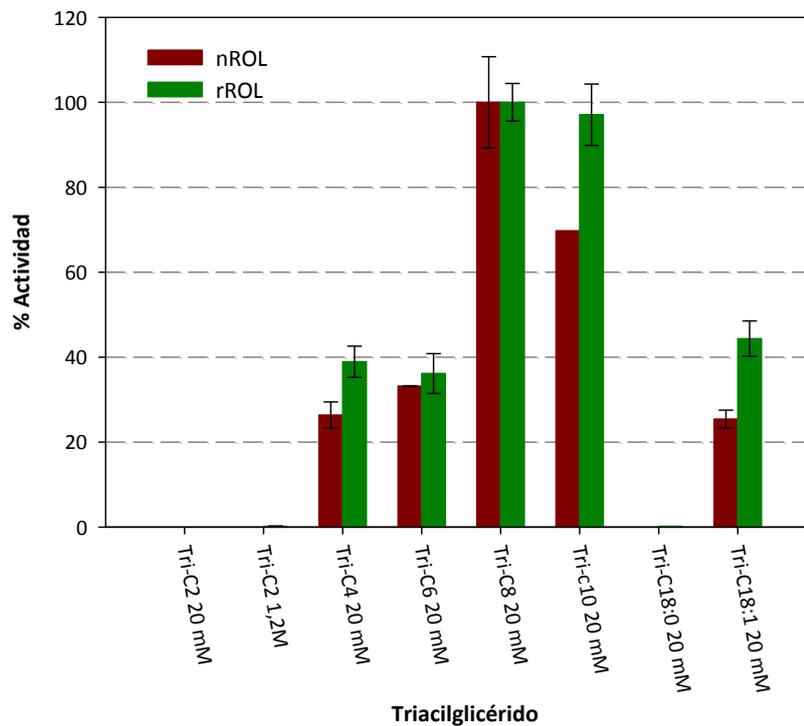


Figura 4.1.10. Porcentaje de actividad frente a triacilglicéridos para nROL y rROL. La máxima actividad para cada enzima fue escogida como el 100%.

El substrato hidrolizado de forma preferente por ambas lipasas fue el Tri-C8, además del Tri-C10 en el caso de rROL. Por otro lado, ni nROL ni rROL mostraron capacidad catalítica frente a Tri-C2 al igual que frente a Tri-C18:0. Las mayores diferencias entre ambos extractos se encontraron al utilizar Tri-C10 y Tri-C18:1, donde la especificidad de rROL frente a estos esteres fue superior en un 20% comparado con nROL. Sin embargo, cabe destacar que, como se aprecia en la gráfica, el comportamiento de ambos productos fue similar.

La especificidad de la ROL nativa purificada frente a estos substratos fue estudiada previamente por otros autores (Hiol *et al.*, 2000), al igual que para la ROL recombinante purificada (Minning *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998), encontrándose una preferencia en todos los casos hacia Tri-C10 y Tri-C8, concordando con los mostrados en este estudio.

4.1.5 Especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol.

Los ésteres de *p*-nitrofenol de diferente longitud de cadena se utilizan habitualmente, de igual forma que los triacilglicéridos, para el análisis de la especificidad lipásica. Al ser ésteres solubles se utilizan básicamente para el estudio de la capacidad esterásica de la enzima.

A continuación, en la figura 4.1.11, se muestran los resultados obtenidos para nROL y rROL.

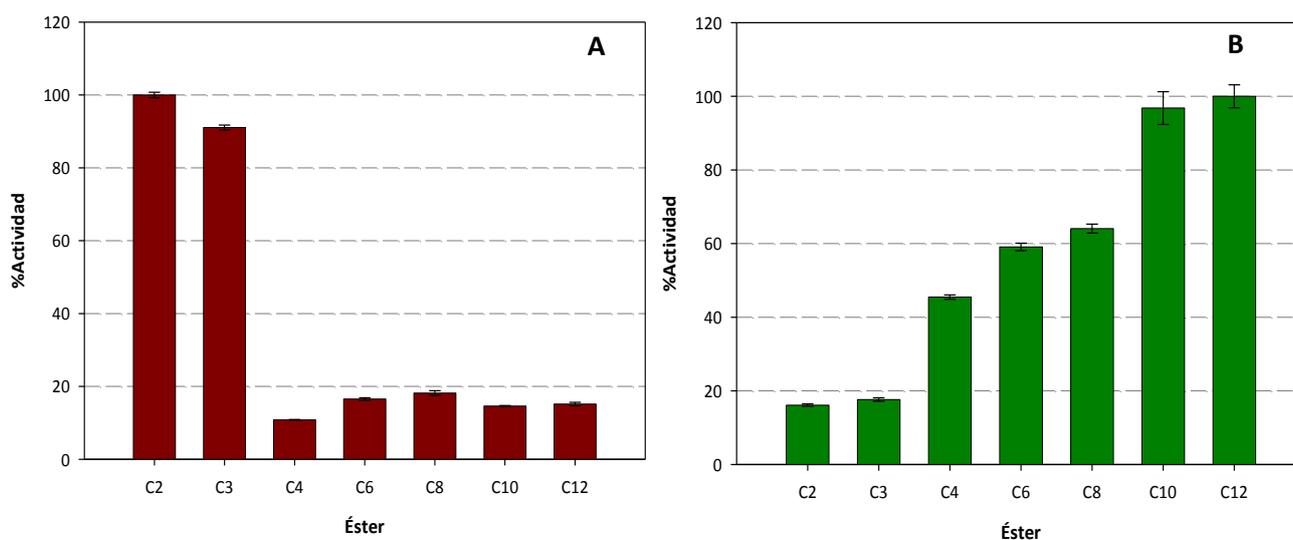


Figura 4.1.11. Porcentaje de actividad frente a ésteres de *p*-nitrofenol para nROL (A) y rROL (B). La máxima actividad para cada enzima fue escogida como el 100%.

Como se observa en la figura anterior, los comportamientos que se obtuvieron frente a diferentes ésteres de *p*-nitrofenol, fueron contrapuestos. nROL hidrolizaba de forma preferente los ésteres de cadena más corta, mientras que rROL mostró una preferencia frente a los de cadena más larga.

En el caso de nROL, para los ésteres de cadena entre C4 y C12 no se alcanzó el 20% de la actividad registrada para C2, el cual fue el componente con el que se observó la mayor velocidad de reacción. En contraste con nROL, el producto recombinante se mostró más activo a medida que se incrementaba el número de carbonos de la cadena del éster. Esta diferencia entre ambos extractos podría ser explicada por la presencia de una esterasa en nROL, como previamente se había sugerido del análisis del zimograma y Western Blot (figura 4.1.1). La actividad de esta esterasa podría explicar la alta especificidad de nROL frente a los ésteres de cadena corta. Con el

fin de comprobar esta hipótesis, se analizaron dos extractos comerciales obtenidos de cultivos de *R. oryzae*: Esterasa-Sigma (Esterasa de *R. oryzae*) y ROL-Sigma (Lipasa de *R. oryzae*). Estos liofilizados se caracterizaron mediante SDS-PAGE, Western Blot y zimograma (Fig 4.1.12) y comparados con nROL y rROL.

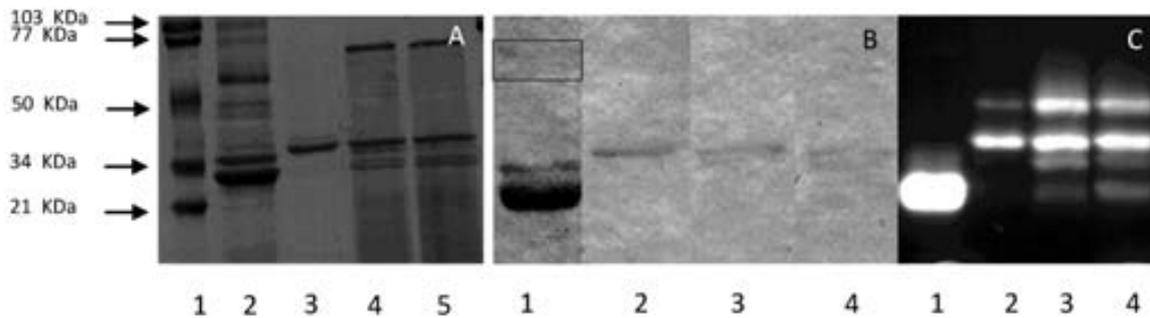


Figura 4.1.12. (A) SDS-PAGE, 1. Marker Bio Rad Low Range 2. rROL 3. ROL-Sigma 4. Esterasa-Sigma 5. nROL. (B) Western Blot 1. rROL 2. ROL-Sigma 3. Esterasa-Sigma 4. nROL. (C) Zimograma 1. rROL 2. ROL-Sigma 3. Esterasa-Sigma 4. nROL.

Los resultados mostraron que Esterasa-Sigma es un extracto crudo, con un patrón prácticamente idéntico al comercializado por AMANO como lipasa de *R. oryzae* (nROL), ya que para los tres análisis realizados se obtuvieron idénticos resultados. Por otro lado ROL-Sigma presentaba un mayor grado de purificación con respecto al resto de extractos comerciales. Es importante remarcar que se detectó la presencia de lipasa en los tres extractos comerciales (figura 4.1.12 B) al igual que la banda con actividad hidrolítica a 40 kDa, la cual correspondería a una esterasa (figura 4.1.12 C).

Estos resultados podrían indicar que nROL y Esterasa-Sigma podrían ser obtenidos por procedimientos muy similares y esto explicaría la presencia tanto de la esterasa como de la lipasa en ambos extractos, de modo que quedaría justificada la alta especificidad de nROL frente a ésteres de *p*-nitrofenol de cadena corta.

Tras estos análisis, se evaluó la especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol para los nuevos productos comerciales y se compararon los resultados con los obtenidos para nROL y rROL (figura 4.1.13).

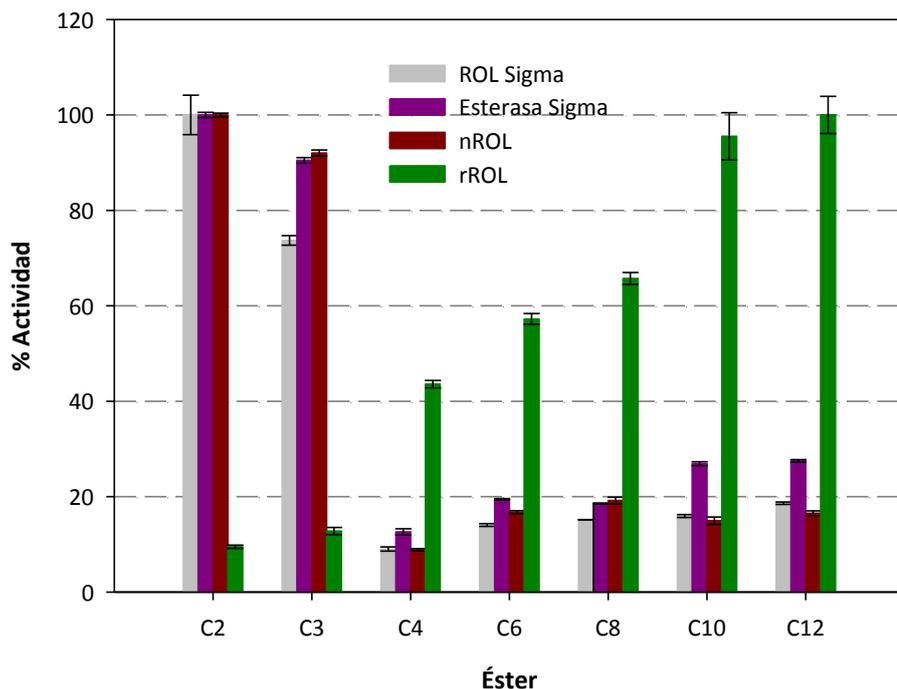


Figura 4.1.13. Porcentaje de actividad frente a ésteres de *p*-nitrofenol para nROL, rROL, Esterasa- Sigma y Lipasa-Sigma. La máxima actividad para cada enzima fue escogida como el 100%.

Como se aprecia en la figura anterior, todos los extractos comerciales mostraron una alta similitud en cuanto a especificidad mientras que rROL mostró una tendencia totalmente opuesta.

Cabe destacar, que no sólo el hecho de la presencia de esterasa en los extractos comerciales puede afectar a la especificidad. Otro factor a tener en cuenta es la diferencia en el N-terminal de las lipasas. Se ha demostrado que modificaciones en esta parte de la secuencia, como la presencia o no de los últimos 28 aminoácidos de la pro-secuencia, afectan a la especificidad de ésteres de *p*-nitrofenol (Takahashi *et al.*, 1999).

Otra hipótesis, que de ser cierta, también podría afectar a la especificidad sería el hecho de diferencias en algunos aminoácidos de la secuencia primaria de las lipasas. Algunos autores han encontrado sustituciones en cuatro posiciones de la secuencia aminoacídica dependiendo de la cepa utilizada para producir la enzima (Ben Salah *et al.*, 2006). Así que, aunque la secuencia entera de ROL clonada en *P. pastoris* es conocida (Minning *et al.*, 1998), el producto comercial podría ser obtenido de una cepa de *R. oryzae* que produce la lipasa con cierta diferencia en la

secuencia aminoacídica comparado con rROL y estas diferencias podrían producir cambios en la afinidad enzimática (Beer *et al.*, 1996; Ben Salah, 2009).

4.1.6 Conclusiones

Tras analizar las propiedades bioquímicas de rROL y nROL, se han determinado diferencias importantes entre ambos extractos.

En primer lugar, la actividad específica expresada como UA·mg proteína total⁻¹ de rROL llegó a alcanzar valores cuarenta veces superiores que nROL.

En cuanto a los ensayos sobre masa molecular, se observó que ambos extractos presentaban bandas de masa molecular alrededor de 34 kDa reconocidas como ROL, siendo este valor ligeramente superior al encontrado en la bibliografía tanto para ROL expresada en *P. pastoris* (Minning *et al.*, 1998) como para la ROL nativa (Hiol *et al.*, 2000). El análisis del N-terminal de rROL reveló que estas bandas poseían la misma secuencia aminoacídica y los ensayos sobre glicosilación no revelaron presencia de azúcares, indicando que la diferencia de masa molecular entre estas isoformas de lipasa podrían deberse a otro tipo de modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, fue detectada en nROL una banda a 40kDa con actividad hidrolítica pero no reconocida como lipasa por el anticuerpo, la cual podría corresponder a una esterasa, ya que de hecho al analizar un extracto comercial de esterasa de *R. oryzae* se obtuvieron los mismos resultados.

Los valores de pI de las formas de lipasa presentes en rROL fueron difíciles de determinar, ya que al realizarse un gel 2D, aparecieron varias isoformas en cada una de las bandas detectadas a 34kDa, estando en unos rangos de pI desde 4.5 a 9 indicando la posibilidad de diferentes grados de fosforilación.

En cuanto a dependencia de actividad con ciertos parámetros como la fuerza iónica, temperatura y pH, se observó que tanto nROL como rROL dependían fuertemente de la concentración de sales del medio, obteniendo la máxima capacidad catalítica a una concentración de tampón de análisis de 200mM. La temperatura óptima para nROL (40°C) no se vio afectada por un cambio en la fuerza iónica mientras que la de rROL varió de 40°C a 30°C al aumentar de 200mM a 400mM el tampón de análisis. En cuanto a pH óptimo (7.25 a 400mM y 8

a 200mM), ambos productos mostraron el mismo comportamiento frente a un cambio de fuerza iónica.

Al analizar la especificidad frente a diferentes triacilglicéridos se observaron comportamientos muy similares en nROL y rROL obteniéndose en ambos casos una mayor velocidad de hidrólisis en el caso de Tri-C8, además de Tri-C10 en el caso de rROL. Sin embargo, al analizarse la especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol se observaron comportamientos totalmente opuestos, prefiriendo rROL los ésteres de cadena larga y nROL los de cadena corta atribuyéndose esta diferencia principalmente a la presencia de esterasa en los preparados comerciales de Amano y Sigma.

4.1.7 Bibliografía.

Beer HD, McCarthy JEG, Bornscheuer UT, Schmid RD, Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1299 (1998) 173-180.

Beer HD, Wohlfahrt G, McCarthy J, Schomburg D, Schmid RD, Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants, 9 (1996) 507-517 (b).

Beer HD, Wohlfahrt G, Schmid RD, McCarthy JEG, The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence, *Biochem. J.* 319 (1996) 351-359. (a).

Ben Salah A, Fendri K, Gargoury Y, La lipase de *Rhizopus oryzae* : production, purification et caractéristiques biochimiques, *Rev. Fr. Corps. Gras.* 5/6 (1994) 133-137.

Ben Salah A, Sayari A, Verger R, Gargouri Y, Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique, *Biochimie.* 83 (2001) 463-469.

Ben Salah R, Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2009) 1375-1384.

Ben Salah R, Mosbah H, Fendri A, Gargouri A, Gargouri Y, Mejdoub H, Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*, *FEMS. Microbiol. Lett.* 260 (2006) 241-248.

Essamri M, Deyris V, Corneau L, Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents, *J. Biotechnol.* 60 (1998) 97-103.

Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, Comeau LC, Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit, *Enzyme. Microb. Tech.* 26 (2000) 421-430.

Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD, Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties, *J. Biotechnol.* 66 (1998) 147-156.

Resina D, Serrano A, Valero F, Ferrer P, Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter, *J. Biotechnol.* 109 (2004) 103-113.

Sayari A, Frikha F, Miled N, Mtibaa H, Ali YB, Verger Y, Gargouri Y, N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties, FEBS. Lett. 579 (2005) 976-982.

Takahashi S, Ueda M, Atomi H, Beer HD, Bornscheuer UT, Schmid RD, Tanaka A, Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Ferment. Bioeng. 86 (1998) 164-168.

Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Microbiol. Biot. 52 (1999) 534-540.

Uyttenbroeck W, Hendriks D, Vriend G, Baere ID, Moens L, Scharpe S, Molecular characterization of an extracellular acid-resistant lipase produced by *Rhizopus javanicus*, Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 374(1993) 245-254.

www.expasy.org



4.2 Estudios de inmovilización y estabilidad de rROL y nROL

4.2 Estudios de inmovilización y estabilidad de rROL y nROL

Con la finalidad de aplicar las enzimas en procesos de interés industrial, es necesaria la recuperación de la proteína de forma activa tras el fin de un proceso discontinuo o de retenerla durante un proceso continuo. Esto es posible mediante la inmovilización enzimática sobre soportes inertes. Es por ello que en este capítulo se fija como objetivo el estudio de la inmovilización de nROL y rROL mediante adsorción y enlace covalente, sobre soportes de diferente naturaleza, como son el polipropileno (EP100) y un polímero derivado de la metacrilamida (Eupergit®C), con el fin de fijar una relación proteína:suporte que proporcione una actividad por miligramo de polímero óptima. Tras estudiar los procesos de inmovilización se analizará un factor clave en la aplicación de estos derivados inmovilizados: la estabilidad. En este capítulo las estabilidades se comprobarán mediante un test hidrolítico y los resultados de los derivados inmovilizados se compararán con los obtenidos para las enzimas en solución.

Tras obtener los valores óptimos de relación proteína:suporte para los derivados inmovilizados de rROL se realizarán stocks de estos biocatalizadores para su posterior aplicación en reacciones de interés industrial (Capítulo 4.3). Desafortunadamente, el soporte Eupergit®C (150 μm) fue retirado del mercado previamente a los estudios de reacciones, de modo que fue sustituido por Eupergit®CM (50 - 300 μm). Éste soporte presenta idéntica composición química que Eupergit®C pero diferente tamaño de partícula de modo que se realizó un nuevo estudio de inmovilización de rROL para encontrar la relación proteína:suporte óptima.

4.2.1. Inmovilización en EP100

Como es sabido, la cantidad de proteína adsorbida sobre un soporte depende del área superficial de éste, del número de sitios disponibles para la adsorción de la proteína así como del tamaño de ésta (Gitlesen *et al.*, 1997). Por lo tanto es importante analizar las propiedades de los soportes utilizados en los procesos de inmovilización. El EP100, utilizado como soporte hidrofóbico para inmovilizar las lipasas por adsorción, se presenta en forma de polvo que contiene partículas de tamaño menor a 200 μm y una área superficial específica de $91.4 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ determinado mediante el método de área superficial B.E.T. (Brunauer, Emmett and Teller) (Capellas *et al.*, 1996).

El estudio de la inmovilización de enzima en EP100 se llevó a cabo tanto para nROL como para rROL.

En el caso de nROL, tanto el porcentaje de inmovilización como el porcentaje de proteína inmovilizada siguieron un comportamiento teórico ya que estos parámetros disminuyeron a medida que se aumentaba la carga proteica ofrecida al soporte (Figura 4.2.1). Sin embargo, el porcentaje de actividad retenida presentó dos tendencias diferenciadas. En la primera, el porcentaje de actividad retenida era inferior al porcentaje de inmovilización hasta un valor de carga de $461 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$. Además, éste se vio incrementado a medida que la carga enzimática inicial aumentó hasta llegar a cargas iniciales de $277.7 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esto indica que no existen problemas de difusión, ya que de ser así, al aumentar la carga enzimática debería reducirse el porcentaje de actividad retenida en el soporte, cosa que no ocurre en este rango de cargas iniciales. El incremento de actividad obtenido podría explicarse debido a que a cargas bajas la lipasa tiene disponible una gran superficie para adsorberse, de manera que puede producirse una tendencia a maximizar el área de contacto con la superficie del soporte, provocando una pérdida de la configuración proteica que otorga una actividad óptima (Bosley *et al.*, 1997). Este hecho explicaría una disminución de la actividad y la eficiencia, y por tanto valores inferiores a los del porcentaje de inmovilización. A medida que se aumenta la relación proteína: soporte este efecto disminuye, ya que cada vez hay disponible menos superficie de interacción entre la lipasa y el soporte.

En la segunda tendencia, a partir de $461 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$, el porcentaje de actividad retenida fue superior al porcentaje inmovilizado, indicando este hecho una posible hiperactivación de la enzima, lo que queda plasmado en los valores de actividad total ya que alcanzan valores

superiores al 100%. Los efectos de hiperactivación de lipasas al inmovilizarse por adsorción sobre soportes de diferente naturaleza, como la octil-agarosa, ya fueron vistos por otros autores. (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998). Por otro lado, la tendencia creciente del porcentaje de actividad retenida desaparece, debido posiblemente a un efecto de limitaciones difusionales. Por lo tanto, según estos resultados, la relación proteína:soporte óptima fue de 5.16 mg de proteína ofrecida por cada 100 mg de soporte.

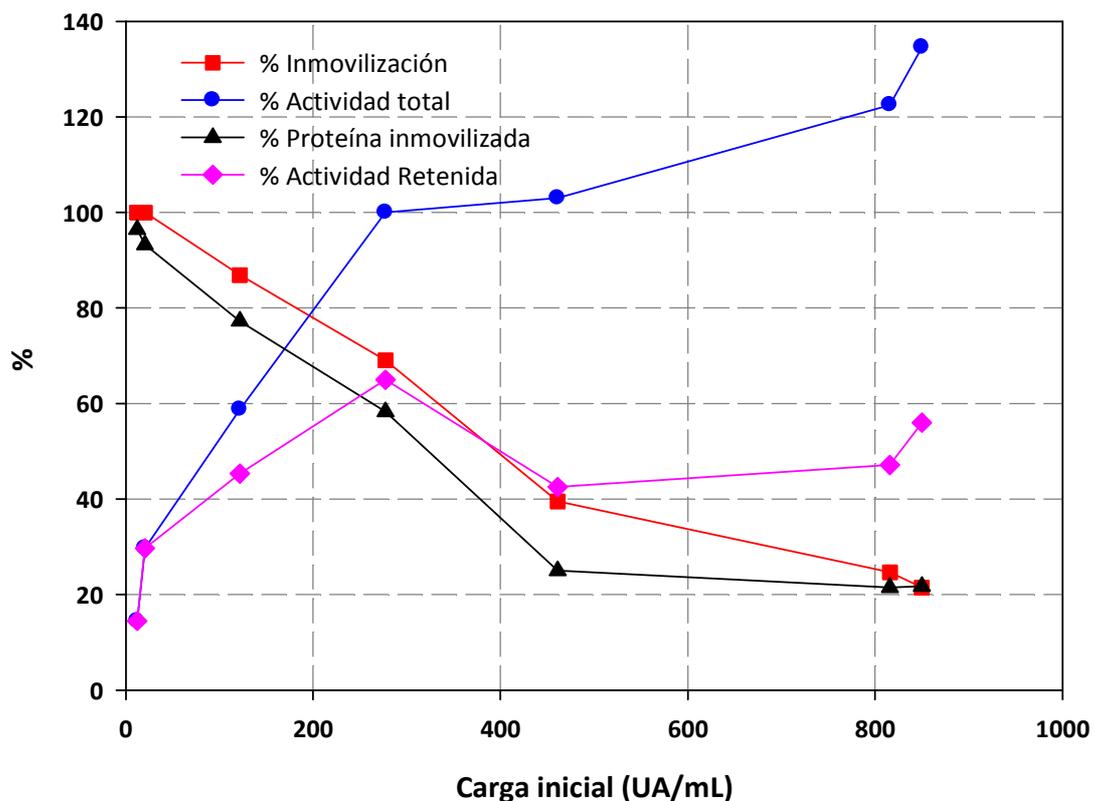
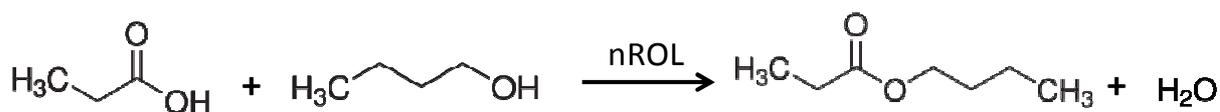


Figura 4.2.1 Porcentajes de inmovilización de nROL en EP100

Con el objetivo de confirmar la validez de los valores obtenidos de porcentaje de actividad retenida, los cuales no seguían un comportamiento teórico, se llevaron a cabo diferentes ensayos en una reacción en medio orgánico (ciclohexano), la síntesis de propionato de butilo (esquema 4.2.1), utilizando los derivados inmovilizados de nROL que mostraron una clara tendencia de incremento de porcentaje de actividad retenida al aumentar la carga enzimática.



Esquema 4.2.1. Reacción de síntesis de propionato de butilo catalizada por nROL inmovilizada

Se seleccionaron las cargas iniciales de 20.41 (exp 1), 121.9 (exp 2) y 277.7 UA·mL⁻¹ (exp 3). Los valores de velocidad inicial obtenidos se encuentran en la tabla 4.2.1 mientras que las relaciones calculadas se encuentran en la tabla 4.2.2. En la figura 4.2.2 se han representado las evoluciones de las reacciones.

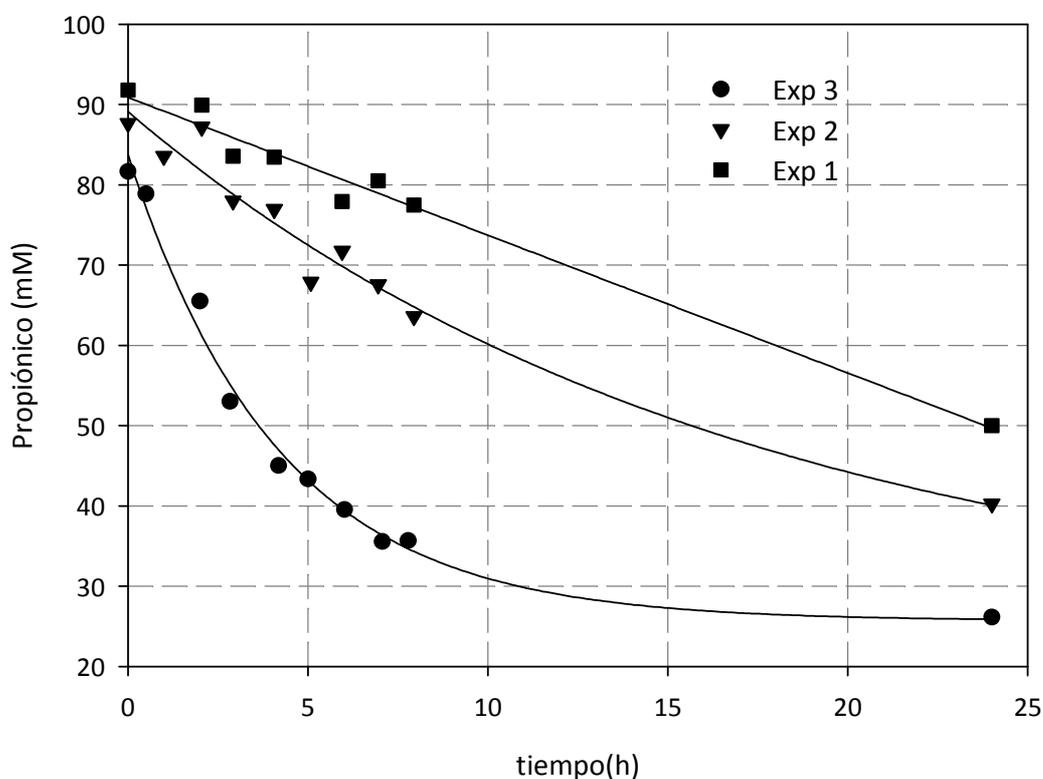


Figura 4.2.2 Evolución de la concentración de ácido propiónico en las reacciones de síntesis de propionato de butilo catalizadas por nROL inmovilizada en EP100. La reacción se realizó a 40°C, 200 rpm y 100mM de ácido propiónico y butanol.

Tabla 4.2.1. Velocidades iniciales de síntesis de propionato de butilo en ciclohexano utilizando nROL inmovilizada en EP100.

Exp	Carga inicial a inmovilizar (UA)	Actividad inmovilizada según ecuación (3.1) (UA)	Actividad retenida según ecuación (3.4) (UA)	Velocidad inicial de síntesis (mM/h·mg soporte)
1	204.1	204.1	60.55	0.049
2	1219	1055	552	0.21
3	2777	1916	1921	1.21

Tabla 4.2.2. Relaciones de los resultados obtenidos en las reacciones de síntesis de butil propionato en ciclohexano utilizando nROL inmovilizada en EP100.

Ratio experimentos	Relación de velocidades iniciales de síntesis	Relación de inmovilización según ecuación (3.1)	Relación de actividad retenida según ecuación (3.4)
3/2	5.76	1.8	3.48
3/1	24.69	9.38	31.72

Como se observa en la tabla anterior, las relaciones que mostraron mayor similitud con las de velocidad inicial de la reacción de síntesis fueron las relaciones calculadas según la actividad retenida obtenida según la ecuación 3.4. Por tanto se corroboran los resultados obtenidos en los experimentos de inmovilización para cargas bajas, indicando un aumento de la actividad retenida sobre el soporte al aumentar la carga enzimática tanto para reacciones de hidrólisis como para síntesis.

En la figura 4.2.3 se muestran los datos obtenidos durante las inmovilizaciones de rROL sobre EP100.

Como ocurría con nROL, tanto el porcentaje de inmovilización como el porcentaje de proteína inmovilizada siguieron el comportamiento teórico esperado ya que estos disminuían al aumentar la carga. Sin embargo, el porcentaje de actividad retenida alcanzó valores similares a bajas cargas y se incrementó de forma muy acusada para valores de carga superiores a 2000 UA·mL⁻¹, llegando a alcanzar valores superiores a los del porcentaje de inmovilización.

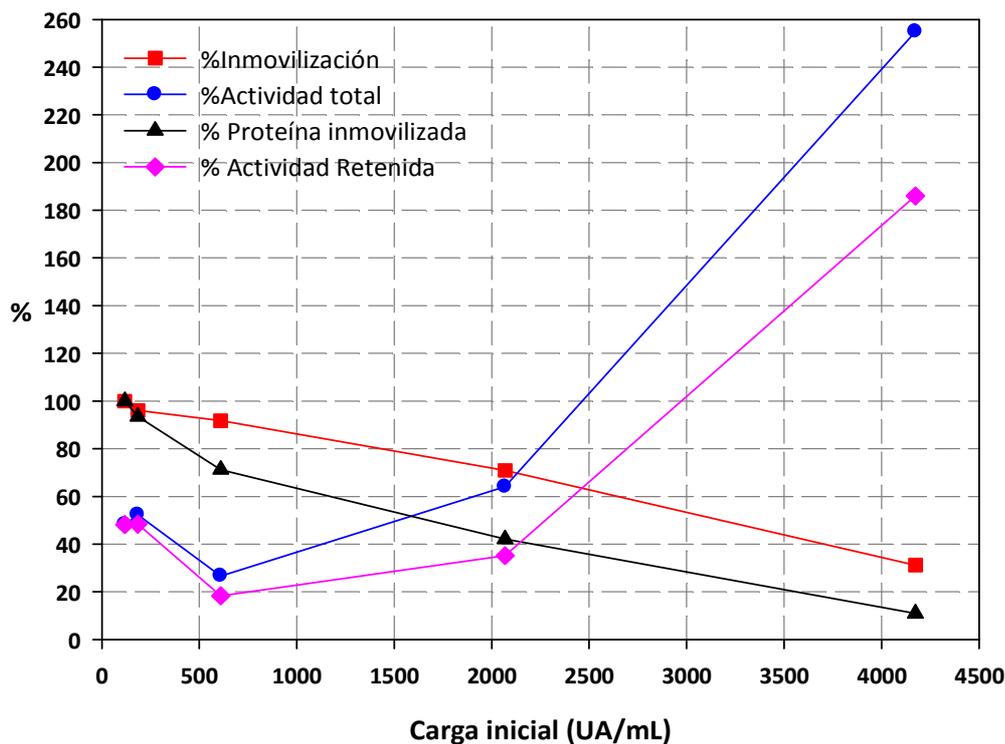


Figura 4.2.3. Porcentajes de inmovilización de rROL en EP100

El incremento observado puede deberse, como ya se comentó para nROL, a una reducción del área disponible para las enzimas disminuyendo la pérdida de conformación (Bosley *et al.*, 1997) y a una hiperactivación de las lipasas adsorbidas, como queda patente en los valores de porcentaje de actividad total, los cuales alcanzan valores superiores al 100%. A partir de estos resultados se obtuvo una relación óptima de 8.6 mg de proteína ofrecida por cada 100 mg de soporte.

4.2.2. Estudio de los equilibrios de adsorción de las lipasas sobre EP100

Existen muchas ecuaciones en la bibliografía para describir matemáticamente los equilibrios de adsorción, que parten de consideraciones tanto experimentales como teóricas. Una de las más antiguas y sencillas es la de Langmuir, que supone una serie de condiciones ideales: la no existencia de interacciones entre las moléculas adsorbidas, las superficies son lisas y tienen capacidad de adsorción uniforme y solamente se forma una capa monomolecular de adsorbato.

La ecuación de Langmuir presenta la siguiente expresión matemática, ya descrita en el apartado 3.13:

$$C_S = \frac{A_{MAX} \cdot C_L}{K_L + C_L} \quad (4.2.1)$$

Donde:

C_S = Actividad lipásica o proteína total adsorbida sobre el soporte en el equilibrio (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mg soporte}^{-1}$)

C_L = Actividad lipásica o proteína total en solución en el equilibrio (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mL}^{-1}$)

A_{MAX} = Máxima actividad lipásica o proteína total adsorbida en el soporte (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mg soporte}^{-1}$)

K_L = Constante de Langmuir (UA o $\mu\text{g prot.}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Las isotermas de adsorción de proteínas globulares, como las lipasas, pueden ser normalmente ajustadas a esta ecuación (Kim *et al.*, 1994; Gitlesen *et al.*, 1997). Es por ello que la isoterma de adsorción de Langmuir fue escogida para ajustar los datos experimentales de equilibrios de adsorción de rROL y nROL sobre polipropileno.

Las isotermas de adsorción, tanto de nROL como de rROL sobre EP100, fueron determinadas tanto para la actividad como para la proteína y los resultados están representados en la figura 4.2.4.

Los resultados muestran un buen ajuste sugiriendo que tan sólo se forma una monocapa, en este rango de cargas, durante la adsorción, como ocurre en el caso de otras lipasas de *Candida rugosa*, *Humicola lanuginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (López *et al.*, 2002; Gitlesen *et al.*, 1997).

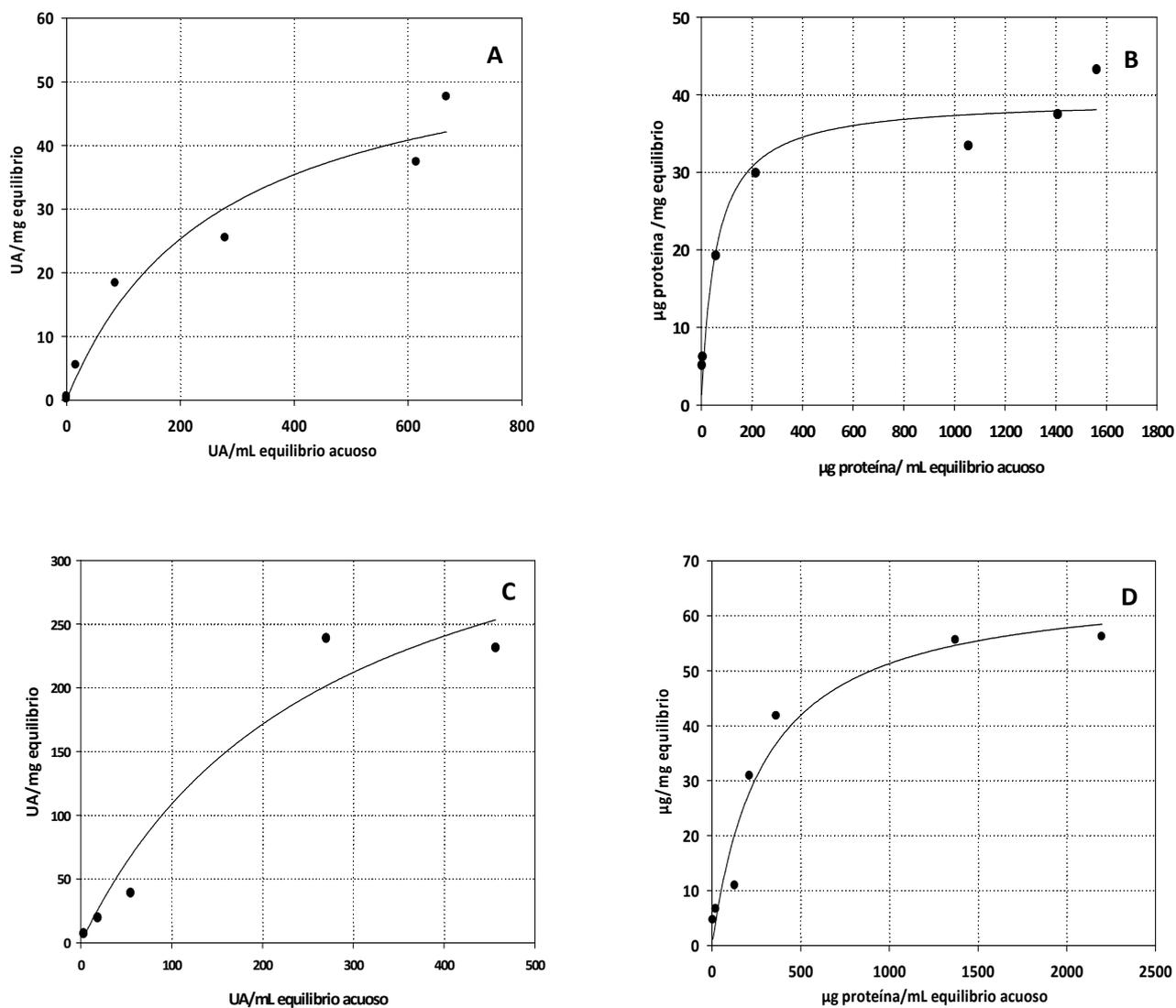


Figura 4.2.4. Isotermas de Langmuir para la adsorción sobre EP100 de nROL para actividad (A) y proteína (B) y de rROL para actividad (C) y proteína (D)

Los valores de A_{MAX} y K_L determinados se muestran en la tabla 4.2.3

Tabla 4.2.3. Valores de A_{MAX} y K_L para las isotermas de Langmuir de rROL y nROL inmovilizadas en EP100.

	rROL	nROL
A_{MAX} (AU/mg)	403.3 ± 149.2	58.8 ± 11.14
K_L (AU/mL)	270.5 ± 119.95	264.5 ± 134.02
A_{MAX} ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	66.2 ± 6.40	39.5 ± 2.52
K_L ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	289.9 ± 89.43	57.1 ± 21.92

En términos de saturación proteica, los valores de A_{MAX} de rROL fueron 1.6 veces superiores a los de nROL. Esta diferencia observada entre ambos preparados podría ser explicada debida a una diferencia en la composición de proteínas de cada liofilizado. La afinidad en términos de cantidad de proteína entre rROL y EP100 fue muy inferior comparados con los de nROL, como indican los valores de K_L .

Por otro lado, en términos de actividad lipolítica, tanto nROL como rROL mostraron una afinidad muy similar por el soporte como indica la similitud en los valores de K_L obtenidos (270.5 y 264.5 UA·mL⁻¹). Sin embargo, los valores de saturación de rROL fueron 6.85 veces superiores. Este hecho indica que el límite de actividad que puede quedar adsorbido sobre polipropileno es superior para la rROL, producida por *P. pastoris*. Cabe destacar que nROL presenta una esterasa juntamente con la lipasa mientras que el producto recombinante sólo posee lipasa, siendo exclusivamente la lipasa de *R. oryzae* ya que *P. pastoris* no expresa ninguna lipasa extracelular. Por lo tanto estas diferencias en A_{MAX} pueden deberse a que, en el caso de nROL, la esterasa u otras proteínas de naturaleza hidrofóbica compiten con la lipasa por el soporte.

Cabe destacar que, en el caso de nROL, pudo apreciarse en altas cargas una cierta tendencia a una adsorción multicapa, como describen las isothermas de BET. Sin embargo, los ajustes obtenidos aplicando esta ecuación no mejoraron con respecto los de Langmuir. No fue posible realizar experimentos a cargas más altas para comprobar si efectivamente había una adsorción multicapa, ya que se sobrepasaba el límite de solubilidad del preparado inicial en agua.

Otro aspecto interesante a estudiar es la actividad específica alcanzada por las lipasas adsorbidas, expresada como $UA_{inmovilizada} \cdot mg \text{ proteína}_{inmovilizada}$, y como este valor difiere de la actividad específica en solución (Tabla 4.2.4).

Tabla 4.2.4. Valores actividad específica de rROL y nROL en solución e inmovilizadas en EP100.

Lipasa	Actividad específica en solución (UA/mg prot.)	Actividad específica en soporte (UA _{inmovilizada} /mg prot. inmovilizada)
nROL	452	1490
rROL	4533	6096

Las actividades específicas que pueden llegar a alcanzarse por las proteínas adsorbidas, tanto en el caso de nROL como rROL, fue superior a las que presentaban en solución. Aunque este hecho se apreció con ambos preparados, nROL mostró un incremento mayor que rROL aunque ésta última presenta actividades específicas superiores tanto en solución como inmovilizada.

4.2.3. Inmovilización en Eupergit®C

Como en el caso de EP100, tanto nROL como rROL se inmovilizaron en Eupergit®C variando la carga inicial enzimática. Los resultados de nROL (figura 4.2.5) mostraron una tendencia decreciente tanto de porcentaje de inmovilización como porcentaje de proteína inmovilizada. Este comportamiento fue el predicho teóricamente al aumentar la carga enzimática. Cabe destacar que los valores obtenidos para dichos porcentajes fueron muy inferiores a los obtenidos utilizando EP100 y la disminución de estos valores fue mucho más suave que en el caso de usar el anterior soporte. Sorprendentemente, en todos los ensayos realizados, los porcentajes de actividad retenida fueron superiores a los porcentajes de inmovilización, hecho que indica una hiperactivación de la enzima inmovilizada en Eupergit®C, como queda patente en los valores obtenidos superiores al 100% de porcentaje de actividad total. Cabe destacar que esta hiperactivación fue superior a la obtenida con EP100.

Por otro lado se observó un incremento del porcentaje de actividad retenida hasta llegar a valores de carga inicial de $400 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ a partir del cual comienza a decrecer, probablemente debido a problemas difusionales. El hecho de que los valores de este porcentaje aumenten al incrementar la carga hasta llegar a $400 \text{ UA}\cdot\text{mL}^{-1}$ iniciales puede deberse a una relación elevada de enzima: polímero, de manera que se crean múltiples enlaces covalentes entre la proteína y el soporte y un exceso de estas uniones podrían perturbar la estructura globular de las enzimas y por tanto afectar a la actividad de éstas (Hernaiz *et al.*, 2000). Por tanto, la relación óptima obtenida para la inmovilización de nROL en Eupergit®C fue de 5.99 mg de proteína ofrecida por cada 100 mg de soporte.

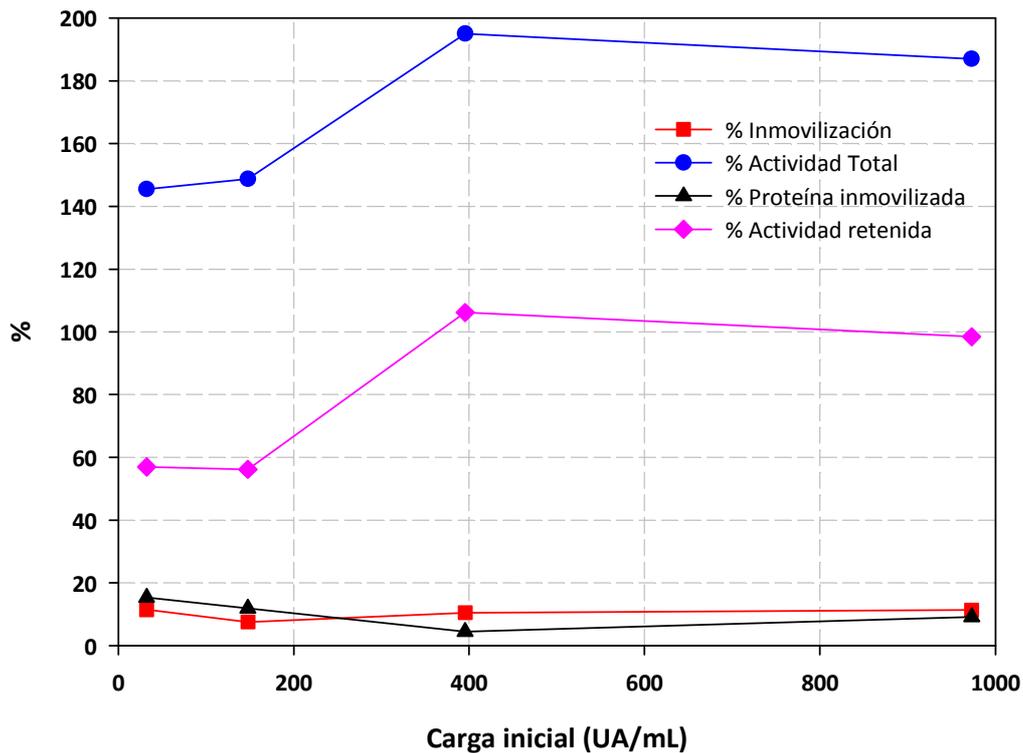


Figura 4.2.5. Porcentajes de inmovilización de nROL en Eupergit®C

En la figura 4.2.6 se muestran los resultados de rROL y puede apreciarse que, como en el caso de nROL, tanto el porcentaje de inmovilización como el de proteína inmovilizada disminuyen al aumentar la relación enzima: soporte y que ambos alcanzan valores inferiores a los obtenidos haciendo uso del EP100. También fue evidente una elevada hiperactivación enzimática y que este efecto fue incrementado hasta ofrecer una carga de $450 \text{ UA} \cdot \text{mL}^{-1}$, a partir de la cual disminuye. Para cargas superiores, el porcentaje de actividad retenida comenzó a disminuir. Este cambio de la tendencia de porcentaje de actividad retenido puede deberse a las mismas causas mencionadas en el caso de nROL. Probablemente existe un valor óptimo de carga proteína:soporte que proporciona la mejor conformación terciaria posible para las propiedades catalíticas de la enzima y por debajo de este ratio un exceso de enlaces podría afectar negativamente a la enzima. Por encima de este ratio el porcentaje de actividad retenido disminuye, probablemente debido a la aparición de problemas difusionales.

Tras analizar los resultados, la relación óptima obtenida para la inmovilización de rROL en Eupergit®C se estimó en 0.95 mg de proteína ofrecida por cada 100 mg de soporte.

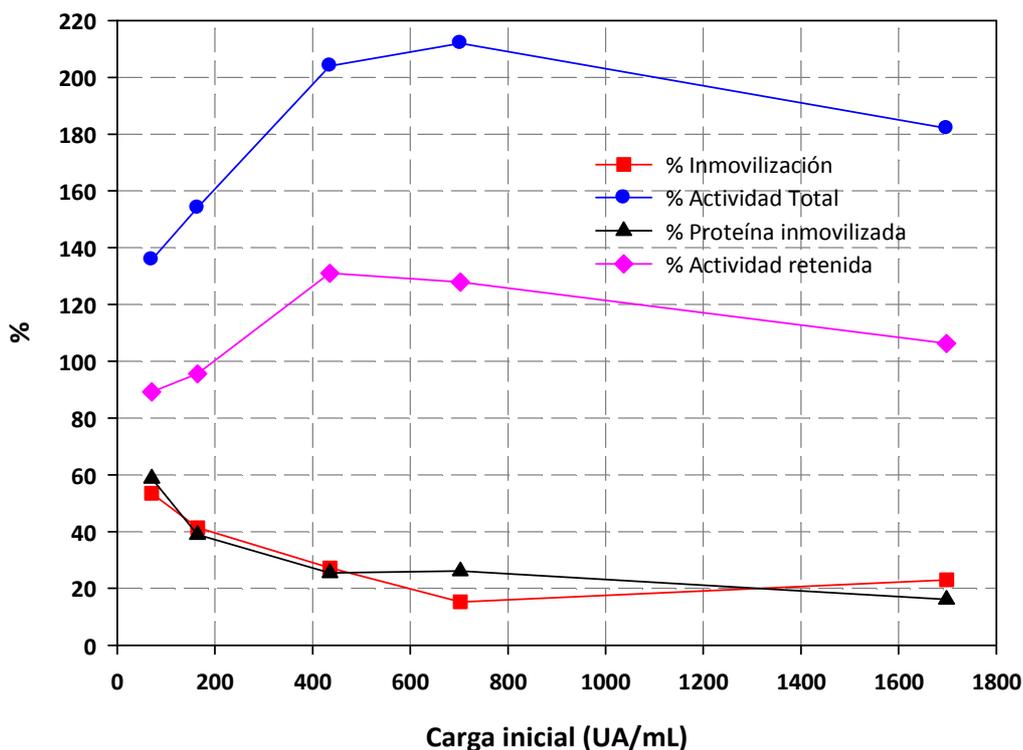


Figura 4.2.6. Porcentajes de inmovilización de rROL en Eupergit®C

4.2.4. Estabilidad frente a pH y temperatura de la lipasa en solución e inmovilizada

La estabilidad enzimática puede definirse como el grado en el que una enzima conserva su conformación estructural o su actividad cuando está sometida durante un determinado periodo de tiempo a unas determinadas condiciones: almacenaje, aislamiento, manipulaciones físicas o químicas, de purificación, presencia de enzimas proteolíticas, calor, pH, etc. En el presente trabajo se estudió la influencia del pH y la temperatura sobre la estabilidad lipásica en solución. Conocer su dependencia con el tiempo en función de los factores externos es de vital importancia para determinar las condiciones óptimas de trabajo, puesto que éstas no tienen por qué coincidir con las de máxima actividad. Podría ocurrir que los valores de pH y temperatura para las cuales se obtiene una mayor actividad provoquen una pérdida muy acusada de la capacidad catalítica del enzima a lo largo del tiempo. Esto daría lugar a que este valor de velocidad de reacción, aún siendo elevado, no compensaría debido a su corta duración. Por tanto, las condiciones de trabajo escogidas deben ser una solución de compromiso que permita mantener una elevada actividad durante el mayor tiempo posible. Cabe destacar que

normalmente las enzimas mejoran su estabilidad tras ser inmovilizadas (Mozhaev *et al.*, 1990; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Al-Duri *et al.*, 2001, Ghangui *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009). Es por esto que también se estudió la estabilidad de nROL y rROL inmovilizadas en EP100 y Eupergit®C frente a la temperatura y pH y se comparó con la estabilidad de las enzimas en solución.

Para llevar a cabo el estudio de estabilidad se realizó un diseño de experimentos de tipo Box-Hunter, ya descrito en el apartado 3.15. En primero lugar, se escogieron los rangos de temperatura y pH. Estos fueron fijados alrededor de los valores óptimos de actividad en solución, obtenidos utilizando un tampón de análisis de concentración 200mM, siendo estos 40°C y pH 8, tanto para nROL y rROL . Por lo tanto, el rango de temperatura escogido fue de 25-45°C mientras que el de pH se fijó entre 7.25-9. Tras fijar los límites de las variables, se obtuvo el diseño de experimentos esquematizado en la figura 4.2.7.

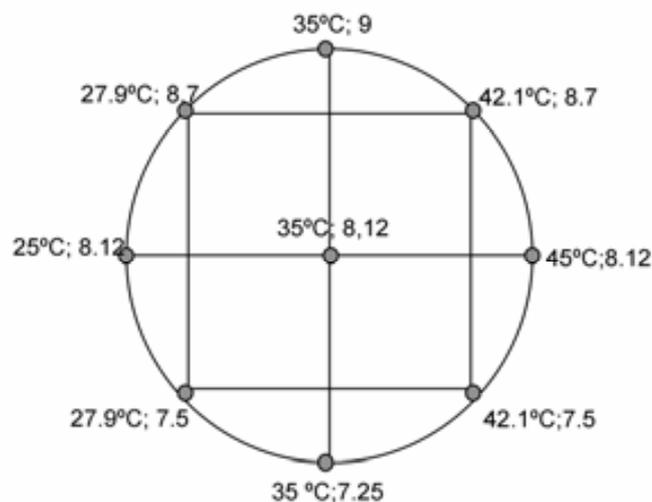


Figura 4.2.7. Diagrama del diseño de experimentos para el estudio de estabilidad de nROL y rROL en solución e inmovilizadas.

Los valores obtenidos en los experimentos de determinación de actividad residual de nROL y rROL, siguiendo el diseño 4.2.7, se muestran en las tablas 4.2.5 y 4.2.6.

Tabla 4.2.5. Porcentajes de actividad residual obtenidos para nROL en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

Temperatura (°C)	pH	% Actividad residual en solución	% Actividad residual en EP100	% Actividad residual en Eupergit®C
25	8.12	95	94.74	100
45	8.12	0	7.86	7.62
35	9.0	66	63.45	23.17
35	7.25	75	78.87	68.46
42.1	8.7	3	8.62	8.51
42.1	7.5	57	65.88	37.21
27.9	8.7	79	89.03	66.70
27.9	7.5	89	94.89	85.91
35	8.12	75	87.59	33.09
35	8.12	81	77.17	43.28
35	8.12	77	92.66	45.08
35	8.12	85	99.77	41.43

Tabla 4.2.6. Porcentajes de actividad residual obtenidos para rROL en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

Temperatura (°C)	pH	% Actividad residual en solución	% Actividad residual en EP100	% Actividad residual en Eupergit®C
25	8.12	91	094.65	100.00
45	8.12	0.5	1.79	2.06
35	9	0.2	1.31	10.59
35	7.25	59	63.21	69.45
42.1	8.7	0.5	3.17	1.77
42.1	7.5	0.1	11.01	16.40
27.9	8.7	33	38.43	46.65
27.9	7.5	74	89.1	98.36
35	8.12	11	35.05	37.88
35	8.12	11	38.21	42.04
35	8.12	10	33.54	40.71
35	8.12	10	37.19	37.88

Los valores de actividad residual obtenidos frente a temperatura y pH fueron ajustados al modelo empírico siguiente:

$$\% \text{ Actividad residual} = a + b \cdot T + c \cdot pH + d \cdot T^2 + e \cdot pH^2 + f \cdot T \cdot pH \quad (4.2.2)$$

Este modelo ya ha sido utilizado previamente para describir la estabilidad de otras lipasas frente a temperatura y pH (López *et al.*, 2004)

Las superficies de respuesta obtenidas tanto para nROL y rROL se muestran en las figuras 4.2.8 y 4.2.9 mientras que los valores obtenidos para los parámetros se encuentran en la tabla 4.2.7.

A continuación se detallan las ecuaciones obtenidas para nROL en solución e inmovilizada.

$$\% \text{ Actividad residual de nROL en solución} = 79.5 - 30.3 \cdot T - 9.6 \cdot pH - 16.6 \cdot T^2 - 11 \cdot T \cdot pH \quad R^2 = 0.955 \quad R_{aj}^2 = 0.918$$

(4.2.3)

$$\% \text{ Actividad residual de nROL en EP100} = 84 - 27 \cdot T - 10 \cdot pH - 17 \cdot T^2 - 12 \cdot T \cdot pH \quad R^2 = 0.952 \quad R_{aj}^2 = 0.912$$

(4.2.4)

$$\% \text{ Actividad residual de nROL en Eupergit}^{\circ} C = 29 - 20 \cdot T - 9.5 \cdot pH \quad R^2 = 0.965 \quad R_{aj}^2 = 0.936 \quad (4.2.5)$$

Primeramente, es de destacar que no se muestra un efecto significativo del término cuadrático de pH en ninguna de las superficies de respuesta obtenidas, a diferencia del término cuadrático de temperatura, el cual tiene un efecto significativo en la estabilidad tanto en solución como inmovilizada en EP100. Por otro lado, si se comparan los términos lineales de temperatura y pH, se observa que los que acompañan a la variable T son más elevados que los de pH , demostrándose un efecto mayor de la temperatura sobre la estabilidad. El término de interacción $T \cdot pH$ sólo fue significativo para el porcentaje residual de estabilidad en solución e inmovilizada en EP100, obteniéndose valores similares en ambos casos.

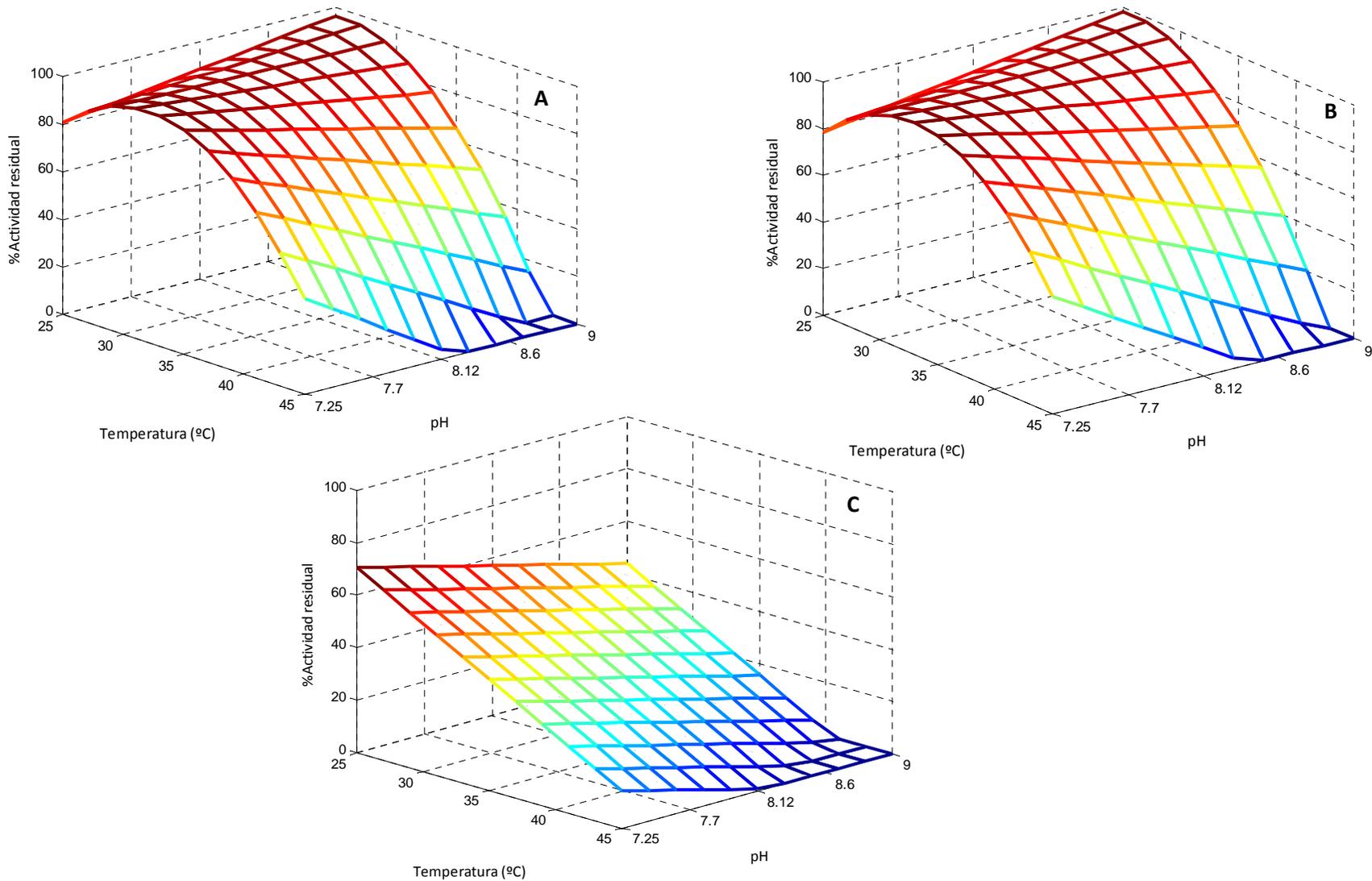


Figura 4.2.8. Superficies de respuesta para la estabilidad de nROL en solución (A) inmovilizada en EP100 (B) e inmovilizada en Eupergit®C en Tris-HCl 200mM durante 1h.

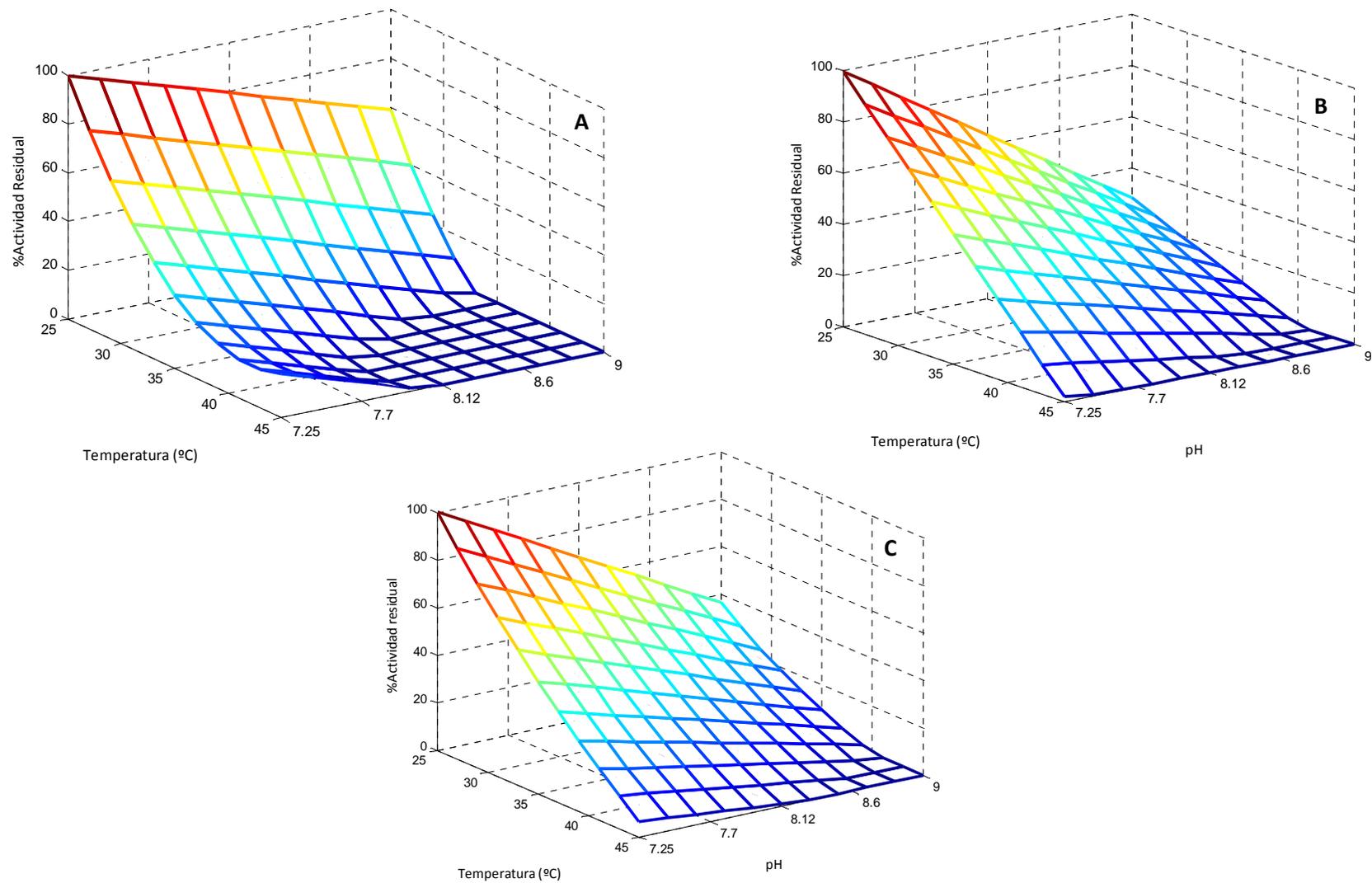


Figura 4.2.9. Superficies de respuesta para la estabilidad de rROL en solución (A) inmovilizada EP100 (B) e inmovilizada en Eupergit®C en Tris-HCl 200mM durante 1h.

Tabla 4.2.7. Parámetros de las ecuaciones empíricas obtenidas para las superficies de respuesta de la estabilidad de rROL y nROL en solución e inmovilizadas.

Lipasa	a	p _{value}	b	p _{value}	c	p _{value}	d	p _{value}	e	p _{value}	f	p _{value}
rROL en solución	9.7	0.0457	-29.3	0.0001	-14.5	0.0035	14.5	0.0069	6.6*	0.1157	10*	0.0693
rROL en EP100	30	<0.0001	-24	<0.0001	-14.6	0.0005	3.8*	0.1726	-2.9*	0.2775	7.6	0.0475
rROL en Eupergit®C	28.3	<0.0001	24	<0.0001	13.4	<0.0001	3.2	0.0391	-0.72*	0.5793	6.6	0.0053
nROL en solución	79.5	<0.0001	-30.3	<0.0001	-9.6	0.0231	-16.6	0.0035	-5*	0.2095	-11	0.0495
nROL en EP100	84	<0.0001	-27	0.0001	-10	0.0188	-17	0.0028	-7.8*	0.0699	-12	0.0342
nROL en Eupergit®C	29	<0.0001	-20	<0.0001	-9.5	0.0016	3.6*	0.1180	0.85*	0.6827	-1.6*	0.5372

*parámetro no significativo ($p>0.05$)

Por otro lado, observando la figura 4.2.8 puede apreciarse que la estabilidad de nROL prácticamente no se vio modificada al ser inmovilizada en EP100. Sin embargo, al inmovilizarse en Eupergit®C se aprecia una disminución de la actividad residual, como ya han observado otros autores utilizando otro tipo de procedimientos de inmovilización (Mateo *et al.*, 2007).

En cuanto a los resultados de rROL, a continuación se muestran las ecuaciones obtenidas.

$$\% \text{Actividad residual de rROL en solución} = 9.7 - 29.3 \cdot T - 14.5 \cdot pH + 14.5 \cdot T^2 \quad R^2 = 0.953 \quad R_{aj}^2 = 0.914 \quad (4.2.6)$$

$$\% \text{Actividad residual de rROL en EP100} = 30 - 24 \cdot T - 14.6 \cdot pH + 7.6 \cdot T \cdot pH \quad R^2 = 0.969 \quad R_{aj}^2 = 0.943 \quad (4.2.7)$$

$$\% \text{Actividad residual de rROL en Eupergit}^{\text{®}}\text{C} = 28.3 + 24 \cdot T + 13.4 \cdot pH + 3.2 \cdot T^2 + 6.6 \cdot T \cdot pH \quad R^2 = 0.991 \quad R_{aj}^2 = 0.983 \quad (4.2.8)$$

En primer lugar, se aprecia una menor estabilidad de rROL frente a nROL en solución e inmovilizada en EP100. De hecho, el término independiente del modelo de estabilidad en solución decrece del 79.5 % para nROL en solución al 9.7% en el caso de rROL, y del 84% al 30% inmovilizadas en EP100.

El término de pH^2 no fue significativo para la estabilidad en ninguno de los tres casos. En cuanto a los coeficientes de T y T^2 , fueron superiores a los coeficientes del término pH . De hecho, como en el caso de nROL, la estabilidad enzimática fue más dependiente de la temperatura que de la concentración de protones. A diferencia de nROL, el efecto de interacción $T \cdot pH$ sólo fue significativo para la estabilidad cuando la enzima estuvo inmovilizada en Eupergit®C.

Observando la superficie de la figura 4.2.9 y los valores significativos de los coeficientes del modelo, se observa un ligero aumento de la estabilidad cuando rROL fue inmovilizada, como puede apreciarse al observar los términos independientes, los cuales aumentan de un 9.7% en solución a un 30% aproximadamente en ambos soportes. A bajos pH, la actividad residual mejoró en ambos soportes comparado con la obtenida para el extracto en solución, bajo las mismas condiciones. Sin embargo, cuando el pH se incrementó, esta mejora decreció hasta el

punto en que la actividad residual para el pH más elevado, a bajas temperaturas, fue menor que para la lipasa en solución.

Las diferencias obtenidas entre nROL y rROL, podrían explicarse debido a una diferencia en las modificaciones post-traduccionales sufridas por ambas lipasas. El efecto positivo en la estabilidad que confieren ciertas modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, ya han sido descritos por otros autores para otros enzimas como la α -amilasa (Yañez *et al.*, 1998) o la cicloinulo-oligosacarido fructanotransferasa (Kanai *et al.*, 1997). De todas formas, como se vio en el capítulo anterior, no se ha demostrado que nROL presente un mayor grado de glicosilación frente a rROL, sin embargo ambas enzimas presentan una diferencia en el amino terminal, como ya se ha descrito anteriormente. La presencia de 28 aminoácidos de la pro-secuencia en el amino terminal de nROL podría ser una de las causas de una mayor estabilidad de la lipasa comercial, ya que se ha descrito que la presencia de estos aminoácidos podría mejorar a la estabilidad (Beer *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1999).

4.2.5. Inmovilización de rROL en Eupergit®CM

Como ya se ha comentado anteriormente, Eupergit®C dejó de ser suministrado por el fabricante, de modo que no sería posible preparar un stock del derivado inmovilizado con rROL para su posterior aplicación en reacciones de interés industrial (Capítulo 4.3). Como solución, se decidió adquirir Eupergit®CM, el cual presenta las mismas propiedades que Eupergit®C excluyendo el tamaño de partícula, ya que Eupergit®CM no está tamizado. Tras su adquisición se realizaron los estudios de inmovilización para así obtener la relación óptima proteína:polímero, ya que ésta podría variar de la encontrada para Eupergit®C.

En la figura 4.2.10 se muestran los resultados del estudio de inmovilización de rROL en Eupergit®CM. Como en todos los estudios anteriores, el porcentaje de inmovilización así como el porcentaje de proteína inmovilizada disminuyeron, cumpliéndose de este modo el comportamiento teórico esperado. Sin embargo, cabe destacar que los porcentajes de inmovilización obtenidos en el caso de este soporte fueron ligeramente superiores a los obtenidos al utilizar Eupergit®C (figura 4.2.6), para la misma actividad ofrecida.

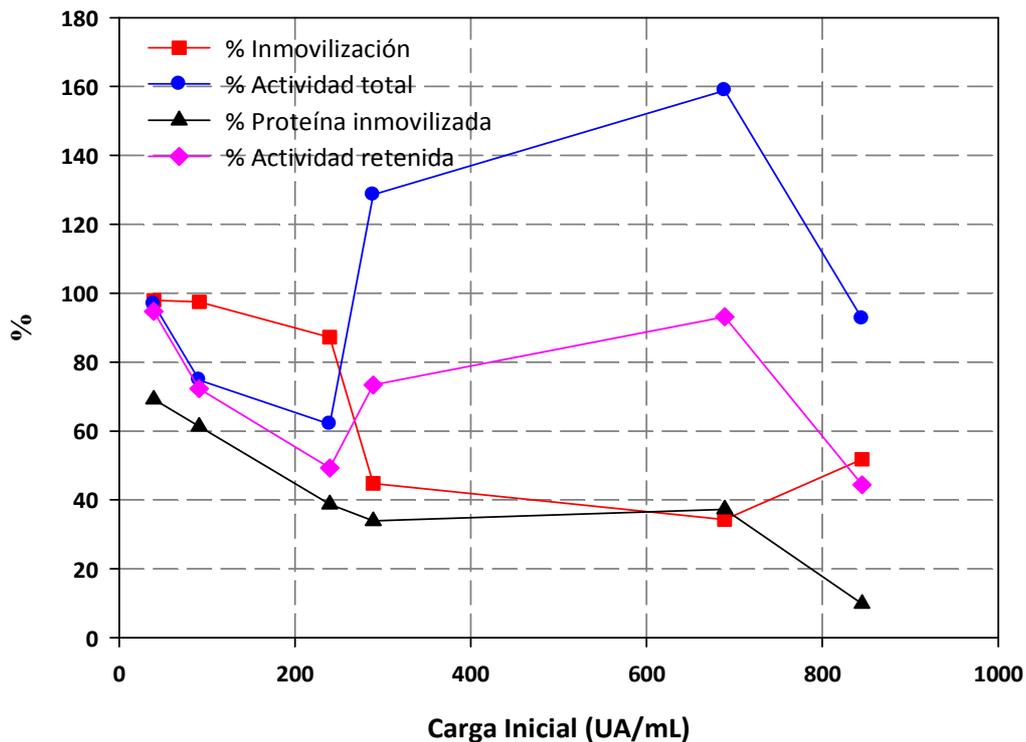


Figura 4.2.10. Porcentajes de inmovilización de rROL en Eupergit®CM

En el caso del porcentaje de actividad retenida, este decreció al aumentar la carga ofrecida hasta un valor de 240 UA/mL. Este efecto podría atribuirse a problemas difusionales o a una hipoactivación enzimática al inmovilizarse, ya que estos valores de porcentaje de actividad retenida se encontraban por debajo de los valores de porcentaje inmovilizado. Al aumentar la carga ofrecida, el porcentaje de actividad retenida se vio incrementado, hasta llegar a un valor máximo ofrecido de 690 UA/mL. A partir de éste valor, volvió a observarse una tendencia decreciente, probablemente debido a problemas difusionales. En este tramo de cargas cabe destacar que se alcanzaron valores de porcentaje de actividad retenida superiores a los de actividad inmovilizada, indicando una hiperactivación lipásica.

Comparando con los resultados obtenidos en Eupergit®C, se aprecia una variación en el valor óptimo de relación proteína:soporte, ya que éste se alcanzó al ofrecer 0.95 mg de proteína a 100 mg Eupergit®C, mientras que en el caso de Eupergit®CM se obtuvo al ofrecer 1.5 mg a 100 mg de soporte. Por otro lado, el comportamiento del porcentaje de actividad retenida también fue diferente, ya que en el caso de Eupergit®C se observó un crecimiento de éste hasta llegar a un

valor máximo tras el cual decreció y, como ya se ha comentado, en el caso de Eupergit®CM hubo un decrecimiento en la zona de baja carga. Por tanto, queda patente un efecto notable del tamaño de partícula sobre el porcentaje de actividad retenida, así como sobre la relación óptima de proteína:soporte.

4.2.6 Conclusiones

Tras inmovilizar nROL y rROL en dos soportes de diferente composición, como son el EP100 y Eupergit®C, se obtuvieron las relaciones óptimas de proteína:soporte para realizar las inmovilizaciones. Cabe destacar ciertos resultados obtenidos durante los experimentos de inmovilización. En primer lugar, se observó hiperactivación lipásica en ambos productos y en ambos soportes. Por otro lado, cabe destacar que a bajas cargas enzimáticas se obtuvieron porcentajes bajos de actividad retenida haciendo uso tanto de EP100 como de Eupergit®C, atribuyéndose este fenómeno a cambios en la estructura proteica debido a una alta disposición de superficie para la enzima en el caso de EP100 y a múltiples uniones covalentes en el caso del Eupergit®C. En el caso del estudio de los equilibrios de adsorción en EP100, se observó un comportamiento de tipo Langmuir en ambos liofilizados.

Tras analizar las estabildades de nROL y rROL en solución, se obtuvieron valores de porcentaje actividad residual superiores en nROL que en rROL. Esto indica una estabilidad superior de la lipasa nativa en comparación con la recombinante. Además, se observó que el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de ambos productos era superior al del pH, como quedó patente en los valores de los coeficientes de dichos términos. Al inmovilizarse nROL sobre EP100, no se apreciaron cambios significativos en la estabilidad lipásica, mientras que ésta decreció al inmovilizarse sobre Eupergit®C. Sin embargo, rROL mejoró su estabilidad al inmovilizarse en ambos soportes, aunque sólo ocurrió para condiciones de pH bajo. Aún inmovilizando rROL y mejorar ligeramente su estabilidad, no se consiguieron valores comparables a los alcanzados por lipasa nativa, excepto en el caso de la inmovilización en Eupergit®C.

Al inmovilizar rROL sobre Eupergit®CM para su utilización posterior en reacciones, se apreció una variación del comportamiento del porcentaje de actividad retenida comparado con Eupergit®C, además de un cambio en la relación óptima proteína:polímero quedando patente el efecto de una variación del tamaño de partícula.

4.2.7 Bibliografía

Al-Duri B, Goddard R, Bosley J, Characterization of a novel support for Biocatalysis in supercritical carbon dioxide, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11 (2001) 825-834.

Beer HD, Wohllfahrt G, Schmid RD, McCarthy JEG, The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence, *Biochem. J.* 319 (1996) 351-359.

Bosley J, Peilow A, Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in sterification efficiency at low loadings, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74 (1997) 107-111.

Capellas M, Benaiges MD, Caminal G, González G, López-Santín J, Influence of water activity and support material on the enzymatic synthesis of a cck-8 tripeptide fragment, *Biocatal. Biotransform.* 13 (1996) 165-178.

Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 185-197.

Ghamgui H, Miled N, Karra-chaâbouni M, Gargouri Y, Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study, *Biochem. Eng. J.* 37 (2007) 34-41.

Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P, Adsorption of lipase on polypropylene powder, *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1997) 188-196.

Hernaiz M, Crout D, Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme Microb. Tech.* 27 (2000) 26-32.

Kanai T, Ueki N, Kawaguchi T, Teranishi Y, Atomi H, Tomorbaatar C, Ueda M, Tanaka A, Recombinant thermostable cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4956-4960.

Kim DW, Jeong YK, Lee LK, Adsorption kinetics of exoglucanase in combination with endoglucanase from *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose and its influence on synergistic degradation, *Enzyme Microb. Technol.* 16 (1994) 649-658.

López N, Pérez R, Vázquez F, Valero F, Sánchez A, Immobilization of different *Candida rugosa* lipases by adsorption onto polypropylene powder: application to chiral synthesis of ibuprofen and trans-2-phenyl-1-cyclohexanol esters, *J. Chem. Technol. Biot.* 77 (2002) 175-182.

Lopez N, Pernas MA, Pastrana LM, Sánchez A, Valero F, Rúa ML, Reactivity of pure *Candida rugosa* isoenzymes (Lip1, Lip2 and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media, *Biotechnol. Prog.* 2004;20:65-73.

Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Improvement of enzyme activity stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Tech.* 40 (2007) 1451-1463.

Mozhaev VV, Melik-Nubarov NS, Sergeeva MV, Sikrnis V, Martionek K, Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support, *Biocatalysis* 3 (1990) 179-187.

Takahashi S, Ueda M, Tanaka A, Independent production of two molecular forms of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase by KEX2-engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biot.* 52 (1999) 534-540.

Yang G, Wu J, Xu G, Yang L, Improvement of catalytic properties of lipase from *Arthrobacter* sp. by encapsulation in hydrophobic sol-gel materials, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 4311-4316.

Yañez E, Carmona TA, Tiemblo M, Jiménez A, Fernandez-Lobato M, Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion, *Biochem. J.* 328 (1998) 65-71.



4.3 Aplicación de rROL inmovilizada en una reacción de interés industrial: Síntesis de butirato de etilo

4.3 Aplicación de rROL inmovilizada en una reacción de interés industrial: síntesis de butirato de etilo

La utilización de las lipasas en reacciones de interés industrial es ampliamente conocida. Una de estas aplicaciones es su utilización en la síntesis de aromatizantes, ya que una gran parte de estos compuestos son ésteres de cadena corta. Una de las ventajas de la aplicación enzimática frente a la vía química en la síntesis de aromatizantes es que los compuestos obtenidos pueden etiquetarse como “naturales”.

En el estudio que nos ocupa, se llevó a cabo la síntesis de un aromatizante con olor a piña: butirato de etilo. Esta síntesis se realizó de forma directa a partir de ácido butírico y etanol.

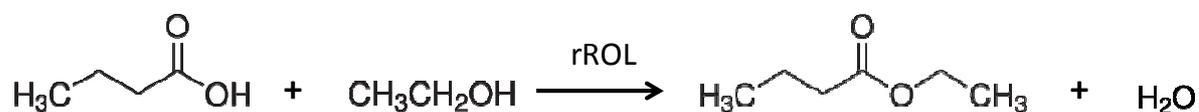
La lipasa se utilizó inmovilizada en dos tipos de soportes: EP100 y Eupergit®CM, los cuales ya han sido estudiados en el capítulo 2, y se consideró la opción de utilizarla inmovilizada en un tercer soporte el cual se había visto que presentaba unos altos valores de estabilidad en medio orgánico: Octadecil-Sepabeads.

Por tanto, el objetivo de este capítulo es el estudio de la aplicabilidad de rROL inmovilizada en la síntesis de un compuesto de interés industrial como es el butirato de etilo. Se evaluarán los efectos de diferentes variables sobre la velocidad inicial así como sobre la conversión y se fijarán los valores óptimos de dichas variables para cada uno de los tres biocatalizadores estudiados. Por último, se estudió la estabilidad de estos biocatalizadores, siendo un factor clave en su aplicación posterior a escala industrial.

4.3.1 Efecto de diferentes parámetros sobre la conversión y velocidad de reacción de la síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada.

Son diversos los factores que afectan a la evolución de una reacción enzimática. Conocer el comportamiento de la reacción de interés frente a diferentes factores es clave a la hora de optimizar un proceso de biocatálisis.

En el presente apartado se muestran los efectos de diferentes variables sobre la conversión y la velocidad de reacción en la síntesis de butirato de etilo (esquema 4.3.1), catalizada por rROL inmovilizada en diferentes soportes (rROL-EP100, rROL-Eupergit®CM, rROL-Sepabeads).



Esquema 4.3.1 Reacción de síntesis de butirato de etilo catalizada por rROL inmovilizada

Los parámetros que se analizaron fueron los siguientes:

- Presencia de agua en el biocatalizador
- Temperatura
- Agitación
- Carga enzimática
- Solvente
- Relación molar ácido:alcohol

El objetivo principal era encontrar los valores óptimos de cada uno de estos parámetros, de manera que, a medida que eran analizados se iban fijando para los siguientes experimentos.

En los siguientes apartados se muestran los efectos de cada una de estas variables sobre la reacción de estudio.

4.3.1.1 Efecto de la presencia de agua en el biocatalizador

Es conocido que el agua es un parámetro esencial en la actividad enzimática ya que tiene una presencia básica en la formación de puentes de hidrógeno, los cuales son fundamentales en las interacciones que mantienen la conformación enzimática. Además, en las reacciones que se llevan a cabo en medios orgánicos, afecta a la dirección del desplazamiento del equilibrio de reacción. Por tanto, el agua se presenta como un factor importante a estudiar (Pires-Cabral *et al.*, 2005; Pires-Cabral *et al.*, 2007).

El efecto del agua en la reacción se estudió mediante la utilización del biocatalizador desecado o sin desecar, tal como se describe en el apartado 3.16.

En la tabla 4.3.1 se muestran los resultados de velocidad para cada uno de los biocatalizadores mientras que en la figura 4.3.1 se muestran las evoluciones de las reacciones.

Tabla 4.3.1. Efecto de la presencia de agua en el biocatalizador sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mL·min)	
	No desecado	Desecado
rROL-EP100	$5.12 \cdot 10^{-6} \pm 3.30 \cdot 10^{-6}$	$1.24 \cdot 10^{-5} \pm 1.04 \cdot 10^{-6}$
rROL-Eupergit®CM	$2.92 \cdot 10^{-7} \pm 4.08 \cdot 10^{-8}$	$5.45 \cdot 10^{-7} \pm 1.51 \cdot 10^{-7}$
rROL-Sepabeads	$1.51 \cdot 10^{-7} \pm 3.94 \cdot 10^{-8}$	$9.54 \cdot 10^{-7} \pm 4.36 \cdot 10^{-7}$

En la tabla anterior se observa claramente una velocidad superior alcanzada utilizando rROL-EP100. De hecho, dicha velocidad llegó a ser 23 veces superior a la velocidad inicial obtenida con rROL-Eupergit®CM y 13 superior a la conseguida con rROL-Sepabeads

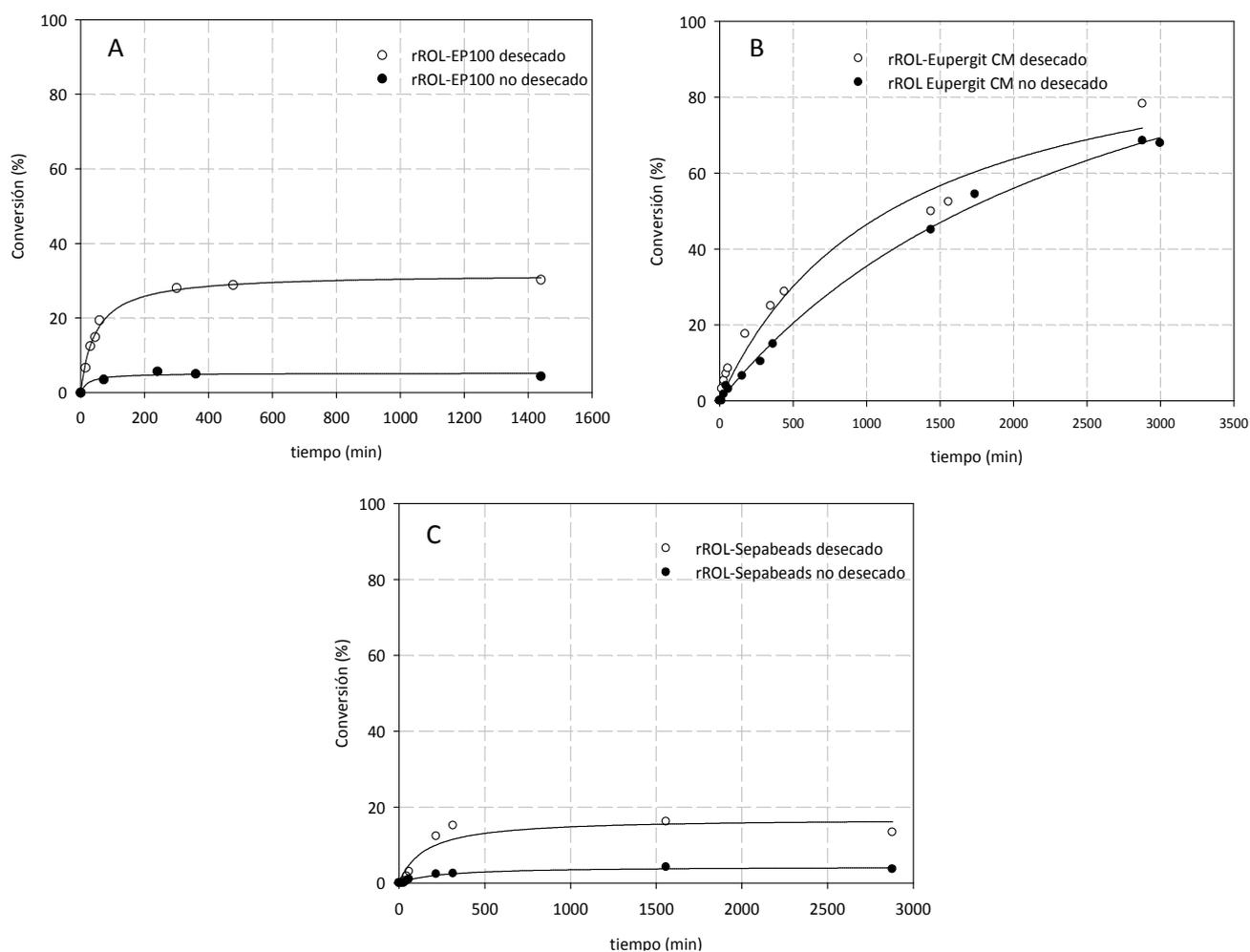


Figura 4.3.1 Efecto de la presencia de agua en el biocatalizador sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 a 30°C, 250 rpm, 50UA, n-Hexano, 100mM butírico y 0.5 butírico:etanol, (B) rROL-Eupergit®CM a 30°C, 250 rpm, 100UA, n-Hexano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol y (C) rROL-Sepabeads a 30°C, 250 rpm, 100UA, n-Hexano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol.

Como se observa en la tabla 4.3.1 y en la figura 4.3.1, la utilización del biocatalizador sin desecar, independientemente del soporte utilizado, afectó negativamente a la velocidad inicial de reacción así como a la conversión. Esto indica que un exceso de agua, por parte del biocatalizador, no ayuda al progreso de la síntesis y que el agua retenida en el soporte, tras 24 horas de desecado, es suficiente para mantener la actividad enzimática. Este efecto puede explicarse termodinámicamente, ya que el agua es un producto de la reacción de la síntesis directa del éster y, por tanto, su presencia inicial afecta al equilibrio (Mahapatra *et al.*, 2009). En la bibliografía se encontraron resultados similares en cuanto a contenido en agua. Un ejemplo es

la utilización de la lipasa de *R. oryzae* inmovilizada en CaCO_3 en la síntesis de 1-butil oleato, ya que se obtienen mejores resultados al desecar tanto los reactivos como el biocatalizador (Ghamgui et al., 2004). Estos resultados están en concordancia con estudios previos que revelaron una mayor actividad de esta lipasa a bajas actividades de agua, tanto en reacciones de síntesis como de transesterificación (Koller et al., 2001; Ma et al., 2002).

Por otro lado, se describió un comportamiento opuesto al observado en estos estudios en el caso de la esta lipasa inmovilizada en Celite 545, ya que se obtuvieron mejores resultados en la síntesis de butil acetato añadiendo un 45% en peso de agua al inicio de a reacción (Ben Salah et al., 2007).

4.3.1.2 Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro esencial a estudiar ya que provoca dos efectos contrapuestos. Por un lado, afecta positivamente a la cinética, pero por otro, afecta de forma negativa a la estabilidad enzimática. El rango de temperatura para realizar los ensayos se fijó entre 30 y 40°C y fue escogido según datos bibliográficos.

En la tabla 4.3.2 se muestran los datos de velocidad para cada biocatalizador en las temperaturas estudiadas mientras que en la figura 4.3.2 se muestran las evoluciones de las reacciones.

Tabla 4.3.2. Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mL·min)		
	30°C	35°C	40°C
rROL-EP100	$1.24 \cdot 10^{-5} \pm 1.04 \cdot 10^{-6}$	$1.34 \cdot 10^{-5} \pm 1.78 \cdot 10^{-6}$	$1.38 \cdot 10^{-5} \pm 1.53 \cdot 10^{-6}$
rROL-Eupergit®CM	$5.45 \cdot 10^{-7} \pm 1.51 \cdot 10^{-7}$	$9.02 \cdot 10^{-7} \pm 8.50 \cdot 10^{-8}$	$5.84 \cdot 10^{-7} \pm 6.28 \cdot 10^{-8}$
rROL-Sepabeads	$9.54 \cdot 10^{-7} \pm 4.36 \cdot 10^{-7}$	$1.00 \cdot 10^{-6} \pm 2.87 \cdot 10^{-7}$	$7.51 \cdot 10^{-7} \pm 1.85 \cdot 10^{-7}$

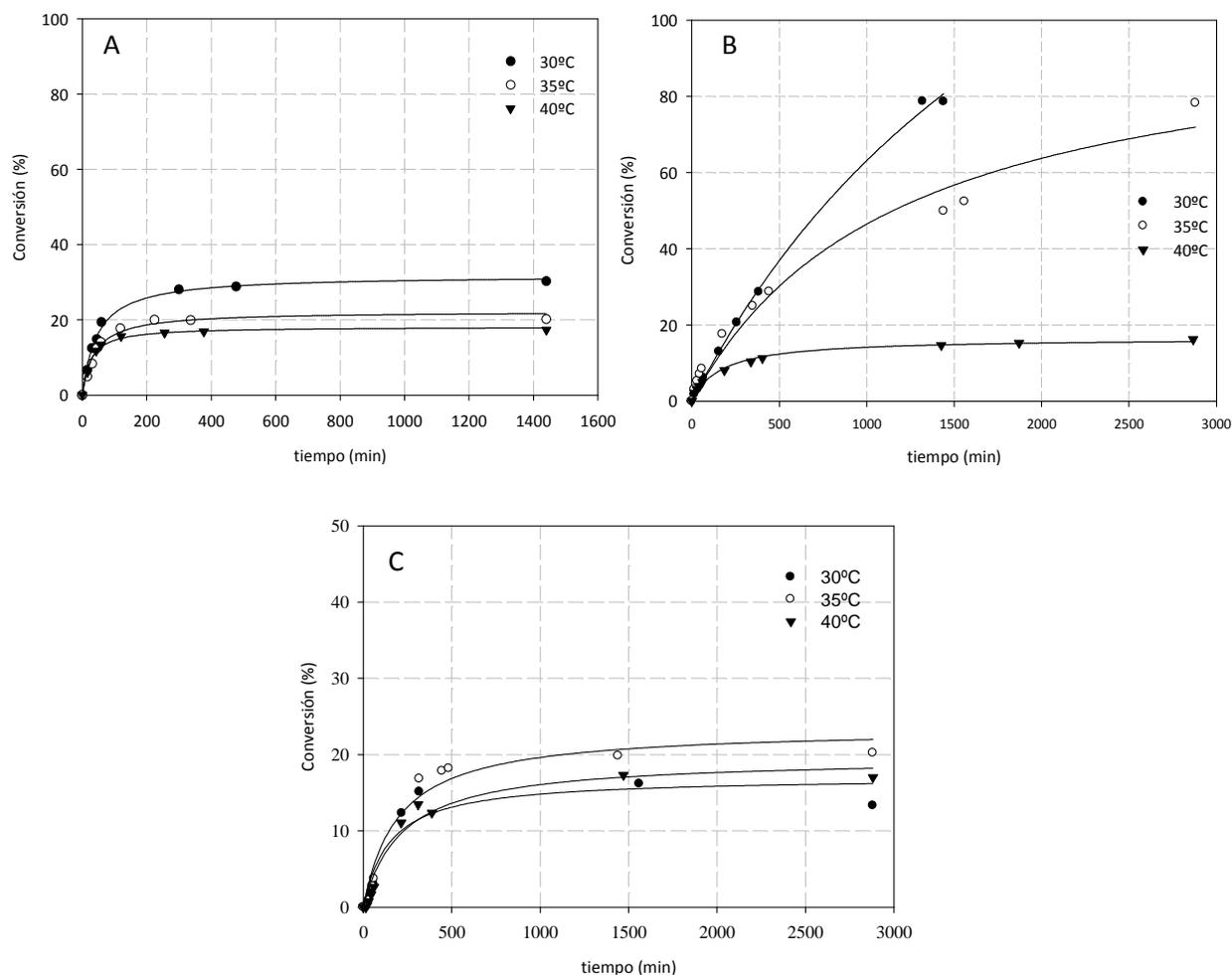


Figura 4.3.2. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 desecado, 250 rpm, 50UA, n-Hexano, 100mM butírico y 0.5 butírico:etanol, (B) rROL-Eupergit®CM desecado, 250 rpm, 100UA, Hexano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol y (C) rROL-Sepabeads desecado, 250 rpm, 100UA, Isooctano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol.

Como se ha comentado anteriormente, un aumento de la temperatura incrementa la velocidad de reacción ya que, según la ecuación de Arrhenius, la constante cinética aumenta. Sin embargo, como se muestra en la tabla 4.3.2, las velocidades máximas no se alcanzaron a la máxima temperatura analizada, si no que se alcanzaron a los 35°C en el caso de rROL-Eupergit®CM y rROL-Sepabeads. Este resultado indicó que a 40°C el efecto de desactivación térmica fue superior, incluso en los estados iniciales de la reacción, comparado con el efecto del incremento de la constante cinética. Sin embargo rROL-EP100 obtuvo una mayor velocidad inicial a 40°C.

Analizando estos valores juntamente con las evoluciones de las reacciones (figura 4.3.2) se aprecia claramente que, en el caso de rROL-Eupergit®CM así como rROL-EP100, las conversiones más elevadas se obtuvieron a 30°C, no coincidiendo en ambos casos con la temperatura a la que se observó la máxima velocidad. Esto refuerza la hipótesis de una desactivación térmica de la enzima, ya que a medida que avanza el tiempo la velocidad de reacción disminuye de forma más acusada a temperaturas más elevadas. Sin embargo, en el caso de rROL-Sepabeads la mayor velocidad inicial se consiguió a la misma temperatura (35°C) a la que se obtuvo la mejor conversión.

En la bibliografía se encuentra un amplio rango de temperaturas óptimas aplicadas en reacciones de síntesis utilizando lipasas. Algunos autores obtuvieron mejores resultados en la síntesis de butil acetato utilizando la lipasa de *R. oryzae* a 37°C (Ben Salah et al. 2007). Sorprendentemente, no se encontró un efecto estadísticamente significativo de la temperatura, en los rangos estudiados, en la síntesis de isoamil butirato utilizando la lipasa de *Geotrichum sp* así como con la lipasa de *R. oryzae* (Macedo et al., 2004) o en la síntesis de 2-feniletil octanoato utilizando palatase® 20000L de Novozymes (Grace Tan et al., 2011).

4.3.1.3 Efecto de la velocidad de agitación

La velocidad de agitación tiene un efecto importante, no sólo en la homogeneidad de la suspensión, sino también sobre las limitaciones difusionales.

En reacciones heterogéneas, como es el caso que nos ocupa, toman importancia los llamados efectos difusionales. A causa de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno.

En el caso de las resistencias de tipo externo, éstas son causadas debido a la formación de una capa estacionaria de líquido creada alrededor de las partículas de soporte, la cual debe ser atravesada por los sustratos. Debido a esto, se crea un gradiente de concentración en esta capa estacionaria, siendo más elevada la concentración de sustrato en el medio de reacción que en la propia superficie de la partícula. Existen diferentes métodos para disminuir estas limitaciones difusionales externas, como por ejemplo, aumentar la concentración de sustrato o la velocidad de agitación. En este apartado se muestran los efectos de una variación de la velocidad de agitación sobre la reacción.

En la tabla 4.3.3 se muestran los datos de velocidad inicial de cada biocatalizador para los diferentes valores de agitación utilizados, mientras que en la figura 4.3.3 se encuentran las evoluciones de las reacciones. Cabe destacar que a menor velocidad de agitación escogida (250 rpm) fue aquella a partir de la cual se observaba la suspensión de las partículas de biocatalizador.

Tabla 4.3.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mL·min)		
	250rpm	450rpm	550rpm
rROL-EP100	$1.24 \cdot 10^{-5} \pm 1.04 \cdot 10^{-6}$	$1.08 \cdot 10^{-5} \pm 1.42 \cdot 10^{-6}$	-
rROL-Eupergit®CM	$5.45 \cdot 10^{-7} \pm 1.51 \cdot 10^{-7}$	$1.55 \cdot 10^{-6} \pm 1.67 \cdot 10^{-7}$	$7.97 \cdot 10^{-7} \pm 7.68 \cdot 10^{-8}$
rROL-Sepabeads	$1.00 \cdot 10^{-6} \pm 2.87 \cdot 10^{-7}$	$8.65 \cdot 10^{-7} \pm 3.45 \cdot 10^{-7}$	-

Aunque, como se ha comentado anteriormente, una mayor velocidad de agitación mejora la transferencia de materia y por tanto aumenta la velocidad de reacción, se aprecia como en el caso de rROL-EP100 y rROL-Sepabeads, un aumento de las revoluciones por minuto tiene un efecto contrario en la velocidad así como en la conversión (fig. 4.3.3); obteniéndose los mejores resultados a la menor velocidad de agitación (250 rpm). Sin embargo en rROL-Eupergit®CM la mayor velocidad inicial y la mejor conversión se obtuvieron a un valor de 450 rpm, disminuyendo al llegar hasta 550 rpm. Este hecho puede explicarse debido a un posible efecto de fractura en los soportes a causa de una excesiva agitación. Otra explicación a este fenómeno podría atribuirse al tipo de inmovilización. Tanto rROL-EP100 como rROL-Sepabeads se obtienen mediante adsorción mientras que rROL-Eupergit®CM corresponde a una inmovilización por enlace covalente. Esto podría indicar que las fuerzas moleculares que mantienen la adsorción de las lipasas son distorsionadas debido a una fuerte agitación mientras que las lipasas inmovilizadas mediante enlace covalente mantienen mejor su unión al soporte.

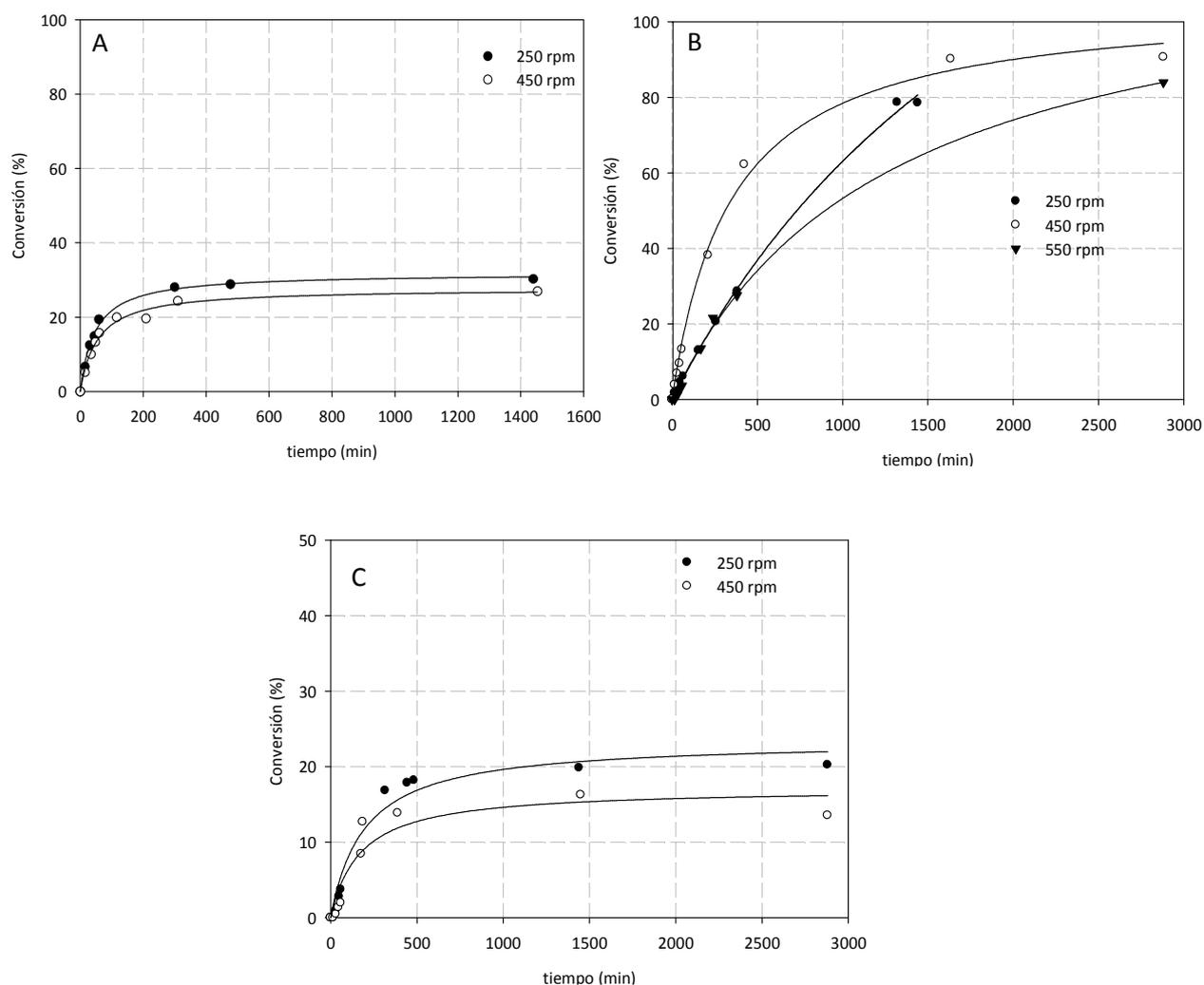


Figura 4.3.3. Efecto de la velocidad de agitación sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 desecado, 30°C, 50UA, n-Hexano, 100mM butírico y 0.5 butírico:etanol, (B) rROL-Eupergit®CM desecado, 30°C, 100UA, Hexano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol y (C) rROL-Sepabeads desecado, 35°C, 100UA, Isooctano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol.

4.3.1.4 Efecto de la carga enzimática

Como objetivo del estudio de este parámetro se fijó la carga inicial necesaria para alcanzar la máxima conversión tras 24 horas de reacción.

En la tabla 4.3.4 se muestran las velocidades iniciales de cada ensayo mientras que en la figura 4.3.4 se representan las evoluciones de las reacciones.

Tabla 4.3.4. Efecto de la carga enzimática sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mL·min)				
	50UA	100UA	150UA	500UA	550UA
rROL-EP100	$1.24 \cdot 10^{-5} \pm$	$1.37 \cdot 10^{-5} \pm$	$1.64 \cdot 10^{-5} \pm$	-	-
	$1.04 \cdot 10^{-6}$	$3.64 \cdot 10^{-6}$	$1.03 \cdot 10^{-6}$		
rROL-Eupergit®CM	$3.06 \cdot 10^{-7} \pm$	$1.55 \cdot 10^{-6} \pm$	$1.51 \cdot 10^{-6} \pm$	-	-
	$1.57 \cdot 10^{-8}$	$1.67 \cdot 10^{-7}$	$2.23 \cdot 10^{-7}$		
rROL-Sepabeads	$6.44 \cdot 10^{-7} \pm$	$1.00 \cdot 10^{-6} \pm$	$9.73 \cdot 10^{-7} \pm$	$1.05 \cdot 10^{-6} \pm$	$1.02 \cdot 10^{-6} \pm$
	$2.07 \cdot 10^{-7}$	$2.87 \cdot 10^{-7}$	$2.91 \cdot 10^{-7}$	$1.86 \cdot 10^{-7}$	$1.43 \cdot 10^{-7}$

Como puede extraerse de la tabla anterior, la velocidad inicial de reacción aumentaba cuando se incrementaban las unidades de actividad cargadas, aunque en algunos casos no fue muy notable. En cuanto al rendimiento obtenido, se observó que no todas las reacciones alcanzaban el 100% de rendimiento, llegándose a detener la reacción sin alcanzar la conversión total. Con estos resultados puede postularse que la enzima perdía actividad con el tiempo y si la velocidad inicial no tenía un valor mínimo, no se llegaba a alcanzar la total conversión antes de que se produjera la desactivación prácticamente total de la lipasa. Es por esto, que se marca como objetivo encontrar la carga que permite alcanzar la total conversión en 24 horas, tiempo adecuado para el seguimiento de la reacción.

En el caso de rROL-EP100 se necesitaron 100UA para alcanzar una conversión del 100%. En el caso de rROL-Eupergit®CM fueron necesarias 150 UA para alcanzar la misma conversión mientras que en el caso de rROL-Sepabeads se necesitaron 550 UA. Estos resultados nos indican que la capacidad de síntesis de la lipasa depende del tipo de soporte en la que se encuentra inmovilizada, ya que se necesitaron diferentes valores de unidades de actividad inicial para alcanzar dicha conversión, a consecuencia de las diferentes actividades que tiene cada biocatalizador en la reacción. Probablemente las enzimas adquieran conformaciones diferentes al inmovilizarse en dichos soportes lo cual afectaría a su capacidad catalítica (Mateo *et al.*, 2007).

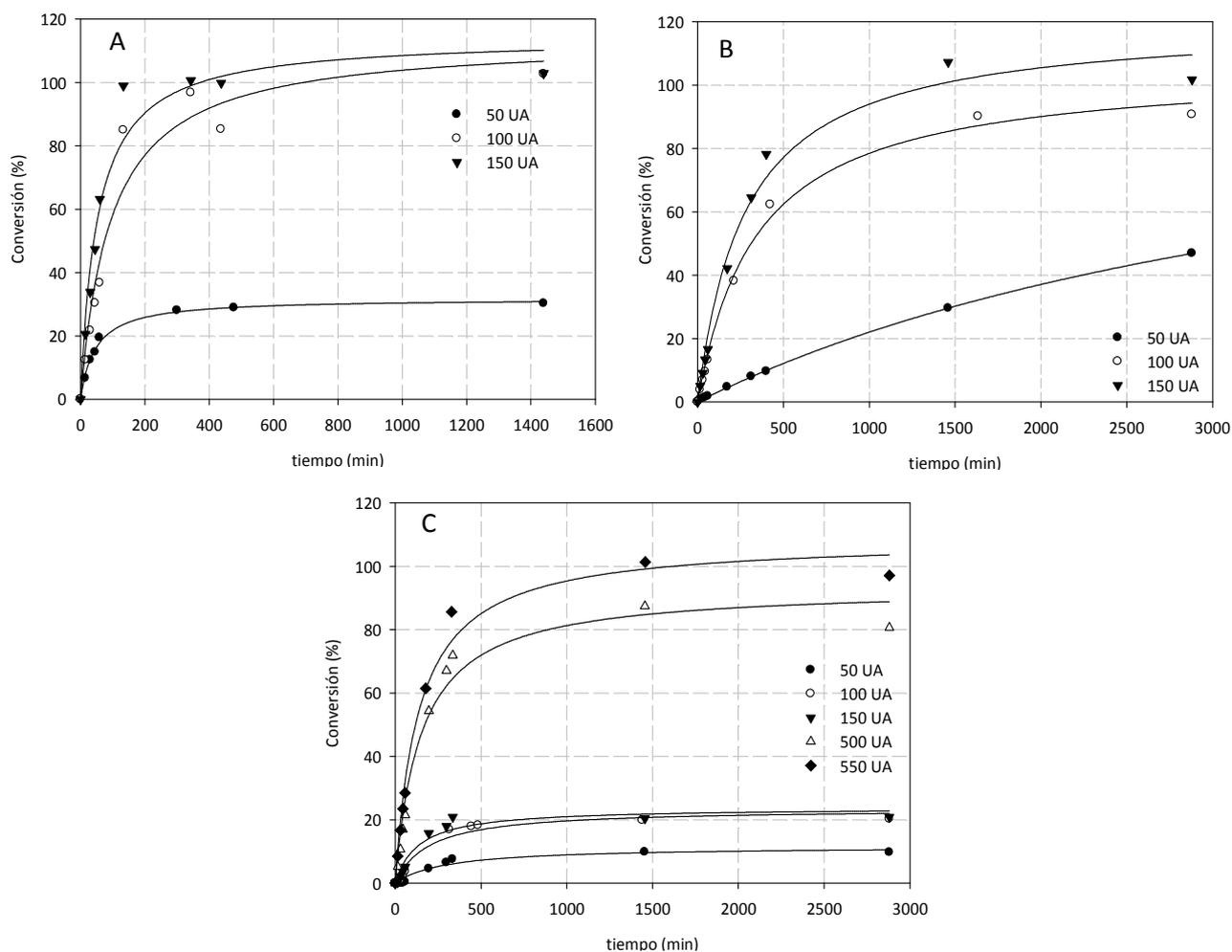


Figura 4.3.4. Efecto de la carga enzimática sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 desecado, 30°C, 250 rpm, n-Hexano, 100mM butírico y 0.5 butírico:etanol, (B) rROL-Eupergit®CM desecado, 30°C, 450 rpm, Hexano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol y (C) rROL-Sepabeads desecado, 35°C, 250 rpm, Isooctano, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol.

4.3.1.5 Efecto del solvente

Es sabido que el comportamiento catalítico de las enzimas, como las lipasas, depende fuertemente de la polaridad del entorno del biocatalizador (Klibanov *et al.* 1997). Se ha descrito que los porcentajes de conversión, en muchas reacciones en medio orgánico catalizadas por lipasas, eran mejores con solventes no polares ya que los solventes polares pueden distorsionar la capa de agua alrededor de la enzima, la cual es necesaria para su actividad (Ben Salah *et al.*,

2007). En la bibliografía se encuentra que los mejores resultados de reacciones de esterificación se obtuvieron con solventes de $\log P > 2$, entendiendo $\log P$ como el logaritmo del coeficiente de reparto octanol:agua, que corresponde a solventes no polares (Laane *et al.*, 1987; Chen, 1996; Yang *et al.*, 2002;). Por lo tanto en este estudio se escogieron como solventes para la reacción de síntesis de butirato de etilo: n-hexano ($\log P=3.5$), n-heptano ($\log P=4.0$), e isooctano ($\log P=4.11$).

En la tabla 4.3.5 se muestran los resultados de velocidad inicial obtenidos y en la figura 4.3.5 se representan las evoluciones de las reacciones.

Tabla 4.3.5. Efecto del solvente sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mL·min)		
	n-Hexano	n-Heptano	Isooctano
rROL-EP100	$1.37 \cdot 10^{-5} \pm 3.64 \cdot 10^{-6}$	$1.18 \cdot 10^{-5} \pm 2.10 \cdot 10^{-6}$	$9.28 \cdot 10^{-6} \pm 2.07 \cdot 10^{-6}$
rROL-Eupergit®CM	$1.51 \cdot 10^{-6} \pm 2.23 \cdot 10^{-7}$	$1.33 \cdot 10^{-6} \pm 1.70 \cdot 10^{-7}$	$1.26 \cdot 10^{-6} \pm 1.63 \cdot 10^{-7}$
rROL-Sepabeads	$1.02 \cdot 10^{-6} \pm 1.43 \cdot 10^{-7}$	$1.05 \cdot 10^{-6} \pm 1.99 \cdot 10^{-87}$	$1.10 \cdot 10^{-6} \pm 1.40 \cdot 10^{-7}$

Como puede observarse, variar el solvente entre los escogidos no causó un efecto notable sobre la velocidad inicial así como sobre la conversión, independientemente del biocatalizador utilizado. Estos resultados están en consonancia con la similitud de los valores de $\log P$ de estos solventes.

Estos resultados nos indican que la elección del disolvente de entre los probados debería decidirse por otros parámetros tales como la estabilidad, la seguridad de cada uno de ellos o el precio.

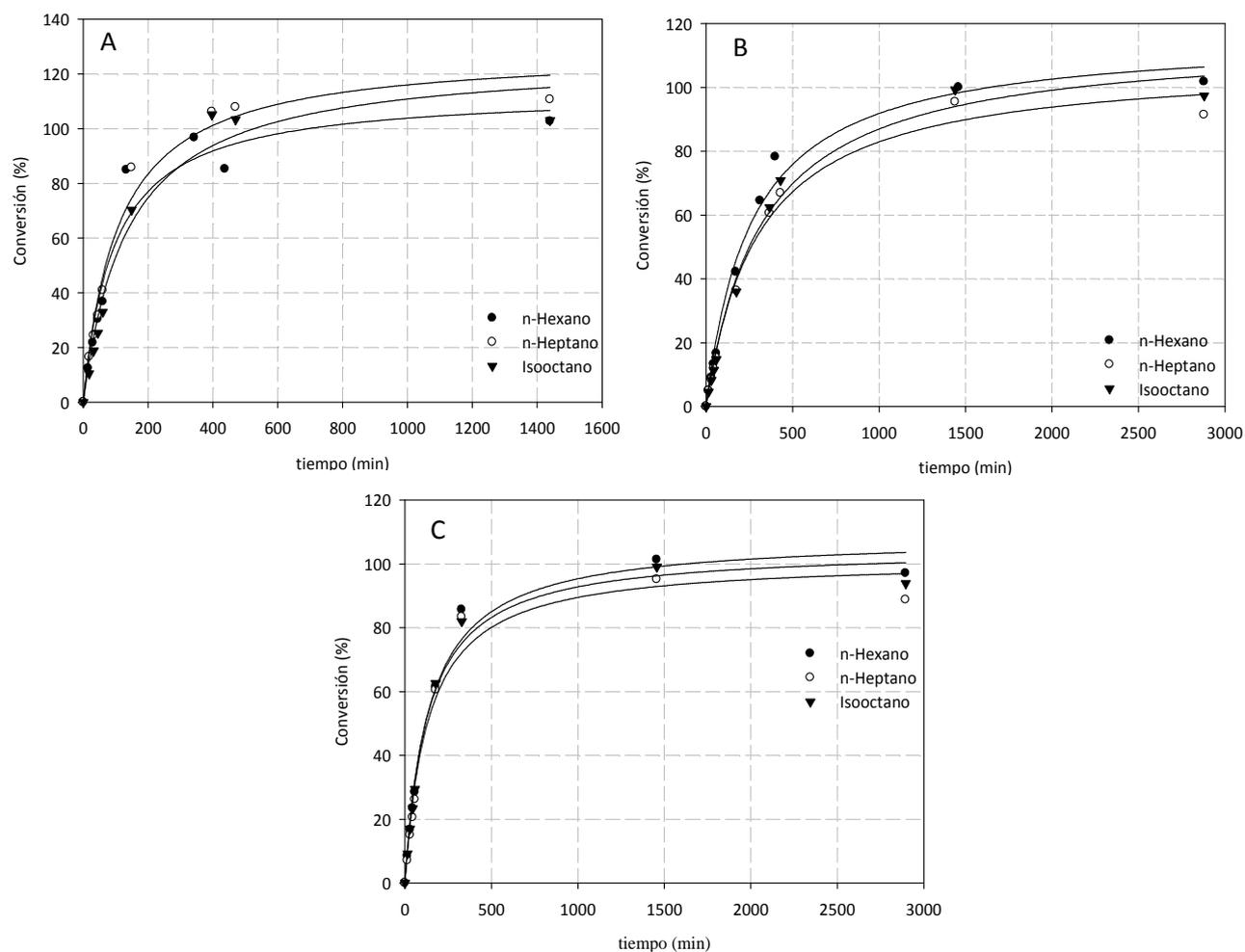


Figura 4.3.5. Efecto del solvente sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 desecado, 30°C, 250 rpm, 100UA, 100mM butírico y 0.5 butírico:etanol, (B) rROL-Eupergit®CM desecado, 30°C, 450 rpm, 150UA, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol y (C) rROL-Sepabeads desecado, 35°C, 250 rpm, 550UA, 100mM butírico y 1.25 butírico:etanol.

4.3.1.6 Efecto de la relación molar ácido:alcohol

El efecto de la concentración de sustratos y la relación molar entre los reactivos resulta un factor remarcable en el comportamiento de las reacciones de síntesis. Algunos autores observaron un gran efecto de la concentración del ácido sobre la actividad enzimática (Ben Salah *et al.*, 2007), sin embargo, en otros casos, el alcohol fue el sustrato que presentó un efecto más significativo (Chen, 1996; Ghangui *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2010).

En este estudio se mantuvo la concentración de ácido constante a 100mM y la de etanol fue variando de manera que se fijaron tres relaciones molares butírico:etanol correspondientes a 0.5, 1 y 1.25.

En la tabla 4.3.6 se muestran los datos de velocidad inicial obtenidos en cada caso mientras que en la figura 4.3.6 se representan los perfiles de reacción.

Tabla 4.3.6. Efecto de la relación molar ácido:alcohol sobre la velocidad inicial en la reacción de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada

Biocatalizador	Velocidad inicial (mmol/UA·mmol S· mL·min)		
	0.5 Butírico:Etanol	1 Butírico:Etanol	1.25 Butírico:Etanol
rROL-EP100	$4.56 \cdot 10^{-6} \pm 1.21 \cdot 10^{-6}$	$6.60 \cdot 10^{-6} \pm 9.85 \cdot 10^{-7}$	$7.61 \cdot 10^{-6} \pm 7.00 \cdot 10^{-7}$
rROL-Eupergit®CM	$9.43 \cdot 10^{-7} \pm 1.52 \cdot 10^{-7}$	$1.71 \cdot 10^{-6} \pm 2.99 \cdot 10^{-7}$	$7.0 \cdot 10^{-7} \pm 9.06 \cdot 10^{-8}$
rROL-Sepabeads	$3.53 \cdot 10^{-7} \pm 6.57 \cdot 10^{-8}$	$5.1 \cdot 10^{-7} \pm 4.53 \cdot 10^{-8}$	$6.11 \cdot 10^{-7} \pm 7.78 \cdot 10^{-8}$

Se aprecia, en todos los casos, un efecto negativo sobre la velocidad inicial de la reacción al haber un exceso de etanol ya que, según los resultados obtenidos, los tres soportes mostraron la menor velocidad inicial a una relación molar ácido:alcohol de 0.5. Tanto rROL-Sepabeads como rROL-EP100 mostraron una mayor velocidad de reacción con un ligero exceso de ácido mientras que, por el contrario, se obtuvieron los mejores valores de velocidad inicial en el caso de rROL-Eupergit®CM al utilizar una relación equimolar, indicando este hecho que un exceso de ácido también provoca un ligero efecto negativo sobre este biocatalizador. En cuanto a los valores de conversión, éstos se vieron más afectados al variar la relación molar de sustratos en el caso de rROL-Sepabeads apreciándose un efecto negativo al disminuir dicha relación. En el caso de rROL-EP100 no se mostró una diferencia notable sobre la conversión mientras que en rROL-Eupergit®CM se obtuvieron valores de conversión final ligeramente superiores a una menor concentración de etanol.

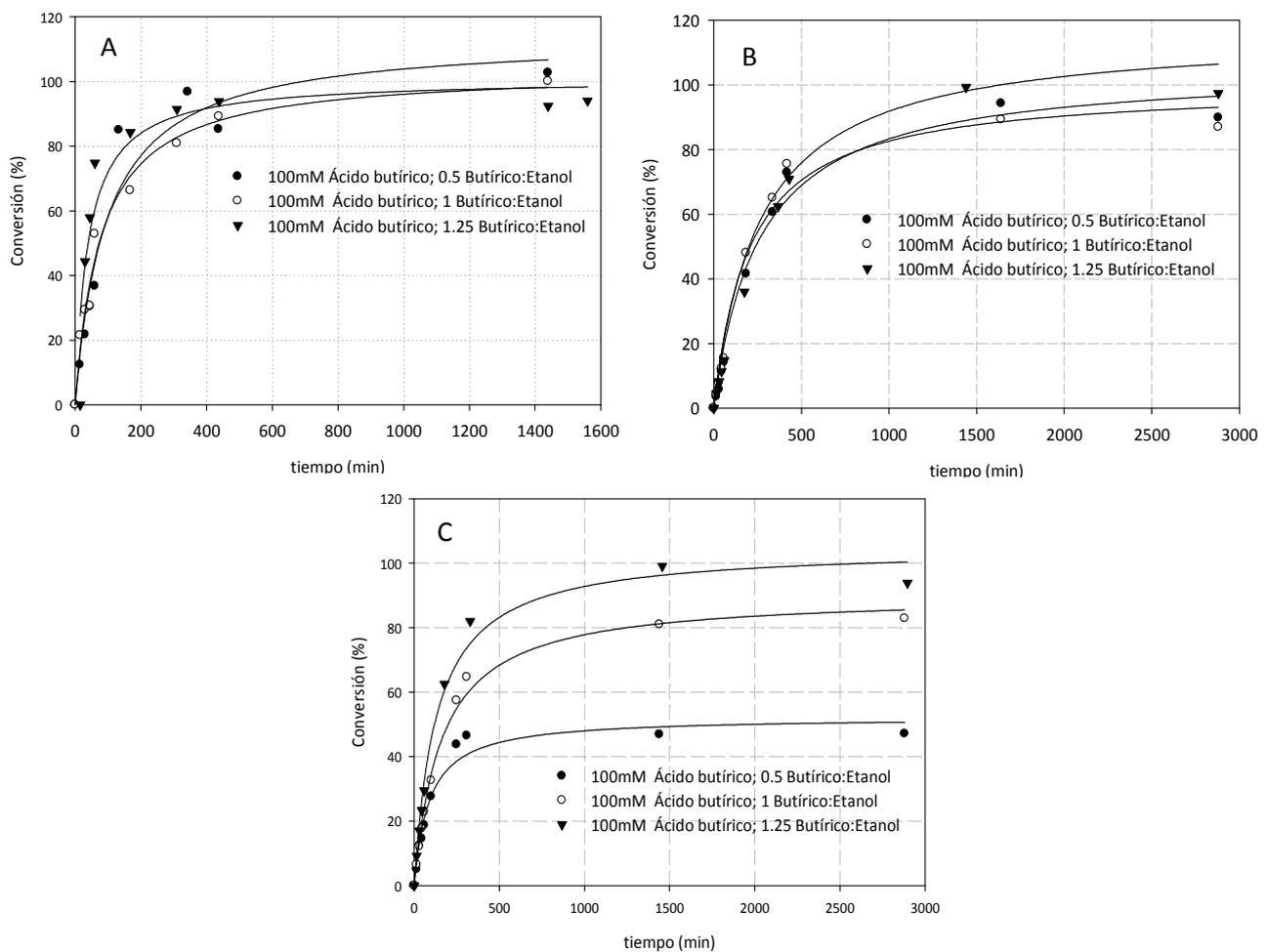


Figura 4.3.6. Efecto de la relación de sustratos sobre el porcentaje de conversión frente al tiempo para la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando (A) rROL-EP100 desecado, 30°C, 250 rpm, 100UA, n-Hexano, (B) rROL-Eupergit®CM desecad, 30°C, 450 rpm, 150UA, Isooctano y (C) rROL-Sepabeads desecado, 35°C, 250 rpm, 550UA, Isooctano.

Al observarse un efecto negativo de un exceso de etanol en todos los casos, puede realizarse la hipótesis de un efecto inhibitorio sobre la reacción por parte del alcohol, debido a una desactivación enzimática (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2005; Pires-Cabral *et al.*, 2007; Gogoi *et al.* 2008; Hassan *et al.*, 2010). Otro factor que podría explicar este efecto podría estar relacionado con el mecanismo cinético descrito para las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas (Beer *et al.*, 1996; Paiva *et al.*, 2000; Bayramoğlu *et al.*, 2001), según este mecanismo, el primer paso de la reacción de síntesis consiste en la unión de la molécula del ácido a la enzima. Por tanto, a relaciones bajas de ácido:etanol podría estar favorecida la unión inicial de la enzima con

una molécula de etanol en el primer paso, compitiendo con el ácido, afectándose negativamente a la velocidad de reacción (Bayramoğlu *et al.*, 2011).

En cuanto al efecto negativo sobre la velocidad inicial provocado por un exceso de ácido sobre rROL-Eupergit®CM, se ha descrito también por otros autores (Chen, 1996) al utilizar biocatalizadores derivados de soportes hidrofílicos, como es el caso que nos ocupa.

Tras analizar cada parámetro, en la tabla 4.3.7 se resumen los valores óptimos de cada variable para cada uno de los biocatalizadores utilizados y en la figura 4.3.7 se muestran los perfiles de reacción a estas condiciones.

Tabla 4.3.7. Valores óptimos de los parámetros estudiados en la síntesis de etil butirato mediante rROL inmovilizada en EP100, Eupergit®CM y Octadecil-Sepabeads

	rROL-EP100	rROL-Eupergit® CM	rROL-Sepabeads
Agua en el biocatalizador	Desecado	Desecado	Desecado
Temperatura	30°C	30°C	35°C
Velocidad de agitación	250 rpm	450 rpm	250 rpm
Actividad inicial cargada	100 UA	150 UA	550 UA
Solvente	Hexano	Isooctano	Isooctano
Relación molar ácido:alcohol	1.25	1.25	1.25
Velocidad inicial de reacción (mmol/mL·min)	$2.50 \cdot 10^{-3} \pm 1.26 \cdot 10^{-4}$	$1.89 \cdot 10^{-4} \pm 2.45 \cdot 10^{-5}$	$6.06 \cdot 10^{-4} \pm 7.70 \cdot 10^{-5}$
Velocidad inicial de reacción (mmol/UA·mL·min)	$2.50 \cdot 10^{-5} \pm 1.26 \cdot 10^{-6}$	$1.26 \cdot 10^{-6} \pm 1.63 \cdot 10^{-7}$	$1.10 \cdot 10^{-6} \pm 1.40 \cdot 10^{-7}$
Conversión (%)	100	99.3	99.1

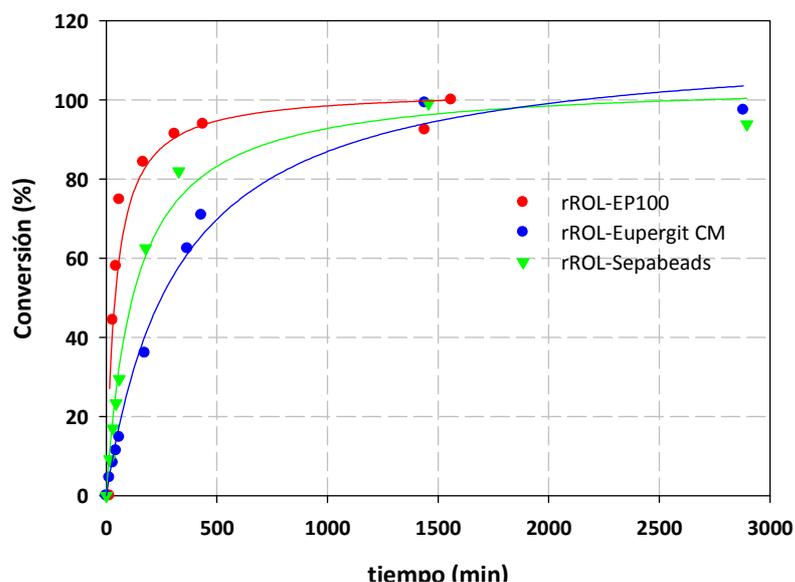


Figura 4.3.7. Conversión de la síntesis de butirato de etilo con rROL-EP100, rROL-Eupergit®CM y rROL-Sepabeads en las mejores condiciones para cada biocatalizador.

Como puede apreciarse en la tabla 4.3.7, rROL-EP100 fue el mejor biocatalizador en términos de velocidad inicial de reacción. Basándose en estos resultados, este biocatalizador sería escogido para continuar los estudios de biocatálisis de la reacción de síntesis de butirato de etilo. Sin embargo, debe destacarse la importancia de la estabilidad de los biocatalizadores ya que nos marcará sus vidas útiles y por tanto, repercutirá sobre el coste total del proceso. Es por esto que, antes de decidir el biocatalizador óptimo se llevaron a cabo estudios de estabilidad que se presentarán en los apartados 4.3.3 y 4.3.4.

4.3.2 Análisis de las limitaciones difusionales internas.

Como ya se ha comentado en el apartado 4.3.1.3, en reacciones heterogéneas pueden existir limitaciones difusionales externas y/o internas. En dicho apartado se han comentado las causas de las limitaciones difusionales externas y se han minimizado mediante un estudio del efecto de la agitación sobre la evolución de las reacciones.

Las limitaciones difusionales internas se producen debido a que los sustratos deben difundir a través de los poros del biocatalizador hasta llegar a los centros activos que se encuentran en el

interior de las partículas. En este apartado se estudiará si existen posibles limitaciones difusionales internas en las reacciones llevadas a cabo mediante rROL-EP100, rROL-Eupergit®CM o rROL- Sepabeads, en las condiciones óptimas.

El módulo de Weisz-Prater permite evaluar la influencia de la difusión en los poros (Blanch *et al.*, 1997). Este módulo es particularmente útil ya que proporciona un valor adimensional, calculado únicamente con parámetros observables o fácilmente calculables.

$$\Phi = \frac{r_{obs} \cdot \rho_p}{D_{ef} \cdot S_f} \cdot \left(\frac{V_p}{A_p} \right)^2$$

Donde,

(4.3.1)

r_{obs} = velocidad observada (mol/g_p·s)

ρ_p = densidad de la partícula (g_p/cm_p³)

D_{ef} = Difusividad efectiva (m³/cm_p·s)

S_f = concentración del sustrato en el fluido (mol/m³)

V_p = Volumen de partícula (cm_p³)

A_p = Área de partícula (cm_p²)

Este módulo adimensional puede relacionarse matemáticamente con el factor de eficacia, definido como el cociente entre la velocidad de reacción observada y la velocidad de reacción que se obtendría sin limitaciones difusionales. Para valores del módulo de Weisz-Prater inferiores a 0.3 puede considerarse que no existen limitaciones difusionales internas ya que el factor de eficacia toma valores muy próximos a la unidad (Blanch *et al.*, 1997).

Como queda plasmado en la ecuación 4.3.1, para el cálculo de este módulo adimensional es necesaria la estimación del valor de la difusividad efectiva D_{ef} de los sustratos en los poros del biocatalizador. Éste parámetro puede estimarse a partir del valor de la difusividad del sustrato en el medio de reacción corregido en función de las características de los poros de las partículas de biocatalizador:

$$D_{ef} = D_s \cdot \frac{\varepsilon_p}{\tau} \cdot H \quad (4.3.2)$$

Donde:

D_{ef} =Difusividad efectiva (cm^2/s)

D_s =Difusividad en el fluido (cm^2/s)

ε_p = porosidad

τ =tortuosidad

H= factor de constricción

La difusividad en el fluido puede ser estimada mediante correlaciones como la de Nakanishi (Reid *et al.*, 1986), mientras que la porosidad es un factor que puede extraerse de los datos comerciales del soporte. La tortuosidad, en cambio, es un valor que en ocasiones es difícil de determinar, de modo que suelen utilizarse valores típicos como 1.41 (Fogler, 2006). En cuanto al factor de constricción, puede tomarse como la unidad si el radio de las moléculas es bastante menor al de los poros.

En la tabla 4.3.8 y 4.3.9 se muestran los resultados de los cálculos del módulo de Weisz-Prater obtenido para cada una de las reacciones, catalizadas por los tres tipos de soportes en las condiciones óptimas, así como los valores de los parámetros necesarios para su determinación.

Tabla 4.3.8. Valores de los módulos de Weisz-Prater para butírico obtenidos para las reacciones de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada en EP100, Eupergit®CM y Octadecil-Sepabeads en las mejores condiciones de cada biocatalizador.

Biocatalizador	r_{obs} ($\text{mol}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$)	Peso catalizador (mg)	ρ_p (g_p/mL_p)	r_{obs} ($\text{mol}/\text{m}_p^3 \cdot \text{s}$)	D_s (cm^2/s)	ε_p	D_{ef} (cm^2/s)	ϕ
rROL-EP100	$4.17 \cdot 10^{-2}$	240	0.902	1.57	$3.17 \cdot 10^{-5}$	0.72	$1.61 \cdot 10^{-5}$	0.1
rROL-Eupergit®CM	$3.15 \cdot 10^{-3}$	350	1.200	0.108	$2.06 \cdot 10^{-5}$	0.65	$9.50 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-4}$
rROL-Sepabeads	$1.01 \cdot 10^{-2}$	68	0.714	1.06	$2.21 \cdot 10^{-5}$	0.2	$3.13 \cdot 10^{-6}$	0.2

Tabla 4.3.9. Valores de los módulos de Weisz-Prater para etanol obtenidos para las reacciones de síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada en EP100, Eupergit®CM y Octadecil-Sepabeads en las mejores condiciones de cada biocatalizador.

Biocatalizador	r_{obs} (mol/m ³ ·s)	Peso catalizador (mg)	ρ_p (g _p /mL _p)	r_{obs} (mol/m _p ³ ·s)	D_s (cm ² /s)	ϵ_p	D_{ef} (cm ² /s)	ϕ
rROL-EP100	$4.17 \cdot 10^{-2}$	240	0.902	1.57	$3.64 \cdot 10^{-5}$	0.72	$1.85 \cdot 10^{-5}$	0.11
rROL-Eupergit®CM	$3.15 \cdot 10^{-3}$	350	1.200	0.108	$2.39 \cdot 10^{-5}$	0.65	$1.1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-3}$
rROL-Sepabeads	$1.01 \cdot 10^{-2}$	68	0.714	1.06	$2.58 \cdot 10^{-5}$	0.2	$3.65 \cdot 10^{-6}$	0.2

En ninguno de los casos el módulo estimado superó el valor de 0.3, indicando que las limitaciones difusionales internas eran desestimables. Como puede observarse, los valores más pequeños del módulo de Weisz-Prater se obtuvieron para el caso de rROL-Eupergit®CM debido, en mayor medida, al menor tamaño medio de partícula de este derivado en comparación con el resto.

Por tanto, según los resultados obtenidos, la resistencia de transferencia de materia interna no representaba la etapa limitante de las reacciones en las condiciones óptimas determinadas previamente.

4.3.3 Estabilidad en disolventes orgánicos de rROL-EP100, rROL-Eupergit®CM y rROL-Sepabeads.

Como se ha mencionado anteriormente, los disolventes orgánicos pueden causar una desnaturalización enzimática debido a la distorsión que provocan en la capa de agua que rodea al biocatalizador, la cual tiene una gran importancia en cuanto a la conformación enzimática (Mateo *et al.*, 2007). En este trabajo la estabilidad de los tres biocatalizadores utilizados ha sido analizada mediante dos procedimientos: la determinación de la actividad residual tras la incubación en diferentes disolventes orgánicos analizada según el test de actividad descrito en el apartado 3.2, y el estudio de la estabilidad operacional a las condiciones óptimas, el cual se discutirá en el siguiente apartado.

El porcentaje de actividad residual alcanzado por cada uno de los biocatalizadores, tras 1 hora o 24 horas de incubación, en hexano, heptano e isooctano, puede observarse en la figura 4.3.8. Se observó muy baja estabilidad del derivado rROL-EP100 en comparación con los otros dos derivados inmovilizados. Este biocatalizador perdió más de un 80% de su actividad inicial tras 1 hora de permanecer incubado en hexano, más de un 60% en heptano y prácticamente la pérdida total de actividad tras 1 hora en isooctano. Tras 24 horas de incubación, prácticamente no se detectó actividad tras la incubación en cualquiera de los disolventes utilizados.

rROL-Eupergit®CM mostró una mejor estabilidad en hexano e isooctano, alcanzando valores de hasta el 70% de actividad residual en ambos casos, tras una hora de incubación. Tras 24 horas, el derivado inmovilizado perdió como mínimo el 60% de su actividad inicial.

Respecto a rROL-Sepabeads, se observó que fue el derivado más estable en los tres disolventes utilizados. Tras una hora de incubación, mantuvo el 80% de su actividad inicial y tras 24 horas ésta decreció en hexano y heptano, manteniéndose constante en isooctano. El derivado de octadecyl-Sepabeads mostró la mejor estabilidad, corroborando estudios previos que describían este soporte como un prometedor material para la inmovilización de lipasas, debido a su elevada estabilidad frente temperatura, co-solventes orgánicos o incluso con peróxido de hidrógeno (Palomo *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2011). También pueden encontrarse en la bibliografía, con otro tipo de soportes, altos valores de actividad residual de la lipasa nativa de *R. oryzae* inmovilizada (Kharrat *et al.*, 2011).

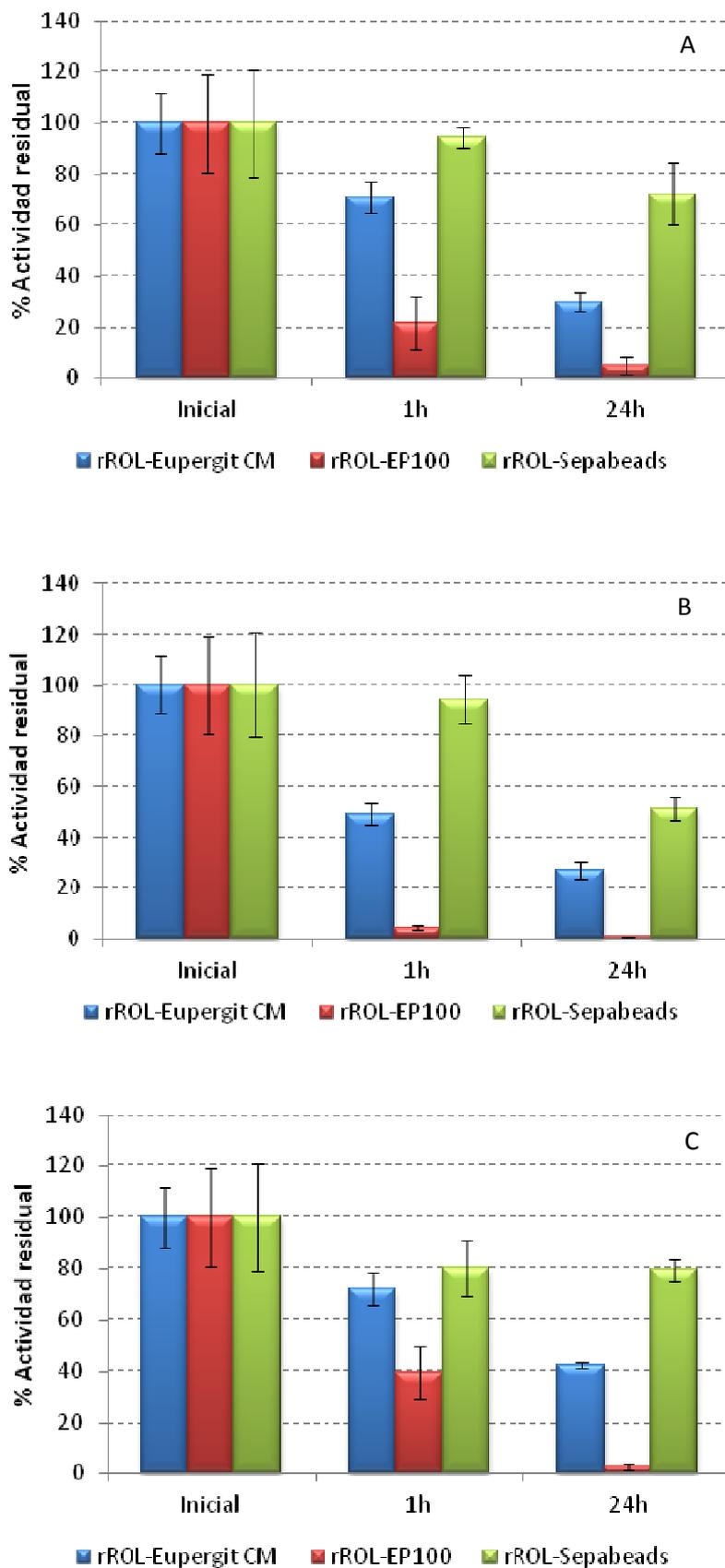


Figura 4.3.8. Porcentaje de actividad residual de rROL-EP100, rROL-Eupergit®CM y rROL-Sepabeads tras 1h y 24 h de incubación de hexano (A), heptano (B) e isooctano(C).

Como ya se ha comentado, la velocidad de reacción alcanzada utilizando rROL-EP100 fue la mayor de entre los tres biocatalizadores. Es por esto que, con el fin de no descartar este biocatalizador por su baja estabilidad, se decidió realizar una reactivación de la enzima inmovilizada.

El replegamiento de enzimas inactivadas mediante la incubación en medios “reactivantes” es un método muy útil en la reactivación enzimática. En la bibliografía encontramos ejemplos de reactivaciones mediante incubación acuosa tras desactivaciones en medios orgánicos o en presencia de solventes. Son ejemplos la reactivación de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* mediante su incubación en medios acuosos en presencia de detergentes (Rodrigues *et al.*, 2009) o la reactivación de α -quimotripsina o la penicilina G acilasa (Soler *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2011).

Así pues, rROL-EP100 fue incubada en agua destilada, en una disolución de glucosa 30 g/L y en una de lactosa 30 g/L tras su incubación en hexano durante 1 hora y 24 horas a 30°C. Los resultados de actividad obtenidos después del tratamiento se muestran en la figura 4.3.9.

Como puede apreciarse en la figura, no se consiguió un incremento notable de la actividad residual de rROL-EP100 tras incubarse en medio acuoso, en comparación con los valores obtenidos sin incubación.

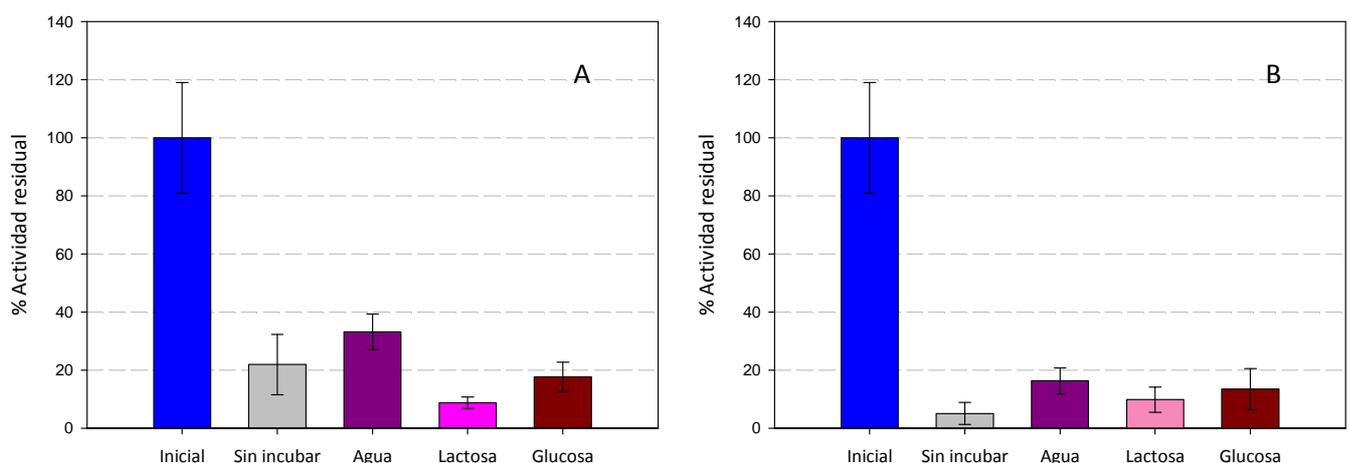


Figura 4.3.9. Porcentaje de actividad residual de rROL-EP100 tras la reactivación mediante incubación en solución acuosa después de su desactivación tras 1h en hexano (A), y 24 horas en hexano (B).

Vistos estos resultados podría desestimarse este biocatalizador debido a su baja estabilidad en disolventes orgánicos. Sin embargo, debería comprobarse su estabilidad operacional, la cual indica la capacidad del biocatalizador de ser reutilizado en la reacción de interés de forma consecutiva.

4.3.4 Estabilidad operacional de rROL-EP100, rROL-Eupergit[®]CM y rROL-Sepabeads en reacciones en discontinuo en la síntesis de butirato de etilo.

La estabilidad operacional de los biocatalizadores se analizó mediante la conversión alcanzada tras discontinuos consecutivos llevados a cabo en las condiciones óptimas. La actividad inicial de cada biocatalizador se seleccionó para conseguir el máximo de conversión en el mínimo tiempo posible, puesto que a menor tiempo de reacción, mayor número de reacciones discontinuas podrá realizar un biocatalizador determinado. Los resultados se muestran en la figura 4.3.10.

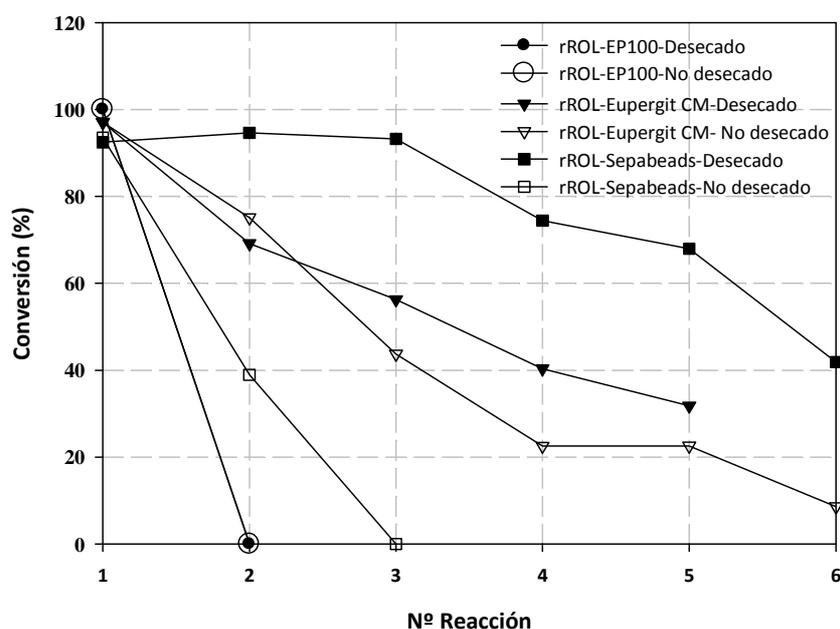


Figura 4.3.10. Conversión alcanzada tras reacciones en discontinuo consecutivos en la reacción de síntesis de butirato de etilo utilizando rROL-EP100, rROL-Eupergit[®]CM y rROL-Sepabeads en las condiciones óptimas.

Los biocatalizadores fueron utilizados desecados en el primer proceso discontinuo ya que, como se ha demostrado en el apartado 4.3.1, se obtenían mayores velocidades iniciales y conversiones finales utilizando los biocatalizadores desecados. Sin embargo, se siguieron dos procedimientos

a la hora de reutilizar los derivados inmovilizados tras la primera reacción. Por un lado el biocatalizador era recuperado y lavado con solvente antes de ser reutilizado mientras que por otro, el biocatalizador, aparte de ser lavado con solvente, se desecó 24 horas antes de volverse a cargar en una nueva reacción. Estos procedimientos se llevaron a cabo con el objetivo de determinar si la acumulación de agua entre reacción y reacción repercutía en la conversión alcanzada.

Como puede apreciarse en la figura 4.3.10, rROL-EP100 no pudo ser reutilizado en un segundo discontinuo, ni siquiera utilizándolo desecado. Los resultados mostraron que no se produjo éster más allá de un primer discontinuo de manera que podría deducirse que la ausencia de capacidad para ser reutilizado se debía a una baja estabilidad, estando de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior. Por tanto, rROL-EP100 quedó descartado para futuras investigaciones en la síntesis de butirato de etilo.

En el caso de rROL-Eupergit®CM, se obtuvo una disminución de un 30% aproximadamente en cada uno de los discontinuos consecutivos en el caso de no desecar el soporte entre reacciones, probablemente debido a una acumulación sucesiva de agua. Utilizando el biocatalizador desecado antes de empezar el siguiente discontinuo, sólo se apreció un ligero incremento de la conversión alcanzada a partir del tercer discontinuo, en comparación con el uso del biocatalizador sin desecar.

Por otro lado, rROL-Sepabeads se vio fuertemente afectado por el contenido en agua ya que, sin desecar, la conversión decreció drásticamente hasta el punto de no detectarse producción de éster en el tercer discontinuo. En el caso de desecar el biocatalizador entre discontinuos, se alcanzó más de un 95% de conversión hasta el tercer discontinuo con un decrecimiento de la conversión en las siguientes reacciones. Cabe destacar que se alcanzó un 40% de conversión tras la sexta reutilización.

Tras analizar la estabilidad operacional de los biocatalizadores se decidió comprobar si se producía una desorción de la lipasa de soporte tras estar sometidas a un medio orgánico ya que si ocurriera dicha desorción, ésta afectaría a la capacidad catalítica del biocatalizador al producirse una pérdida de enzima en cada discontinuo. Tras incubar los biocatalizadores en medio orgánico y resuspender en agua destilada las posibles proteínas desorbidas, se realizó un análisis de proteína total de las muestras obtenidas que no reveló la presencia de proteína en las

muestras. Para corroborar los resultados obtenidos en los análisis de proteína total se decidió hacer un SDS-PAGE. El resultado se muestra en la figura 4.3.11.

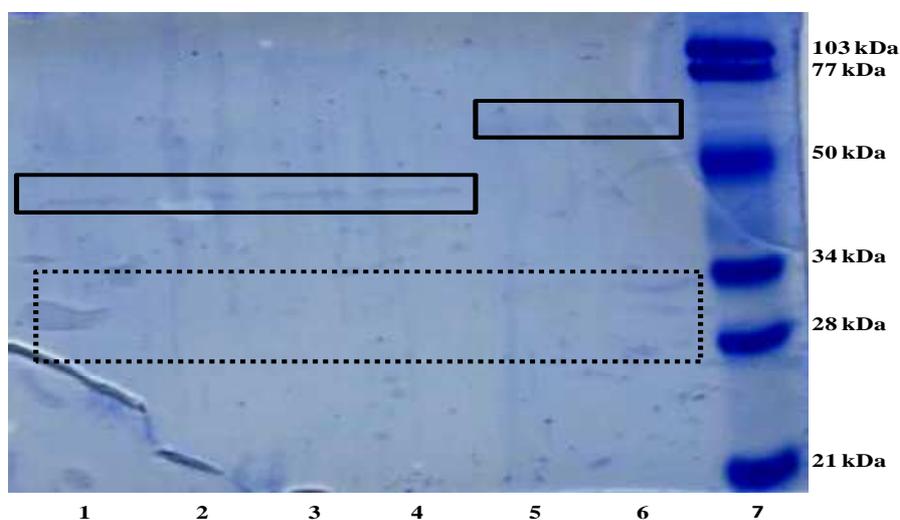


Figura 4.3.11. SDS-PAGE de las muestras obtenidas de los experimentos de desorción proteica en medio orgánico de rROL-Sepabeads (1-2), rROL-Eupergit®CM (3-4) y rROL-EP100 (5-6). El carril número 7 corresponde al marcador de masa molecular. Las muestras se obtuvieron tras disolver en medio acuoso las proteínas resorbidas tras la incubación de los biocatalizadores durante 24 horas a 30°C en hexano a 250 rpm.

Con el gel de poliacrilamida se demostró que no se producía desorción de lipasa (cuadro punteado) en ninguno de los biocatalizadores, sin embargo, se detectó la presencia de ciertas proteínas de alta masa molecular. Se visualizó una proteína de más de 50 kDa en las muestras derivadas de rROL-EP100, mientras que otra proteína de masa ligeramente inferior a 45 kDa se detectó en el caso de las muestras procedentes de las incubaciones de rROL-Eupergit®CM y rROL-Sepabeads.

Por tanto, tras los resultados obtenidos en este capítulo, se escogió rROL-Sepabeads como el biocatalizador más idóneo para síntesis de butirato de etilo debido, en mayor medida, a su elevada estabilidad en comparación con el resto de biocatalizadores probados.

4.3.5 Conclusiones

La lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*, fue aplicada como biocatalizador de la síntesis de butirato de etilo en medio orgánico. La lipasa fue utilizada inmovilizada en tres diferentes tipos de soportes: EP100, Eupergit[®] CM y Octadecyl-Sepabeads.

Se demostró que los tres derivados inmovilizados probados son capaces de llevar a cabo la biocatálisis de la síntesis de este aromatizante. Se realizaron estudios de la influencia de varios parámetros de reacción con el fin de encontrar los valores óptimos de éstos para cada biocatalizador con el objetivo de determinar las mejores condiciones de cada biocatalizador y poder comparar entre ellos.

Este estudio mostró que todos los derivados inmovilizados trabajaron mejor cuando éstos fueron previamente desecados y que se obtenían mejores resultados utilizando un ligero exceso de ácido butírico. Por otro lado, no se detectaron grandes diferencias al utilizar cada uno de los tres solventes escogidos (hexano, heptano e isooctano).

El derivado inmovilizado obtenido mediante la formación de enlace covalente (rROL-Eupergit[®] CM) mostró un mejor comportamiento a altas velocidades de agitación comparado con los derivados inmovilizados obtenidos por adsorción. En cuanto a la temperatura, su óptimo se situó en 30°C, excepto para rROL-Sepabeads, el cual presentó los mejores resultados a 35°C.

Analizando los resultados obtenidos a las condiciones óptimas para cada biocatalizador, quedó patente que, desde un punto de vista de velocidad inicial de síntesis, rROL-EP100 era el mejor biocatalizador de los tres. Sin embargo, éste mostró muy baja estabilidad tras incubarse en medio orgánico, al igual que la imposibilidad de ser reutilizado en sucesivas reacciones.

Aunque se intentó reactivar este derivado inmovilizado en soluciones acuosas, no se obtuvieron resultados que probaran una reactivación suficiente como para proseguir adelante los estudios de reacción con este biocatalizador.

Los estudios de estabilidad también revelaron una alta estabilidad de rROL-Sepabeads, sugiriéndose este biocatalizador como la mejor opción para la síntesis de butirato de etilo catalizado por la lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* inmovilizada.

4.3.6 Bibliografía

Bayramoğlu G, Hazer B, Altıntaş B, Arica MY, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochem.* 46 (2011) 372-378.

Beer HD, Wohlfahrt G, McCarthy JEG, Schomburg DS, Schmid RD, Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants, *Protein Eng.* 9 (1996) 507-517.

Ben Salah R, Ghamghui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y, Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*, *J. Biosci. Bioeng.* 4 (2007) 368-372.

Blanch HW, Clarck DS, *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker 1997.

Chen J, Production of ethyl butyrate using gel –entrapped *Candida cylindracea* lipase, *J. Ferment. Bioeng.* 82 (1996) 404-407.

Fogler H S, *Elements of chemical reaction engineering*, Fourth edition, Prentice Hall, 2006.

Ghamgui H, Karra-Chaâbouni M, Gargouri Y, 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system, *Enzyme Microb. Tech.* 35 (2004) 335-363.

Gogoi S, Pahtak MG, Dutta A, Dutta NN, Porcine pancreas lipase catalyzed synthesis of lauryl laurate, in organic solvent media: A kinetic study, *Indian J. Biochem. Bio.* 45 (2008) 192-197.

Grace Tan HS, Yu B, Curran P, Quan Liu S, Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream, *Food Chem.* 124 (2011) 80-847.

Hassan Ahmed E, Raghavendra T, Madamwar D, An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter sp. EH28*: Application for ethyl caprylate synthesis, *Bioresource Technol.* 101 (2010) 3628-3634.

Hernandez K, Fernandez-Lafuente R, Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide, *Process Biochem.* 46 (2011) 873-878.

Kharrat N, Ben Ali Y, Marzouk S, Gargouri Y, Karra-Châabouni M, Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with free enzyme, *Process Biochem.* 46 (2011) 1083-1089.

- Klibanov AM, Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, Trends Biotechnol. 3 (1997) 97-101.
- Koller G, Aris MJ, Ujang Z, Vaidya AM, Dependence of the synthetic activity of nine immobilized lipases on water activity, Biocatal. Biotransfor. 19 (2001) 37-49.
- Laane C., Boeren S., Holhorst R.K., Veeger C., Rules for optimization of Biocatalysis in organic solvents, Biotechnol. Bioeng. 30 (1987) 81-87.
- Ma L, Persson M, Adlercreutz P, Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions, Enzyme Microb. Tech. 31 (2002) 1024-1029.
- Macedo GA, Pastore GM, Rodrigues MI, Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus oryzae* lipase with a central composite rotatable design, Process Biochem. 39 (2004) 687-692.
- Mahapatra P, Kumari A, Garlapati VK, Banerjee R, Nag A, Enzymatic synthesis of fruit flavour esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology, J. Mol. Catal. B-Enzym. 60 (2009) 57-63.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, Enzyme Microb. Tech. 40 (2007) 1451-1463.
- Miranda V, Wilson L, Cárdenas C, Illanes A, Reactivation of immobilized penicillin G acylase: Influence of cosolvents and catalytic modulators, J. Mol. Catal. B-Enzym. 68 (2011) 77-82.
- Paiva AL, Balcão VM, Malcata FX, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, Enzyme Microb. Tech. 27 (2000) 187-204.
- Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisan JM, Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, J. Mol. Catal. B-Enzym. 19-20 (2002) 279-286.
- Pires-Cabral P, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Modeling the production of ethyl butyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, Biochem. Eng. J. 33 (2007) 148-158.
- Pires-Cabral P, Dubreucq E, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Partitioning of water in organic system with lipase immobilized in polyurethane foams, Biochem. Eng. J. 26 (2005) 29-37.

Rodrigues RC, Godoy CA, Filice M, Bolivar JM, Palau-Ors A, García-Vargas JM, Romero O, Wilson L, Ayub MAZ, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.* 44 (2009) 641-646.

Rodriguez-Nogales JM, Roura E, Contreras E, Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach, *Process Biochem.* 40 (2005) 63-68.

Reid RC, Prausnitz JM, Poling BE, The properties of gases and liquids, Fourth edition, McGraw-Hill, 1986.

Soler G, Bastida A, Blanco RM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after incubation by organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta* 1339 (1997) 167-175.

Xu Y, Wang D, Mu X Q, Zhao GA, Zhang KC, Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 18 (2002) 29-37.



4.4 Efecto de la concentración y relación de sustratos en la síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada en Octadecil-Sepabeads

4.4 Efecto de la concentración y relación de sustratos en la síntesis de butirato de etilo mediante rROL inmovilizada.

El efecto de los sustratos sobre la conversión y velocidad inicial de reacción ha sido estudiado brevemente en el capítulo anterior para cada uno de los biocatalizadores aplicados en la síntesis de butirato de etilo. Sin embargo, el efecto combinado de la concentración de butírico y su relación molar con el etanol sobre los parámetros de reacción, requiere de un estudio más amplio del realizado hasta ahora, el cual proporcionaba una breve descripción del comportamiento de la síntesis frente a estas variables.

En el presente capítulo se estudiará en más profundidad el efecto combinado de estas variables sobre la reacción catalizada por el soporte escogido en el capítulo anterior como el óptimo, rROL-Sepabeads. Para ello se llevó a cabo un diseño de experimentos de tipo Box-Hunter y se realizó un ajuste a modelos matemáticos polinómicos tanto de la conversión y la velocidad de reacción como de la producción del aromatizante.

4.4.1. Diseño de experimentos y resultados obtenidos.

Para el estudio del efecto de la concentración de butírico y la relación molar ácido:alcohol sobre la reacción de síntesis de butirato de etilo, se realizó el diseño de experimentos descrito en el apartado 3.20.

En primer lugar debían escogerse los rangos de las variables independientes, los cuales se definieron según valores bibliográficos (Pires-Cabral et al., 2005; Pires-Cabral et al., 2007). Por tanto, la concentración de ácido butírico se fijó entre 10 y 750 mM y la relación molar butírico:etanol se estableció entre 0.5 y 2.

A partir de los límites escogidos para las variables se llevó a cabo el diseño de experimentos, descrito en el apartado 3.20, obteniéndose el esquema descrito en la figura 4.4.1

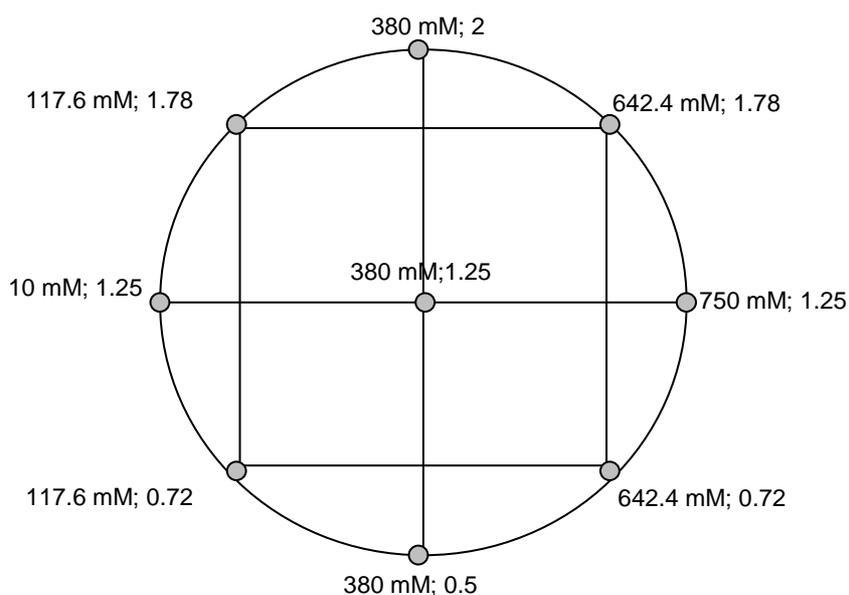


Figura 4.4.1. Diagrama del diseño de experimentos para el estudio la conversión, la velocidad inicial y la producción, de reacciones de síntesis de butirato de etilo a partir de rROL-Sepabeads

Tras conocer los valores de las variables de las 9 condiciones experimentales necesarias, se llevaron a cabo las reacciones de síntesis, tal y como se describe en los apartados 3.16 y 3.20.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.4.1.

Tabla 4.4.1. Velocidad inicial de reacción, conversión y producción obtenidos para la síntesis de butirato de etilo mediante rROL-Sepabeads a 35°C, 250rpm, Isooctano y 5500 UA, en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

Butírico (mM)	Relación molar Butírico:Etanol	Velocidad inicial·10 ⁴ (mmol/mL·min)	% Conversión	Producción (mmol/h)
10.0	1.25	1.710	100.0	0.1060
117.6	1.78	11.880	94.0	0.1240
117.6	0.72	5.400	72.0	0.0790
380.0	2.00	10.940	10.2	0.0750
380.0	0.50	1.300	12.7	0.0300
642.4	1.78	2.160	2.7	0.0152
642.4	0.72	0.664	4.4	0.0159
750.0	1.25	5.600	8.4	0.0230
380.0	1.25	14.600	25.3	0.1120
380.0	1.25	13.600	26.5	0.0940
380.0	1.25	13.509	25.6	0.0940
380.0	1.25	11.910	25.6	0.0740

A partir de los datos anteriores, se ajustaron los datos de velocidad, conversión y producción a al modelo siguiente:

$$\begin{aligned}
 \text{Respuesta} = & a + b \cdot [\text{Butírico}] + c \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol}) + d \cdot [\text{Butírico}]^2 + e \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol})^2 + \\
 & + f \cdot [\text{Butírico}] \cdot (\text{Butírico} : \text{Etanol})
 \end{aligned}$$

(4.4.1)

De esta forma se construyeron las superficies de respuesta para cada variable de interés en función de la concentración de butírico y la relación molar de butírico y etanol, con el objetivo de encontrar los valores óptimos de estas variables.

4.4.1.1 Efecto sobre la velocidad inicial de reacción.

La expresión cinética más conocida para una reacción enzimática es la expresada por Michaelis-Menten. Sin embargo, no todas las reacciones catalizadas por enzimas pueden describirse matemáticamente tal y como describe dicha ecuación, cosa que ocurre con la mayoría de las lipasas.

Se han descrito diferentes mecanismos que describen las cinéticas de las reacciones de síntesis de ésteres catalizadas por lipasas. Algunos de ellos corresponden a modelos del tipo Michaelis-Menten con inhibición por producto (Rodrigues-Nogales *et al.*, 2005), Ping-Pong Bi-Bi (Paiva *et al.*, 2000; Mahapatra *et al.*, 2009); Ping-Pong Bi-Bi con inhibición de ácido o etanol (Bezbradica *et al.*, 2007) u otras derivaciones de este modelo (Aziah Serri *et al.*, 2010).

Sin embargo, en muchas ocasiones, el ajuste de las velocidades de reacción a ecuaciones que describen un determinado mecanismo cinético no resulta exitoso.

En el presente estudio, se evaluó el efecto de la concentración de butírico y de la relación molar butírico:etanol sobre la velocidad inicial de reacción, ajustando los datos obtenidos a un modelo cuadrático (ecuación 4.4.1). De este modo pudo describirse el efecto de estas variables sobre la actividad enzimática según una ecuación sencilla, que deja a un lado la descripción del mecanismo de reacción.

En la tabla 4.4.2 se encuentran los valores de los parámetros obtenidos así como el valor del parámetro estadístico p para cada uno de ellos.

Tabla 4.4.2. Parámetros de las ecuaciones empíricas obtenidas para las superficies de respuesta de la velocidad inicial de reacción de la síntesis de butirato de etilo utilizando rROL-Sepabeads

Parámetro	Valor	p -value
a	13.40	0.0001
b	-1.12*	0.344
c	2.70	0.0487
d	-4.86	0.0075
e	-3.62	0.0259
f	-1.21*	0.4517

*parámetro no significativo ($p > 0.05$)

Por tanto, el modelo obtenido pudo expresarse según la ecuación 4.4.2:

$$\begin{aligned} \text{Velocidad inicial (mmol/mL} \cdot \text{min)} \cdot 10^4 &= 13.404 + 2.704 \cdot (\text{Butírico : Etanol}) - 4.856 \cdot [\text{Butírico}]^2 \\ &- 3.6162 \cdot (\text{Butírico : Etanol})^2 \quad R^2 = 0.9082 \quad R_{aj}^2 = 0.8248 \end{aligned} \quad (4.4.2)$$

En la figura 4.4.2 se muestra la superficie de respuesta obtenida para la velocidad inicial de reacción según la ecuación anterior.

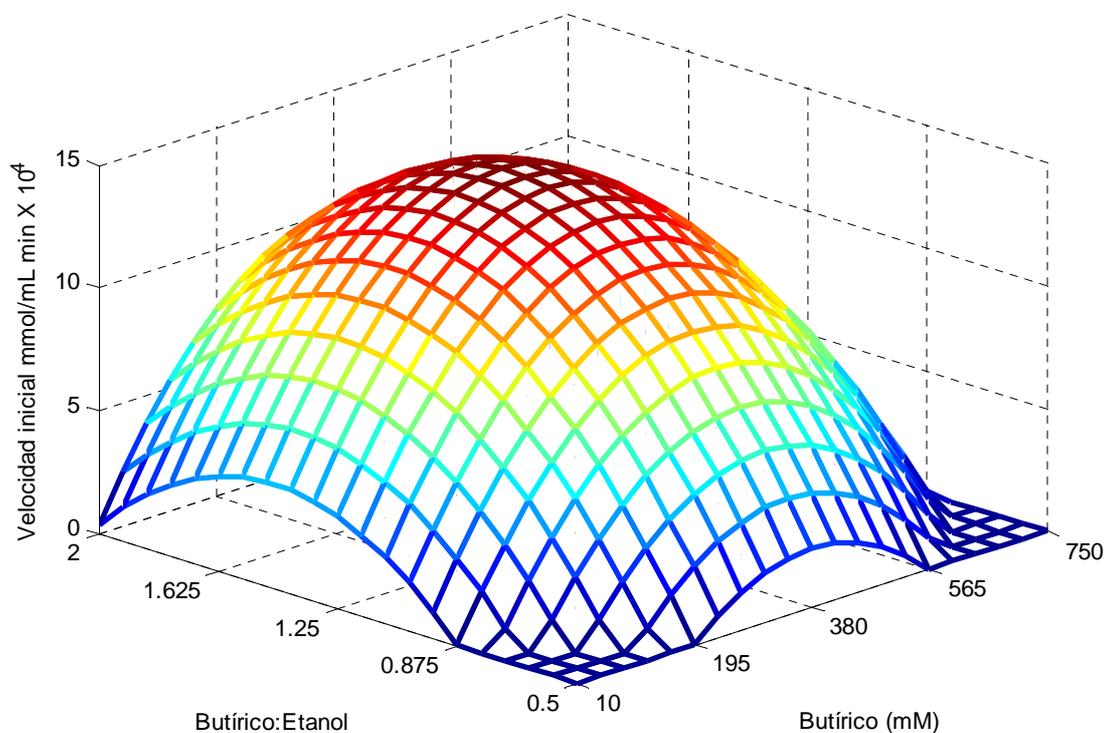


Figura 4.4.2. Superficie de respuesta obtenida para la velocidad inicial de reacción obtenida para la síntesis de butirato de etilo mediante rROL-Sepabeads a 35°C, 250rpm, Isooctano y 5500 UA, en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

De la ecuación del modelo se extrae que los efectos más significativos sobre la velocidad inicial son los aportados por los parámetros cuadráticos de la concentración de ácido y la relación molar de sustratos, teniendo un efecto ligeramente más significativo el parámetro cuadrático de

la concentración de butírico. Por otro lado, la relación molar, a diferencia de la concentración de ácido, también presentaba un notable efecto lineal sobre la velocidad. Cabe destacar, que el efecto combinado de ambas variables pudo ser desestimado.

Mediante la expresión matemática 4.4.3, siendo f la ecuación 4.4.2, pudo encontrarse las condiciones a las cuales se obtiene la máxima velocidad inicial.

$$\nabla f(\text{butírico}; \text{butírico: etanol}) = 0 \quad (4.4.3)$$

El máximo de velocidad se localizó a una concentración de butírico de 380 mM y una relación butírico:etanol de 1.45. El efecto negativo de un exceso de ácido queda patente por encima de los 380 mM, indicando una inhibición causada por el ácido por encima de dicho valor. Otros autores han descrito una inhibición de la reacción al incrementarse la concentración de ácido, atribuyéndose este hecho, a una acidificación excesiva de la fase acuosa que recubre la enzima, afectando a su estructura y por tanto a su capacidad catalítica (Alvarez-Macarie *et al.*, 2000; Ben Salah *et al.*, 2007; Ozyilmaz *et al.*, 2010;).

En cuanto a la relación de sustratos, en los estudios previos del capítulo anterior, se observó un efecto negativo a causa de un exceso de etanol. Esto queda patente en la figura 4.4.1 donde se observa la velocidad inicial óptima con un exceso de ácido de 1.45. El efecto negativo de un exceso de etanol sobre la actividad puede deberse, como ya se ha comentado en el capítulo anterior, al mecanismo descrito previamente para la síntesis de ésteres (Paiva *et al.*, 2000; Bayramoğlu *et al.*, 2001; Beer *et al.*, 1996), el cual describe la unión inicial del ácido a la enzima como primera etapa preferente. El efecto de un exceso de alcohol podría conllevar una competencia de estas moléculas con las de ácido en la unión a la enzima en la primera etapa de reacción, comportando de este modo una disminución de la velocidad inicial de reacción.

También se ha descrito la posibilidad de un efecto inhibitorio del alcohol debido a una desactivación enzimática a causa del “secuestro” por parte del alcohol de las moléculas de agua que mantienen la conformación enzimática, ya que al ser un compuesto polar queda acumulado en el microambiente acuoso que envuelve las enzimas. (Ghamgui *et al.*, 2004 ; Rodríguez-Nogales *et al.*, 2005; Pires-Cabral *et al.*, 2007; Gogoi *et al.* 2008; Pires-Cabral *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2010).

4.4.1.2 Efecto sobre la conversión.

Los valores de velocidad inicial nos ofrecen una importante información sobre la reacción. Sin embargo, el efecto de una posible desactivación enzimática puede comportar que las condiciones que ofrecen una mayor velocidad inicial no coincidan con aquellas que conllevan la máxima conversión. El estudio de la conversión final de la reacción, permite intuir la existencia de un fenómeno de desactivación enzimática con el tiempo.

Los valores obtenidos de conversión final se ajustaron a una ecuación de segundo orden (ecuación 4.4.1) en función de la concentración de butírico y la relación molar ácido:alcohol. En la tabla 4.4.3 se muestran los valores obtenidos para cada coeficiente y su valor estadístico p correspondiente.

Tabla 4.4.3. Parámetros de las ecuaciones empíricas obtenidas para la superficie de respuesta de la conversión de de la síntesis de butirato de etilo utilizando rROL-Sepabeads

Parámetro	Valor	p -value
a	25.7	0.0064
b	-39.4	0.0001
c	-1.2*	0.8029
d	18.7	0.0097
e	-2.9*	0.5812
f	0.575*	0.9300

*parámetro no significativo ($p > 0.05$)

Según los datos de la tabla anterior, pudo construirse el modelo expresado según la ecuación 4.4.4:

$$\% \text{Conversión} = 25.7 - 39.4[\text{Butírico}] + 18.7[\text{Butírico}]^2 \quad R^2 = 0.940 \quad R_{aj}^2 = 0.8902 \quad (4.4.4)$$

En la figura 4.1.3 se ha representado la superficie de respuesta correspondiente al modelo descrito en la ecuación anterior.

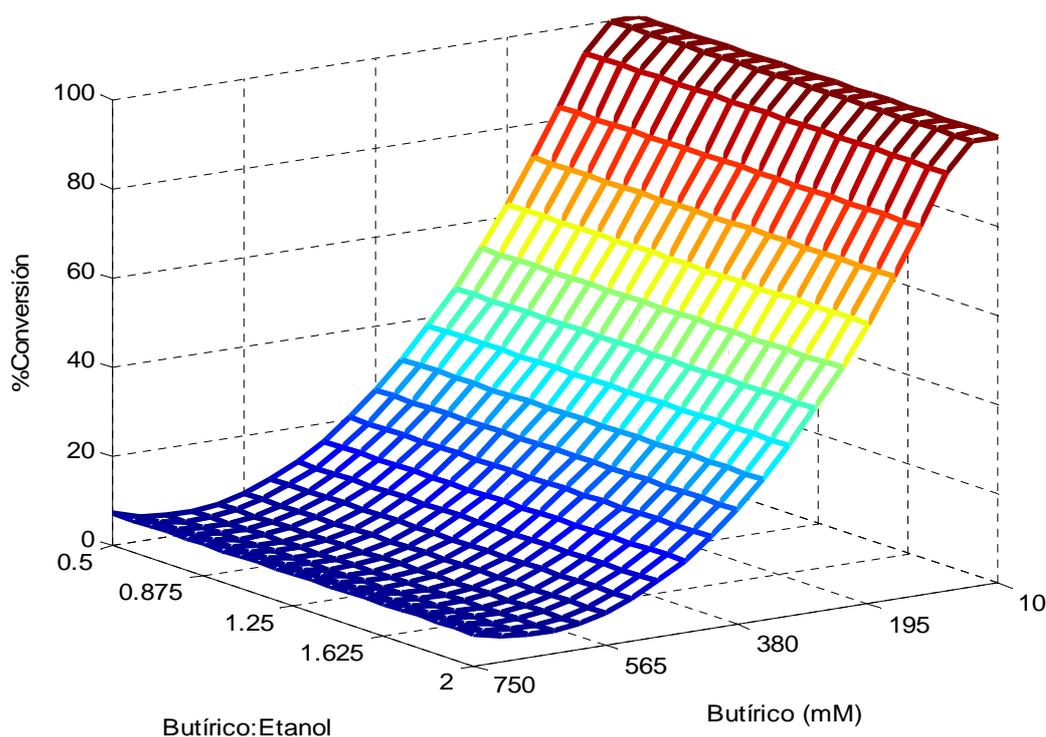


Figura 4.4.3. Superficie de respuesta obtenida para la conversión obtenida para la síntesis de butirato de etilo mediante rROL-Sepabeads a 35°C, 250rpm, Isooctano y 5500 UA, en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

Según la ecuación obtenida, el efecto de la concentración de ácido sobre la conversión resultó tan elevado que el peso de la relación molar fue estimado estadísticamente como no significativo.

Los datos obtenidos revelaron una clara y acusada disminución de la conversión obtenida a concentraciones de ácido superiores a 68 mM. Primeramente se mantuvo la hipótesis de que podría producirse una parada de la reacción por encima de dicha concentración de sustrato debido al efecto negativo de un exceso de agua producida a elevadas concentraciones de sustrato. Sin embargo, los biocatalizadores fueron reutilizados tras desecarse sin obtenerse nueva producción de éster, indicando este hecho una desactivación enzimática y no una parada de la reacción debido a una acumulación de agua. Este resultado indicó que por encima de 68 mM de ácido el biocatalizador padece un efecto de desactivación muy acusado debido, posiblemente a una acidificación del medio acuoso que envuelve a la lipasa, el cual se mantiene

durante un periodo de tiempo suficiente como para producirse una inactivación total de las enzimas.

4.4.1.3 Efecto sobre la producción y determinación de los valores óptimos de reacción

Al observarse los resultados obtenidos en cuanto a velocidad inicial de reacción y conversión, resultaba complicada la selección de unas condiciones de reacción óptimas, ya que los valores que proporcionaban una mayor velocidad de reacción no comportaban una elevada conversión final.

Una forma útil para decidir las condiciones óptimas de operación se basa en maximizar la productividad. Esta variable se define como la cantidad de producto obtenida por unidad de tiempo y volumen. En el caso que nos ocupa, el volumen se mantuvo igual y constante en todos los casos, de modo que el término de productividad puede simplificarse estudiando la producción, la cual se define como la cantidad de producto obtenida por unidad de tiempo.

Por tanto, con los datos de producción obtenidos de los ensayos del diseño de experimentos (tabla 4.1.1) se construyó un modelo de segundo orden que ajustara dichos valores (ecuación 4.4.1). En la tabla 4.4.4 se muestran los valores de los coeficientes obtenidos junto con los valores correspondientes del parámetro estadístico p .

Tabla 4.4.4. Parámetros de las ecuaciones empíricas obtenidas para la superficie de respuesta de la producción de la de butirato de etilo utilizando rROL-Sepabeads

Parámetro	Valor	p -value
a	0.094	<0.0001
b	-0.036	0.0003
c	0.014	0.0323
d	-0.015	0.0376
e	-0.021	0.0094
f	-0.011*	0.1479

*parámetro no significativo ($p > 0.05$)

El modelo obtenido se describió según la ecuación 4.4.5 presentando un valor de R^2 de 0.9331 y un valor de R^2_{aj} de 0.8774.

$$\text{Producción (mmol/h)} = 0.094 - 0.036[\text{Butírico}] + 0.014(\text{Butírico : Etanol}) - 0.015[\text{Butírico}]^2 - 0.021(\text{Butírico : Etanol})^2$$

$$R^2 = 0.933 \quad R_{aj}^2 = 0.8774$$

(4.4.5)

En la figura 4.4.4 se ha representado la superficie de respuesta correspondiente a la producción de butirato de etilo.

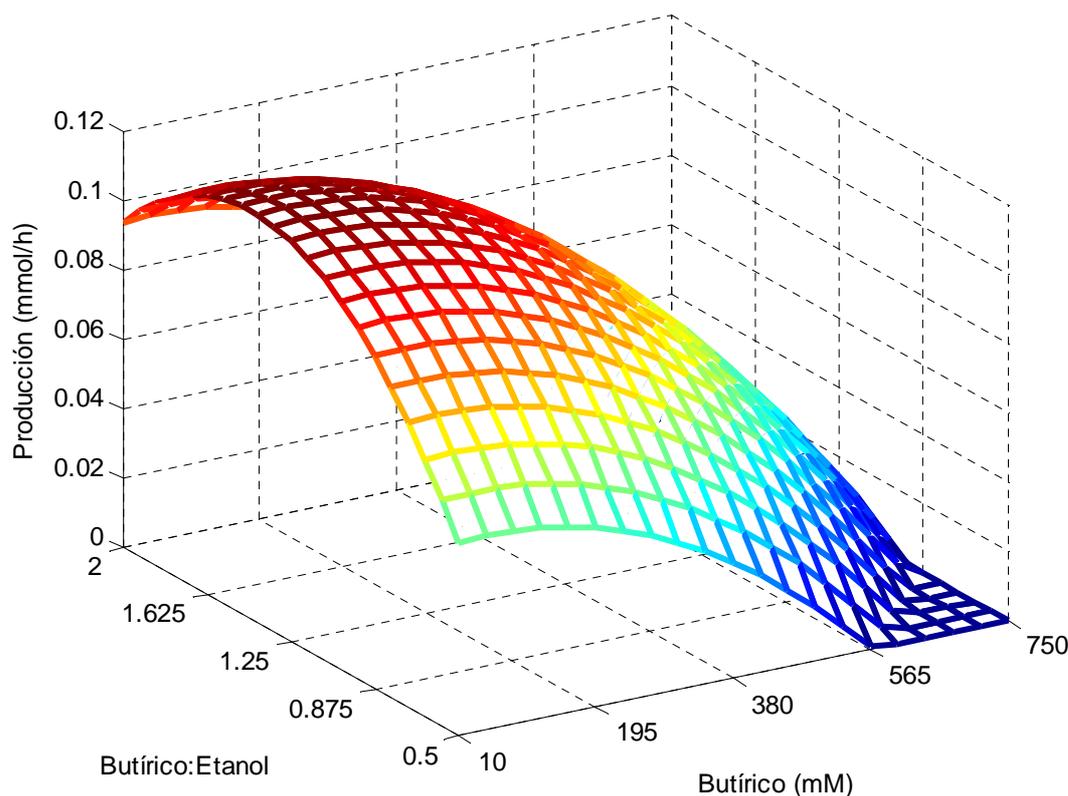


Figura 4.4.4. Superficie de respuesta obtenida para la producción de butirato de etilo mediante rROL-Sepabeads a 35°C, 250rpm, Isooctano y 5500 UA, en los ensayos correspondientes al diseño de experimentos.

Al igual que en el estudio de velocidad inicial de reacción, se obtuvo un modelo cuadrático. De la ecuación del modelo 4.4.5, se extrae un efecto más significativo sobre la producción de los parámetros cuadráticos de concentración de ácido y relación molar. También presentaron ambos factores un aporte lineal significativo.

Una vez obtenido el modelo matemático, pudo determinarse un óptimo de producción, mediante la ecuación 4.4.3, siendo f la función de producción 4.4.5.

Mediante la solución de la ecuación 4.4.3 se obtuvo un máximo de producción de 0.1183 mmol/h a una concentración inicial de butírico de 54.6 mM y una relación ácido:alcohol de 1.42. Por tanto, se dedujo que un exceso de etanol era contraproducente, como ya se vio en los valores de velocidad inicial, y que un exceso de ácido butírico por encima de 1.42 también conllevaba una reducción de la producción, debido al efecto de desactivación producido por este sustrato.

4.4.2. Evaluación de la producción en las condiciones óptimas

Una vez hallados los valores óptimos de las variables, se realizó la reacción de síntesis en dichas condiciones para determinar si el modelo 4.4.5 predecía correctamente la producción de butirato de etilo.

En la tabla 4.4.5 se resumen las condiciones de ensayo a las que se realizó la reacción de síntesis, según el procedimiento descrito en el apartado 3.16.

Tabla 4.4.5. Condiciones de reacción de la síntesis de butirato de etilo mediante rROL-Sepabeads para la comprobación de producción óptima

Variables	rROL-Sepabeads
Agua en el biocatalizador	Desecado
Temperatura	35°C
Velocidad de agitación	250 rpm
Actividad inicial cargada	1500 UA
Solvente	Isooctano
Concentración de ácido butírico	54.6 mM
Relación molar ácido:alcohol	1.42

En la figura 4.4.5, se muestra el perfil de reacción obtenido para la síntesis de butirato según las condiciones de la tabla 4.4.5.

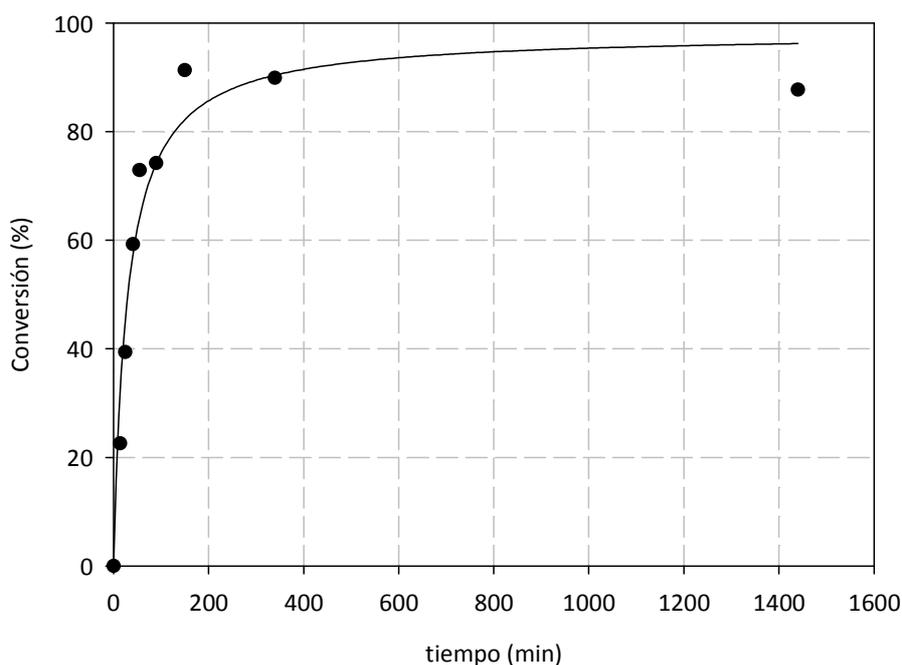


Figura 4.4.5. Evolución de la reacción de síntesis de butirato etilo mediante rROL-Sepabeads a 35°C, 250rpm, Isooctano y 5500 UA, 54.6 mM de ácido butírico y relación molar butírico:etanol 1.42.

La producción obtenida experimentalmente alcanzaba un valor de 0.117 mmol/h mientras que la predicha por el modelo correspondía a 0.118 mmol/h. Estos valores difieren en un 0.78 %, validándose de éste modo el modelo matemático de producción de butirato de etilo expresado en la ecuación 4.4.5.

El valor obtenido de producción es equivalente al valor de productividad volumétrica de 11.7 $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{h}$. Se han descrito en la bibliografía valores similares de productividad de butirato de etilo mediante la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada en espumas de poliuretano de tipo FHP 2002 y FHP 5000, alcanzándose valores de 12.8 $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{h}$ y 15.0 $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{h}$, respectivamente (Pires-Cabral *et al.*, 2007).

4.4.3 Conclusiones

El efecto de la concentración de ácido butírico y la relación molar butírico etanol en la reacción de síntesis de butirato de etilo se ha estudiado mediante un diseño de experimentos de tipo Box-Hunter. Las demás condiciones de ensayo se mantuvieron según los mejores valores obtenidos previamente en el capítulo 4.3:

- Biocatalizador desecado
- Temperatura: 35°C
- Agitación: 250 rpm
- Actividad inicial: 1500 UA
- Disolvente: Isooctano

Los efectos de la concentración de ácido y la relación molar se estudiaron para tres variables de reacción: la velocidad inicial de síntesis, la conversión y la producción. Para cada una de ellas se construyeron modelos matemáticos, según la metodología de superficies de respuesta.

En cuanto a los resultados de velocidad inicial, se observó un efecto inhibitor a concentraciones de butírico por encima de 380 mM, así como un efecto negativo al utilizarse un exceso de etanol. Cabe destacar que aún y obteniéndose un óptimo de velocidad con un exceso de ácido, una relación molar ácido:alcohol superior a 1.45 también comportaba una disminución de la velocidad inicial de síntesis.

En los estudios de conversión quedó patente un efecto de desactivación fuertemente dependiente de la concentración de ácido. A concentraciones superiores a 68 mM, la conversión final se veía mermada, obteniéndose rendimientos menores al 100%.

La producción fue el parámetro escogido para la selección de los valores óptimos de reacción.

Se determinaron unas condiciones óptimas a una concentración inicial de ácido butírico de 54.6 mM y una relación molar ácido:alcohol 1.42 con una predicción de producción, según el modelo, de 0.118 mmol/h.

Tras obtenerse las condiciones óptimas se realizó la reacción de síntesis a dichas condiciones con el objetivo de comparar la producción obtenida con el valor predicho por el modelo matemático construido. Ambos valores solo diferían en un 0.78 %, validándose de este modo el modelo de producción de butirato de etilo mediante la biocatálisis con rROL-Sepabeads.

4.4.4 Bibliografía

Alvarez-Macarie E, Baratti J, Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 10 (2000) 377-383.

Aziah Serri N, Kamaruddin AH, Tau Len KY, A continuous esterification of malonic acid with citronellol using packed bed reactor: investigation of parameter and kinetic study, *Food Bioprod. Process.* 88 (2010) 327-332.

Bayramoğlu G, Hazer B, Altintaş B, Arica MY, Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis, *Process Biochem.* 46 (2011) 372-378.

Beer HD, Wohlfahrt G, McCarthy JEG, Schomburg DS, Schmid RD, Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants, *Protein Eng.* 9 (1996) 507-517.

Ben Salah R, Ghamghui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y, Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*, *J. Biosci. Bioeng.* 4 (2007) 368-372.

Bezbradica D, Mijin D, Šiler-Marinković S, Knežević z, The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 45 (2007) 97-101.

Ghamgui H, Karra-Chaâbouni M, Gargouri Y, 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system, *Enzyme Microb. Tech.* 35 (2004) 335-363.

Gogoi S, Pahtak MG, Dutta A, Dutta NN, Porcine pancreas lipase catalyzed synthesis of lauryl laurate, in organic solvent media: A kinetic study, *Indian J. Biochem. Bio.* 45 (2008) 192-197.

Hassan Ahmed E, Raghavendra T, Madamwar D, An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter sp. EH28*: Application for ethyl caprylate synthesis, *Bioresource Technol.* 101 (2010) 3628-3634.

Paiva AL, Balcão VM, Malcata FX, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme Microb. Tech.* 27 (2000) 187-204.

Mahapatra P, Kumari A, Garlapati VK, Banerjee R, Nag A, Enzymatic synthesis of fruit flavour esters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 60 (2009) 57-63.

Ozyilmaz G, Gezer E, Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel, J. Mol. Catal. B-Enzym. 64 (2010) 140-145.

Pires-Cabral P, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Modeling the production of ethyl butyrate catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, Biochem. Eng. J. 33 (2007) 148-158.

Pires-Cabral P, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study, Biochem. Eng. J. 43 (2009) 327-332.

Pires-Cabral P, Dubreucq E, da Fonseca MMR, Ferreira-Dias S, Partitioning of water in organic system with lipase immobilized in polyurethane foams, Biochem. Eng. J. 26 (2005) 29-37.

Rodriguez-Nogales JM, Roura E, Contreras E, Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach, Process Biochem. 40 (2005) 63-68.



4.5 Aplicaciones de rROL en reacciones de interés industrial. Colaboraciones internacionales

4.5. Aplicaciones de rROL en reacciones de interés industrial. Colaboraciones internacionales.

En el capítulo 4.4 se ha aplicado la rROL inmovilizada en la síntesis de un producto de interés industrial: el butirato de etilo. Sin embargo, rROL se ha aplicado con éxito en la síntesis de otros compuestos que también presentan un elevado interés. Esto se ha podido comprobar gracias a colaboraciones internacionales con el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires (Argentina) y con el Instituto Superior de Engenharia La Universidad Técnica de Lisboa (Portugal), dentro de la red ENZNUT, financiada por un proyecto CYTED.

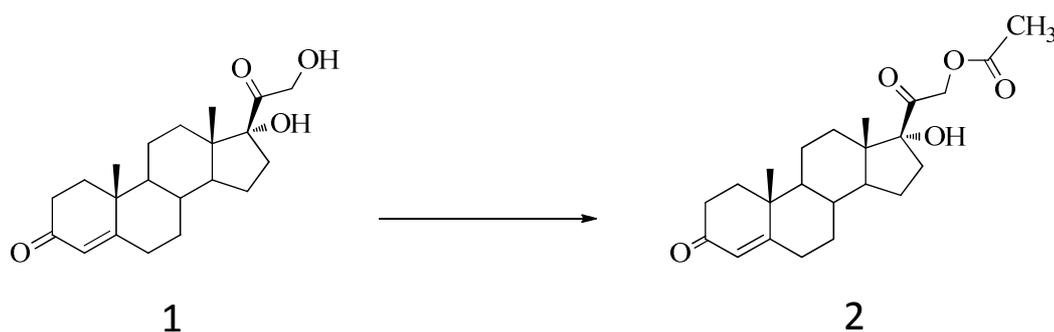
En el caso de la colaboración con la Universidad de Buenos Aires, se demostró la capacidad catalítica de rROL en la síntesis de un derivado acetilado de la cortexolona, el cual presenta la ventaja frente a la cortexolona de tener una baja capacidad de oxidación.

En cuanto a las colaboraciones con el Instituto Superior de Engenharia de la Universidad Técnica de Lisboa, se consiguió catalizar de forma satisfactoria con rROL tanto lípidos estructurados de bajo contenido calórico, como triacilglicéridos sustitutorios de las grasas de leches maternas. En el primer caso, los lípidos estructurados se obtuvieron mediante la acidólisis de triacilglicéridos de aceite de oliva con los ácidos grasos caprílico y cáprico. En cuanto a los triacilglicéridos sustitutorios de grasas de leches maternas, estos se obtuvieron mediante acidólisis de la tripalmitina con ácido oleico.

4.5.1 Acetilación de la cortexolona

Los corticosteroides son un tipo de moléculas utilizadas para el tratamiento sintomático de los procesos inflamatorios de la piel (Isaksson, 2004). De entre estos, la cortexolona se utiliza de forma eficiente en el tratamiento del acné (Trifu *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso tópico de estos compuestos está asociado con procesos alérgicos (Laipottevin *et al.*, 1998). El grupo hidroxilo situado en la posición 21 de las moléculas de corticosteroides puede ser fácilmente oxidado y la reacción de estos compuestos oxidados con las argininas puede llevar a la formación de proteínas modificadas, desencadenando de este modo una respuesta del sistema inmunitario, explicándose así la causa de estas reacciones alérgicas (Wilkinson *et al.*, 1996).

La preparación de derivados acetilados podría evitar la oxidación de la molécula y por tanto sus efectos adversos. Por tanto la producción de la cortexolona-21-acetato se presenta como un objetivo interesante (esquema 5.1.1).



Esquema 4.5.1. Esquema sintetizado de la acetilación de la cortexolona (1) para la obtención de la cortexolona-21-acetato (2)

La síntesis química de este compuesto acetilado comporta seis pasos a partir de los cuales se obtienen finalmente 21 monoésteres, siendo necesario un complejo método de purificación posterior (Sokolova *et al.*, 1969). Por tanto, la síntesis enzimática mediante lipasas se presenta como una buena alternativa a la vía química.

En el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Buenos Aires (Argentina), bajo la dirección de la profesora Alicia Baldessari, se llevó a cabo el estudio de la acetilación de la cortexolona mediante lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*. En dicho estudio se seleccionó como mejor opción el derivado inmovilizado de rROL obtenido a partir de la inmovilización sobre una resina de intercambio iónico de nombre Lewatit 1600, ya

que son él se obtenían los mayores porcentajes de acetilación. De entre los solventes y agentes acilantes probados, obtuvieron los mejores resultados utilizando isopropenil acetato como acilante y diisopropil éter (DIPE) como solvente. La temperatura de reacción se fijó en 55°C y la acetilación finalizó tras 48 horas.

Nuestra colaboración en esta investigación, se centró en el estudio de la relación enzima:sustrato (E/S) así como la relación acilante:sustrato (Acil/S) sobre la reacción. Para ello se construyó un diseño de experimentos de tipo Box-Hunter, ajustando los resultados a un modelo matemático según la metodología de la superficie de respuesta (ecuación 4.5.1).

$$Re\ spuesta = a + b \cdot (E / S) + c \cdot (Acil / S) + d \cdot (E / S)^2 + e \cdot (Acil / S)^2 + f \cdot (E / S) \cdot (Acil / S) \quad (4.5.1)$$

Los rangos seleccionados para las variables de estudios fueron de 5-20 y de 30-70 para la relación Enzima:Sustrato y Acilante:Sustrato, respectivamente. Partiendo de estos rangos se realizó el diseño de experimentos esquematizado en la figura (4.5.1).

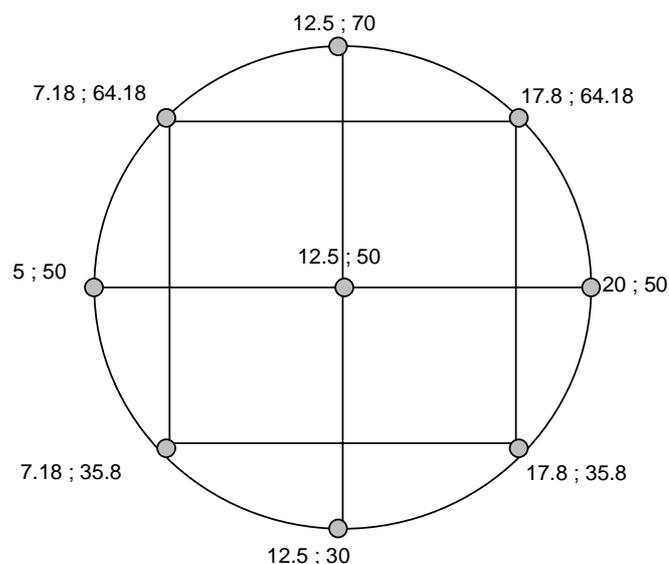


Figura 4.5.1. Diagrama del diseño de experimentos para el estudio la producción de cortexolona-21-acetato mediante rROL-Lewatit

Con los resultados experimentales proporcionados por los miembros de la Universidad de Buenos Aires se contruyó la tabla 4.5.1.

Tabla 4.5.1. Resultados experimentales de las reacciones de acetilación de la cortisolona a 55°C, 200rpm, DIPE como solvente e isopropenil acetato como acilante.

Enzima:Sustrato	Acilante:Sustrato	% Conversión	Rendimiento específico (mmol producto/g Enz)	Rendimiento específico (mmol producto/mmol Acil ·g Enz)
5	50	75.9	0.4275	1.562
7.18	35.8	67.0	0.2681	1.3406
12.5	30	70.8	0.1647	0.9152
17.8	35.8	88.6	0.1446	0.723
20	50	99.6	0.1416	0.5056
17.8	64.18	74.5	0.1218	0.3291
12.5	70	79.5	0.1853	0.4633
7.18	64.18	77.4	0.3098	0.8376
12.5	50	98.3	0.2265	0.8089
12.5	50	99.2	0.2265	0.8089
12.5	50	98.0	0.2265	0.8089
12.5	50	96.4	0.2265	0.8089

Las variables de respuesta estudiadas fueron la conversión final y el rendimiento específico expresado tanto en mmol de producto/g enzima como en mmol de producto/mmol acilante·g enzima.

En la tabla 4.5.2 se recogen los parámetros obtenidos para el modelo de conversión junto con los valores de parámetro p estadísticos de cada uno de ellos.

Tabla 4.5.2. Parámetros de la ecuación empírica obtenidas para las superficies de respuesta de la conversión de la reacción de acetilación de la cortisolona, utilizando rROL-Lewatit, expresada como mmol de producto/g enzima.

Parámetro	Valor	p -value
a	97.98	<0.0001
b	6.55	0.0043
c	1.075	0.4925*
d	-6.28	0.0089
e	-12.61	0.0003
f	-6.11	0.026

* parámetro no significativo ($p > 0.05$)

La descripción matemática del modelo obtenido se describe según la ecuación 4.5.2 y la correspondiente superficie de respuesta se muestra en la figura 4.5.2.

$$\begin{aligned} \%Conversion &= 97.98 + 6.55 \cdot (Enz / S) - 6.28 \cdot (Enz / S)^2 - 12.61 \cdot (Acil / S)^2 - 6.11 \cdot (Enz / S) \cdot (Acil / S) \\ R^2 &= 0.9393 \quad R_{aj}^2 = 0.8887 \end{aligned} \quad (4.5.2)$$

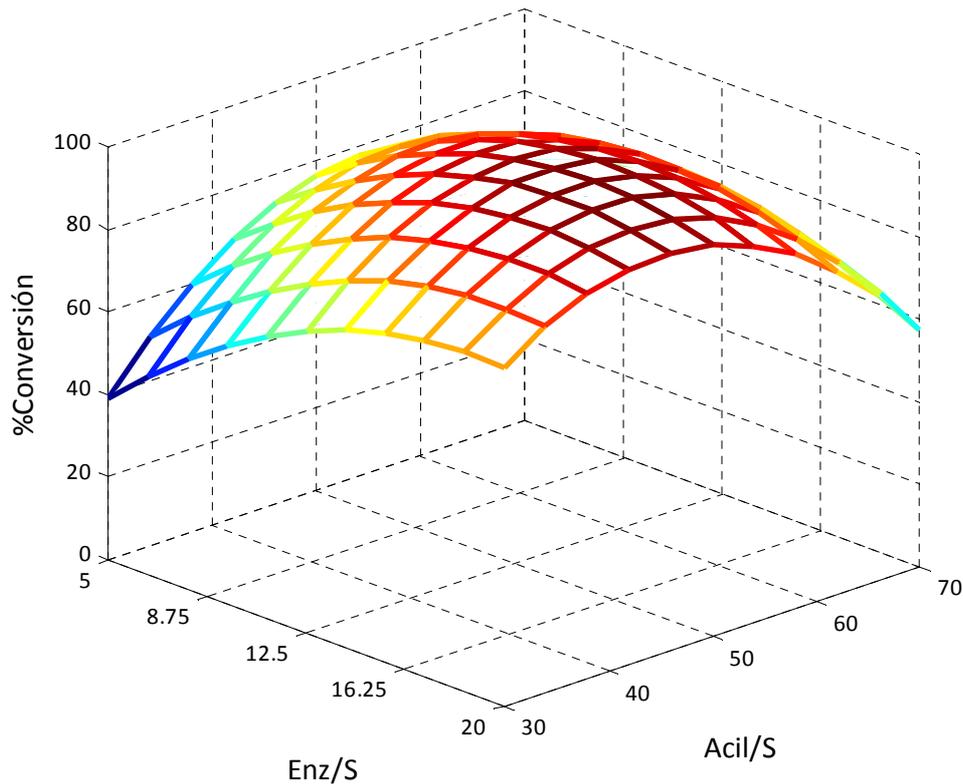


Figura 4.5.2. Superficie de respuesta obtenida para la conversión de la reacción de acetilación de la cortisolona mediante rROL-Lewatit a 55°C, 200 rpm, DIPE, isopropenil acetato como agente acilante y 2 g de cortisolona tras 48 horas de reacción.

Como se observa en la tabla 4.5.2, el parámetro que representaba el mayor peso sobre el modelo fue el del valor cuadrático de la relación acilante:sustrato, así como el parámetro de la relación enzima:sustrato. También se mostró un peso significativo sobre el modelo por parte del efecto combinado entre las dos relaciones. Sin embargo, el efecto lineal de la relación acilante:sustrato pudo ser excluido de la expresión matemática del modelo.

Mediante la aplicación de la ecuación 4.5.3, siendo f la expresión matemática de conversión 4.5.2, pudieron obtenerse las condiciones óptimas de conversión.

$$\nabla f(\text{Enzima: sustrato}; \text{Acilante: sustrato}) = 0 \quad (4.5.3)$$

Los valores obtenidos fueron de 15.64 de relación enzima:sustrato y 48.01 de relación acilante sustrato; con una predicción de una conversión máxima a dichas condiciones de un 99.9%.

Sin embargo, resulta mucho más correcto para optimizar el proceso realizar un análisis y optimización del proceso mediante el análisis de la producción, en lugar de tener en cuenta únicamente la conversión final.

A continuación se muestran los resultados referidos a los valores de rendimiento específico. Primeramente se muestran los resultados de rendimiento específico expresado por gramo de enzima, los coeficientes obtenidos del modelo, así como sus correspondientes valores del parámetro estadístico p , los cuales se resumen en la tabla 4.5.3.

Tabla 4.5.3. Parámetros de la ecuación empírica obtenidas para las superficies de respuesta del rendimiento específico de la síntesis de cortexolona acetilada utilizando rROL-Lewatit, expresada como mmol de producto/ g enzima.

Parámetro	Valor	p -value
a	0.2266	<0.0001
b	-0.0914	<0.0001
c	0.006	0.4257*
d	0.0263	0.0156
e	-0.0313	0.0074
f	-0.0161	0.1557*

* parámetro no significativo ($p > 0.05$)

El modelo obtenido se describe matemáticamente según la expresión 4.5.4 y la superficie de respuesta generada por la dicha ecuación se ha representado en la figura 4.5.3.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento específico (mmolP / gEnz)} &= 0.2266 - 0.0914 \cdot (\text{Enz} / \text{S}) + 0.0263 \cdot (\text{Enz} / \text{S})^2 - 0.0313 \cdot (\text{Acil} / \text{S})^2 \\ R^2 &= 0.9716 \quad R_{aj}^2 = 0.9480 \end{aligned} \quad (4.5.4)$$

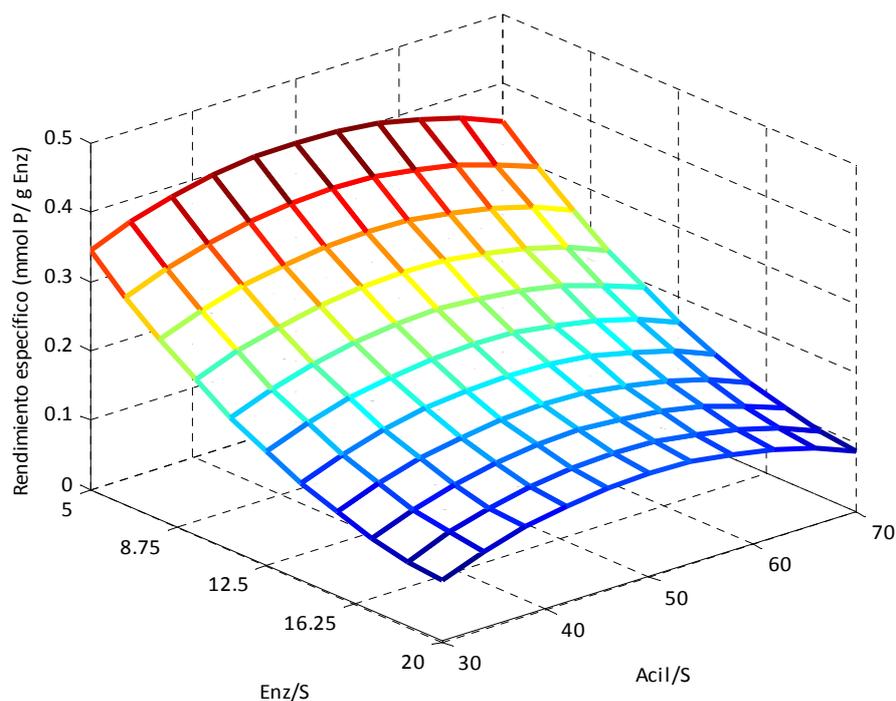


Figura 4.5.3. Superficie de respuesta obtenida para el rendimiento específico expresado por gramo de enzima de la reacción de acetilación de la cortexolona mediante rROL-Lewatit a 55°C, 200 rpm, DIPE, isopropenil acetato como agente acilante y 2 g de cortexolona tras 48 horas de reacción.

En cuanto al rendimiento específico expresado por gramo de enzima y milimol de acilante, los parámetros obtenidos del modelo, así como sus correspondientes valores del parámetro estadístico p , se resumen en la tabla 4.5.4.

Tabla 4.5.4. Parámetros de la ecuación empírica obtenidas para las superficies de respuesta del rendimiento específico de la síntesis de cortexolona acetilada utilizando rROL-Lewatit, expresada como mmol de producto/mmole acilante-g enzima.

Parámetro	Valor	p -value
a	0.8091	<0.0001
b	-0.3275	<0.0001
c	-0.1923	0.0003
d	0.0990	0.0134
e	-0.0738	0.0414
f	0.0272*	0.4781

* parámetro no significativo ($p > 0.05$)

La expresión matemática del modelo de producción se expresa en la ecuación 4.5.5 mientras que en la figura 4.5.4 se representa la superficie de respuesta correspondiente.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento específico (mmol P / mmol Acil} \cdot \text{g Enz)} &= 0.8091 - 0.3275 \cdot (\text{Enz} / \text{S}) - 0.1923 \cdot (\text{Acil} / \text{S}) + 0.099 \cdot (\text{Enz} / \text{S})^2 \\ &\quad - 0.0738 \cdot (\text{Acil} / \text{S})^2 \\ R^2 &= 0.9762 \quad R_{aj}^2 = 0.9564 \end{aligned}$$

(4.5.5)

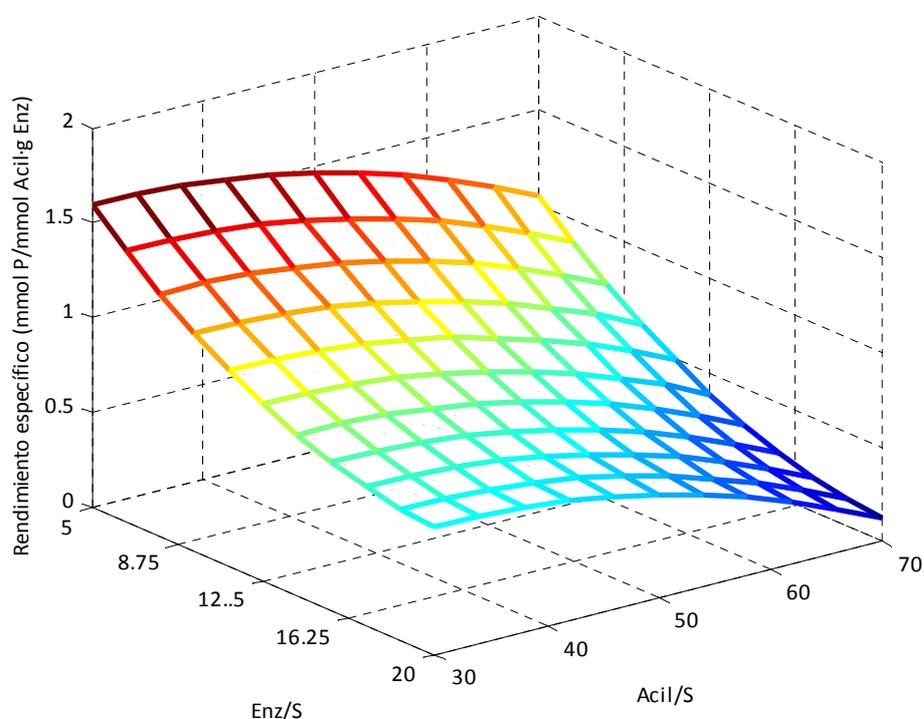


Figura 4.5.4. Superficie de respuesta obtenida para el rendimiento específico expresado por gramo de enzima y mmol de acilante de la reacción de acetilación de la cortexolona mediante rROL-Lewatit a 55°C, 200 rpm, DIPE, isopropenil acetato como agente acilante y 2 g de cortexolona tras 48 horas de reacción.

Como se observa en los modelos matemáticos obtenidos, en ninguna de las expresiones del rendimiento específico se obtuvo un efecto significativo de la interacción entre la relación enzima:sustrato y acilante:sustrato. Además, el parámetro más significativo en ambos modelos recayó sobre la relación enzima:sustrato.

Tras obtenerse las expresiones matemáticas de ambos modelos, se procedió al cálculo de los valores óptimos de las relaciones estudiadas para conseguir maximizar el rendimiento. Para ello se aplicó la expresión 4.5.3, siendo f la función de rendimiento específico en cada caso.

Los valores óptimos máximos de producción se resumen en la tabla 4.5.5:

Tabla 4.5.5. Resumen de los valores óptimos de las relaciones enzima:sustrato y acilante sustrato.

Rendimiento específico	Enzima:Sustrato	Acilante:Sustrato
0.41 mmol/g enzima	5	50
1.59 mmol/mmol acilante·g enzima	5	31.6

Los valores óptimos de la relación enzima:sustrato coincidieron, en ambas expresiones de rendimiento, con el valor mínimo del rango escogido en el diseño experimental. Esto indicó que el rendimiento específico expresado por unidad de enzima se maximizaba con la mínima cantidad de enzima añadida, independientemente de incorporar los milimoles de acilante añadidos a la expresión.

En cuanto a los valores óptimos de la relación de acilante:sustrato, para el caso del rendimiento específico expresado por gramo de enzima, el valor óptimo fue 50, siendo este valor 1.6 veces superior al óptimo obtenido para la producción por milimoles de acilante y sustrato.

4.5.2 Producción de lípidos estructurados de tipo MLM

Los lípidos estructurados de tipo MLM son triacilglicéridos que poseen ácidos grasos de cadena media (M) en las posiciones $sn-1$ y $sn-3$ y un ácido graso de cadena larga (L) en la posición $sn-2$ (figura 4.5.5). Los ácidos grasos de cadena media son ácidos saturados que poseen de 6 a 12 átomos de carbono, mientras que los ácidos grasos de cadena larga pueden ser saturados o insaturados de entre 14 y 24 átomos de carbono. Los triacilglicéridos MLM presentan un elevado interés nutricional ya que son lípidos estructurados bajos en carga calórica y son adecuados para el control de la obesidad o para personas que tiene problemas metabólicos tales como dificultades de absorción de grasas ya que los ácidos grasos de cadena mediana en las posiciones

sn-1 y *sn*-3 son rápidamente oxidados en el hígado y generalmente no se acumulan en los tejidos adiposos (Osborn *et al.*, 2002).

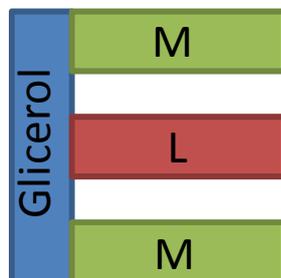


Figura 4.5.5. Esquema de la estructura de un lípido estructurado de baja carga calórica. La nomenclatura M y L hace referencia a ácidos grasos de cadena media (C6 –C12) saturados y a ácidos grasos de cadena larga (C14-24) saturada o insaturada.

El uso de lipasas regiospecíficas para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, como la lipasa de *R. oryzae*, se presenta como una buena elección para catalizar enzimáticamente la síntesis de estos lípidos estructurados. Los aceites vegetales pueden ser modificados incorporando ácidos grasos de cadena media en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, dejando intacta la posición *sn*-2.

En el Instituto Superior de Engenharia de Faro en Portugal, se ha aplicado la rROL para la síntesis de lípidos de estructura MLM a partir de aceite de oliva mediante la incorporación de ácido caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0).

En estudios previos, la lipasa de rROL se utilizó inmovilizada en Eupergit[®]C y sepiolita modificada, tanto en medio orgánico como sin solvente. Los mejores resultados, a una temperatura fijada de 40°C y una relación molar de ácido graso:triacilglicerol de 1:2, se obtuvieron con el derivado inmovilizado de Eupergit[®]C y sin la utilización de solvente (Nunes *et al.*, 2011). Ensayos de estabilidad operacional realizados posteriormente, mostraron una elevada capacidad de reutilización del biocatalizador obtenido vía inmovilización en Eupergit[®]C (Nunes *et al.*, 2012).

Tras la optimización, mediante metodología de superficie de respuesta, de la temperatura y la relación molar de ácido de cadena media y triacilglicerol, se obtuvieron unos valores de 37°C y una relación de 2.8:1 para el caso de la incorporación de C8:0 y de 35°C y 3:1 en el caso de la

incorporación de C10:0. Los valores máximos de incorporación de C8:0 y C10:0 predichos por los modelos en las condiciones óptimas fueron de 15.5% y 33.3% respectivamente, validándose de forma experimental estos resultados (Nunes *et al.* b, 2012).

4.5.3 Producción de sustitutos de grasas de leches maternas

Las grasas presentes en las leches de rumiantes, así como en aceites vegetales, están constituidas básicamente por triacilglicéridos que presentan ácidos grasos insaturados en la posición *sn*-2. Sin embargo, en las leches maternas, los triacilglicéridos presentan un ácido graso saturado en la posición *sn*-2 (ácido palmítico en un 70%) y ácidos grasos insaturados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 (Jensen, 2001) (figura 4.5.6). La presencia de ácido palmítico en la posición central del triacilglicérido comporta una mejor absorción del monoacilglicérido *sn*-2 monoacilpalmitato durante el proceso de digestión (López-López *et al.*, 2001; Sahín *et al.*, 2005).

Es por esta razón que las lipasas *sn*-1,3 regioespecíficas, como la de *Rhizopus oryzae* o *Rhizomucor miehei*, han sido utilizadas para la producción de lípidos sustitutos de grasas de leche materna humana (Meiri-Bendek *et al.*, 2011).

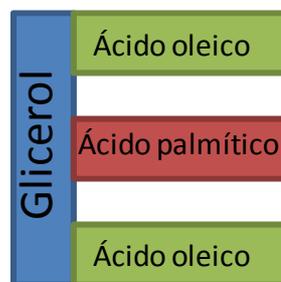


Figura 4.5.6. Esquema de la estructura de un lípido estructurado sustitutivo de las grasas de leches maternas humanas.

En el Instituto Superior de Engenharia de la Universidad Técnica de Lisboa, al igual que en la síntesis de lípidos estructurados MLM, se aplicó la rROL en la síntesis de triacilglicéridos sustitutos de grasas de la leche materna humana.

rROL fue inmovilizada en EP100, Eupergit[®]C y Lewatit 1600 y aplicada en la acidólisis entre la tripalmitina y el ácido oleico a 60°C y sin solvente. Los mejores resultados de incorporación de

ácido oleico se consiguieron con los derivados inmovilizados de EP100 y Lewatit 1600, alcanzando valores de 22% y 30%, respectivamente. Los estudios de estabilidad operacional mostraron una mayor estabilidad por parte del biocatalizador derivado del Lewatit 1600 (Tecelão et al., 2012).

4.5.4 Conclusiones

La lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* ha sido aplicada, inmovilizada en diferentes soportes, en la producción de diversos compuestos de interés industrial.

Los compuestos sintetizados se resumen a continuación:

- Acetil 21-cortexolona. La incorporación de un grupo acetato en la posición 21 de la cortexolona, mediante la formación de enlace éster, ha sido catalizada exitosamente con rROL inmovilizada en la resina Lewatit 1600. Tras fijar diversas variables como la temperatura (55°C), el solvente (DIPE) y el tipo de acilante (isopropenil acetato), se optimizó el rendimiento específico de la síntesis de este compuesto mediante la determinación de los valores óptimos de relaciones molares de enzima:sustrato y acilante:sustrato. Para ello se siguió la metodología de las superficies de respuesta.
- Lípidos estructurados MLM. La síntesis de estos compuestos a partir de aceite de oliva mediante la incorporación de ácido caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) pudo catalizarse mediante la utilización de rROL inmovilizada en Eupergit[®]C. Mediante metodología de superficie de respuesta, se optimizaron la temperatura y la relación molar de ácido de cadena media y triacilglicerol. Los valores obtenidos fueron 37°C y una relación de 2.8:1 para el caso de la incorporación de C8:0 y de 35°C y 3:1 en el caso de la incorporación de C10:0.
- Sustitutivos de grasas de leches maternas humanas. La acidólisis de la tripalmitina con ácido oleico en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 se consiguió mediante la biocatálisis de rROL inmovilizada en diferentes soportes. Los mejores porcentajes de incorporación se obtuvieron con rROL inmovilizada en EP100 y Lewatit 1600.

4.5.5 Bibliografía

Isaksson M, Corticosteroids, *Dermatol. Ther.* 17 (2004) 314-320.

Jensen RG, Infant formulas, in structured and modified lipids, Ed. FD Gunstone, New York, 2001, 455-464.

Leipottevin JP, Drieghes J, Goossens A, Studies in patients with corticosteroid contact allergy: understanding cross-reactivity among different steroids, *Arch. Dermatol.* 131 (1995) 31-37.

López-López A, Castellote-Bargalló AI, Campy-Folgoso C, Rivero-Urgel M, Tormo-Carnicé R, Infante-Pina D, López-Sabater MC, The influence of dietary palmitic acid triacylglycerid position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces, *Early Hum. Dev.* 65 Suppl. (2001) S83-S94.

Meiri-Bendek, Ben Dror G, Laouz H, Yaakobi D, Bar-On Z, Shukman A, Human breast milk lipid mimetic as dietary supplement, Patente europea EP 1 681 945 B1, 09.03.2011.

Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S, Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids, *Biochem. Eng. J.* (2012) *Submitted (a)*.

Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S, Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae lipase*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (2012) *In press (b)*.

Nunes PA, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S, Production of MLM-Type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 473-480.

Osborn HT, Akon CC, Structured lipids-novel fat with medical, nutraceutical and food applications, *Compr. Rev. Food Sci. Saf.* 3 (2002) 93-103.

Sahín N, Akoh CC, Karaali A, Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5779-5783.

Sokolova LV, Klimova LI, Kaminka EM, Yaroslavtseva ZA, Suvorov NN, Steroids. XXXVIII. Synthesis of the acetate of Reichstein's substance S, *Pharm. Chem. J.* 3 (1969) 709-712.

Tecelão C, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S, Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: a feasible biocatalyst for the production of human fat substitutes, *Biochem. Eng. J.* (2012) *Submitted*.

Trifu V, Tiplica GS, Naumescu E, Zalupca L, Moro L, Celasco G, Cortexolone 17 α -propionate 1% cream, a new potent antiandrogen for topical treatment of acne vulgaris. A pilot randomized, double-blind comparative study vs. placebo and tretinoin 0.05% cream, *Br. J. Dermatol.* 165 (2011) 177-183.

Wilkinson SM, Jones MF, Corticosteroid usage and binding to arginine: determinants of corticosteroid hypersensitivity, *Br. J. Dermatol.* 135 (1996) 225-230.



5. CONCLUSIONES GENERALES

5. Conclusiones generales

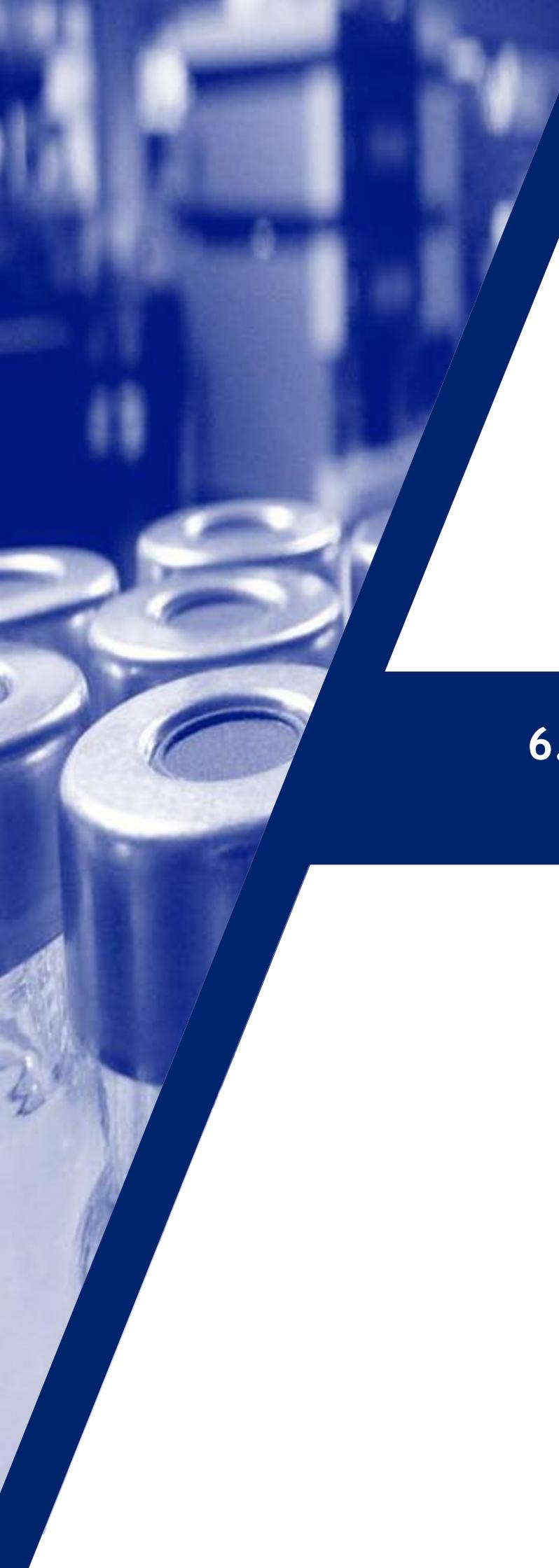
En el presente trabajo se ha caracterizado y se ha comprobado la viabilidad de la lipasa recombinante de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris* para su aplicación en biotransformaciones de interés industrial.

Esta conclusión general se desglosa en las siguientes conclusiones parciales:

- En el extracto proteico obtenido de cultivos de *P. pastoris* recombinante, se detectaron dos isoformas de la lipasa de *R. oryzae*, con idéntico N-terminal, así como una tercera proteína de mayor masa molecular pudiendo corresponder esta última a algún tipo de dímero proteico.
- El extracto nativo mostró la presencia de tres isoformas de lipasa alrededor de 34kDa. Además, se detectó una cuarta proteína con capacidad hidrolítica, atribuyéndose ésta a una esterasa.
- Tanto nROL como rROL mostraron una actividad fuertemente dependiente de la fuerza iónica. La temperatura óptima de nROL fue de 40°C, independientemente de la concentración de sales del medio mientras que su pH óptimo varió de 7.25 a 8 al disminuirse la fuerza iónica. rROL vio modificada su temperatura óptima de 40°C a 30°C, al igual que el pH óptimo que pasó de 8 a 7.25, al doblarse la concentración del tampón de análisis.
- rROL mostró una mayor actividad específica en comparación con nROL que, dependiendo de las condiciones de ensayo enzimático, en ocasiones llegó a ser 40 veces superior.
- Las especificidades frente a triacilglicéridos de nROL y rROL fueron similares, hidrolizando de manera preferente el Tri-C8 y Tri-C10.
- Las especificidades de ésteres de *p*-nitrofenol de nROL y rROL fueron opuestas, posiblemente debido a la presencia de una esterasa en el preparado comercial.
- Al inmovilizarse rROL y nROL en EP100 y Eupergit[®]C, se observaron fenómenos de hiperactivación a ciertas relaciones de proteína:soporte. Por otro lado, a bajas cargas, se obtuvieron bajos porcentajes de actividad retenida en los soportes.
- nROL mostró una mayor estabilidad en comparación con rROL, tanto en solución como inmovilizada sobre EP100. Este hecho se atribuyó a la presencia de una parte de la pro-

secuencia en la enzima nativa, a posibles diferencias en las modificaciones pos-traduccionales y a la presencia de posibles estabilizantes. La estabilidad de rROL a bajos pH mejoró ligeramente al inmovilizarse tanto en EP100 como en Eupergit[®]C.

- Utilizando Eupergit[®]CM en lugar de Eupergit[®]C en la inmovilización de rROL, se apreciaron resultados diferentes de los porcentajes de inmovilización posiblemente debido a la diferencia en el tamaño de partícula de ambos soportes.
- La lipasa de rROL fue utilizada inmovilizada sobre EP100, Eupergit[®]CM y Octadecil-Sepabeads en la síntesis de butirato de etilo. Con el objetivo de seleccionar el más idóneo de entre estos derivados inmovilizados, se buscaron los mejores valores de contenido en agua, temperatura, agitación, solvente así como de relación de sustrato, obteniéndose la mayor velocidad de síntesis en el caso del derivado de EP100.
- La estabilidad operacional, así como las actividades residuales tras incubaciones en medios orgánicos, mostraron una estabilidad muy superior del derivado inmovilizado de Sepabeads en comparación con los otros biocatalizadores, escogiéndose éste como la mejor opción.
- Se optimizó la concentración de ácido butírico y la relación molar ácido:alcohol en términos de velocidad inicial, conversión y producción de butirato de etilo mediante la metodología de las superficies de respuesta, utilizando rROL-Sepabeads. Se obtuvieron resultados que indicaban un efecto inhibitor de butírico por encima de 380 mM así como un efecto inhibitor al utilizarse exceso de etanol.
- En términos de máximo de producción, las condiciones óptimas fueron: 54.6 mM de ácido butírico y una relación butírico:etanol de 1.42, consiguiéndose un valor óptimo de producción de 0.117 mmol/h .
- Se ha demostrado la capacidad de rROL para producir diferentes compuestos de interés como un derivado acetilado de la cortexolona, lípidos estructurados de baja carga calórica así como triacilglicéridos sustitutivos de las grasas presentes en la leche materna humana.
- Se han sentado las bases para poder realizar el diseño de un reactor enzimático para la producción en continuo de butirato de etilo.



6. CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

6. Contribuciones científicas

- Guillén M, Benaiges MD, Valero F, Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract, *Biochem. Eng. J.* 54 (2011) 117-123.
- Guillén M, Benaiges MD, Valero F, Immobilization and stability of a *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*: Comparison between native and recombinant variants, *Biotechnol. Progr.* 27 (2011) 1232-1241.
- Guillén M, Benaiges MD, Valero F, Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*, *Biochem. Eng. J.* (En revisión)
- Nunes P, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S, Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *JAACS.* 88 (2011)473-480.
- Nunes P, Pires-Cabral P, Guillén M, Valero F, Ferreira-Dias S, Optimized production of MLM triacylglycerols catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase, *JAACS. Aceptado*
- Tecelão C, Guillén M, Valero F., Ferreira-Dias, S, Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: a feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes, *Biochem. Eng. J. En revisión*
- Nunes PA, Pires-Cabral P., Guillén M, Valero F., Ferreira-Dias, S, Batch operational stability of immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase during acidolysis of virgin olive oil with medium-chain fatty acids, *Biochem. Eng. J. Aceptado*
- Quintana PG, Guillén M, Valero F, Palomo JM, Baldessari A, Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase as an efficient catalyst in the acetylation of cortexolone, *ChemCatChem, En revisión*



7. ANEXOS

7. Anexos

7.1 Calibración del método de análisis de actividad lipolítica

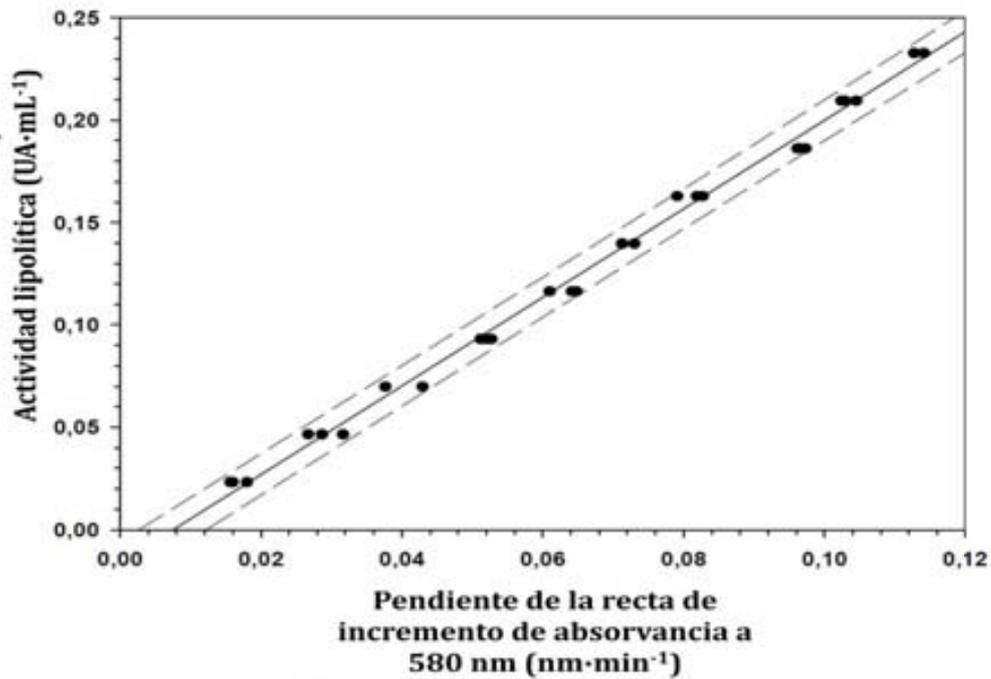


Figura 7.1. Calibrado para la medida de actividad hidrolítica 30°C y pH 7.25

$$\text{Actividad} \left(\frac{\text{UA}}{\text{mL}} \right) = 2.16 \cdot \text{pendiente}(\text{min}^{-1}) - 0.016 \quad (7.1)$$

7.2 Recta de calibrado para el método de especificidad frente a ésteres de *p*-nitrofenol

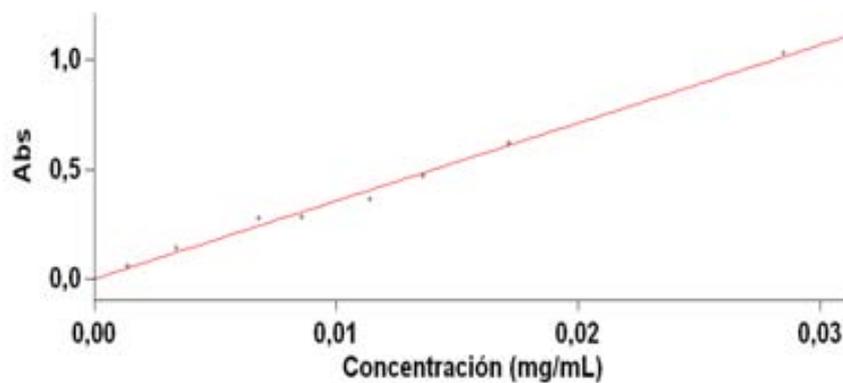


Figura 7.2. Recta de calibrado para la medida de actividad hidrolítica de ésteres de *p*-nitrofenol a 30°C y pH 7.0.

$$\text{Abs} = 35,47477 \cdot [p\text{-nitrofenol}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) + 0,00299 \quad R^2 = 0.995 \quad (7.2)$$

7.3 Rectas de calibrado de butanol y ácido propiónico para el seguimiento de las reacciones de síntesis de propionato de butilo

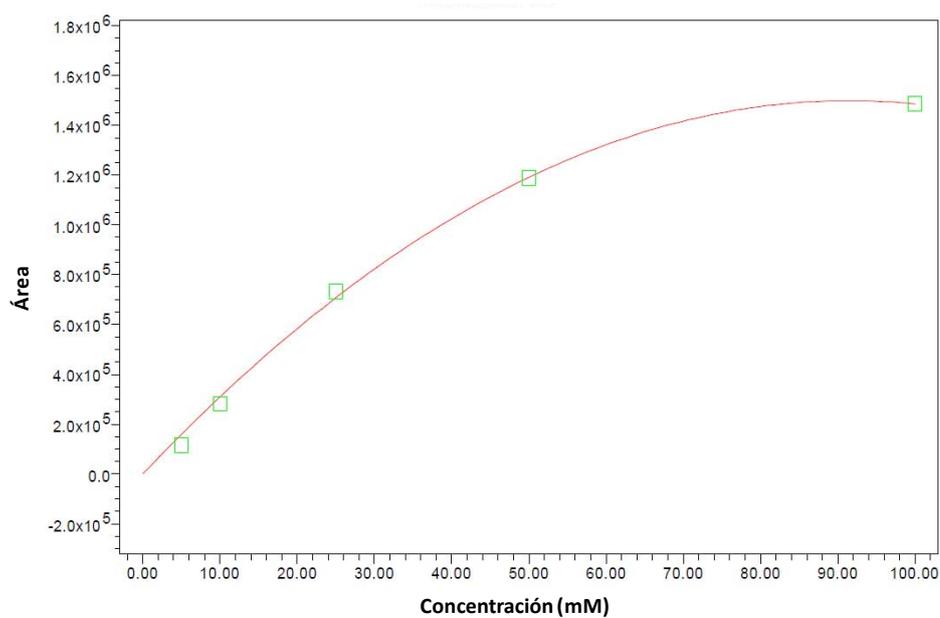


Figura 7.3. Recta de calibrado para la medida de butanol según el método cromatográfico descrito en el apartado 3.14

$$\begin{aligned} \text{Área} &= 3.2798 \cdot 10^4 [\text{Alcohol}](\text{mM}) - 1.7939 \cdot 10^2 [\text{Alcohol}](\text{mM})^2 \\ R^2 &= 0.9996 \end{aligned}$$

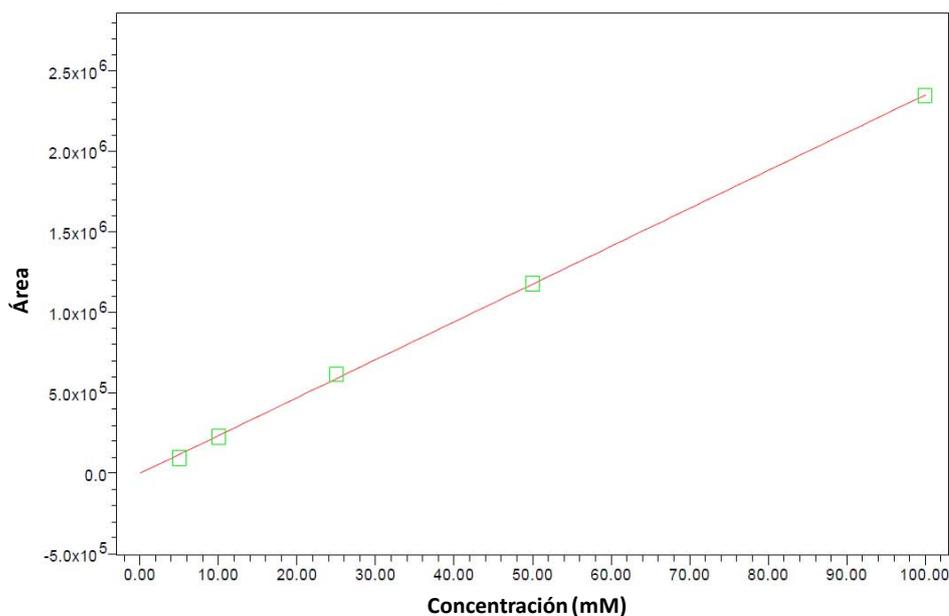


Figura 7.4. Recta de calibrado para la medida de ácido butírico según el método cromatográfico descrito en el apartado 3.14.

$$\text{Área} = 2.352 \cdot 10^4 [\text{Ácido}] (\text{mM}) \quad R^2 = 0.9975 \quad (7.4)$$

7.4 Rectas de calibrado de ácido butírico y butirato de etilo para el seguimiento de las reacciones de síntesis de propionato de butilo

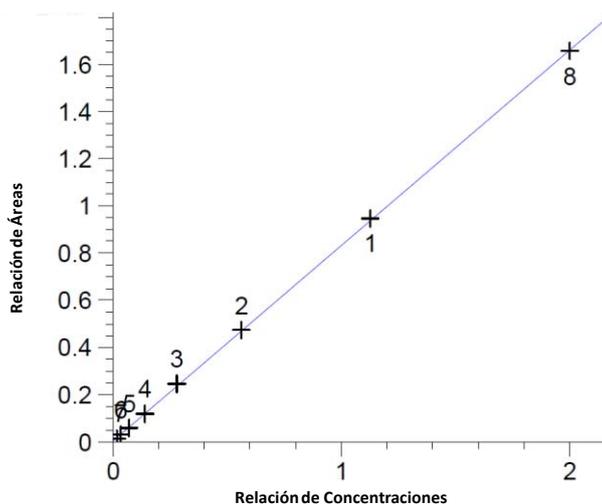


Figura 7.5. Recta de calibrado para la medida de butirato de etilo según el método cromatográfico descrito en el apartado 3.16. Las relaciones de áreas y concentraciones fueron referenciadas al patrón interno.

$$\text{Área} = 0.29982[\text{éster}](\text{mM}) + 3.78049 \cdot 10^{-3} \quad R^2 = 0.9999 \quad (7.5)$$

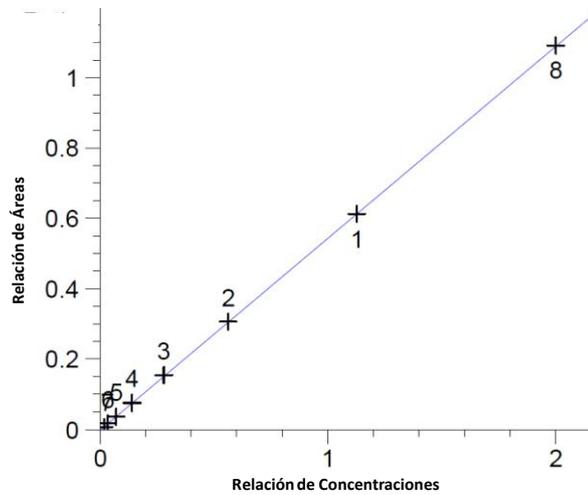


Figura 7.6. Recta de calibrado para la medida de ácido butírico según el método cromatográfico descrito en el apartado 3.16. Las relaciones de áreas y concentraciones fueron referenciadas al patrón interno.

$$\text{Área} = 0.54584[\text{ácido}](\text{mM}) + 8.92135 \cdot 10^{-4} \quad R^2 = 0.99999 \quad (7.6)$$

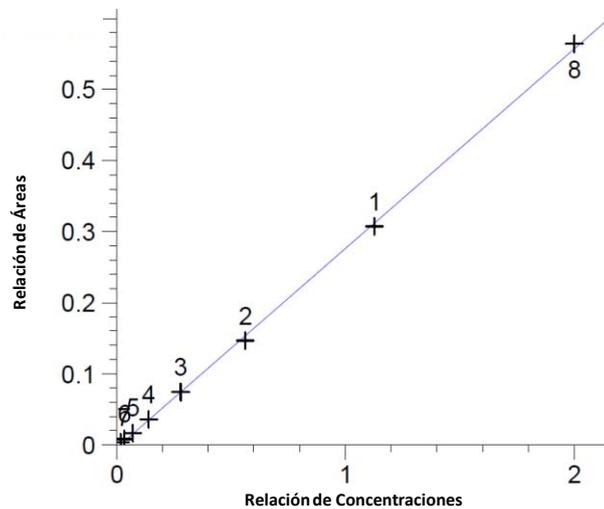


Figura 7.7. Recta de calibrado para la medida de etanol según el método cromatográfico descrito en el apartado 3.16. Las relaciones de áreas y concentraciones fueron referenciadas al patrón interno.

$$\text{Área} = 0.281358[\text{alcohol}](\text{mM}) - 3.85184 \cdot 10^{-3} \quad R^2 = 0.9997 \quad (7.7)$$

NOTAS

NOTAS
