

Título de la Tesis: “Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autosoportadas a partir de agregados de enzimas (cleas) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis.”

Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Materiales

Autor: Guauque Torres, María del Pilar

Directores: Dra. María Lujan Ferreira - Dra. María Laura Foresti

Resumen

La presente tesis se enmarca en la aplicación de nuevas técnicas de inmovilización de catalizadores biológicos dentro del grupo de biocatálisis del instituto PLAPIQUI, teniendo en cuenta el empleo de reacciones test para la caracterización y seguimiento de la actividad catalítica retenida en el proceso. La técnica de inmovilización usada es la denominada “Agregados enzimáticos entrecruzados” o CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates por sus siglas en inglés). Mediante esta metodología, se inmovilizaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosa* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML) y *Candida antarctica* B (CALB), probando su actividad catalítica en reacciones de hidrólisis, esterificación y acidólisis.

En el capítulo I se presentan los lineamientos teóricos generales sobre catálisis enzimática, haciendo especial énfasis en las lipasas y su mecanismo de acción, así como también en las diversas técnicas de inmovilización de enzimas conocidas, sus ventajas y desventajas. Se concluye el capítulo referenciando algunos de los trabajos más destacados sobre la técnica de CLEAs aplicada a lipasas.

En el capítulo II se resumen los materiales y métodos empleados a lo largo de la tesis, especificando los protocolos “base” de preparación de CLEAs, así como las reacciones empleadas en la caracterización de actividad catalítica de los mismos. Se mencionan además, las técnicas de análisis instrumental aplicadas a la caracterización de los catalizadores inmovilizados más activos obtenidos en esta tesis.

El capítulo III contiene el protocolo desarrollado para la determinación de actividad recuperada de los CLEAs, en las condiciones de reacción empleadas. Se clarifica la forma de reportar actividad enzimática, partiendo de la cuantificación de la concentración de proteína precipitable (PP) contenida en los preparados líquidos comerciales de lipasa, y enfatizando en la necesidad de reportes de actividad específica. Además, se establece la contribución de los reactivos de preparación de CLEAs y de los reactivos presentes en el medio de reacción a la acidez medida en la determinación de la actividad recuperada del biocatalizador.

El capítulo IV contiene los resultados encontrados en la síntesis de CLEAs de TLL, cuya actividad catalítica se determinó en la reacción test de hidrólisis de trioleína. Se mencionan los

Título de la Tesis: “Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autoportadas a partir de agregados de enzimas (cleas) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis.”

Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Materiales

Autor: Guauque Torres, María del Pilar

Directores: Dra. María Lujan Ferreira - Dra. María Laura Foresti

cambios en la actividad retenida en función de la naturaleza y cantidad de precipitante, la concentración de entrecruzante, el uso de diferentes aditivos tales como proteínas de co-precipitación, ácidos grasos, surfactantes, solventes orgánicos y aminas. Además, se evalúa la estrategia de síntesis de CLEAs en capas (unión a un soporte proteínico), y algunos mecanismos de estabilización de actividad en el tiempo de almacenamiento.

El capítulo V presenta los resultados de actividad catalítica retenida obtenidos para los CLEAs de RML. La actividad de los biocatalizadores fue determinada en las reacciones test de síntesis de etiloleato y heptiloleato.

El capítulo VI contiene los resultados de la síntesis de CLEAs de CALB. La efectividad del proceso de inmovilización se midió utilizando la síntesis de etiloleato como reacción test. Se evaluó el efecto del cambio de la cantidad y concentración del entrecruzante, la estabilidad de los CLEAs en el tiempo de almacenamiento, el impacto del secado y de la adición de dextrosa. Por último, el CLEA de CALB con mayor actividad retenida dentro de aquellos preparados, se evaluó en reacciones de esterificación, acidólisis e hidrólisis.

En el capítulo VII se describen los resultados de la caracterización de los CLEAs con mejor actividad retenida en las reacciones test ensayadas. Para ello, se estudia la naturaleza química de los biocatalizadores mediante espectroscopía infrarroja; la morfología de los CLEAs por microscopía electrónica de barrido; los cambios en el potencial zeta (ζ) de los CLEAs y la lipasa libre por determinación de su movilidad electroforética, y finalmente se reporta el radio hidrodinámico de los CLEAs usando dispersión de luz dinámica.

Por último, el capítulo VIII recoge las conclusiones más importantes y relevantes de todo el trabajo experimental desarrollado y explicado en detalle en cada uno de los capítulos de la presente tesis.

Título de la Tesis: “Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autosoportadas a partir de agregados de enzimas (cleas) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis.”

Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Materiales

Autor: Guauque Torres, María del Pilar

Directores: Dra. María Lujan Ferreira - Dra. María Laura Foresti

Abstract

The present thesis concerns the application of new techniques for the immobilization of biological catalysts within the research group of biocatalysis from PLAPIQUI, UNS. It takes into account the use of test reactions for the characterization and monitoring of the catalytic activity retained in the process. The immobilization technique is the so-called “Cross-Linked Enzyme Aggregates” or CLEAs. By this methodology, lipases from *Thermomyces lanuginose* (TLL), *Rhizomucor miehei* (RML) and *Candida antarctica* B (CALB) were immobilized, and their catalytic activity was tested in hydrolysis, esterification and acidolysis reactions.

Chapter I provides general theoretical guidelines about enzymatic catalysis; with particular emphasis on the lipases and their reaction mechanism, as well as various known techniques for immobilization of enzymes, including their advantages and disadvantages. At the end, the chapter describes some of the most important papers about CLEAs techniques applied to lipases.

Chapter II is a generalized summary of the materials and methods that were employed in this thesis, specifying the basic protocols about preparation of CLEAs and the reactions used for the characterization of their catalytic activity. In addition, describes the instrumental analytical techniques applied for the characterization of the catalysts that shown higher activity.

Chapter III contains the protocol developed for the determination of recovered activity from CLEAs, carefully established for the reaction conditions. It clarifies the way of reporting enzymatic activity, based on the quantification of the concentration of precipitable protein contained in liquid commercial lipase and emphasizing the need for specific activity reports given in $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$. Furthermore, in the case of advancing test reactions quantified by acid-base titration, establishes the distinction between the contribution of CLEAs preparation reagents and the reactants present in the reaction medium to measure the acidity in the determination of CLEAs recovered activity.

In the chapter IV the results about CLEAs from TLL are presented. The catalytic activity was determined in hydrolysis of triolein. It describes the changes in the recovered activity as a

Título de la Tesis: “Preparación y caracterización fisicoquímica de lipasas autosoportadas a partir de agregados de enzimas (cleas) con actividad catalítica en reacciones de esterificación, hidrólisis y acidólisis.”

Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Materiales

Autor: Guauque Torres, María del Pilar

Directores: Dra. María Lujan Ferreira - Dra. María Laura Foresti

function of the nature and quantity of precipitant, the concentration of crosslinking, and the use of different additives such as co-precipitated proteins, fatty acids, surfactants, organic solvents and amines. In addition, evaluates the strategy of synthesis of layered-CLEAs (binding to a protein support) and some mechanisms for stabilization of activity during storage time.

The chapter V presents the results obtained for CLEAs from RML). The activity of this biocatalyst was determined with the test reactions of ethyl oleate and heptyl oleate synthesis.

Chapter VI contains the results about synthesis of CLEAs from CALB. Monitoring the effectiveness of the immobilization process in terms of recovered catalytic activity was performed using the synthesis of ethyl oleate as test reaction. Different parameters were evaluated such as the effect of changing the amount and concentration of crosslinker, the stability on storage time, the impact of drying and the addition of dextrose. Finally, the CALB-CLEA with the higher recovered activity was evaluated in test reactions of esterification, acidolysis and hydrolysis.

Chapter VII describes the results of characterization of CLEAs with higher retained activity in the reactions tested. The chemistry nature of biocatalyst was determined by infrared spectroscopy. The morphology of CLEAs was observed with scanning electron microscopy. The change in the zeta potential of free lipases and CLEAs was evaluated by determination of electrophoretic mobility and finally the hydrodynamic radius was measured using dynamic light scattering.

Finally, chapter VIII contains the most important and relevant conclusions about the experimental work that were developed and explained in detail in every chapter of this thesis.