

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS PARA SU APLICACIÓN EN LA SÍNTESIS DE BIODIESEL

**Entregado como requisito para la obtención del título de Licenciado en
Biotecnología**

**Gastón Risi-173807
María Pía Garat-174183**

**Tutor: Mariana Ferrari
2015**

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotros, Gastón Risi y María Pía Garat, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Proyecto de grado;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y que fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Gastón Risi

13 de Abril 2015



María Pía Garat

13 de Abril 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a aquellas personas que han contribuido en nuestra formación académica y nos han apoyado a lo largo de la realización del proyecto. Entre ellos destacamos a nuestra tutora Mariana Ferrari, a Lorena Betancor y a Erienne Jackson.

También queremos agradecer a la ANII por el apoyo brindado por medio de la beca de iniciación a la investigación.

Por último queremos agradecer a la Universidad ORT Uruguay por dejarnos utilizar sus instalaciones en el Laboratorio de Biotecnología para poder llevar a cabo este trabajo.

ABSTRACT

El biodiesel es un combustible alternativo al clásico gas-oil derivado del petróleo. Se elabora a partir de elementos 100% naturales y biodegradables. Entre estos elementos se encuentran los aceites vegetales obtenidos de semillas, plantas y algas oleaginosas. El biodiesel se sintetiza a partir de una reacción de transesterificación, donde se utilizan como reactivos triglicéridos que contengan ácidos grasos de cadena larga y un alcohol de cadena corta y bajo peso molecular; en presencia de un catalizador. El catalizador puede ser químico o enzimático. Siendo los químicos los más económicos y usados a nivel industrial mientras que los enzimáticos son amigables con el medio ambiente y permiten fácil recuperación del glicerol. En la actualidad el mercado de las enzimas está en aumento y puede verse incrementado si se logra mejorar la estabilidad de las enzimas disminuyendo así los costos. Una estrategia es la inmovilización de las enzimas a un soporte físico el cual les confiere en muchos casos un aumento en la estabilidad generando biocatalizadores robustos y reutilizables. En el proceso de transesterificación las enzimas que se encargan de que ocurra dicha reacción son las lipasas. Por lo tanto el área de inmovilización de las lipasas es un área interesante para su exploración. Es por ello que este proyecto se enfocó en la realización de preparaciones de lipasas inmovilizadas para la síntesis de biodiesel. Para ello se utilizaron dos estrategias de inmovilización como son el atrapamiento y la unión covalente en nanopartículas de sílica. Se trabajó con tres lipasas derivadas de distintos organismos: *Rhizomucor miehei* (RML), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), y *Bacillus thermocatenolatus* (BTL2). RML y TLL se adquirieron de forma comercial mientras que BTL2 fue expresada y purificada en nuestro laboratorio. Se logró optimizar un protocolo de inmovilización para dichas lipasas con el cual se obtuvo un 75,5%, 46,5% y 61,1% de actividad en los inmovilizados de TLL, RML y BTL2 respectivamente. Además se evaluó la estabilidad de dichos inmovilizados a altas temperaturas (60°C-65°C). Se determinó la capacidad de generar biodiesel utilizando una técnica cromatográfica (TLC) para visualizar los resultados. Se comprobó la capacidad de uno de los inmovilizados realizados con TLL de generar biodiesel luego de 24hs. Se obtuvo un alto porcentaje de conversión (estimado en un 90%) ya que se observó una desaparición de los triglicéridos y una aparición del oleato de etilo. Estos ensayos son prometedores en la utilización de enzimas inmovilizadas para la producción de biodiesel.

Palabras Clave: Biodiesel, lipasas, Inmovilización enzimática, nanopartículas de sílica, derivados enzimáticos, generación de energía, síntesis enzimática.

ÍNDICE

1. Introducción	8
1.1 Producción de Biodiesel	9
1.2 Enzimas	13
1.3 Inmovilización	15
1.3.1 Unión Covalente	16
1.3.2 Adsorción	17
1.3.3 Atrapamiento.....	17
1.4 Nanopartículas de sílica biomimética	18
1.5 Lipasas	18
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo General:	21
2.2 Objetivos Específicos:.....	21
3. Metodología.....	22
3.1 Materiales	22
3.2 Métodos	22
3.2.1 Expresión y recuperación de BTL2 en <i>E.coli</i> BL21	22
3.2.2 Purificación de BTL2 mediante cromatografía hidrofóbica en Batch	23
3.2.3 Acondicionamiento de los preparados enzimáticos comerciales	23
3.2.4 Purificación de RML.	24
3.2.5 Análisis de pureza por SDS-PAGE.....	24
3.2.6 Evaluación de actividad por medio de zimografía	24
3.2.7 Evaluación del efecto del Tritón X-100 sobre la conformación de las lipasas	24
3.2.8 Medidas de actividad	25
3.2.9 Cuantificación proteica	25
3.2.10 Inmovilización de enzimas a soportes de sílica.....	26
3.2.11 Inmovilización Covalente	27
3.2.12 Evaluación de estabilidad a temperatura.	27
3.2.13 Evaluación de estabilidad en acetona.	27
3.2.14 Reacción para la generación de biodiesel.....	27
3.2.15 Cromatografía en capa fina.....	28
4. Resultados Obtenidos:	29
4.1 Determinación de contenido proteico en los preparados enzimáticos.	29
4.2 Determinación de la actividad enzimática y de actividad específica	31

4.3 Purificación de RML	32
4.4 Ensayos de estabilidad en presencia de acetona	35
4.5 Generación de inmovilizados enzimáticos	38
4.6 Ensayos de estabilidad a altas temperaturas.....	44
4.7 Aproximación a la producción de biodiesel	47
5. Discusión	49
6. Análisis Económico	51
7. Conclusiones	52
8. Referencias Bibliográficas.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la utilización de combustibles derivados de fuentes no renovables como es el caso del petróleo es un asunto crucial de la vida cotidiana. A partir de la crisis del petróleo de 1970 se generó un desconcierto con respecto a la disponibilidad del mismo y los precios se vieron incrementados dado que la demanda superó a la oferta. Es por esto que en el transcurso de los años se han buscado fuentes de energía alternativas. Además se intenta sustituir la utilización de combustibles tradicionales por fuentes que sean sustentables y amigables con el ambiente para disminuir la emisión de gases que generan el efecto invernadero (1). Existen muchas empresas interesadas en la elaboración de un producto sustituto que pueda satisfacer esta demanda. En nuestro país la empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR) se encuentra trabajando en la generación de nuevas fuentes de energía como es la generación de biodiesel (2).

El biodiesel es un combustible alternativo al clásico gas-oil derivado del petróleo. Se elabora a partir de elementos 100% naturales y biodegradables. Entre estos elementos se encuentran los aceites vegetales obtenidos de semillas, plantas, algas oleaginosas, sebo y también reciclando aceite usado para cocción (3, 4). Más estrictamente, según la especificación standard para biodiesel de US (ASTM 6751-02), el biodiesel es definido como un combustible generado a partir de mono-alquil ésteres provenientes de cadenas largas de ácidos grasos derivados de aceites vegetales o grasas animales (5). Esta definición con respecto al biodiesel también es acogida por la Unión Europea (EN 14214) (6).

Con respecto a Uruguay, actualmente la empresa ALUR suministra a ANCAP 50.000 toneladas de biodiesel al año. Se elaboran mezclas con gas-oil conteniendo hasta 7% de biodiesel. La política empresarial de ANCAP es que en un futuro Uruguay pueda sustentarse mediante la energía obtenida a partir de los residuos de aceite (2). Para ello el biocombustible será generado a partir de un 80% de girasol y 20% de soja dando como subproductos harina para animales y glicerol para la industria farmacéutica (Figura 1) (7).

El biodiesel puede ser mezclado con otros combustibles y otorga diversas ventajas. Se ha reportado como un posible sustituto de los combustibles basados en petróleo dado su amplia gama de propiedades atractivas. Ofrece la ventaja de ser biodegradable y no tóxico con el medio ambiente; pero su principal ventaja es que, al tratarse de una fuente de energía renovable, mantiene los niveles del ciclo de dióxido de carbono. Además, su combustión emite una baja proporción de gases perjudiciales para el medio ambiente como son el monóxido de carbono, el sulfuro, hidrocarburos aromáticos y otras partículas (8).

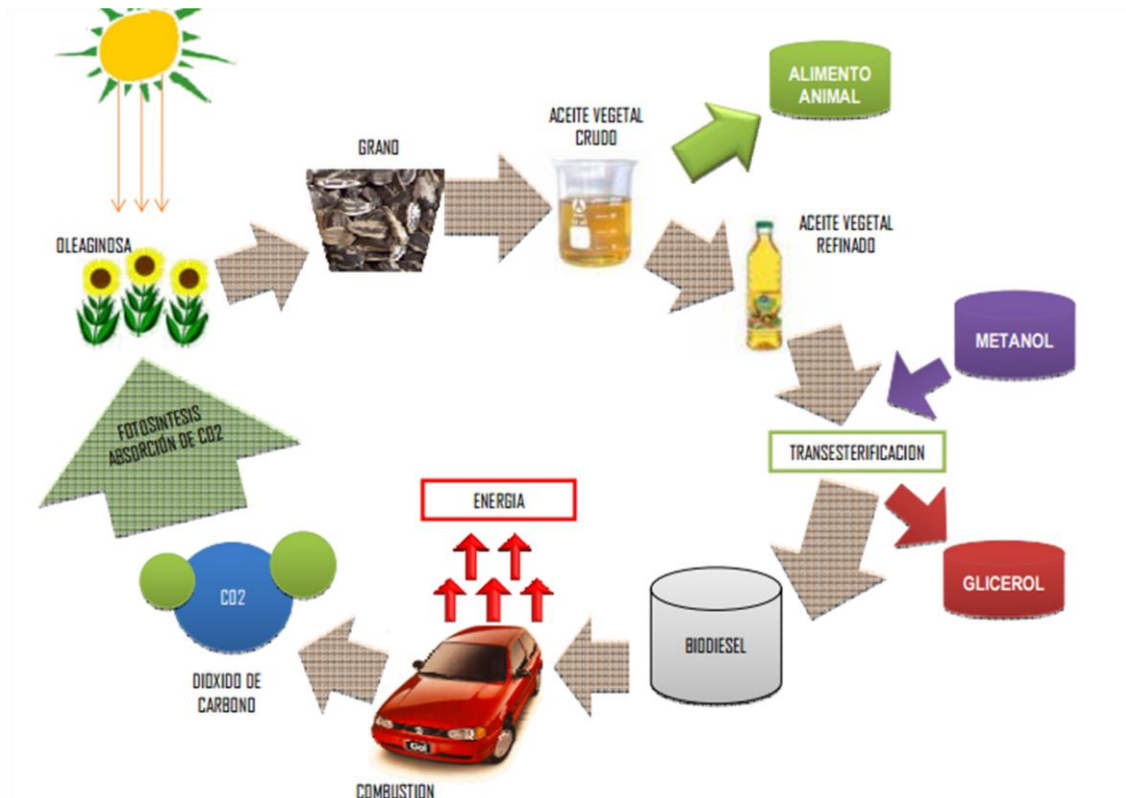


Figura 1: Ciclo del biodiesel propuesto por ANCAP. Se extrae aceite de los cultivos. Luego éste se transesterifica para generar biodiesel. Este es utilizado como combustible liberando energía y dióxido de carbono que es absorbido por las plantas cerrando el ciclo. Como subproductos se generan alimentos animales y glicerol (7).

1.1 Producción de Biodiesel

Para la producción de biodiesel, como fue mencionado anteriormente, la metodología más tradicional consiste en la transesterificación de aceites vegetales y grasas animales. El proceso de transesterificación fue descubierto en 1853 por los científicos E. Duffy y J. Patrick. Esta reacción se da entre los triglicéridos y un alcohol en presencia de un catalizador, dando como productos finales de reacción ésteres del alcohol utilizado y glicerol (Figura 2). Para la generación de biodiesel es fundamental el uso de triglicéridos que contengan ácidos grasos de cadena larga como son los que se encuentran contenidos en distintos aceites como el de soja, maíz, arroz, canola, entre otros. Los alcoholes más adecuados para la generación de Biodiesel son los de cadena corta y bajo peso molecular como es el caso del metanol, etanol y butanol. Con respecto a los catalizadores estos son muy variados. A nivel industrial el método químico es el que prevalece y consiste en el agregado de una base (hidróxido de potasio o de sodio) o un ácido (ácido sulfúrico). El utilizar una base tiene como ventaja una mayor efectividad, resultando en una alta conversión. Además, se obtienen buenos resultados trabajando a relativamente bajas temperaturas (60°C). Sin embargo, también presenta desventajas. Si el aceite utilizado presenta muchos ácidos grasos libres o un alto contenido de agua, es probable que se lleve a cabo la saponificación. Esto significa, no solo que se consume el catalizador, sino que también aumenta la dificultad de la separación y purificación del Biodiesel. Para el caso del agregado de un ácido, la presencia de altas cantidades de ácidos grasos libres o de

agua no es un inconveniente. Su desventaja radica en que los ácidos, al ser corrosivos, pueden dañar el equipamiento y en que no son efectivos para generar metil ésteres (9). Por otro lado, existen nuevos métodos como es el caso del método enzimático donde se utilizan lipasas como catalizadores (1).

Cuando ocurre la transesterificación se rompe el enlace éster de un ácido graso presente en el triglicérido y se forma un nuevo enlace éster con el alcohol que se encuentre presente. La relación de la reacción es de 3 moles de alcohol por cada mol de triglicérido. Esto da lugar a ésteres de ácidos grasos conocidos como biodiesel y glicerol (Figura 2). Para obtener una reacción completa y formación del glicerol es necesario que ocurran tres reacciones de transesterificación consecutivas (Figura 3). La primera da lugar a la formación de diglicéridos y liberación de un éster, la segunda genera monoglicéridos y la liberación de un nuevo éster y en la tercera reacción se obtiene un nuevo éster y finalmente el glicerol (10).

Es importante tener en cuenta que para que la reacción ocurra se debe trabajar en un ambiente no acuoso ya que la presencia de agua genera hidrólisis (10). Además, se debe de tener en cuenta que existen múltiples parámetros que influyen directa o indirectamente en la reacción. Estos abarcan la cantidad de catalizador a utilizar, el tipo de alcohol utilizado y la temperatura, así como también el tiempo de reacción. Asimismo hay que tener en cuenta la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el reactivo utilizado y por supuesto el contenido de agua (1).

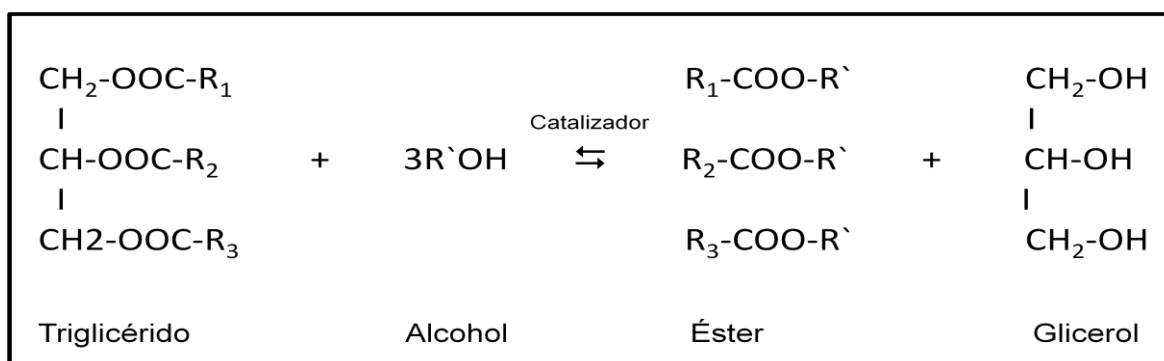


Figura 2: Esquema de una reacción general de transesterificación de triglicéridos. En este esquema se muestra la relación molar que existe entre los triglicéridos y el alcohol utilizado para la generación de esteres de alcohol y obtención de glicerol (11).

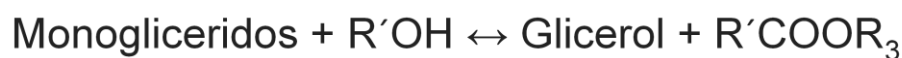
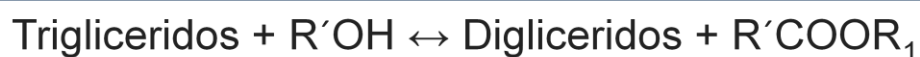
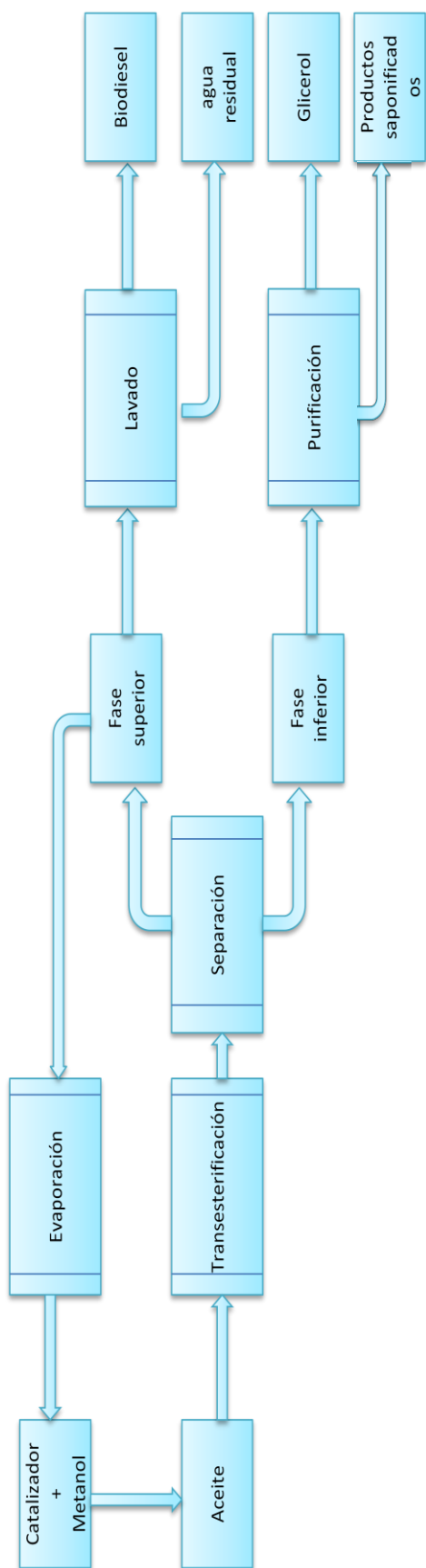


Figura 3: Transesterificación de triglicéridos en presencia de alcohol por medio de tres reacciones reversibles consecutivas (10).

Como ya fue mencionado, los catalizadores en el proceso de transesterificación pueden ser químicos o enzimáticos presentando cada uno de ellos ventajas y desventajas. Debido a que los catalizadores químicos son de bajo costo (US\$ 0,62 por kilo) y que con ellos se obtiene un alto rendimiento (mayor al 95%), son la opción utilizada por excelencia en la industria (12). En este proceso la glicerina es un subproducto de fácil contaminación por el exceso de alcohol utilizado y el catalizador químico. Por lo tanto, si se quiere utilizar es necesario que sea refinada y se debe de remover el alcohol en exceso. El proceso en su totalidad genera una cantidad de desperdicios considerable. La recuperación de la glicerina pura es muy importante y en caso de no poderse remover el alcohol se requiere la realización de procesos más costosos y dañinos para el medio ambiente. Por el contrario, los métodos enzimáticos si bien son más costosos (US\$ 1000 por kilo) son más amigables con el medio ambiente, y tras la reacción el glicerol es fácilmente recuperable (12). El glicerol debe ser obtenido con una pureza superior al 80% para que este pueda ser utilizado en la industria (cosmética, alimentos, pasta de dientes, drogas, alimentos para animales, pesticidas, tabaco, etc) (4, 13). Por otro lado, los métodos enzimáticos presentan un menor número de pasos de purificación y una menor cantidad de residuos a ser tratados (Figura 4) (10).

A



B

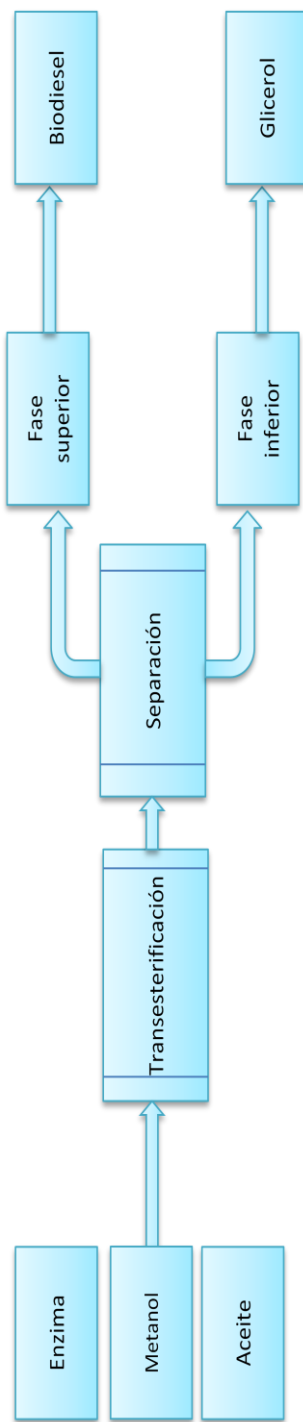


Figura 4: Comparación entre los pasos para la Obtención de biodiesel por métodos químicos y enzimáticos
 Los métodos químicos requieren mayor cantidad de pasos para la recuperación del glicerol y un lavado para la obtención del Biodiesel mientras que los métodos enzimáticos tanto la generación de biodiesel y el glicerol es directa (4).

Sin embargo, en la actualidad la utilización de enzimas no es aplicable a nivel industrial ya que su utilización genera un aumento en los costos de producción (14). De todas formas, debido a las ventajas que estas presentan existen diversas aproximaciones para poder aprovecharlas. Una de las formas que se encuentra en desarrollo y es prometedora en la disminución de los costos es la posibilidad de reutilizar la enzima. Para ello se plantean distintas estrategias de inmovilización (ver 1.3) con lo cual se genera la posibilidad de decantar la enzima una vez culminada la reacción.

1.2 Enzimas

Los procesos mediados por enzimas han sido utilizados desde las civilizaciones más antiguas hasta el día de hoy donde se conocen aproximadamente 4000 tipos de enzimas diferentes (15, 16). Las enzimas son en su gran mayoría proteínas que catalizan procesos biológicos. Son generadas en organismos vivos y se destacan por acelerar una amplia variedad de reacciones químicas que naturalmente tardarían demasiado tiempo como para que se diera la vida (17). Las mismas pueden desempeñar su función en un rango de condiciones muy variables dependiendo del organismo del que provienen y de su función primordial. La mayoría son sustrato específicas y dan origen a un único producto propio de cada enzima (17). Para trabajar con ellas se debe realizar una correcta evaluación para determinar cuales son las mejores condiciones para favorecer su desempeño (pH óptimo, temperatura, presión, solvente, etc) (18-20).

Son de gran interés biotecnológico ya que no generan subproductos indeseados y además pueden ofrecer ventajas económicas frente a la utilización de métodos químicos tradicionales. El Mercado de las enzimas fue de 3300 millones de dólares en el 2010 y tiene un crecimiento anual mayor al 6% proyectándose un movimiento de 4400 millones de dólares para el 2015 (Figura 5) (21, 22). El 80% de estas enzimas utilizadas en la industria son hidrolasas que catalizan el clivaje hidrolítico de ésteres, grupos amino y de otros enlaces C-N (23). Sin embargo, estos números podrían ascender aun más si a nivel industrial la utilización de las enzimas generara una mayor ganancia. Actualmente en la mayoría de los procesos en que se utilizan enzimas las mismas se encuentran en estado soluble y la recuperación de estas en el producto final es tediosa y genera costos adicionales (21). Además no son muy estables y presentan serios problemas al encontrarse sometidas a procesos que no desarrollan naturalmente (21, 24). Sin embargo, a pesar de estas desventajas existen industrias en las que son muy utilizadas como por ejemplo en la elaboración de productos cosméticos, en la industria alimentaria, industria farmacéutica, industria papelera, textiles, jabón en polvo y detergentes, entre otros (Tabla 1) (20, 25). De encontrarse estrategias adecuadas para la disminución de costos la utilización de las enzimas se podría extender a otras áreas industriales como la producción de biodiesel. Como se mencionó anteriormente, una de las estrategias más prometedoras para este fin es la inmovilización de las mismas (17, 21).

Tabla 1: Mercados y segmentos donde se utilizan las enzimas. Se muestra el incremento del mercado para los próximos años.

Market	Segment	2000		2005	
		Million dollars	%	Million dollars	%
Industrial	Food	680	37	890	33
	Detergents	500	27	690	26
	Textiles/leather	140	9	190	7
	Paper	80	6	160	6
	Chemicals	50	3	70	3
	Total	1450	81	1451	81
Speciality	Diagnostics	150	8	300	11
	Reagents	120	6	240	9
	Kinetic resolution	70	37	115	4
	Asymmetric synthesis	10	1	15	1
	Total	350	19	670	25
Total		1800	100	2670	100

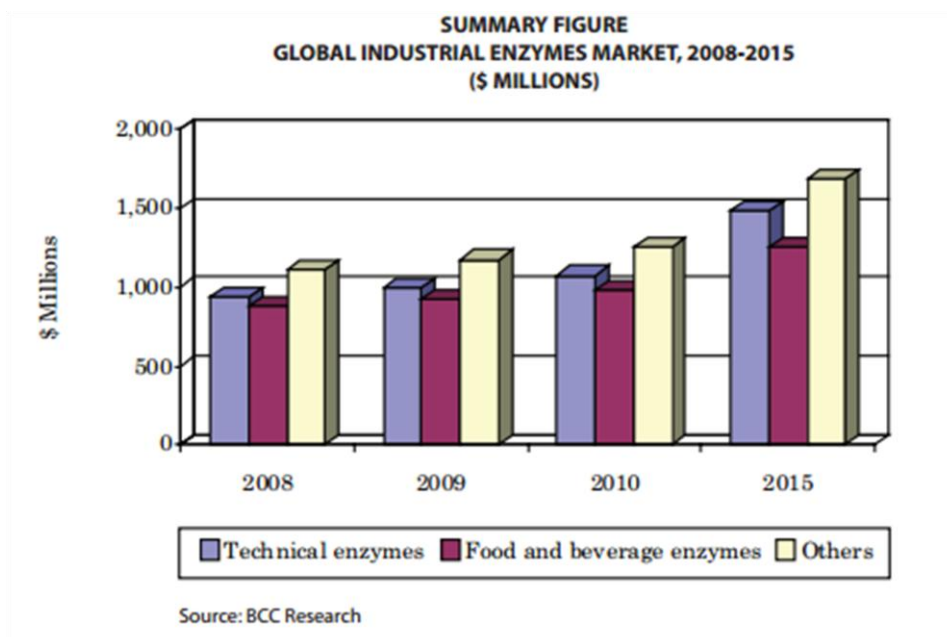


Figura 5 : Mercado global de enzimas aplicadas en la industria (2008-2015). Existen tres segmentos: las enzimas aplicadas en procesos industriales tradicionales, en la elaboración de alimentos y la categoría de otros. Se observa un crecimiento general para los tres segmentos en el transcurso de los años siendo la categoría de otros la que tiene mayor flujo de dinero. Dentro de la categoría de enzimas aplicadas a procesos industriales tradicionales se encuentra el bioetanol (biocombustible) como la mayor fuente de ingresos (22).

1.3 Inmovilización

La inmovilización es un fenómeno presente en la naturaleza. Los microorganismos suelen agruparse en comunidades adheridos a superficies, las que se conocen como biofilms. Por otro lado, artificialmente se han logrado inmovilizar todo tipo de moléculas. Por ejemplo, se han inmovilizado proteínas, pequeños péptidos, azúcares, lípidos, drogas, ligandos y ácidos nucleicos. La inmovilización de enzimas en particular tiene su origen en 1916. Consiste en la unión de la enzima a un soporte físico o matriz. Esto presenta una gran ventaja frente a la enzima soluble al posibilitar su recuperación y reutilización ya que se generan biocatalizadores insolubles, siendo fácilmente separables de la mezcla de reacción; lo cual es clave teniendo en cuenta el alto costo de producción de las enzimas (21, 26, 27). Otra ventaja es la unión de la enzima a un soporte, lo que generalmente aumenta su estabilidad y en algunos casos favorece su interacción con el sustrato (17, 28).

Además, la inmovilización de enzimas resulta atractiva para la industria ya que en este estado la enzima puede tener un tiempo de vida media superior al de su estado soluble y soportar altas temperaturas y distintos rangos de pH. A su vez, el encontrarse más estable permite una mayor flexibilidad operacional ya que en este estado soportan mejor la variación de ambientes (29).

Desde 1916 a la actualidad mucho se ha descrito acerca de los métodos de inmovilización y a los efectos del trabajo se describen tres: a) Unión covalente b) Adsorción c) Atrapamiento (Figura 6) (20).

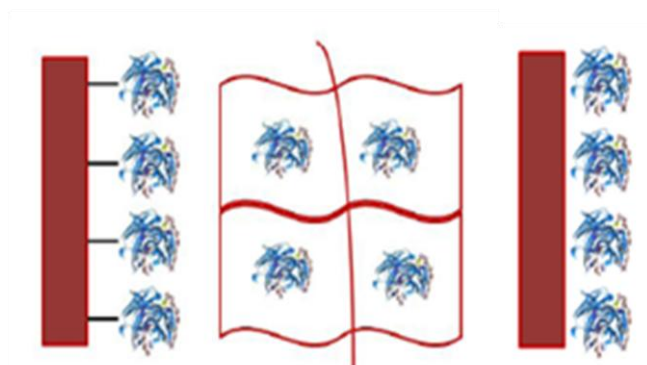


Figura 6: Esquema de los diferentes métodos de inmovilización. a: unión covalente; b: atrapamiento; c: adsorción (20).

1.3.1 Unión Covalente

La unión covalente es un método convencional de inmovilización. Se origina a partir de la unión covalente entre la enzima y el soporte, formando un enlace fuerte y estable. Por lo general los soportes utilizados son poliacrilamida, sílica porosa y agarosa (30).

Para unir a las enzimas covalentemente al soporte se pueden utilizar los diversos grupos químicos que estas presentan. Para ello los más utilizados son los grupos aminos y en segundo lugar los grupos hidroxilos, sulfhidrilos, carboxilos y los anillos aromáticos (31). Estos grupos funcionales pueden encontrarse en diferentes aminoácidos los cuales logran interaccionar con grupos reactivos del soporte (28).

Para usar esta metodología se pueden seguir diversas estrategias pero que comparten lineamientos en común. Generalmente, en primer lugar, se llevaría a cabo la funcionalización del soporte. Luego éste se activaría para finalmente agregar la proteína, completándose así el proceso de inmovilización (30).

La inmovilización covalente presenta como principal ventaja la fuerza del enlace, lo que se puede traducir en una estabilización de la enzima y una menor fuga de esta. Por otro lado, entre sus desventajas se encuentra la posible modificación estérica de la enzima ocasionando pérdida de actividad. Además, suele ser una unión irreversible, imposibilitando la reutilización del soporte (31).

En la figura 7 se visualiza un ejemplo de inmovilización covalente. En este caso, el soporte es primeramente funcionalizado. Luego, éste es activado para finalmente agregar la enzima inmovilizándola.

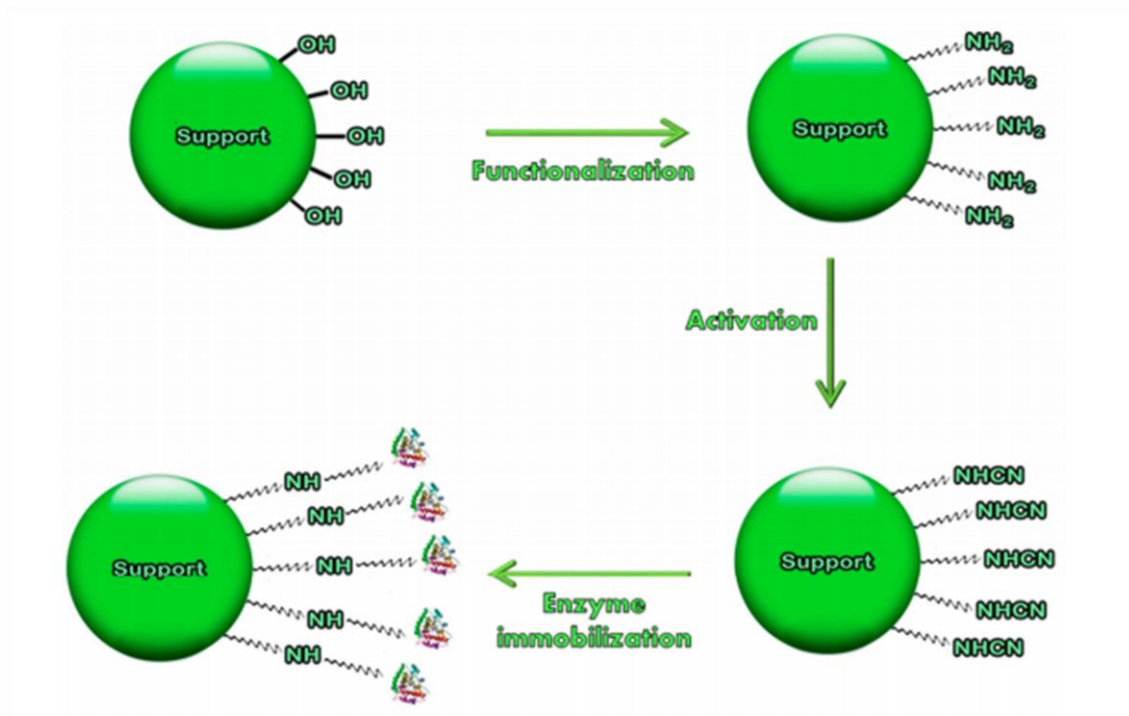


Figura 7: Se visualiza un ejemplo de inmovilización covalente. En este caso, el soporte es primeramente funcionalizado. Luego, éste es activado para finalmente agregar la enzima inmovilizándola.(32).

1.3.2 Adsorción

En la inmovilización por adsorción la unión entre la enzima y el soporte se produce por enlaces débiles como son las interacciones hidrofóbicas y los enlaces iónicos. Es un método simple, rápido y económico. Como ventaja en este método la enzima al no verse modificada químicamente su probabilidad de quedar activa es más alta ya que su sitio activo permanece invariado. Presenta como desventaja que al ser una unión débil es más fácil la pérdida del material cuando se utiliza en condiciones agresivas. Pero al mismo tiempo al ser un método reversible ante cambios de pH o de concentraciones salinas puede traer como ventaja la reutilización del soporte cuando la enzima se inactiva (17, 24, 28, 33).

1.3.3 Atrapamiento

En este caso, las enzimas son atrapadas dentro de nanopartículas o polímeros. La matriz en este caso es permeable, permitiendo la entrada y salida de los sustratos y productos; pero no de la enzima. Las ventajas del atrapamiento son que es un método rápido, económico y que no requiere condiciones extremas. Permite además contener la enzima en un ambiente libre de contaminación microbiana o de otras proteínas. La principal desventaja es la transferencia de masa a través de la matriz y la inactivación de las enzimas en el proceso de encapsulación (28).

1.4 Nanopartículas de sílica biomimética

En la naturaleza, estructuras de sílica pueden ser encontradas en esponjas y diatomeas. Dichas estructuras varían ampliamente en morfología y tamaño de poro. Recientemente se ha reportado la generación de estas estructuras in vitro, mediante el agregado de aditivos, por ejemplo la polietilenimina. Las nanopartículas de sílica biomimética pueden ser sintetizadas en condiciones ambientales (presión y temperatura) lo que es importante por no aumentar los costos. Además tiene características ventajosas como ser de origen natural, su bajo costo, presentar una baja o nula toxicidad, la posibilidad de elegir el tamaño de los poros, la estabilidad de su estructura (resisten ausencia de agua, particularmente importante en este trabajo) y el poder funcionalizar tanto su interior como su exterior de ser necesario (34, 35). A su vez, son muy utilizadas ya que permiten tener una relación superficie/volumen mayor que al utilizar otros materiales (32).

En esta oportunidad se trabajó con la metodología de atrapamiento como una primera exploración. Esta se basó en el atrapamiento de la enzima por medio de la formación de una nanopartícula de sílica recubriendo a la enzima. Para que esto ocurra fue necesaria la presencia de aniones fosfato y grupos aminos. La polietilenimina (PEI) y la espermidina (SP) son polímeros que otorgan estos grupos necesarios para la generación de los entrecruzamientos con los fosfatos que luego precipitan en presencia de ácido silícico (TMOS hidrolizado) (36).

1.5 Lipasas

En 1856 Claude Bernard descubrió una lipasa en el jugo pancreático. Observó que esta enzima hidrolizaba gotas de aceite insoluble y las convertía en productos solubles (37). Ya desde 1901 se ha estudiado la presencia de lipasas en los microorganismos *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* y *B. fluorescens*. Sin embargo, su habilidad como catalizadoras de la hidrólisis y sintetizadoras de ésteres ha sido descubierta hace unos 70 años.

Las lipasas se definen como enzimas, que formando parte de la familia de las hidrolasas, actúan sobre enlaces éster. En la naturaleza su función es hidrolizar triglicéridos para generar diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Se encuentran ampliamente distribuidas siendo encontradas en el reino animal y vegetal, e incluso en los organismos unicelulares más simples. Suelen presentar un lid, el cual es una superficie anfipática que recubre el sitio activo hidrofóbico ocultándolo del agua. La activación interfacial es un aumento pronunciado en la actividad que se encuentra en la mayoría de las lipasas. Ocurre cuando por alguna razón los triglicéridos forman una emulsión estando mucho más accesibles para los sitios activos (38-41).

Además de las funciones biológicas, las lipasas son capaces de catalizar reacciones de acidólisis, alcoholólisis, aminólisis, esterificación, interesterificación y transesterificación; lo que las hace altamente versátiles (42).

Por otro lado, al poder catalizar reacciones tanto en condiciones acuosas como no acuosas, sus aplicaciones son muchas y muy variadas. Se utilizan en la medicina, en la industria alimenticia, en química orgánica y en el tratamiento de aguas residuales, así como también como biosensores y para la producción de biodiesel. Incluso se han hecho investigaciones sobre la degradación de polímeros por la acción de lipasas de levaduras (43, 44).

En este trabajo se experimentó con tres lipasas diferentes. Dos de ellas son comerciales y provienen de *Rhizomucor miehei* (RML) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL). La tercera se produjo recombinante en el laboratorio y proviene de *Bacillus thermocatenuatus* (BTL2). BTL2 presenta un tamaño de 43 kDa (45). Por otro lado, RML y TLL tienen un tamaño de 29,5 kDa y 31,7 kDa respectivamente (46, 47).

Con respecto a BTL2 se ha visto que es muy resistente a la presencia de solventes y cambios térmicos (dado que resiste temperaturas de 60°C-75°C por intervalos cortos). Existen datos estructurales preliminares obtenidos a partir de la técnica de cristalización y difracción de rayos X (Figura 8) (48).

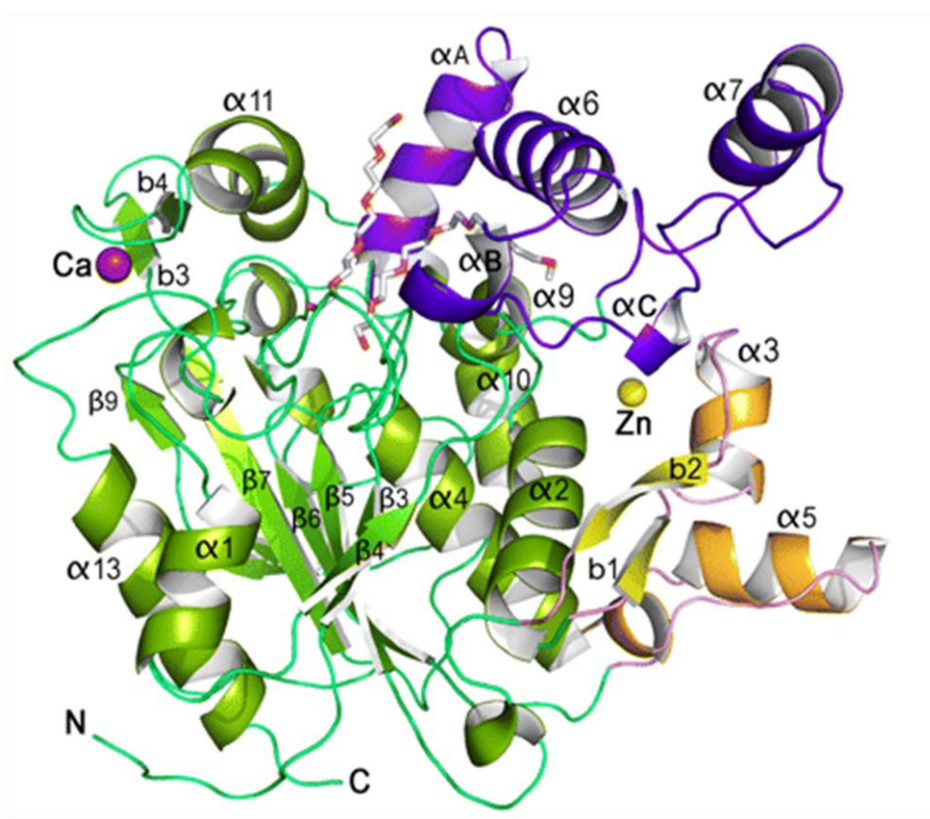


Figura 8: Estructura de BTL2 en conformación abierta.. Se pueden observar los dominios (α/β) en distintos colores. En el sitio activo se observa la presencia de dos moléculas de Triton X-100 (48).

RML fue la primera lipasa a la que se le conoció su estructura tridimensional (Figura 9). Es una enzima que varía su especificidad por diferentes sustratos dependiendo del pH. A pHs bajos es más afín a hidrolizar ácidos grasos de cadena corta, mientras que a pHs altos su afinidad por ácidos grasos de cadena larga aumenta (42).

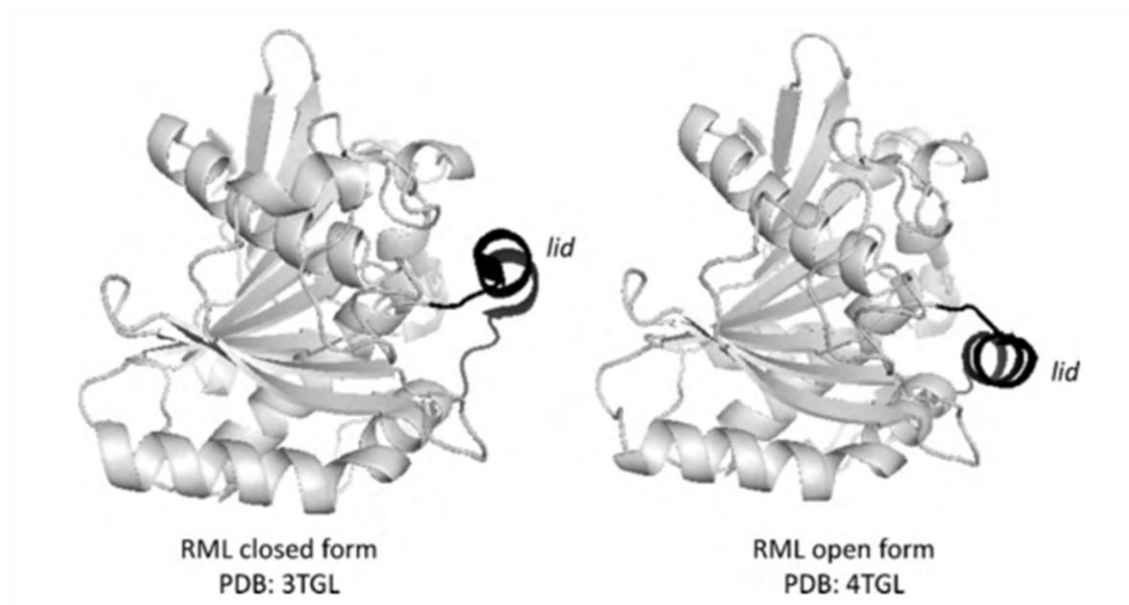


Figura 9 : Estructura de RML en conformación cerrada y abierta. Se observa el sitio activo con el lid (42).

Al igual que RML, TLL es una típica lipasa con lid, presentándose en solución un equilibrio entre la conformación abierta y cerrada como se visualiza en la figura 10. Dicho lid cubre al sitio activo en la conformación cerrada. Por otro lado, en la conformación abierta el sitio activo se encuentra expuesto al medio. El agregado de gotas de aceite, así como de otros compuestos hidrofóbicos, desplaza el equilibrio hacia la conformación abierta de la enzima provocando la conocida activación interfacial (38, 49).

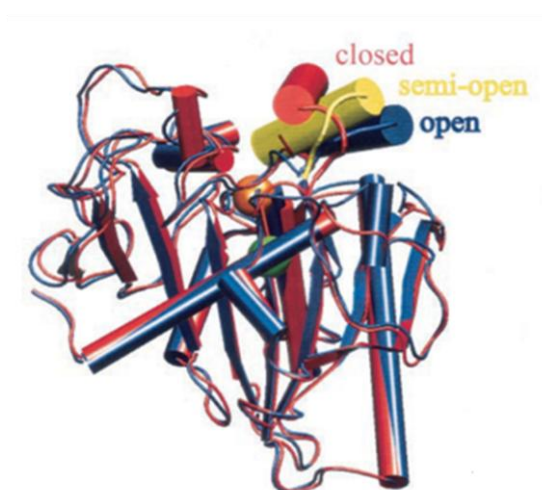


Figura 10 : Estructura de TLL con superposición de conformación cerrada y abierta. Se observa el sitio activo con el lid (48).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo es el estudio de lipasas de distinto origen y su inmovilización para su posible aplicación como catalizadores en la generación de biodiesel a partir de aceite vegetal.

2.2 Objetivos Específicos:

Para poder cumplir con el objetivo general en este trabajo se plantean realizar los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de lipasas comerciales de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y *Rhizomucor miehei* (RML).
- Expresión, purificación y caracterización de la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2).
- Inmovilización de las enzimas en nanopartículas de sílica mediante dos estrategias de inmovilización: 1) Atrapamiento
2) Unión covalente.
- Evaluación de estabilidad de los inmovilizados obtenidos sometiendo a los mismos a 60°C (TLL y RML) y 65°C (BTL2).
- Aproximación a la producción de biodiesel con el derivado más estable y su evaluación mediante técnicas cromatográficas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales

Lipasas comerciales provenientes de los organismos *Rhizomucor miehei* (RML) y *Thermomyces lanuginosus* (TLL) obtenidas de Sigma Aldrich®. La BTL2 recombinante fue expresada y purificada a partir de *E.coli* BL21.

Medio de cultivo LB (Luria Bertani); sales; 4- Nitrofenil butirato (pNPB), azul de coomasie, kit para detección de proteínas; Tritón X-100; polietilenimina (PEI); espermidina (SP); glutaraldehído; carbodimida; etilendiamina; Muf butirato; PBS; lisozima; Standard de oleato de etilo y ácido oleico de Sigma Aldrich®. TMOS: Tetrametil ortosilicato para síntesis de Merck. Aceite alto oleico de Cousa S.A. Hexano; acetona y ácido acético de DORWIL. Columna PD-10 (Sephadex G25) de general electric. TLC de MACHEREY- NAGEL. EDTA de J.T Baker. Buffer Tris y Persulfato amonio (APS) de Biopack. SDS; Acrilamida; bis-acrilamida y TEMED de Applichem. Etanol y fosfato de sodio dibásico de Carlos Erba Reagents. Octyl Sepharose™ 4 Fast Flow de GE Healthcare. Minivolt® 4-12% Bis-Tris Plus de Life Technologies.

3.2 Métodos

3.2.1 Expresión y recuperación de BTL2 en *E.coli* BL21

En primer lugar se expresó BTL2 recombinante en líneas estables de *E.coli* transformadas con el vector (pBTL) que codifica para la lipasa BTL2 (gentileza de Prof. José Manuel Guisán). Se purificó según lo especificado por Schmidt-Dannert et al., 1996 (50), obteniéndose altos niveles de expresión llevando a cabo las especificaciones de Rúa et al., 1998 (51).

Primero se generó un pre-inoculo de *E.coli* BL21 en un tubo de ensayo con medio de cultivo selectivo conteniendo 5mL de LB líquido y ampicilina 100 mg/mL. Se incubó el cultivo 24 hs a 37°C. Luego se inoculó con el pre-inóculo un matraz conteniendo 250mL de LB y ampicilina 100 ug/mL Este cultivo se incubó a 37°C durante 2 horas y se monitoreó su densidad óptica (DO) por medio de un espectrofotómetro (2800 UV/VIS SPECTROPHOTOMETER de Unico) a 600nm. Una vez que se llegó a la densidad óptica deseada (0,6) se procedió a la inducción del promotor colocando el cultivo a 42°C en agitación durante 16 horas.

Posteriormente se centrifugó el cultivo en falcons de 50mL a 5000g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se procedió a la lisis celular. Se utilizaron dos técnicas para la extracción del extracto proteico: 1) ruptura química por medio de un buffer de lisis (EDTA 0,1mM, lisozima 1,5mg/mL y PBS) y 2) la posterior ruptura física por medio del sonicador (Vibra

cell™ SONICS) (tiempo 30seg; pulse on 0.5; pulse of 15; amplitud 030%). Luego se removió el detrito celular por medio de centrifugación durante 30 minutos a 14 000g, 4°C.

3.2.2 Purificación de BTL2 mediante cromatografía hidrofóbica en Batch

En el caso de BTL2 se recuperaron las proteínas solubles y se procedió a una purificación por medio de la realización de una cromatografía hidrofóbica usando una columna Pd10 (Sephadex G-25) con filtro conteniendo 0,5g de octil agarosa. Esta columna se equilibró con buffer fosfato 25mM pH 7 añadiendo 5 mL del mismo y dejándolo eluir por gravedad, este paso se repitió tres veces. Una vez equilibrada la columna se agregó una dilución 1/10 del lisado y se dejó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C). Se dejó eluir el sobrenadante (material no unido) y luego se realizó un lavado de un 1 minuto con 10 mL de buffer fosfato 5mM pH 7. Una vez transcurrido el tiempo de lavado se recogió por gravedad los 10 mL de buffer y se recolectó una muestra (lavado). Luego se desorbió la proteína dejándola en agitación durante 1 hora con 0,5% Triton X-100 en buffer fosfato 25mM pH 7 y colectando el eluido por gravedad.

Posteriormente se removió el Tritón para que no interfiera con la actividad de la enzima y obtener una solución libre de contaminantes. Para esto se realizó una cromatografía de exclusión molecular en la cual se eluyó la proteína en buffer fosfato 25mM pH 7 cuando se trabajó con la proteína en estado soluble y en buffer fosfato 0,1M pH 8 cuando se procedió a la realización de los inmovilizados.

3.2.3 Acondicionamiento de los preparados enzimáticos comerciales

A partir de la presentación comercial de las enzimas TLL y RML se procedió a la remoción de las sales y estabilizantes. Para esto se realizó una cromatografía de exclusión molecular donde en primer lugar se equilibró la columna con buffer fosfato 25mM pH 7 en caso de trabajar con la enzima soluble o en buffer fosfato 0,1M pH 8 cuando se procedió a la realización de los inmovilizados. Una vez equilibrada la columna se añadieron 2mL de enzima comercial que se eluyeron por gravedad, luego 1,5mL de buffer fosfato (el adecuado según si se trabajó con la enzima en estado soluble o con la que se va a inmovilizar) y por último se agregó 2mL de buffer fosfato para recuperar la fracción de interés conteniendo la enzima. Se eluyeron las proteínas en buffer fosfato 25mM pH 7 cuando se trabajó con la proteína en estado soluble y en buffer fosfato 0,1M pH 8 cuando se procedió a la realización de los inmovilizados.

3.2.4 Purificación de RML.

Se realizó una purificación de la enzima comercial RML. Inicialmente se realizó una gel filtración de exclusión molecular. Se equilibró una columna Pd10 (Sephadex G-25) con buffer fosfato 25mM pH 7 y luego se añadieron 2,5mL de enzima comercial RML. La enzima se eluyó en buffer fosfato 25mM pH 7 y luego se continuó con la incorporación de 3mL de RML (gel filtrada) en una columna conteniendo 0,5g de octil agarosa y se purificó mediante cromatografía hidrofóbica en batch al igual que se hizo con BTL2 (ver 3.2.2). Se midió la actividad de la enzima gel filtrada (ofrecido), del material no unido, del lavado y del eluido (ver 3.2.8) y se determinó su actividad específica (ver 3.2.9).

3.2.5 Análisis de pureza por SDS-PAGE.

Se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida Minivolt® 4-12% Bis-Tris Plus así como también geles de poliacrilamida al 10% según Laemmli (52) preparados en el laboratorio. Se trabajó en condiciones desnaturalizantes. Las muestras se sembraron en buffer de carga 4x diluidas previamente 1/10. Por otro lado las muestras se incubaron a 100°C durante 5 minutos para promover la desnaturalización de las proteínas. Se sembraron 20uL de las muestras en el gel y se utilizó buffer corrida SDS 1X. Las muestras se corrieron a 120V durante 1h y 30 minutos. Se tiñó por azul de coomasie.

3.2.6 Evaluación de actividad por medio de zimografía

Una vez finalizada la corrida electroforética se realizó un zimograma para la enzima RML según Jeff Wilkesman et al con ciertas modificaciones (53). Brevemente, el gel se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de tritón X-100 al 2,5%. Se realizaron tres lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con buffer fosfato 25mM pH 7. Luego se sumergió el gel durante 10 minutos en una solución de sustrato fluorescente muf butirato 0,1μM en buffer fosfato 25mM pH 7. Una vez evaluada la actividad por medio de la exposición al UV y tomada la fotografía se procedió a la tinción por coomasie.

3.2.7 Evaluación del efecto del Tritón X-100 sobre la conformación de las lipasas

Para el caso del estudio del efecto del tritón, las muestras se incubaron durante 1 hora con diferentes porcentajes de Tritón X-100: 0,25%, 0,5%, 1%, 2% y 5%. Luego se realizó una corrida electroforética donde se hizo un SDS PAGE 10% (ver 3.2.5).

3.2.8 Medidas de actividad

Se midió la actividad enzimática por medio de espectrofotometría a 348 nm ($E=5,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante 2 minutos para la enzima soluble y 5 minutos para los inmovilizados.

Para realizar dicha medida se utilizaron cubetas de vidrio con 2,0 mL de buffer fosfato 25mM pH 7 y 20 μL de *p*-nitrofenilbutirato (pNPB) 75 mM (disuelto en acetonitrilo) a 25°C. Una vez finalizada la hidrólisis espontánea del pNPB (luego de dos minutos) se añadieron 20 μL de enzima. La lipasa genera la hidrólisis del pNPB en *p*-nitrofenol y ácido butírico el cual es un producto colorimétrico de color amarillo que puede ser seguido por medio del espectrofotómetro. Para realizar las medidas se debió agitar bien la muestra. En el caso de los inmovilizados se les agregó un pequeño imán y se tomó la muestra colocando el tubo de ensayo con el imán sobre un agitador magnético (Equipo de Fisatom). Como blanco se utilizó buffer fosfato con pNPB y todas las medidas se hicieron por duplicado. En los inmovilizados la actividad se determinó de igual forma que la enzima soluble. La unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de 1 μmol de *p*NPB por minuto (UI), a pH 7.0 y 25 °C.

Se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} \left(\frac{\text{UI}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{pendiente} * 10000 * v_{\text{reacción}}}{5150 * v_{\text{enzima}}}$$

3.2.9 Cuantificación proteica

La cuantificación proteica se realizó con el método del ácido bicinconínico (BCA). Para esto se utilizó un kit de Sigma y se siguieron las especificaciones del mismo (54). Este ensayo permite determinar las concentraciones de proteínas que oscilan entre 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y 1,5 mg/mL . El ensayo se sigue por espectrofotometría donde el BCA vira de color verde a azul en función de la concentración proteica. Esto se logra por la reducción dependiente de temperatura (65°C durante 15 minutos) de los iones Cu^{2+} a Cu^{+} mediada por enlaces peptídicos. Esta reducción es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Las moléculas del ácido bicinconínico reaccionan con el Cu^{+} formando un color violeta-azul medido por el espectrofotómetro a 560 nm. Se realizó una curva de calibración con BSA por duplicado y se sembraron diferentes diluciones de las muestras por duplicado: 1/2, 1/5, 1/10 y 1/20 para las tres enzimas.

3.2.10 Inmovilización de enzimas a soportes de sílica

La inmovilización de las enzimas se realizó mediante dos técnicas: ya sea por atrapamiento o por unión covalente. En ambos casos se realizaron en nanopartículas de sílica. Para lograr el atrapamiento se utilizaron cuatro protocolos diferentes los cuales denominaremos:

- 1) Protocolo original PEI
- 2) Enzima aminada
- 3) Protocolo modificado PEI
- 4) Protocolo Sp

3.2.10.1 Protocolo Original

Para la síntesis siguiendo el protocolo original se utiliza PEI 10% a pH 8. Se utilizan 500 μ L de solución enzimática (correspondiente a 66, 8,5 y 116 UI para TLL, RML y BTL2 respectivamente) con 250 μ L de PEI y 250 μ L de TMOS hidrolizado. Se homogeniza bien hasta que se forme la sílica. Una vez formada la sílica se centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente a 5000g. Se recoge el sobrenadante y se procede a lavar la sílica con NaCl 1M para eliminar cualquier unión débil. Posteriormente se realizan dos lavados más con buffer fosfato pH 7 y se deja la sílica en este pH (55). Se mide la actividad del sobrenadante y de la sílica (ver 3.2.8)

3.2.10.2 Enzima aminada

Para la aminación se incuban 10 mL de etilendiamina 1 mol/L junto a 500 μ L de solución enzimática y 19 mg de carbodimida. Se incuba durante 2 horas y se realiza una cromatografía gel filtración para eliminar restos de dichas sustancias. Posteriormente se inmoviliza utilizando el protocolo original (ver 3.2.10.1) y se mide la actividad del sobrenadante y de la sílica (ver 3.2.8)

3.2.10.3 Protocolo modificado PEI

Para la síntesis siguiendo el protocolo nuevo se reduce el volumen de PEI a 50 μ L y luego se procede como en el protocolo original (ver 3.2.10.1).

3.2.10.4 Protocolo Sp

Para la síntesis con Sp se utilizan 250 μ L del mismo a 13mg/mL con 500 μ L de enzima y 250 de TMOS. Al igual que con PEI se homogenizó bien hasta que se formó la sílica. Una vez formada la sílica se centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente a 5000g. Se recoge el sobrenadante y se procede a lavar la sílica con NaCl 1M para eliminar cualquier unión débil.

Posteriormente se realizan dos lavados más con buffer fosfato 25mM pH 7 y se deja la sílica en este pH. Se mide la actividad del sobrenadante y de la sílica (ver 3.2.8).

3.2.11 Inmovilización Covalente

Los soportes glutaraldehído fueron preparados activando previamente los grupos amino de la sílica. Se preparó 1 gramo de sílica a partir de 2,5 mL de PEI 10%, 2,5 mL de TMOS y 5mL de buffer fosfato 100mM pH 8. Luego se funcionalizó la sílica con 2mL de una solución de glutaraldehído al 15% v/v en tampón fosfato de sodio 200mM a pH 7. Se dejó en agitación por 16 hs a 25°C. Se lavó con fosfato de sodio 25mM pH 7 y posteriormente con agua destilada. Finalmente se añadió 2,5 mL de una dilución 1/10 de TLL (ver 3.2.3) o BTL2 (ver 3.2.2) (55).

3.2.12 Evaluación de estabilidad a temperatura.

Para la evaluación de la estabilidad se utilizaron los derivados enzimáticos con alta actividad y en paralelo se utiliza como control la enzima soluble. Se utilizó un termobloque a 65°C para BTL2 y a 60°C para TLL y RML. Se realizó una medida a tiempo 0. Luego se realizaron medidas a tiempo final (90 min).

3.2.13 Evaluación de estabilidad en acetona.

La evaluación de las enzimas solubles TLL, RML y BTL2 en acetona se llevó a cabo midiendo la actividad de las mismas (ver 3.2.8) durante 5 horas luego de someterlas a 50% y 95 % de acetona a temperatura ambiente. A su vez se hizo un blanco sin acetona conteniendo buffer fosfato 25mM pH 7.

3.2.14 Reacción para la generación de biodiesel

La reacción de síntesis se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción conteniendo: 0,3 g de derivado, 2 mL de hexano, 293 µL de aceite alto oleico y 146 µL de etanol. Antes de su utilización el material de vidrio fue secado y el derivado se lavó con cantidades crecientes de acetona (20%, 50%, 80%, 100%) para eliminar el agua contenida. Dicha mezcla se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 72 h para BTL2 y durante 24 h para TLL. Se obtuvieron muestras para analizar en los tiempos: 1 h y 72 h para BTL2 y 24 h para TLL.

3.2.15 Cromatografía en capa fina

Para el análisis de la reacción de biodiesel se realizó una cromatografía en capa fina (TLC). Como fase móvil se utilizó una solución con las siguientes relaciones: hexano 90, acetato de etilo 10, ácido acético 1. Se sembró en la placa de TLC 20 μ L de la mezcla de reacción y 20 μ L de un control conteniendo la mezcla de reacción y la sílica sin la enzima. A su vez se sembraron 5 μ L de un estándar de oleato de etilo, 5 μ L de un estándar de ácido oleico y 5 μ L de aceite alto oleico. Una vez finalizada la siembra de la placa se colocó la misma en un recipiente cerrado herméticamente conteniendo la fase móvil. Se dejó subir la fase móvil hasta el extremo superior de la placa y luego se la retiró para su posterior secado a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo mediante una incubación con yodo en un nuevo recipiente hermético donde se comenzaron a visualizar las bandas.

4. RESULTADOS OBTENIDOS:

4.1 Determinación de contenido proteico en los preparados enzimáticos.

Para determinar el grado de pureza en cuanto a las posibles proteínas contaminantes se decidió realizar un SDS-PAGE. La pureza es importante al momento de inmovilizar las enzimas, ya que la contaminación con otras proteínas genera un menor rendimiento en la relación miligramo de enzima por miligramo de soporte. El objetivo fue inmovilizar las enzimas deseadas y no otras proteínas que estuvieran contaminando las muestras, aumentando así la relación lipasa/soporte. El resultado obtenido puede visualizarse en la figura 11. Según la bibliografía los tamaños de las enzimas son de 31,7 kDa, 29,5 kDa y 43 kDa para TLL, RML y BTL2 respectivamente y en la figura se marcan con una flecha. Se apreció un alto grado de pureza de la enzima recombinante BTL2, por lo que la purificación por cromatografía hidrofóbica resultó exitosa. Por otro lado, en los carriles 2 y 3 correspondientes a TLL y RML (Figura 11) se puede observar una amplia variedad de bandas correspondientes a distintos pesos moleculares. En el carril 2 correspondiente a TLL se observan bandas tenues de aproximadamente 70 y 56 kDa y bandas más intensas entre 40 y 35 kDa. Estas bandas corresponden a otras proteínas presentes en el preparado comercial de SIGMA las cuales no fueron identificadas. La banda correspondiente a TLL está marcada con una flecha y se puede observar que en proporción al resto de las bandas su intensidad es menor por lo que es uno de los productos minoritarios dentro del preparado comercial. Lo mismo ocurre en el carril 3 correspondiente a RML; se pueden observar bandas de 20 kDa, 25 kDa, 35 kDa aproximadamente y una banda muy intensa de aproximadamente 59 kDa. Con respecto a la banda correspondiente a RML está se muestra indicada con una flecha próxima a 30 kDa y también se encuentra en menor cantidad frente al resto de las proteínas presentes. La banda de 59 kDa puede corresponder a la presencia de dímeros de RML ya que la banda es el doble del peso molecular de la lipasa. Dicha banda presenta una intensidad mayor que la banda del monómero.

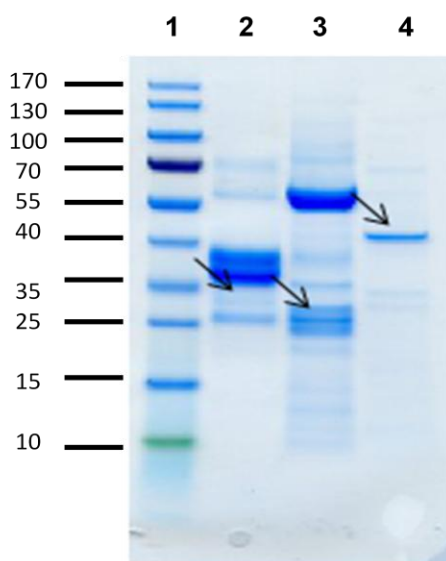


Figura 11: SDS-PAGE para determinación del contenido proteico en las enzimas utilizadas. Las muestras se corrieron en un gel armado comercial de 4 a 12% gradiente. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: TLL 1/10 comercial; Carril 3: RML 1/10 comercial; Carril 4: BTL2

Con el fin de verificar la posible existencia de dímeros en RML se prosiguió a la realización de un zimograma para la misma (Figura 12) y una electroforesis en presencia de diferentes concentraciones de tritón (Figura 13) para evaluar si efectivamente la banda observada corresponde a la posible presencia de dímeros.

En la técnica del zimograma posteriormente a la evaluación de la actividad el gel debe ser teñido con coomasie (Figura 12). El resultado de la tinción con coomasie se puede visualizar en la figura 12A. En los carriles 1 y 2 se sembró RML en distintas diluciones y se puede ver el monómero de unos 30 kDa y una banda de aproximadamente 60 kDa (supuesto dímero). Sin embargo, en la figura 12B donde se evalúa la actividad no se observó que la banda correspondiente al posible dímero presentara actividad tanto para el carril 1 como para el carril 2 mientras que la banda correspondiente al monómero sí presentó actividad. De todos modos, antes de descartar la existencia de un posible dímero se realizó una segunda estrategia para confirmarlo (Figura 13).

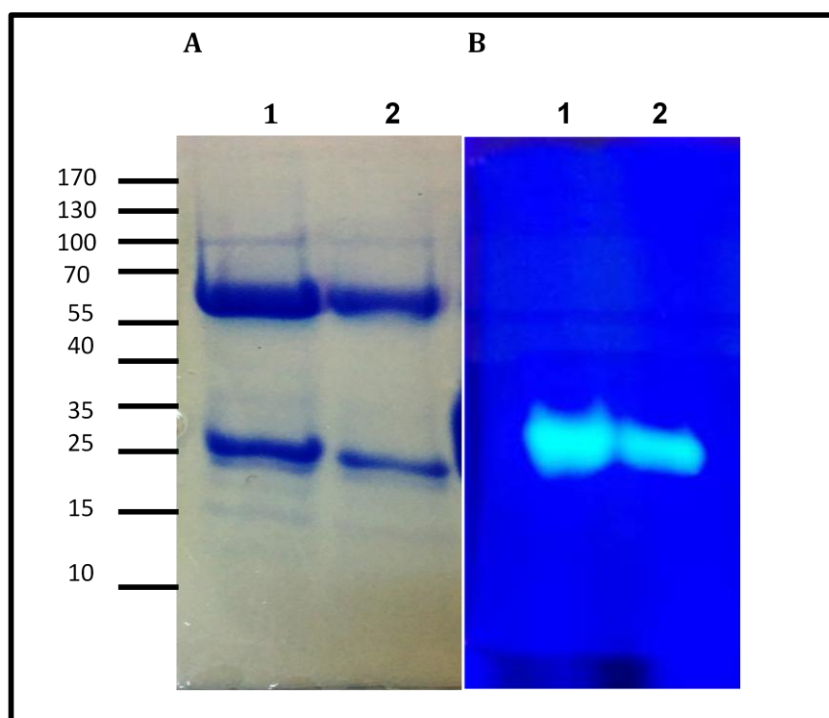


Figura 12: Zimograma para evaluar la presencia de dímeros en RML. A) SDS- PAGE 10%: Carril 1: RML 1/10 comercial Carril 2: RML 1/20 comercial. B) Zimograma luego de 6 minutos Carril 1: RML 1/10 comercial; Carril 2: RML 1/20 comercial

Esta segunda aproximación consistió en someter a RML a diferentes concentraciones del detergente Tritón el cual debería ser capaz de disociar el dímero. Las diferentes fracciones de RML fueron corridas en una electroforesis de proteínas (Figura 13). En la misma se pudo apreciar como en los carriles con altas concentraciones de Tritón la corrida se distorsiona. Se muestra que las altas concentraciones de tritón interfirieron con la corrida. Sin embargo, fue posible determinar que no hubo un aumento de la banda del monómero (29,5 kDa) en

detrimento de la banda del posible dímero en presencia de Tritón. Este resultado, sumado al del zimograma, determinó que no hubo evidencia suficiente para afirmar que existiera un dímero de RML; o que este existiera en una concentración apreciable.

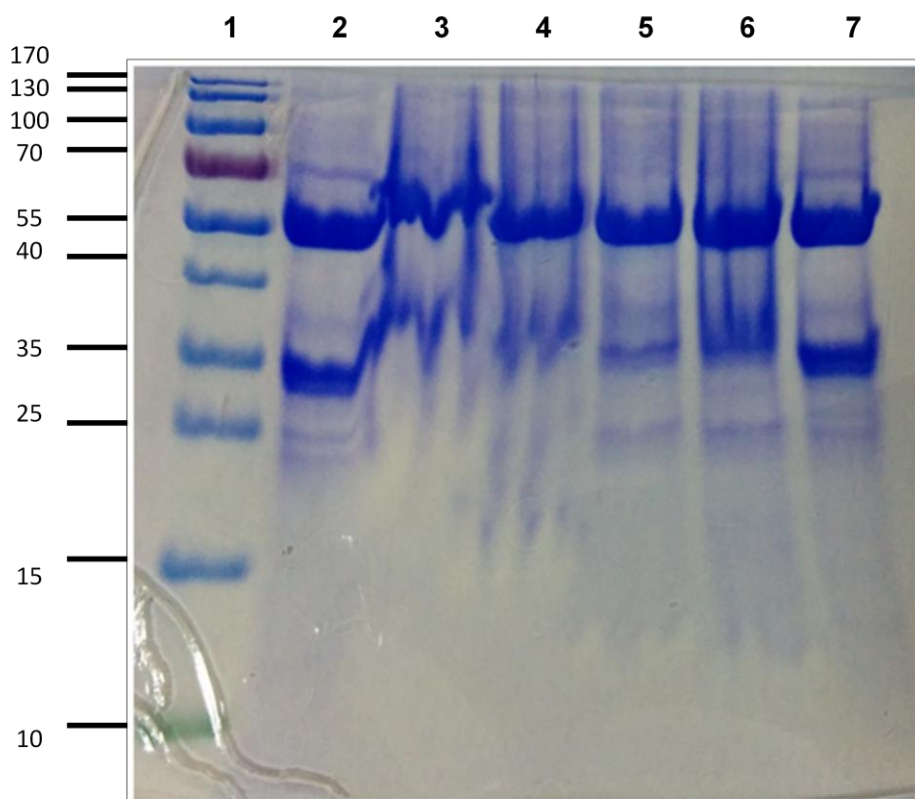


Figura 13: SDS-PAGE al 10%. Evaluación de la presencia de dímeros de RML a partir de concentraciones decrecientes de Tritón X-100. Carril 1: Marcador de peso molecular; Carril 2: RML; Carril 3: RML+5% Tritón X-100; Carril 4: RML + 2% Tritón X-100; Carril 5: RML + 1% Tritón X-100; Carril 6: RML + 0,5% Tritón X-100; Carril 7: RML + 0,25% Tritón X-100.

4.2 Determinación de la actividad enzimática y de actividad específica

Se realizaron las medidas de concentración proteica para cada preparación enzimática mediante el método de BCA (ver 3.2.9). Por otro lado, se midió la actividad de cada una de las muestras (ver 3.2.8) con la finalidad de realizar los cálculos de actividad específica. La tabla 2 muestra los valores calculados para cada una de las muestras. La actividad específica de BTL2 fue sustancialmente superior (aproximadamente 1000 veces) a la actividad específica de las otras enzimas. Esto se correlacionó perfectamente con los resultados de la corrida electroforética (Figura 11) donde en el carril 4 se observa una única banda que se correlaciona con el peso molecular de BTL2, mientras que en el caso de las preparaciones comerciales

tanto de TLL como RML estas presentan una gran variedad de proteínas que no corresponden a las enzimas de interés; lo que se traduce en una actividad específica inferior.

Tabla 2: Medidas de concentración proteica, actividad y actividad específica de los preparados enzimáticos conteniendo las enzimas TLL, RML y BTL2.

Enzima	Concentración (mg/mL)	Actividad (UI/mL)	Actividad específica (UI/mg)
TLL	21 ± 2	42 ± 2	2,0 ± 0,2
RML	9,0 ± 0,4	26 ± 1	2,8 ± 0,3
BTL2	0,210 ± 0,002	590 ± 30	2800 ± 100

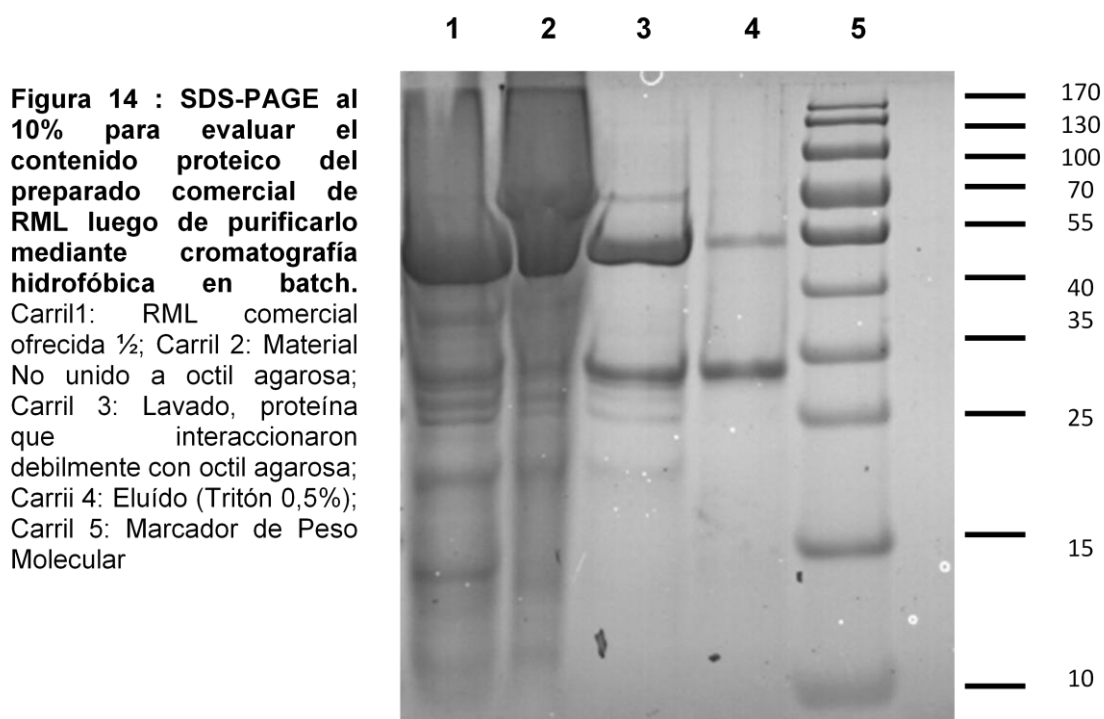
4.3 Purificación de RML

Dado los resultados presentados previamente se decidió realizar una purificación de la enzima comercial RML (ver 3.2.4). De acuerdo a la tabla 1 la actividad específica fue muy baja para RML y TLL. La purificación mediante cromatografía hidrofóbica en batch resultó exitosa para BTL2; de acuerdo a los resultados obtenidos de una alta actividad específica y una única banda en la corrida electroforética. Por lo tanto, se procedió a purificar RML mediante el mismo método (ver 3.2.4)

Se realizó un análisis por SDS-PAGE de las proteínas (Figura 14) con las distintas fracciones recogidas en cada paso de de la purificación: RML $\frac{1}{2}$, material no unido, lavado y eluido (carriles 1-4). De acuerdo a la figura se puede observar a grandes rasgos que el carril 4 correspondiente al eluido presenta tan solo dos bandas una de 30 kDa correspondiente a RML y una de aproximadamente 60 kDa. El carril 1 corresponde a RML gel filtrada y se puede observar una gran cantidad de bandas correspondientes a otras proteínas. Las más importantes son de 60 kDa y 30 kDa coincidiendo esta última con el peso molecular de RML. Además aparecieron bandas de menor peso molecular próximas a 20 kDa y 15 kDa. El carril 1 se asemeja al carril 3 de la figura 11 donde la banda de 60 kDa es prácticamente el doble de la de 30 kDa. Sin embargo, si se compara el carril 1 con el carril 4 de la figura 14 se puede observar que la banda de 60 kDa se torna más tenue que la banda de 30 kDa. Este resultado es fruto de la purificación del preparado comercial. A su vez se puede observar en la figura que la cantidad de bandas es menor en cada carril. En el carril 3 que corresponde al lavado se puede observar nuevamente bandas que corresponden a los pesos moleculares de 60 kDa y 30 kDa. En este caso se observa que hay una proporción significativa de RML que interacciona débilmente con la octil agarosa y por eso se desorbe en el lavado al igual que ocurre con la banda de 60 kDa. Luego de realizada la corrida electroforética se procedió a la cuantificación de proteínas y su posterior evaluación de la actividad específica. De acuerdo a los gráficos (Figura 15 y 16) se pudo determinar que el eluido presenta una gran actividad específica lo cual concuerda con la corrida electroforética donde prácticamente hay solo dos bandas por lo tanto la purificación fue exitosa.

Del análisis de los gráficos observamos que en la figura 15 la determinación de la suma de las actividades totales del material no unido, del lavado y del eluído es levemente superior que la actividad total ofrecida. Nosotros creemos que esto se debe a errores en las medidas espectrofotométricas las cuales se ven evidenciadas en los desvíos estándares presentes o a trazas de Tritón X-100 el cual puede estar generando una hiperactivación en el eluído.

Si comparamos la actividad específica que se obtuvo inicialmente del preparado comercial de RML sin los pasos previos de purificación (Tabla 2) con los valores obtenidos a partir de la purificación con octil (Figura 16) podemos observar que la actividad específica en el eluído aumentó aproximadamente 200 veces. A pesar de que por este nuevo paso de purificación se obtuvo la enzima con una pureza mayor, no se pudo continuar trabajando con la misma ya que perdía un 80% de su actividad en menos de 24hs a 4°C. Por lo tanto, en los sucesivos protocolos a realizar y debido a las horas disponibles en el laboratorio no fue posible trabajar con este material de manera exitosa.



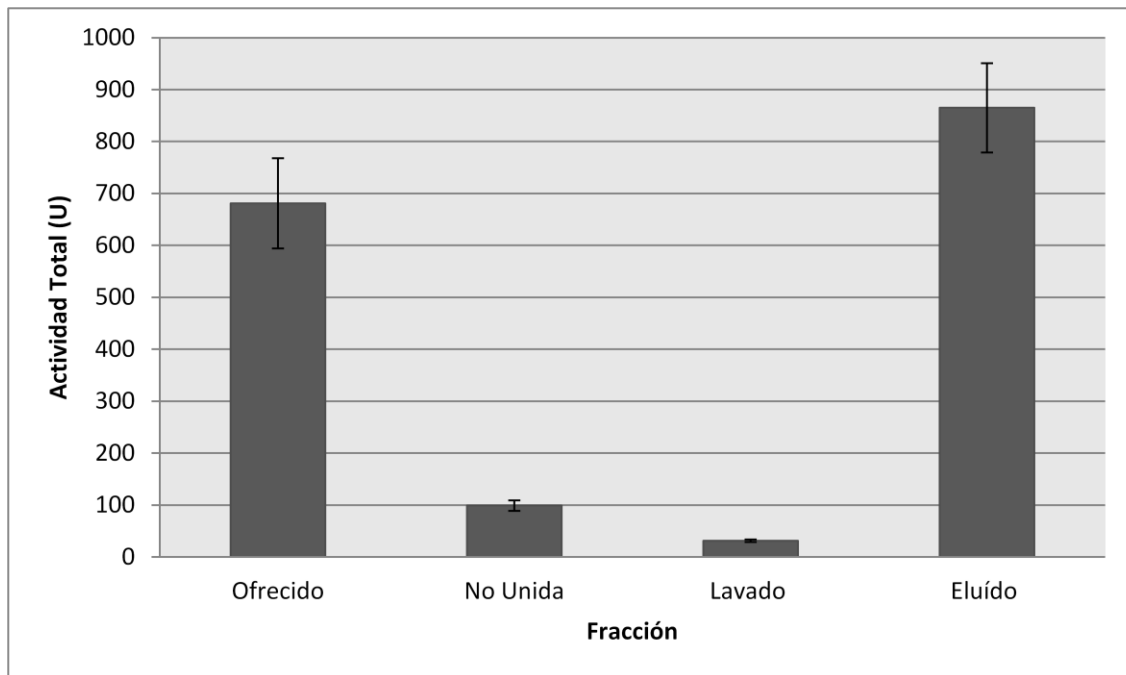


Figura 15: Actividad total de RML luego de purificación mediante cromatografía hidrofóbica en batch. La actividad del eluido junto con el lavado y la enzima no unida es mayor que la actividad ofrecida.

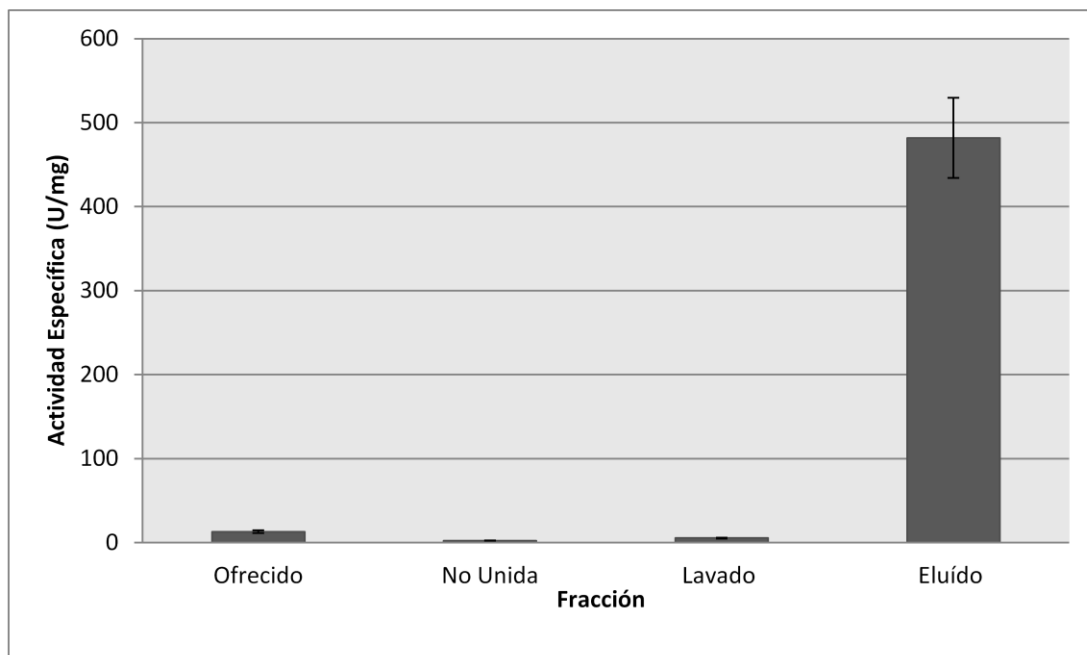


Figura 16: Actividad específica de RML luego de purificación mediante cromatografía hidrofóbica en batch. La actividad específica del eluido es aproximadamente 500 veces mayor que la actividad del lavado, de la enzima no unida y del ofrecido.

4.4 Ensayos de estabilidad en presencia de acetona

El trabajo tiene como objetivo final la producción de biodiesel. Para su generación, como se dijo anteriormente, se debe llevar a cabo una reacción en ausencia de agua. Para ello es necesario secar la enzima a utilizar. Un método muy común de secado es utilizar acetona. Sin embargo, se debe conocer si las enzimas son capaces de resistir dicho procedimiento. Por lo tanto, se procedió a realizar ensayos de estabilidad de las enzimas frente a concentraciones de 50% y 95% de acetona (Figura 17-21).

RML no fue resistente a una concentración de 50% de acetona (Figura 17). Tras su agregado la enzima bajó la actividad drásticamente hasta menos de un 10% de su actividad inicial. Esto permite evidenciar que posiblemente RML no sea el mejor candidato para la síntesis de biodiesel ya que podría no resistir el procedimiento de secado con acetona (dato no realizado para el inmovilizado). Se debería ensayar otro método de secado para evaluar su resistencia.

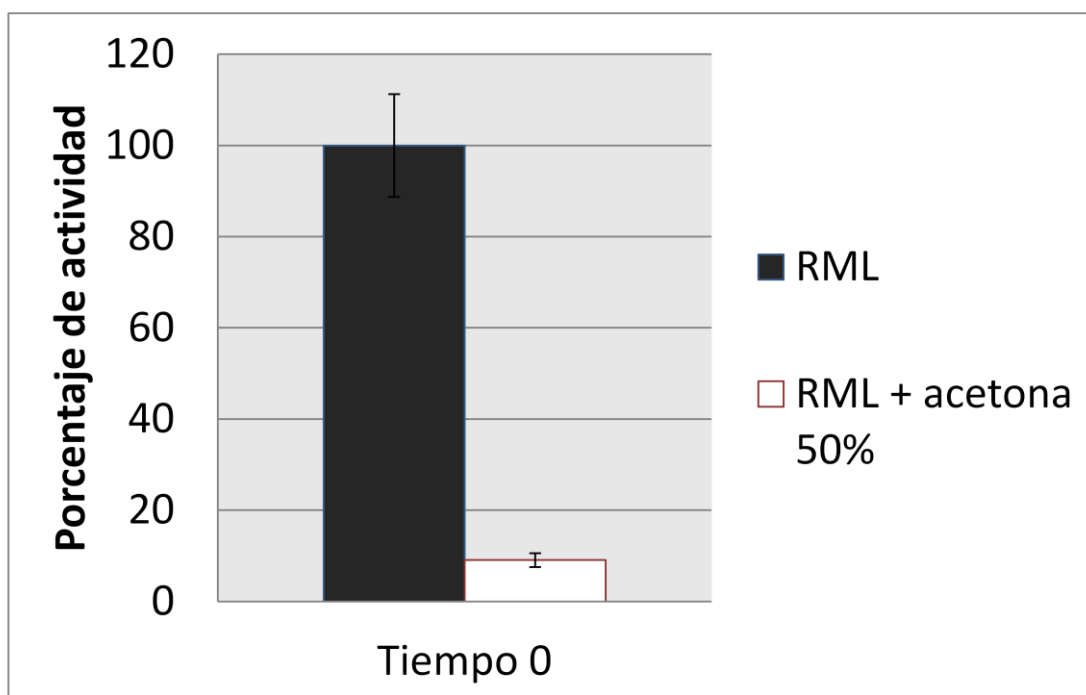


Figura 17: Estabilidad de RML en presencia de 50% de acetona en comparación a la enzima sin acetona. A tiempo 0, RML en presencia de 50% de acetona pierde un 90% de su actividad

Por otro lado, TLL sí demostró ser estable a altas concentraciones de acetona (Figura 18-19). Luego de 5 horas de exposición, su actividad se vio prácticamente invariada al compararla con la enzima sin presencia de acetona. Además se debe tener en consideración que en el proceso de secado la enzima está expuesta a la acetona por períodos de tiempo mucho menores (aproximadamente unos 5 minutos). Por lo tanto se puede afirmar que TLL es una enzima apta para ser secada mediante acetona.

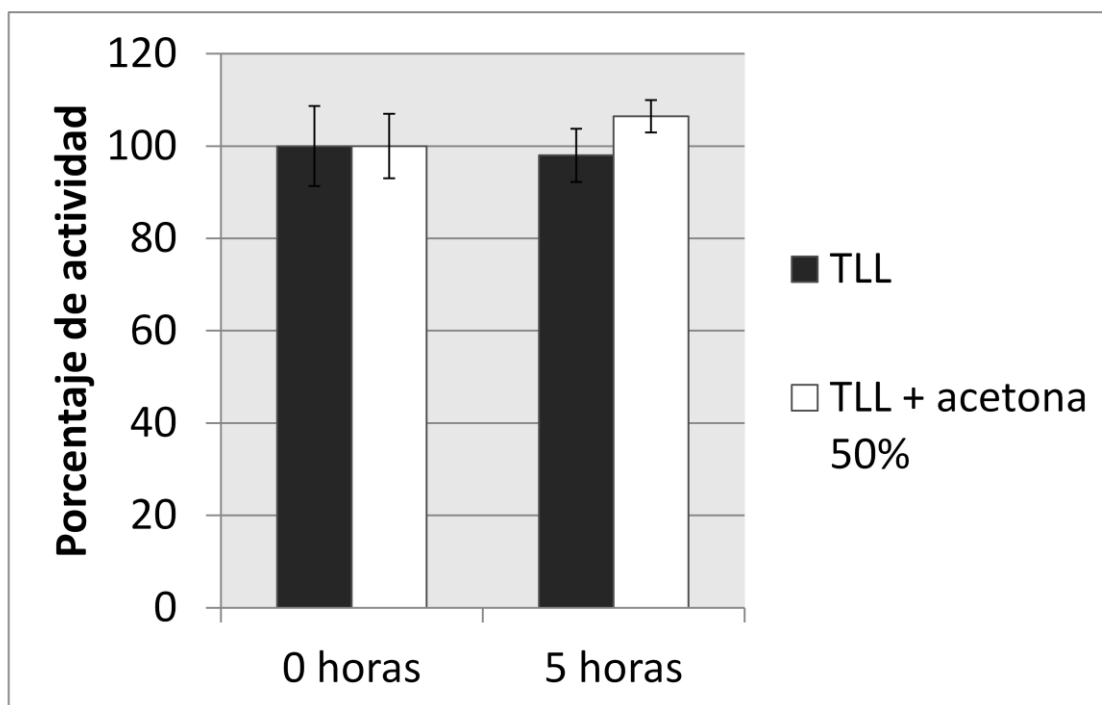


Figura 18: Evaluación de estabilidad de TLL en presencia de 50% de acetona en el transcurso de 5 horas. Si se compara el porcentaje de actividad entre TLL sin acetona y con 50% de acetona luego de 5 horas se puede observar que hay una disminución en la actividad de TLL sin acetona mientras que TLL con 50% de acetona aumenta aproximadamente un 10% su actividad.

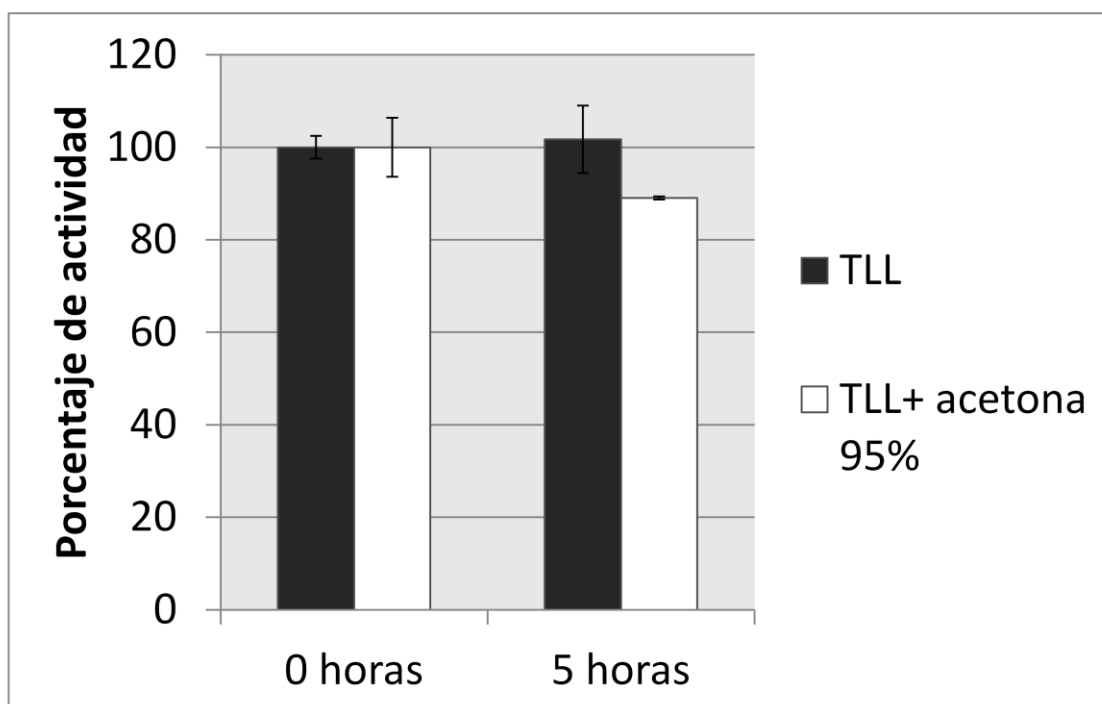


Figura 19 Evaluación de estabilidad de TLL en presencia de 95% de acetona en el transcurso de 5 horas. Si se compara el porcentaje de actividad entre TLL sin acetona y TLL con 95% de acetona luego de 5 horas se puede observar que hay una disminución en la actividad de TLL con 95% de acetona.

BTL2 también es resistente a la exposición a la acetona (Figura 20-21). Su actividad se vio levemente reducida al ser expuesta a la acetona por períodos prolongados; tomando como referencia la actividad de la enzima sin acetona. Por lo tanto, BTL2 también es apta para el procedimiento de secado con acetona

Sin embargo, al igual que sucedió con TLL, la variación de la actividad de la enzima sin acetona fue diferente. Más allá de posibles errores de manipulación, esto demuestra como es necesario correr un control (la muestra sin acetona) al realizar cada experiencia.

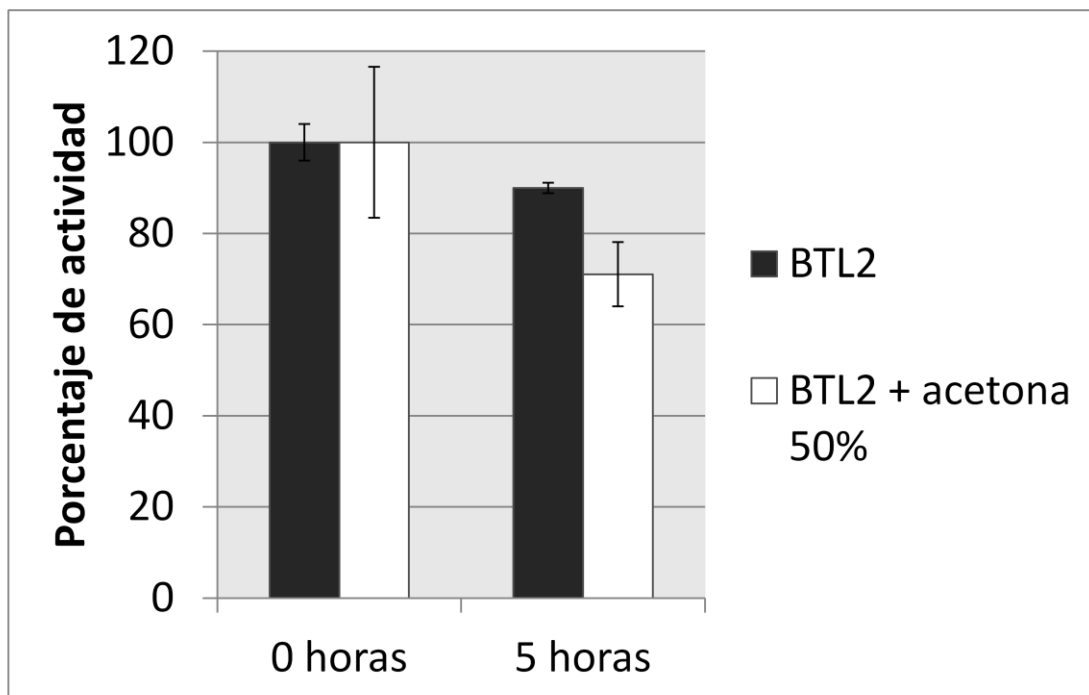


Figura 20: Evaluación de estabilidad de BTL2 en presencia de 50% de acetona en el transcurso de 5 horas. Si se compara el porcentaje de actividad entre BTL2 en sin acetona y BTL2 con 50% de acetona luego de 5 horas se puede observar que hay una disminución en la actividad de ambas fracciones con respecto al tiempo 0.

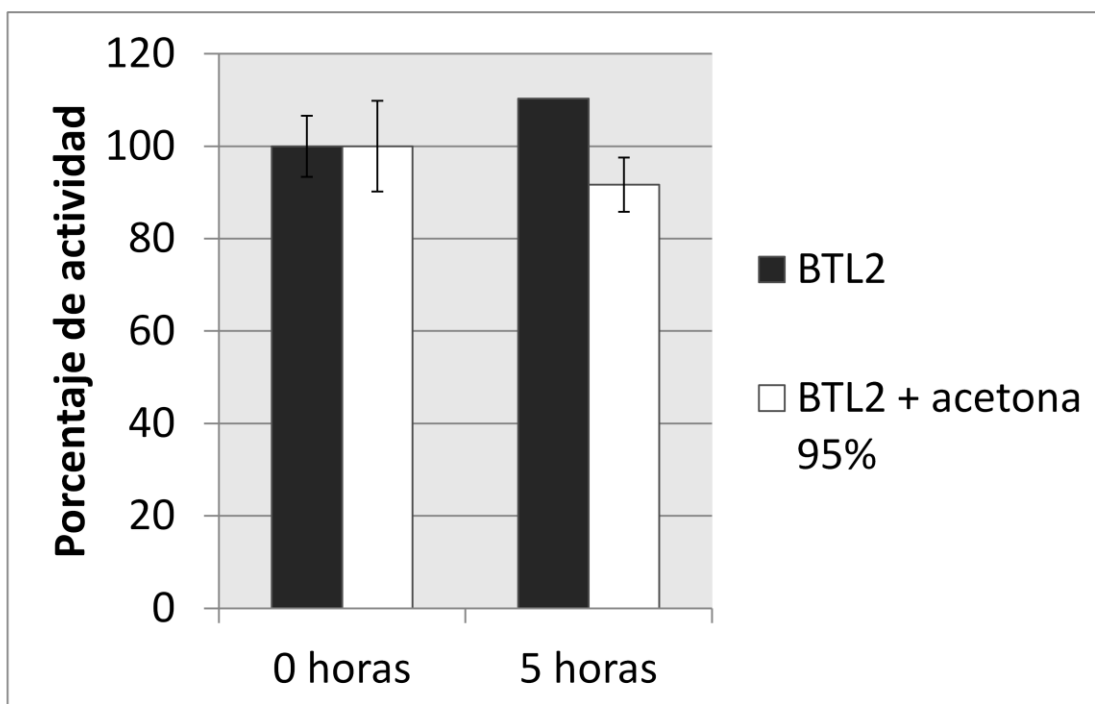


Figura 21: Evaluación de estabilidad de BTL2 en presencia de 95% de acetona en el transcurso de 5 horas. Si se compara el porcentaje de actividad entre BTL2 en sin acetona y BTL2 con 95% de acetona luego de 5 horas se puede observar que hay una leve disminución en la actividad de BTL2 con 95% de acetona.

4.5 Generación de inmovilizados enzimáticos

Una vez que se determinó con que preparados enzimáticos trabajar se procedió a la generación de inmovilizados enzimáticos. En una primera instancia se utilizó el protocolo original (ver 3.2.10.1) donde los tres preparados enzimáticos TLL, RML y BTL2 se sometieron al atrapamiento en nanopartículas de sílica. Para determinar la cantidad de enzima inmovilizada se midió la actividad de: enzima ofrecida, sobrenadante y la enzima inmovilizada en sílica. A partir de estos valores se generó la tabla 3 donde se muestran las unidades para cada fracción. Las medidas de actividad fueron graficadas (Figura 22). En esta figura se observa que el porcentaje de actividad en el sobrenadante es aproximadamente 10%, 60% y 100% para TLL, BTL2 y RML respectivamente. Este resultado sugiere que un 90% de TLL y un 40% de BTL2 puede encontrarse inmovilizado. Sin embargo, la actividad de estas enzimas no se vio reflejada en la sílica lo cual puede deberse a que se inmovilizaran parcialmente o por adsorción y al lavarse se desunieron por tratarse de uniones débiles. Con respecto a RML esta enzima permaneció en su totalidad en el sobrenadante, es decir, no fue posible atraparla en sílica. Este resultado se ve reflejado en la tabla 4 donde se tienen los valores porcentuales para inmovilizado, actividad inmovilizado y rendimiento.

Tabla 3: Valores de las unidades ofrecidas previo a la inmovilización, unidades en el sobrenadante y unidades en la sílica.

Enzima	Unidades Ofrecidas (UI)	Unidades en el Sobrenadante (UI)	Unidades en la sílica (UI)
TLL	66 ± 9	6,0 ± 0,5	2 ± 1
RML	8,5 ± 0,4	8,6 ± 0,8	-9 ± 8
BTL2	116 ± 6	66 ± 3	4 ± 1

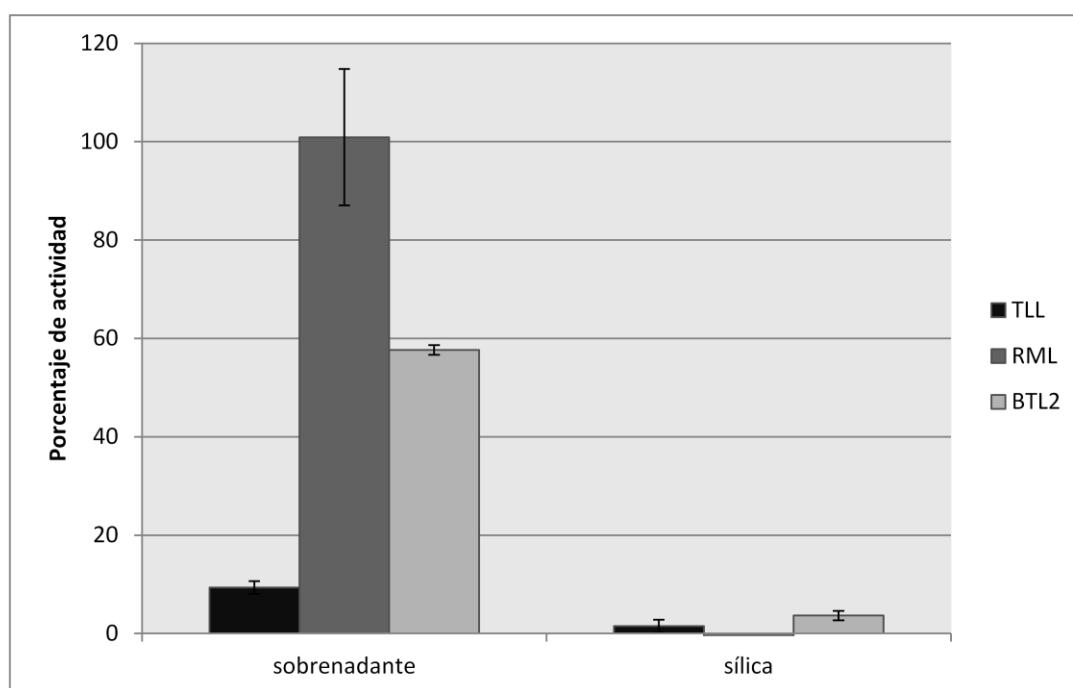


Figura 22: Inmovilización de TLL, RML y BTL2 en PEI con protocolo original. No hay actividad en la sílica para ninguna de las tres enzimas.

Tabla 4: Porcentaje de inmovilización teórico, de actividad de inmovilización y rendimiento para TLL, RML y BTL2.

Enzima	Inmovilizado Teórico(%)	Actividad inmovilizado (%)	Rendimiento(%)
TLL	91 ± 2	2 ± 1	2 ± 1
RML	0	0	0
BTL2	42 ± 1	4 ± 1	9 ± 2

Con estos resultados obtenidos, apareció la necesidad de adecuar el protocolo de inmovilización. Para ello, primeramente se probó la aminación de una de las enzimas (TLL) a

25°C y a una temperatura más baja de 4°C para mantener la enzima estable, sin lograr mayores resultados (Figura 23). No se logró inmovilizar TLL en sílica a pesar de que dicho protocolo, en teoría, mediante la aminación con carbodimida genera grupos amino extra en las proteínas favoreciendo la catálisis de la solubilización del TMOS beneficiando así su atrapamiento. Si bien la actividad enzimática en el sobrenadante fue menor a la ofrecida, la actividad expresada en las nanopartículas de sílica fue menor al 1%. Nuevamente aquí o existió una inactivación de la enzima tras su atrapamiento en sílica o la misma se perdió tras los lavados si se encontraba unida a la misma por adsorción.

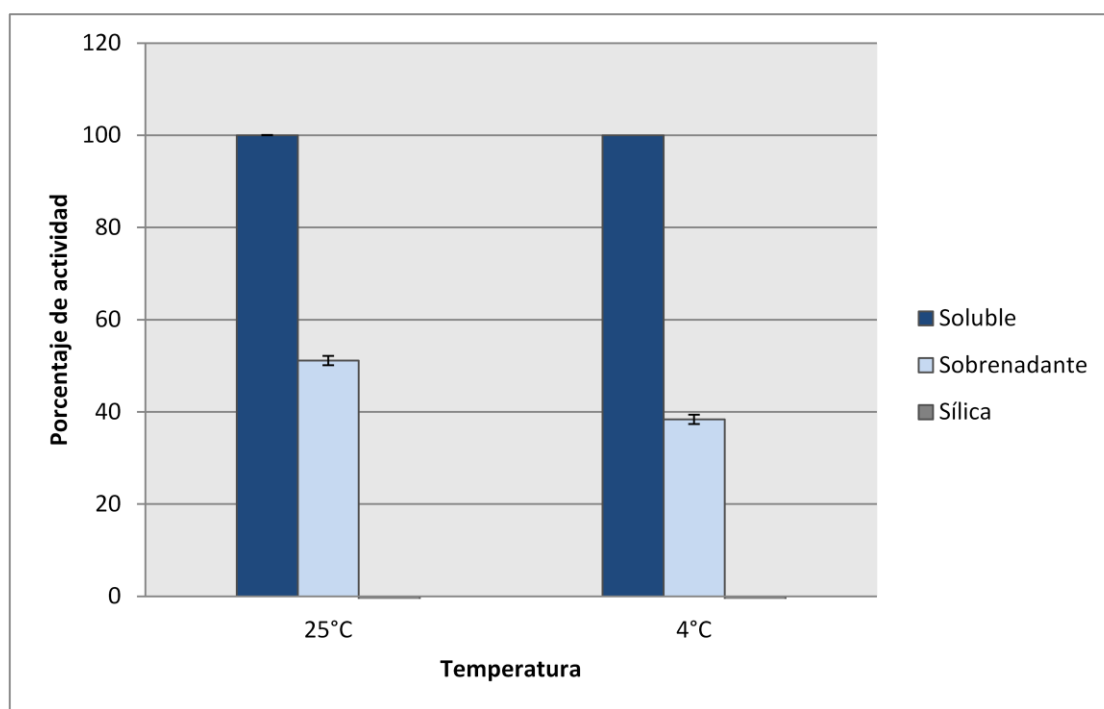


Figura 23: Inmovilización de TLL en PEI por medio de previa aminación con carbodimida a 4°C y 25°C. No se logró inmovilizar activamente.

Posteriormente se intentó cambiar la estrategia de inmovilización hacia una inmovilización covalente. En este caso se intentaron inmovilizar TLL y BTL2 (Figura 24-25). Se obtuvieron resultados moderadamente buenos para BTL2, al llegarse a una actividad del inmovilizado superior al 40% con respecto a la actividad de la enzima soluble ofrecida. Por otro lado, con TLL no fue posible obtener un inmovilizado con una actividad baja ya que el porcentaje de actividad del inmovilizado fue menor al 10%. A su vez se puede observar que la actividad en el sobrenadante es menor al 5% sugiriendo que pudo haberse inmovilizado un 95% de la enzima, aunque dicho porcentaje de actividad no pudo ser detectado. Esto puede deberse a que se perdió enzima en los lavados o que al tratarse de una unión covalente la enzima se inactivó dado que este método puede resultar más agresivo que el atrapamiento.

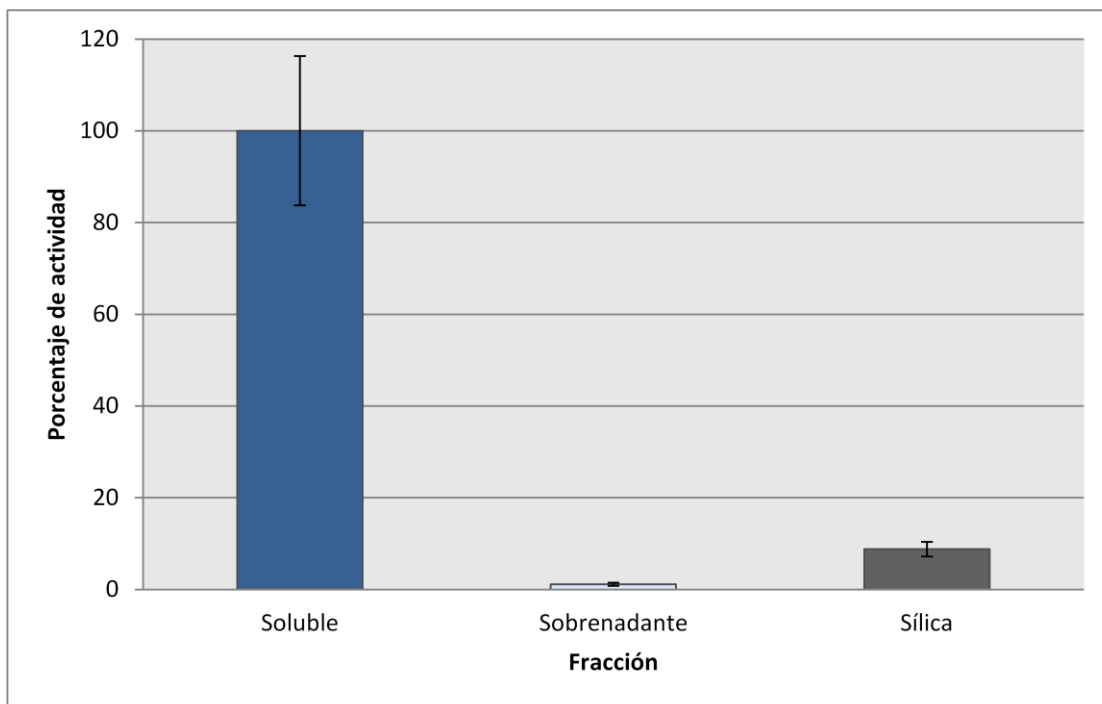


Figura 24: Inmovilización de TLL en sílica por unión covalente con glutaraldehído. Se logró inmovilizar TLL en sílica con un porcentaje menor al 10%. En el sobrenadante la actividad fue próxima a 0%, sin embargo esto no se vio reflejado en la cantidad de enzima inmovilizada.

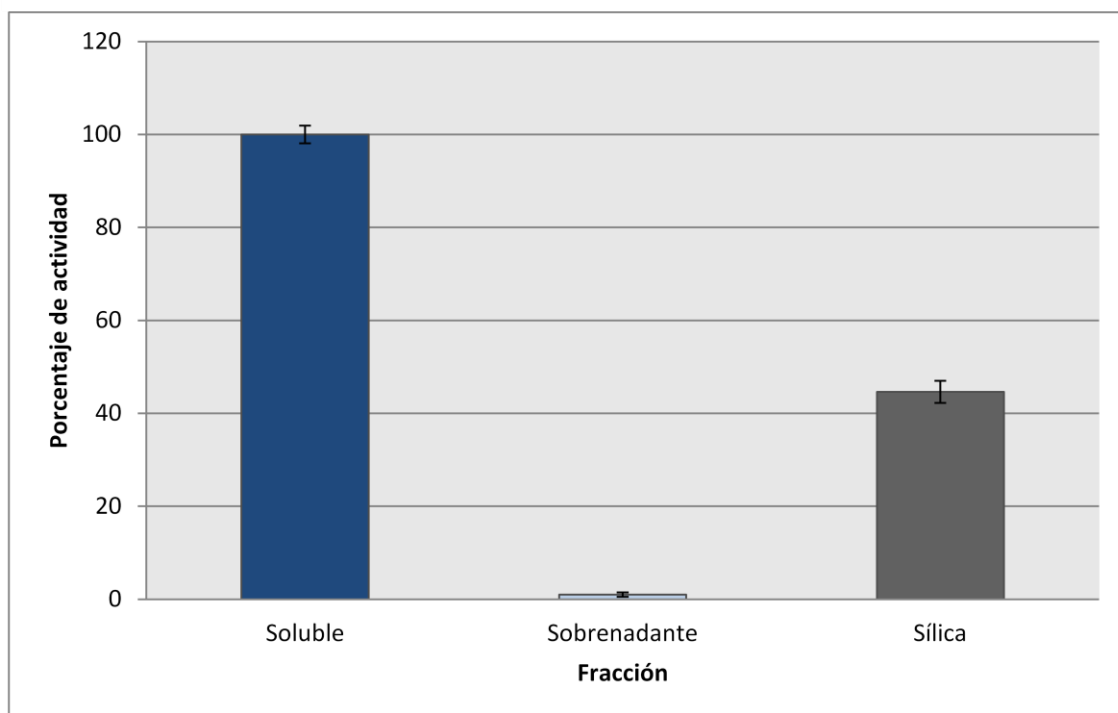


Figura 25: Inmovilización de BTL2 en sílica por unión covalente con glutaraldehído. Se logró inmovilizar BTL2 en sílica con un porcentaje superior al 40%.

Con la finalidad de aumentar el porcentaje de inmovilización y el rendimiento, se modificó el volumen de PEI utilizado en el protocolo original (de 150 μ L a 50 μ L) y se ensayó su sustitución

por 250 μ L de Sp para las tres lipasas en cuestión (Figura 26-28). Dichos resultados fueron tabulados en la tabla 5.

Para TLL se obtuvieron derivados enzimáticos con buenas actividades tanto para PEI (80%) como para Sp (80%). Es de notar que se obtuvieron rendimientos por encima del 100%, ya que los inmovilizados presentaron una mayor actividad a la esperada teniendo en cuenta la cantidad de proteína inmovilizada. Sin embargo, si se observan las barras de error que se presentan en la sílica para PEI y Sp estas son significativas por lo tanto la actividad en el inmovilizado podría ser menor variando así el rendimiento final.

Para RML la actividad del sobrenadante inmovilizando con Sp fue inferior a la del sobrenadante inmovilizando con PEI, esperándose una actividad teórica de los inmovilizados de 83% para Sp y 70% para PEI. Sin embargo, PEI brindó mejores resultados (47%) que Sp (6%). Los resultados utilizando Sp fueron marcadamente inferiores. Esto puede deberse a 2 factores: por un lado, el agregado de Sp pudo haber resultado agresivo para la enzima ocasionando que esta pierda su actividad, por otro lado se pudo haber perdido enzima en los pasos de lavado, es decir, enzima que aunque no estuviera en el sobrenadante no estaba correctamente inmovilizada. Algo similar ocurrió con BTL2. Utilizar PEI en la nueva cantidad fue ampliamente superior a utilizar Sp (61,1% frente a 10,4%).

La inmovilización de TLL fue marcadamente superior a la de las otras enzimas. Por otro lado, si bien la utilización de Sp fue mínimamente superior para su caso, esto no se repitió para las otras enzimas. De hecho, PEI resultó ser acentuadamente mejor en el resto de los casos. La utilización de PEI en el nuevo volumen (50 μ L) permite la aplicación del mismo protocolo para las 3 lipasas.

Cabe destacar que este nuevo protocolo es completamente superior al original. Las actividades de los inmovilizados con el protocolo original eran inferiores al 5% de la actividad de las lipasas ofrecidas en todos los casos.

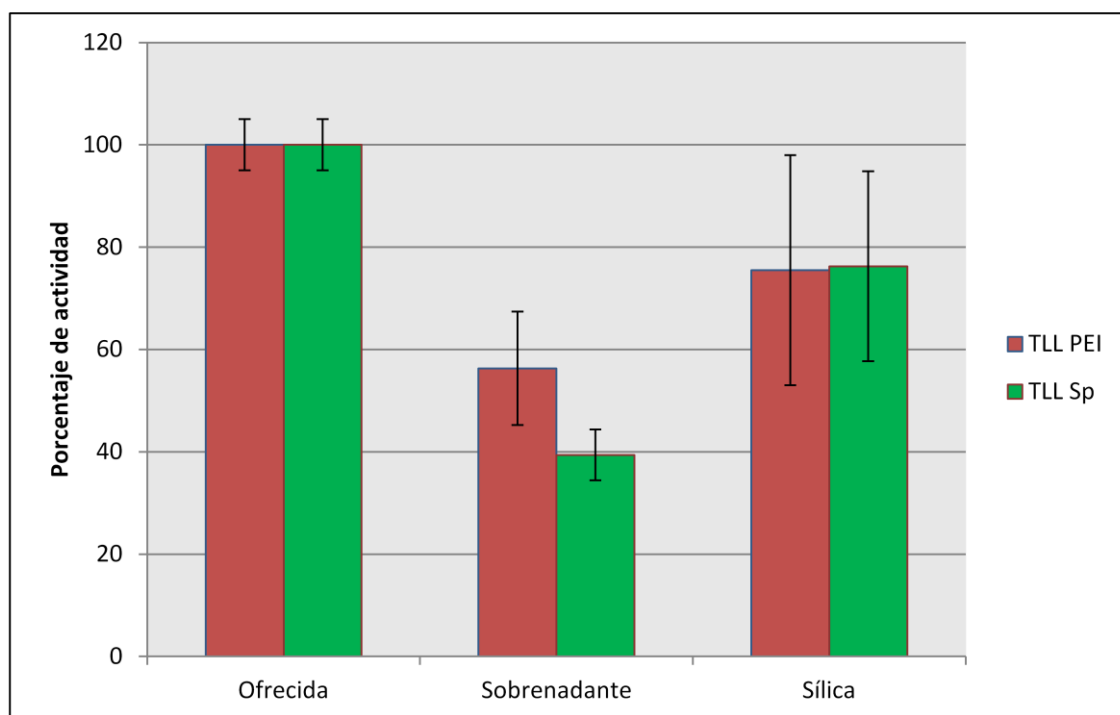


Figura 26: Inmovilización de TLL por atrapamiento mediante protocolo nuevo de PEI o con SP. Se logró inmovilizar TLL en PEI (80%) y en Sp (80%).

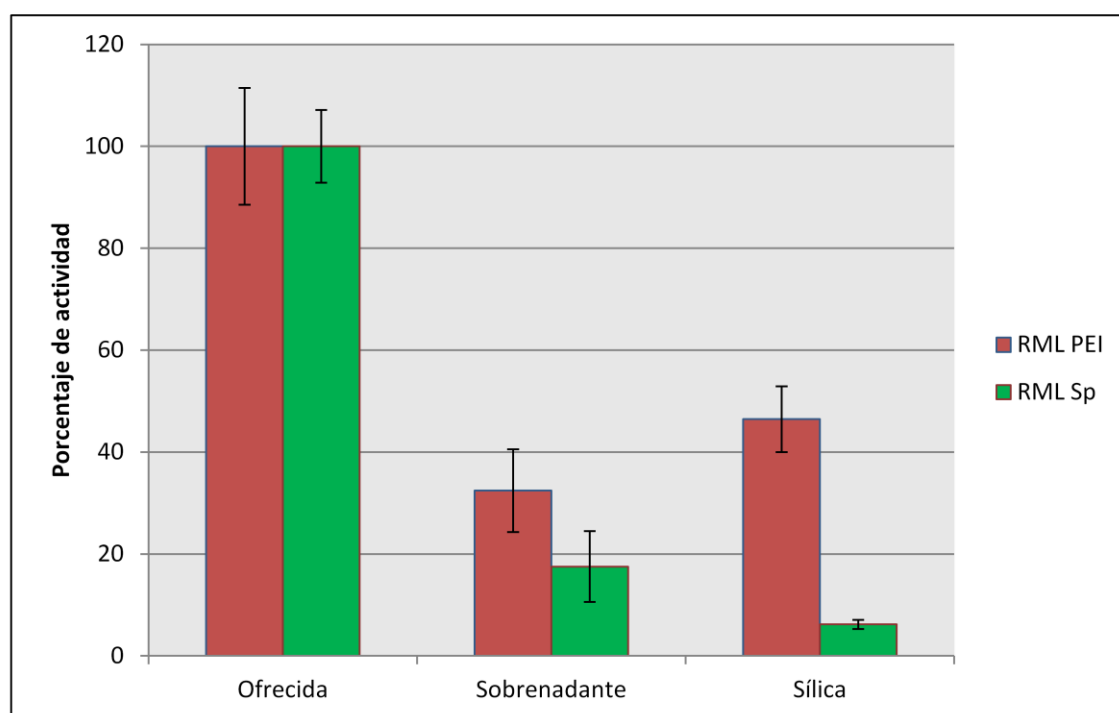


Figura 27: Inmovilización de RML por atrapamiento mediante protocolo nuevo de PEI o con SP. PEI brindó mejores resultados (47%) que Sp (6%).

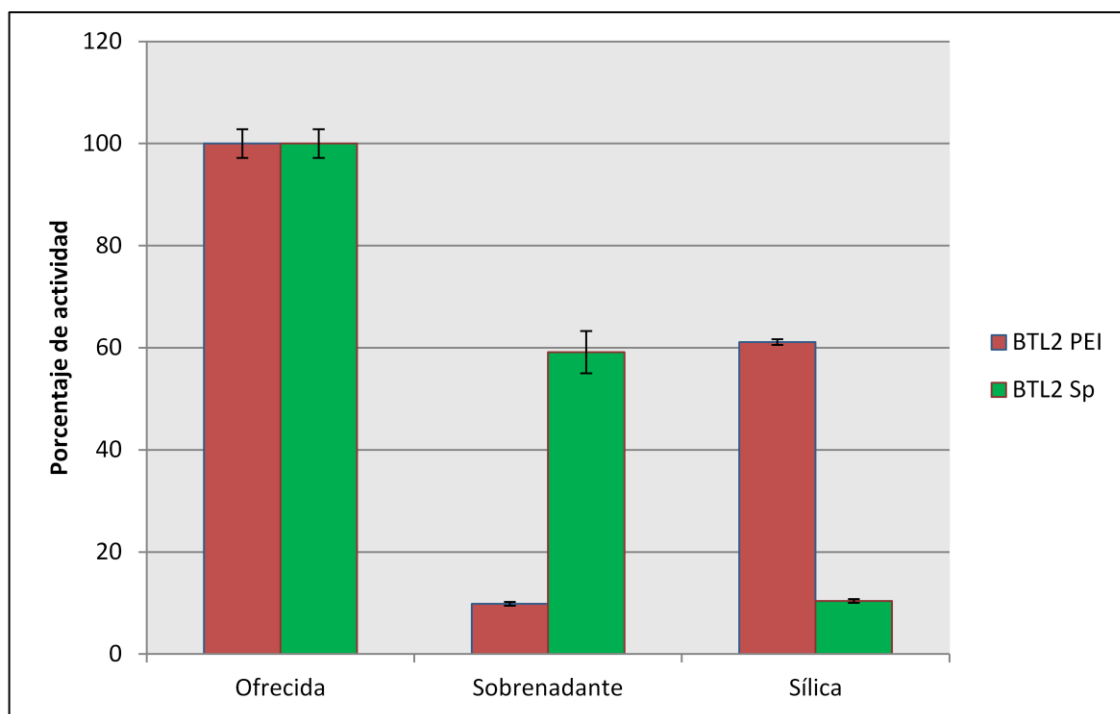


Figura 28: Inmovilización de BTL2 por atrapamiento mediante protocolo nuevo de PEI o con SP. Se logro inmovilizar BTL2 utilizando PEI y Sp. La utilización de PEI fue ampliamente superior a utilizar Sp (61,1% frente a 10,4%).

Tabla 5: Porcentajes de teórico inmovilizado, rendimiento y actividad de inmovilizado para TLL, RML y BTL2

Enzima	Soporte	Teórico Inmovilizado (%)	Actividad Inmovilizado (%)	Rendimiento (%)
TLL	SP	61 ± 5	80 ± 20	130 ± 40
	PEI	40 ± 10	80 ± 20	180 ± 90
RML	SP	83 ± 7	6 ± 7	8 ± 9
	PEI	70 ± 8	47 ± 6	70 ± 20
BTL2	SP	41 ± 4	10,4 ± 0,4	25 ± 3
	PEI	90,4 ± 0,4	61,1 ± 0,6	68 ± 1

4.6 Ensayos de estabilidad a altas temperaturas

Posteriormente se realizaron ensayos de estabilidad a altas temperaturas para los inmovilizados, junto con las enzimas solubles utilizadas como referencia. La figura 29 muestra la diferencia de actividad de TLL al estar expuesta a una temperatura de 60°C durante 90 minutos. El inmovilizado con PEI resultó ser más estable que aquel hecho con Sp, pero sobretodo y más importante aún, más estable que la enzima soluble.

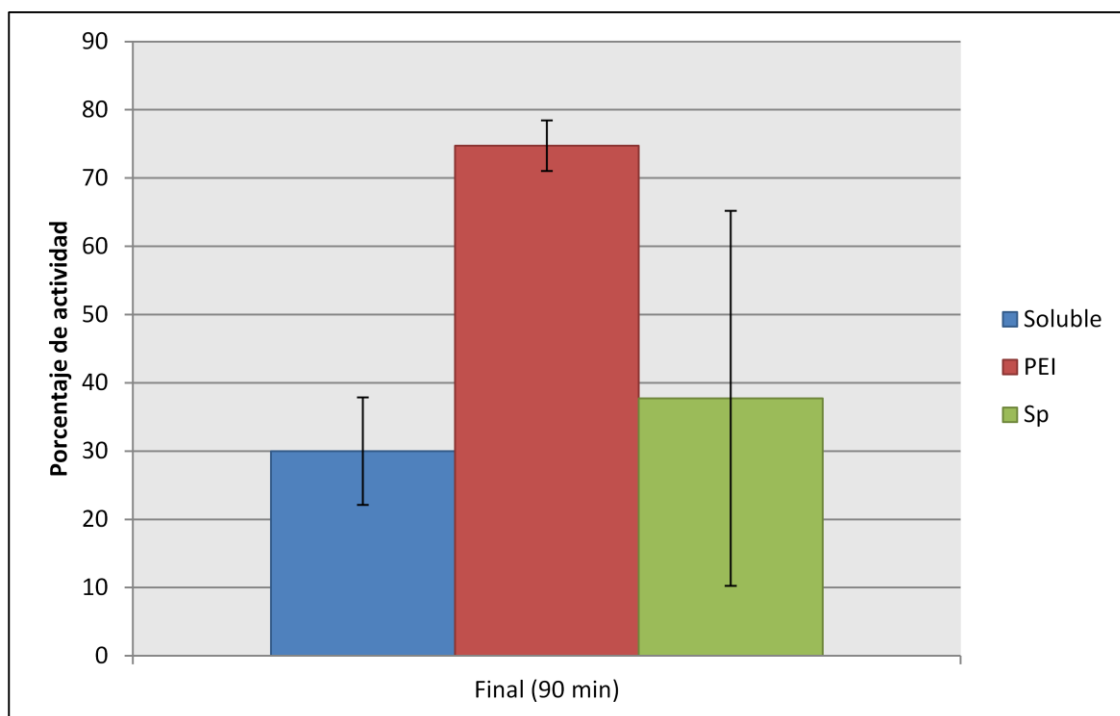


Figura 29: Evaluación de estabilidad de TLL inmovilizada en PEI, en Sp y en estado soluble a 60°C en el transcurso de 90 minutos. Se puede observar que la enzima permanece más estable cuando se encuentra inmovilizada en PEI permaneciendo activa en más de un 70%.

En la figura 30 se graficó el ensayo de estabilidad correspondiente a RML a 60°C. En este caso no se pudo realizar el ensayo para la enzima inmovilizada utilizando Sp ya que la actividad inicial que presentaba era muy baja y no permitía distinguir variaciones suficientemente confiables a lo largo del ensayo. En este ensayo se determinó que las actividades finales resultaron muy similares como para afirmar una superioridad de alguna de las muestras. De todas formas el ensayo comprobó que la inmovilización de RML con PEI no le brinda un aumento en su estabilidad.

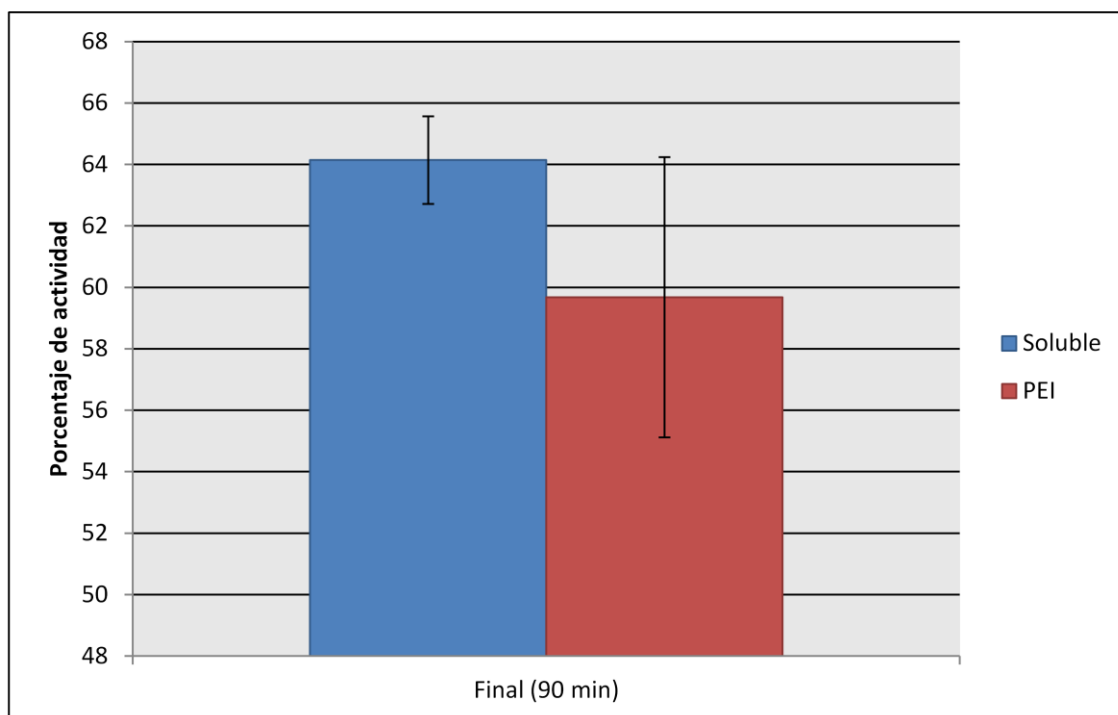


Figura 30: Inmovilización de RML 60 °C inmovilizada en PEI y en estado soluble a 60°C en el transcurso de 90 minutos. Las actividades finales resultaron en una disminución en la actividad muy similar tanto para la soluble como para la inmovilizada en PEI.

Para el caso de BTL2 el ensayo de estabilidad se realizó a una temperatura de 65°C como muestra la figura 31. Al igual que RML, BTL2 no presentó un aumento de su estabilidad al ser inmovilizada. Las pequeñas variaciones de actividad a tiempo final son menores que los desvíos por lo que no se puede afirmar la superioridad de ninguna de las muestras.

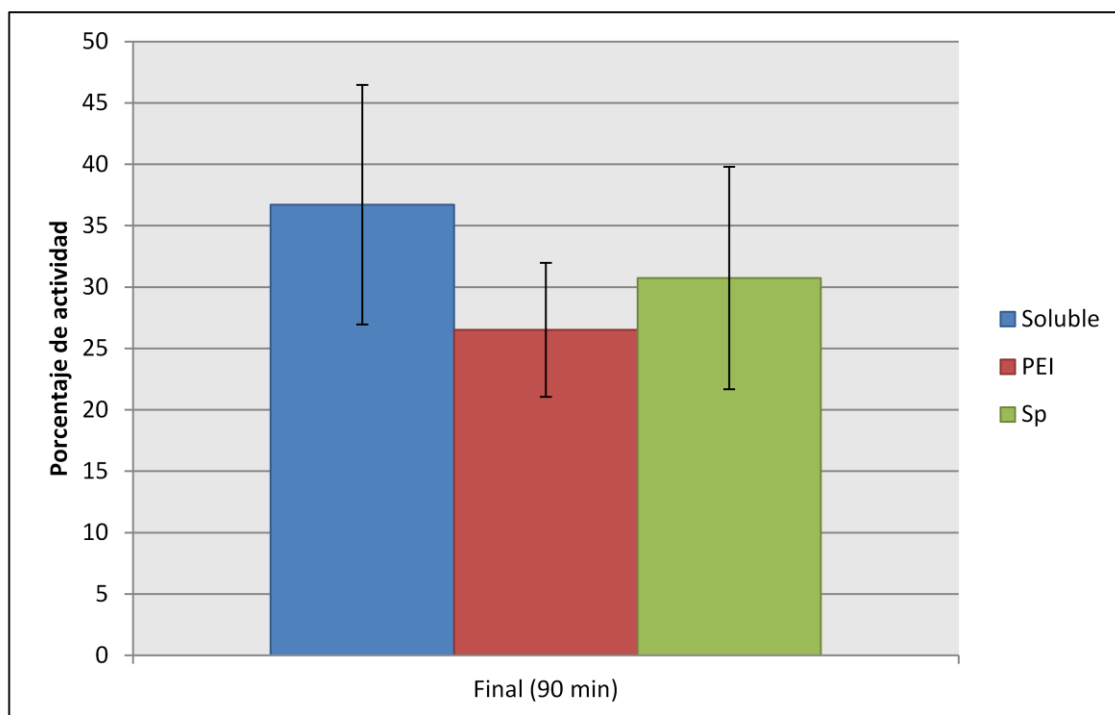


Figura 31: Evaluación de estabilidad de BTL2 inmovilizada en PEI, en Sp y en estado soluble a 65°C en el transcurso de 90 minutos. BTL2 no presentó un aumento de su estabilidad al ser inmovilizada.

4.7 Aproximación a la producción de biodiesel

Finalmente se realizaron ensayos de generación de biodiesel para BTL2 y TLL inmovilizada con PEI. Se eligieron dichos inmovilizados por lograr un alto porcentaje de actividad con respecto a la enzima soluble, lo que resulta en una baja cantidad de enzima perdida en el proceso de inmovilización. Por otro lado, el inmovilizado de TLL presentó la ventaja de mostrar una mejora en la estabilidad con respecto a la enzima soluble.

Para realizar el ensayo de síntesis los inmovilizados fueron secados con acetona (ver 3.2.14) y si bien tras realizado este paso los inmovilizados no se midieron en cuanto a su actividad los ensayos de las enzimas solubles en acetona eran prometedores en cuanto a su resistencia al solvente. Las reacciones de generación de biodiesel fueron posteriormente corridas en una cromatografía en capa fina (Figura 32 y 33).

La reacción de BTL2 (Figura 32) fue una primera aproximación en la cual se sacaron muestras tanto a 1 como a 72 horas. En la TLC se corrieron además una muestra de aceite y dos estándares: ácido oleico y oleato de etilo. Todas las muestras corrieron satisfactoriamente. En este ensayo no se pudo corroborar la generación de biodiesel en ninguno de los dos tiempos. Sin embargo, al comparar las reacciones con el aceite, se pudo observar la presencia de una nueva banda inferior en la muestra tomada a las 72 horas. Esta banda podría corresponder a

los monoglicéridos; siendo las dos bandas próximas por encima las correspondientes a los diglicéridos.

Para TLL (Figura 33) se obtuvo una muestra a las 24 horas y se corrió además un control negativo correspondiente a la sílica sin enzima. En este caso la reacción de generación de biodiesel fue exitosa. Se comprobó la existencia de una banda que se corresponde con la del estándar de oleato de etilo. Por otro lado la banda correspondiente a los triglicéridos se vio fuertemente disminuida. Esto era de esperar ya que para producir biodiesel la enzima degrada los triglicéridos.



Figura 32: Cromatografía hidrofóbica (TLC); Carril 1: oleato de etilo; Carril 2: Ácido oleico; Carril 3: Aceite alto oleico; Carril 4: muestra BTL2 1h; Carril 5: muestra BTL2 72 h. No se observa la generación de oleato de etilo para las muestras de BTL2 en la mezcla de reacción. En las muestra de BTL2 72hs hay presencia de monoglicéridos y diglicéridos (1,2 o 1,3) mientras que en la muestra de BTL2 1h sólo hay presencia de monoglicéridos.



Figura 33: Cromatografía hidrofóbica (TLC) para evaluación de la generación de biodiesel; Carril 1: Ácido oleico; Carril 2: Oleato de etilo; Carril 3: Aceite alto oleico Carril 4: Muestra TLL sílica 24hs; Carril 5: Control muestra sílica sola. Hay producción de oleato de etilo.

5. DISCUSIÓN

En el transcurso de este trabajo se logró caracterizar e inmovilizar de forma exitosa tres lipasas provenientes de distintos organismos. En un principio no se lograron buenos niveles de inmovilizaciones siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio. Los rendimientos obtenidos con el protocolo original eran muy bajos (obteniéndose derivados con una actividad inferior al 10%). Esto invalidaba la posibilidad de continuar con los subsiguientes objetivos específicos del trabajo. Se descartó la posibilidad de que la inmovilización de las lipasas (TLL y RML) se viera desfavorecida por la presencia de otras proteínas. Se pensó en un primer momento que dichas proteínas hipotéticamente podrían ser más afines a atraparse en la sílica desplazando a las enzimas de interés. Sin embargo, este mismo efecto de no inmovilización ocurrió con BTL2 la cual se encontraba realmente pura como fue revelado en la electroforesis de proteínas (Figura 11). Por este motivo se continuó con la exploración de nuevas estrategias de inmovilización que brindaran un mayor rendimiento.

La aminación de las enzimas no fue una metodología que brindara una solución a la problemática. Sin embargo, no se profundizó con esta metodología ni se exploró con la totalidad de las enzimas. Por lo tanto no podemos descartar que futuros protocolos en los cuales se controle la cantidad de grupos amino incorporados a las enzimas puedan ser exitosos.

Con respecto a la inmovilización covalente con glutaraldehído se logró inmovilizar TLL en un porcentaje próximo a 10% y BTL2 en porcentaje mayor al 40%. En el caso de la inmovilización de BTL2 se podría haber continuado trabajando con este inmovilizado. Sin embargo, dado que no se lograba inmovilizar TLL ni RML por ninguna de las metodologías planteadas, se continuó con la búsqueda de un protocolo de inmovilización de lipasas general. En nuestro trabajo se continuó realizando inmovilizaciones de BTL2 con otros protocolos. Sin embargo, hubiera sido interesante haber evaluado la estabilidad de BTL2 glutaraldehído y su potencial aplicación en la síntesis de biodiesel, dado que en la primera aproximación que se realizó con BTL2 inmovilizada con PEI no se logró la síntesis.

Los resultados obtenidos utilizando el protocolo de Sp tampoco cumplían con nuestras expectativas de lograr la inmovilización de las tres enzimas con un mismo método. Sin embargo, la reducción en la cantidad μL de PEI utilizados en la síntesis generó resultados ampliamente satisfactorios. Altos porcentajes de las tres enzimas fueron inmovilizados activamente. Creemos que la disminución en la concentración final de PEI en la inmovilización pueda significar una reducción en la cantidad de cargas positivas presentes, las cuales si bien son necesarias para la polimerización del TMOS, quizás hayan generado la repulsión de las lipasas. De esta forma la inmovilización pudo ser exitosa. Sin embargo, se tendrían que plantear una serie de nuevos experimentos para confirmar dicha hipótesis.

En una primera instancia pensamos que BTL2 era la lipasa más promisoría dada su resistencia a la acetona y la alta pureza observada en el primer resultado de este trabajo. Con lo cual suponíamos obtener soportes con una alta carga de enzima y resistencia a solventes orgánicos. Sin embargo, si bien el derivado generado presentó una alta actividad, este no fue capaz de producir biodiesel el cual era nuestro principal objetivo. Es por este motivo que

inicialmente no se debe tomar una decisión apresurada en cuanto al soporte a utilizar o a la enzima con la cual trabajar. De hecho, siempre se debe explorar una amplia gama de opciones y no siempre la que teóricamente parece más lógica resulta ser la más exitosa. En nuestro caso el hecho de haber trabajado con las otras enzimas fue muy importante ya que permitió llegar a la exitosa generación de biodiesel con al menos una de ellas (TLL).

Sería interesante continuar trabajando en la purificación de las enzimas comerciales previo a su inmovilización ya que presentarían una actividad específica mucho mayor que la enzima comercial diluida. De este modo se podría llegar a aumentar la actividad de los inmovilizados al ofrecerle al soporte la enzima de interés en mayor proporción. RML perdió su actividad al día siguiente de haberla purificado; por lo tanto no se pudo seguir con la inmovilización. Sin embargo, se podría probar inmovilizarla inmediatamente después de la purificación. A los efectos del trabajo y el tiempo que requería esto no se pudo realizar.

La exitosa generación de biodiesel es un hito destacable de este trabajo, que permite delinear nuevas perspectivas y objetivos a futuro. A futuro sería interesante realizar ensayos de reutilización de los inmovilizados. Por otro lado, también se podrían realizar ensayos para determinar el tiempo mínimo de generación de biodiesel, sacando muestras a distintos tiempo en lugar de una única muestra a tiempo final. Además se podría llegar a valores de conversión cuantitativos mediante la utilización de un equipo cromatografía de alta performance (HPLC).

6. ANÁLISIS ECONÓMICO

Este trabajo es una primera exploración en la generación de biodiesel y no aplica la realización de un análisis económico.

7. CONCLUSIONES

- Se logró la optimización de un protocolo de inmovilización por atrapamiento en nanopartículas de sílica biomimética, alcanzándose actividades de los inmovilizados de 80%, 47%, y 61,1% para TLL, RML y BTL2 respectivamente (con respecto a la enzima ofrecida). Este protocolo podría ser explorado para otras lipasas y podría ser extendido como un protocolo general de inmovilización de lipasas.
- Se obtuvo un inmovilizado estable a altas temperaturas para dicho protocolo para la enzima TLL.
- Se llevó a cabo exitosamente la generación de biodiesel por medio del mismo inmovilizado de TLL.
- Durante este trabajo de tesis se logró una buena familiarización con las técnicas de rutina de laboratorio (manejo de enzimas, proteínas, electroforesis, espectrofotometría, etc). Se adquirió un espíritu crítico en cuanto al análisis de resultados, discusión y presentación de los mismos; permitiendo culminar nuestra formación académica con una aproximación al trabajo en los laboratorios de investigación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Balat M, Balat H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. *Energy Conversion and Management*. 2008; 49(10): 2727–2741.
2. ALUR - Alcoholes del Uruguay S.A.. Actualización Biodiesel Informe [Internet]. Montevideo (Uruguay): ALUR; Octubre 2014 [Citado 2015 Abr 5]. Disponible desde :<http://www.alur.com.uy/biodiesel.html>
3. Fjerbaek L, Christensen K V, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and bioengineering*. 2009 ; 102(5): 1298–315.
4. United States Environmental Protection Agency. Environmental Laws Applicable to Construction and Operation of Biodiesel Production Facilities [Internet]. Washington D.C.: United States Environmental Protection Agency; Noviembre 2008 [Citado 2015 Abr 3] Disponible desde: http://www.epa.gov/region7/priorities/agriculture/pdf/biodiesel_manual.pdf
5. ASTM International. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels [Internet]. West Conshohocken (Pennsylvania): ASTM International; Enero 2015 [Citado 2015 Abr 5]. Disponible desde: <http://www.astm.org/Standards/D6751.htm>
6. Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2009; 111:800–813.
7. ANCAP. Biocombustibles información general [Internet]. Montevideo (Uruguay): ANCAP; 2007 [Citado 2015 Abr 5]. Disponible desde : <http://www.ancap.com.uy/BioCombustibles.pdf>
8. Meher L, Vidyasagar D, Naik S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2006; (10): 248–268.
9. Du W, Li W, Sun T, Chen X, Liu D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008; 79 (1) :331–337.
10. Lukovi N, Knežević Z, Bezbradica D. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends , Challenges and Future Perspectives. En: Dr. Maximino Manzanera. *Alternative Fuel*. InTech. Croatia: Rijeka; 2011. pp 47-73.
11. Ma F, Hanna MA. Biodiesel production : a review 1. *Bioresource Technology*. 1999; 70:1–15.
12. Mclean DD, Kates M. Biodiesel production from waste cooking oil : 1 . Process design and technological assessment. *Bioresource technology*. 2003; 89: 1–16.
13. Dexter Biodiesel Solutions. Production & Purification Overview [Internet]. Pearland (Texas): Dexter Biodiesel Solutions. 2011 [Citado 2015 Abr 6]. Disponible desde: <http://www.dexterbiodiesel.com/portals/0/purification.pdf>
14. Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production : Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 44:182–197.

15. Sharma R, Chisti Y, Chand U. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology advances*. 2001; 19: 627–662.
16. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. *Bioresource Technology*. 2003; 89: 17–34.
17. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2013; 1051: 15–31.
18. Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *The Biochemical journal*. 2007; 402: 331–337.
19. Mozhaev VV, Martinek K. Structure-stability relationships in proteins: a guide to approaches to stabilizing enzymes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1990; 4: 387–419.
20. Nisha S, Karthick SA, Gobi N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Reiew and Letters*. 2012; 1(3):148–155.
21. M. M. Elnashar M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2010; 01(10) 61–77.
22. BBC research. Enzymes in industrial applications: Global Markets [Internet]. Salford (UK): BBC research; Marzo 2012 [citado 2015 Abr 12]. Disponible desde: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>
23. Ayala M, Torres E. Enzymatic activation of alkanes: Constraints and prospective. *Applied Catalysis A: General*. 2004; 272: 1–13.
24. Guisan JM editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2da.ed. Londres. Humana Press: 2006.
25. Benešová E, Králová B. Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization. *Affinity Chromatography*. 2012: 29–46.
26. Azócar L, Ciudad G, Heipieper HJ, Navia R. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010; 88: 621–636.
27. Uthoff S, Bröker D, Steinbüchel A. Current state and perspectives of producing biodiesel-like compounds by biotechnology. *Microbial Biotechnology*. 2009; 2: 551–565.
28. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*. 2012; 3(1): 1–9.
29. Spahn C, Minter SD. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering*. 2008; 2: 195–200.
30. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology*. 2008; 26(9): 639–646.
31. Roig MG, Estevez FB, Velasco FG, Ghais NI, Cachaza Silverio JM. Biotechnology and applied biology section. *Biochemical Education*. 1986; 14(4): 180–185.
32. Zucca P, Sanjust E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*. 2014; 19: 14139–14194.

33. Elnashar MMM. The Art of Immobilization using Biopolymers , Biomaterials and Nanobiotechnology. Biotechnology of biopolymers. Croatia, Rijeka. Intechopen; 2009. pp 3–33.
34. Li J, Xu L, Liu H, Wang Y, Wang Q, Chen H, Pan W, Li S. Biomimetic synthesized nanoporous silica@poly(ethyleneimine)s xerogel as drug carrier: Characteristics and controlled release effect. International Journal of Pharmaceutics. 2014; 467: 9–18.
35. Bayramoglu G, Akbulut A, Ozalp VC, Arica MY. Chemical Engineering Research and Design Immobilized lipase on micro-porous biosilica for enzymatic transesterification of algal oil. Chemical Engineering Research and Design. 2015; 95: 12–21.
36. Betancor L, Luckarift HR. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. Trends in biotechnology. 2008; 26(10): 566–72.
37. Aravindan R. Lipase applications in food industry. Indian Journal of Biotechnology. 2007; 6(4):141–158.
38. Jensen MØ, Jensen TR, Kjaer K, Bjørnholm T, Mouritsen OG, Peters GH. Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. Biophysical journal. 2002; 83 (7): 98–111.
39. Peters GH, Olsen OH, Svendsen a, Wade RC. Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in Rhizomucor miehei lipase. Biophysical journal. 1996; 71(7): 119–129.
40. Peters GH, van Aalten DM, Svendsen a, Bywater R. Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length. Protein engineering. 1997; 10(2): 149–158.
41. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004 ; 118(1-3): 155–170.
42. Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2010; 66(1-2): 15–32.
43. Seth S, Chakravorty D, Dubey VK, Patra S. An insight into plant lipase research - Challenges encountered. Protein Expression and Purification. 2014; 95: 13–21.
44. Aarthy M, Saravanan P, Gowthaman MK, Rose C, Kamini NR. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. Chemical Engineering Research and Design. 2014; 92(8): 1591–1601.
45. Quyen DT, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. High-level expression of a lipase from Bacillus thermocatenuatus BTL2 in Pichia pastoris and some properties of the recombinant lipase. Protein Expression and Purification. 2003; 28: 102–110.
46. Kraai GN, Winkelman JGM, de Vries JG, Heeres HJ. Kinetic studies on the Rhizomucor miehei lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. Biochemical Engineering Journal. 2008; 41: 87–94.
47. Miranda JS, Silva NC a, Bassi JJ, Corradini MCC, Lage F a P, Hirata DB, Mendes A a. Immobilization of Thermomyces lanuginosus lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. Chemical Engineering Journal. 2014; 251: 392–403.
48. Carrasco-López C, Godoy C, De Las Rivas B, Fernández-Lorente G, Palomo JM, Guisán JM, Fernández-Lafuente R, Martínez-Ripoll M, Hermoso J a. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the BTL2 lipase from the extremophilic microorganism Bacillus

thermocatenulatus. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 2008; 64: 1043–1045.

49. Galvis M, Barbosa O, Torres R, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R. Effect of solid-phase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*. 2012; 47(3): 460–466.

50. Schmidt-Dannert C, Rúa M, Haruyuki A, D. Schmid R. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1301 1996;1301 (1): 105–114.

51. Rúa ML, Atomi H, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998; 49: 405–410.

52. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.

53. Wilkesman J, Herna Z, Contreras LM, Ferna M, Kurz L. Enhancement of sequential zymography technique for the detection of thermophilic lipases and proteases. *Amino Acids*. 2014; 46: 1409–1413.

54. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia a. K, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 1985; 150: 76–85.

55. Betancor L. Coinmovilización y estabilización de oxidasas y catalasas: aplicaciones biotecnológicas [Doctoral]. Madrid: Univesidad Autónoma de Madrid; 2005.