



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Posgrado en Biotecnología

**“Evaluación de biocatalizadores producidos utilizando CalB o células/enzimas de *Yarrowia lipolytica* para la síntesis de isobutil propionato en un biorreactor de lecho empacado Sólido/Gas”.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

**Mtro. Yahir Alejandro Cruz Martínez**

**Matrícula:** 2192802281

**ORCID:** 0009-0007-9258-219X

**Correo electrónico:** yahircruz95@gmail.com

COMITÉ TUTORAL:

Director

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Codirector

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Asesor

Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

JURADO:

Presidente

Dra. Angélica Román Guerrero

Secretario

Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Vocal

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

Vocal

Dr. Miquel Gimeno Seco

Iztapalapa, Ciudad de México, a 21 de Noviembre de 2025.

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del SECIHTI, con la referencia “001466”.

---

## **Agradecimientos**

Al Dr. Sergio Huerta, quien me aceptó dentro de su grupo de investigación. Agradezco todo su tiempo y dedicación al proyecto, así como todas las charlas y consejos, los cuales me brindaron una excelente guía. Gracias por la confianza, ya que siempre me permitió desarrollar ideas; algunas salieron bien, otras tantas mal, pero siempre me dejó intentarlo. Por otra parte, le agradezco profundamente las oportunidades brindadas para desarrollarme en este ámbito, a nivel de experiencia profesional en congresos, cursos y principalmente, la oportunidad de vivir una estancia de investigación en el extranjero, la cual me cambió la perspectiva de vida a futuro.

A la Dra. Susana Velasco, quien me recibió con afecto y entusiasmo durante mi estancia en Zaragoza. A percepción propia, la Dra. Susana es una apasionada de la ciencia y de las enzimas principalmente, por lo que agradezco todos los conocimientos y tiempo de trabajo brindados, así como todas las enseñanzas profesionales que me dio sin darse cuenta.

A los doctores Omar y Edmundo, por su constante apoyo y consejos durante todo el doctorado. Sin duda, el análisis de resultados de forma semanal (aunque a veces corto de mi parte), me dio herramientas suficientes para avanzar con mayor velocidad en la escritura de los diferentes trabajos derivados del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Mora, Brianda, Uriel y Lalo, quienes siempre que lo requerí me brindaron consejos, ayuda y compañía.

---

En la vida, existen personas ajenas a tu círculo familiar directo que te brindan su apoyo como si lo fueran. Agradezco a mi amigo Manuel y a mi suegra Gladys por siempre estar presentes, por siempre extenderme su ayuda y acompañarnos en el camino.

A Rocío, mi madre. Le agradezco profundamente por siempre escucharme y motivarme a no rendirme, que, aunque por momentos no conozca sobre mis actividades dentro del laboratorio, siempre me motiva a dar todo de mí y realizar todas las cosas lo mejor posible.

A Jennyfer, mi pareja. Quien ha vivido de la mano todo este proceso, hemos tenido toda una montaña rusa de emociones durante este camino. Días en donde todo es alegría, euforia y motivación cuando los experimentos salen bien, y días de tristeza, tolerancia y resiliencia cuando sale todo mal. Hemos reído, llorado, desvelado, debatido, peleado y de todo. Te agradezco por estar siempre para mí de forma incondicional, eres mi persona favorita y mi científica también, te amo con todo mi ser.

---

## **Dedicatoria**

Para mis abuelos: Leo y Gloria, los extraño mucho †



# Índice General

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>3</b>
2.1. Isobutil propionato .....	3
2.2. Ingeniería del medio de reacción en Biocatálisis .....	4
2.3. Biocatálisis sólido/gas (S/G) .....	5
2.4. Biocatalizadores: enzimas o células completas.....	6
2.5. Métodos de inmovilización enzimática y los <i>agregados enzimáticos entrecruzados</i> (CLEA).....	8
2.6. CalB Immo Plus <sup>TM</sup> .....	11
2.7. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	13
<b>3. Estado del arte</b> .....	<b>14</b>
3.1. Aplicaciones de la biocatálisis sólido/gas .....	14
3.2. Síntesis de isoPro.....	17
3.3. Producción de CLEAs de CalB con BSA .....	20
3.4. <i>Yarrowia lipolytica</i> en biocatálisis. ....	21
<b>4. Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>24</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
6.1. Objetivo general .....	24
6.2. Objetivos específicos.....	24
<b>7. Estrategia experimental y componentes del sistema S/G</b> .....	<b>25</b>
7.1. Componentes del sistema S/G.....	28

---

7.2. Análisis cromatográfico .....	29
<b>8. Bloque A. Evaluación de CalB Immo Plus™ en el sistema S/G .....</b>	<b>32</b>
8.1. Resumen .....	32
8.2. Metodología.....	33
8.2.1. Especificaciones del sistema S/G .....	33
8.2.2. Control de la $a_w$ .....	33
8.2.3. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de isoPro con CalB-IP en sistema S/G .....	33
8.2.4. Curvas de ruptura de sustratos y producto .....	33
8.2.5. Experimentos de desorción de reactivos y producto .....	34
8.2.6. Ensayos de adsorción-desorción-reacción de sustratos.....	34
8.2.7. Efecto de la relación molar en la síntesis de isoPro y estabilidad operacional de CalB-IP en sistema S/G. ....	35
8.3. Resultados y discusión .....	35
8.3.1. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de isoPro con CalB-IP .....	35
8.3.2. Análisis de la adsorción.....	40
8.3.3. Papel de la adsorción y desorción en la cinética enzimática .....	45
8.3.4. Efecto de la relación molar de sustratos y estabilidad operacional de CalB-IP. ....	50
8.4. Conclusiones .....	53
<b>9. Bloque B. Evaluación de agregados entrecruzados de CalB con BSA (CalB-CLEA) en el sistema S/G .....</b>	<b>55</b>
9.1. Resumen .....	55
9.2. Metodología.....	56
9.2.1. Producción de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) a partir de CalB. ....	56
9.2.2. Actividad de hidrólisis y estabilidad térmica del biocatalizador.....	57
9.2.3. Actividad de síntesis de CalB-CLEA utilizando <i>n</i> -heptano .....	58
9.2.4. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de isoPro en <i>n</i> -heptano .....	58

---

9.2.5. Reciclabilidad de los CalB-CLEA .....	58
9.2.6. Especificaciones sistema S/G.....	59
9.2.7. Efecto de la $a_w$ y de la carga de biocatalizador en el sistema S/G.....	59
9.2.8. Estabilidad y reciclabilidad de CalB-CLEA en el sistema S/G.....	59
9.2.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	60
9.2.10. Cálculo de parámetros operativos y ambientales basados en masa.....	60
9.3. Resultados y discusión .....	61
9.3.1. Actividad de hidrólisis y termoestabilidad.....	61
9.3.2. Actividad de síntesis en disolvente orgánico .....	65
9.3.3. Efecto de la actividad del agua ( $a_w$ ) en la síntesis de isoPro en <i>n</i> -heptano .....	67
9.3.4. Síntesis de isoPro catalizada por CalB-CLEA en sistema S/G .....	73
9.3.5. Métricas verdes y de sostenibilidad.....	80
9.4. Conclusiones .....	83
<b>10. Bloque C. Evaluación de inmovilizados de <i>Yarrowia lipolytica</i> en el sistema S/G y producción de CLEAs utilizando extracto crudo.....</b>	<b>85</b>
10.1. Resumen .....	85
10.2. Metodología.....	86
10.2.1. Propagación de microorganismo .....	86
10.2.2. Preparación de los soportes para fermentación .....	86
10.2.3. Producción de lipasas con diferentes soportes y evaluación del tiempo de cultivo .....	86
10.2.4. Obtención de agregados enzimáticos entrecruzados a partir de extracto crudo de <i>Ylip</i> utilizando BSA y Q como protector o “ <i>co-feeder</i> ” .....	87
10.2.5. Determinación de actividad enzimática de hidrólisis.....	88
10.2.5.1. Soportes post-fermentación.....	88
10.2.5.2. CLEAs del extracto enzimático de <i>Ylip</i> con BSA o Q. ....	88

---

10.2.6. Determinación de la capacidad de síntesis de isoPro .....	89
10.2.6.1. Solvente orgánico .....	89
10.2.6.2. Sistema S/G .....	90
10.3. Resultados y discusión .....	90
10.3.1. Selección del soporte para el biocatalizador mediante el criterio de actividad de hidrólisis y síntesis de isoPro en medio orgánico.....	90
10.3.2. Cinética de producción de enzimas lipolíticas con PUF como soporte .....	95
10.3.2.1. Actividad de hidrólisis (especificidad de sustrato).....	95
10.3.2.2. Capacidad de síntesis del catalizador PUF en medio orgánico y sistema S/G. ....	97
10.3.3. Screening de precipitantes para la obtención de CLEAs a partir del extracto crudo de <i>Ylip</i> con BSA o Q como <i>co-feeder</i> . ....	99
10.4. Conclusiones .....	103
<b>11. Conclusiones generales.....</b>	<b>104</b>
<b>12. Referencias .....</b>	<b>105</b>
<b>13. Trabajos derivados del proyecto de investigación.....</b>	<b>114</b>

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Reacción de esterificación objetivo del proyecto de investigación. Los sustratos fueron empleados en fase gaseosa y los biocatalizadores (CalB-IP, CalB-CLEA y enzimas/células de <i>Ylip</i> ) inmovilizados en fase sólida. ....	3
<b>Figura 2.</b> Principales medios de reacción involucrados en biocatálisis. ....	4
<b>Figura 3.</b> Modo de operación del sistema de biocatálisis S/G en la reacción de esterificación objetivo. ....	6
<b>Figura 4.</b> Reacciones catalizadas por lipasas. Modificado de Ramos-Sánchez <i>et al.</i> (2015). ....	8
<b>Figura 5.</b> Principales métodos de inmovilización enzimática. Modificado de Maghraby <i>et al.</i> (2023). ....	9
<b>Figura 6.</b> Proceso general de preparación de un <i>agregado enzimático entrecruzado</i> (CLEA) y estructura química del glutaraldehído. ....	11
<b>Figura 7.</b> (A) Apariencia física del producto comercial CalB-IP; (B) Mapeo de zonas hidrofóbicas cercanas al sitio activo de CalB; (C) Método de inmovilización mediante interacción hidrofóbica entre CalB y las resinas poliméricas. <b>B:</b> Modificado de Basso <i>et al.</i> (2007). ....	13
<b>Figura 8.</b> (■) Componentes generales del sistema S/G; (▼) Esquema general de operación del sistema S/G: (A) Saturación, Volatilización y acarreamiento de sustratos; (B) Biorreactor S/G y (C) Recuperación de producto. Mecanismos de transporte implicados en un biorreactor tubular sólido/gas: (1) Convección; (2) Dispersión (axial y radial); (3) Interpartícula; (4) Intrapartícula; y posteriormente, (5) Cinética enzimática. Modificado de Huerta-Ochoa <i>et al.</i> (2023). ....	31
<b>Figura 9.</b> (A) Concentración adimensional de isoPro ( $C_{out-isoPro} / C_{in-aciP}$ ); valores multiplicados por 100 brindan el rendimiento de conversión (%); (B) Porcentaje de carbono total a la salida del bioreactor respecto al de entrada (Carbono $T_{out}$ / Carbono $T_{in}$ ), incluidos sustratos y productos. Condiciones de operación: Temperatura 55 °C, $QN_2$ : 65 mL min <sup>-1</sup> , $N_{aciP}$ : 14 μmol min <sup>-1</sup> y $N_{isoB}$ : 17 μmol min <sup>-1</sup> . <i>Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.</i> ....	37
<b>Figura 10.</b> Curvas de progreso de concentración adimensional de los reactantes aciP e isoB, y del producto isoPro en el efluente respecto a la concentración inicial del reactante limitante aciP ( $C_{in-aciP}$ ) a una $a_w$ de 0.11. <i>Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.</i> ....	39
<b>Figura 11.</b> Curvas de ruptura de: (A) Sustratos isoB y aciP, y producto isoPro en ECR a una $a_w$ de 0.11; (B) Sustratos isoB y aciP en ECR y en CalB-IP a una $a_w$ de 0.11; (C) Sustratos isoB y aciP en CalB-IP a $a_w$ de 0.11 y 0.75. <i>Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.</i> ....	42
<b>Figura 12.</b> Posibles interacciones a través de puentes de hidrógeno entre reactantes y soporte. (Rojo): (A) aciP-ECR y (B) isoB-ECR. [PMMA (verde), DVB (negro), aciP (azul) e isoB (rojo)]. ....	43
<b>Figura 13.</b> Curvas de progreso del proceso de desorción de las especies isoB y aciP de ECR y CalB-IP, (A) concentración de la especie en el efluente; (B) cantidad residual de la especie adsorbida en el sólido “ $q_r$ ”. Condiciones de operación ( $a_w$ de saturación: 0.11, $QN_2$ : 65 mL min <sup>-1</sup> y 55 °C). <i>Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.</i> ....	46
<b>Figura 14.</b> Escenarios de reacción durante los ensayos de adsorción-reacción-desorción, (A) CalB-IP se satura inicialmente con isoB, y posteriormente, se introduce aciP en el biorreactor; (B) CalB-IP inicialmente saturado con aciP, y posteriormente, se introduce isoB en el biorreactor; (C) Representación del mecanismo de reacción “Ping-Pong Bi-Bi” de la lipasa B de <i>Candida</i>	

---

antarctica en la síntesis de isobutil propionato “isoPro” a partir de ácido propiónico “aciP” e isobutanol “isoB”. Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio. ....50

**Figura 15.** (A) Curvas de progreso del efecto de la relación molar en la producción de isoPro (aciP:isoB → 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4.5); (B) Estabilidad operacional de CalB-IP en el sistema S/G durante 10 h de operación continua. (Condiciones de operación: 55 °C,  $a_w$  0.11). Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio. ....52

**Figura 16.** Efecto de la concentración de BSA [ $\text{mg mL}^{-1}$ ] en el cuerpo de los CLEA producidos utilizando 3 % GA (C: CalB sin BSA). ....62

**Figura 17.** (A) Efecto de las concentraciones de BSA y GA sobre la actividad de hidrólisis (barras) y la estabilidad térmica de las CalB-CLEA tras 2 h de incubación a 55 °C (■); (B) Actividad de síntesis de CalB-CLEA en *n*-heptano (400 mM isoB y 100 mM aciP) durante 3 h a 55 °C y 180 rpm, con las diferentes concentraciones de BSA y GA. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media. ....64

**Figura 18.** Efecto de la  $a_w$  en la síntesis de isoPro con 5 mg de CalB-CLEA (400 mM de isoB y 100 mM de aciP en *n*-heptano) durante 270 min a 55 °C y 180 rpm. A) CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub>, B) CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> y C) CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub>. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media. ....70

**Figura 19.** Estabilidad operativa de los CalB-CLEA durante ciclos repetidos de síntesis a isoPro de 2 h. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media. ....71

**Figura 20.** Imágenes SEM de CalB-CLEA: (A) escala de 1  $\mu\text{m}$  con aumento x 3000, (B) distribución de tamaño de los agregados de CalB, (B) escala de 10  $\mu\text{m}$  con aumento x 950, y (C) imagen macromolecular obtenida mediante estereoscopia. ....72

**Figura 21.** (A) Efecto de la  $a_w$  en la síntesis de isoPro en sistema S/G con 200 mg de CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> (liofilizado). (B) Efecto de la carga de biocatalizador en la síntesis de isoPro en el sistema S/G; STY: productividad volumétrica (valor promedio durante el estado estacionario; inicio señalado con línea azul punteada). Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que representan la desviación estándar de la media. ....74

**Figura 22.** (A) Comparación de la productividad volumétrica (STY) y el número total de recambio (TTN) para la síntesis de isoPro utilizando CalB-IP y CalB-CLEA, producidos bajo cinéticas de 10 h en sus respectivas condiciones óptimas de reacción en el sistema S/G. ....77

**Figura 23.** (A) Evaluación de la estabilidad operacional con 600 mg de CalB-CLEA en sistema S/G, ciclos catalíticos de 9 h; (B) Estabilidad del reactor en continuo y métricas de actividad para la síntesis de isoPro bajo 25 h usando 600 mg de CalB-CLEA a una  $a_w$  de 0.52 en sistema S/G. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media. ....79

**Figura 24.** Deconvolución del Factor E (Masa total de residuos/Masa de producto final) Masa de biocatalizador empleada: 5 mg de CalB-CLEA en *n*-heptano, 1 g de CalB-IP en sistema S/G y 600 mg de CalB-CLEA en sistema S/G. ....82

**Figura 25.** Actividad de hidrólisis de los biocatalizadores obtenidos mediante el uso de diferentes soportes en fermentación bifásica: *p*-nitrofenil: acetato, octanoato y decanoato (Actividad de hidrólisis del tipo: esterasa y lipasa) (Condiciones de operación: 37 °C, pH 7 durante 10 min). Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ). ....91

**Figura 26.** Actividad de síntesis ( $U_s$ ) de los biocatalizadores obtenidos mediante el uso de diferentes soportes inertes en fermentación bifásica y rendimiento de conversión a isoPro (%) (Medio y condiciones de reacción: 100 mM aciP y 400 mM isoB

en <i>n</i> -hexano durante 48 h a 55 °C). <i>Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer (p&lt;0.05)</i> . .....	93
<b>Figura 27.</b> Perfil de especificidad (actividades de hidrólisis) durante la fermentación del biocatalizador PUF obtenido mediante fermentación bifásica. Sustratos: ésteres de <i>p</i> -nitrofenol de diferente tamaño de radical, a 37 °C, pH 7 durante 10 min. <i>Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.</i> .....	96
<b>Figura 28.</b> Capacidad de síntesis del biocatalizador PUF durante la curva de crecimiento. (100 mM aciP, 400 mM isoB en <i>n</i> -hexano durante 144 h a 55 °C a 180 rpm). <i>Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer (p&lt;0.05)</i> . .....	97
<b>Figura 29.</b> Capacidad de síntesis del biocatalizador PUF en sistema S/G. (Condiciones de reacción: flujo de N <sub>2</sub> total: 65 mL min <sup>-1</sup> , <i>NisoB</i> : 30.67 μmol min <sup>-1</sup> , <i>NaciP</i> : 6.86 μmol min <sup>-1</sup> (relación ~ 4:1 isoB:aciP respectivamente, a 55 °C y 1 atm; 1 g de biocatalizador PUF a a <sub>w</sub> 0.11 con una altura de lecho de 18 cm). <i>Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.</i> .....	99
<b>Figura 30.</b> (A) Rendimiento de inmovilización y retención de actividad hidrolítica durante el screening de precipitantes en la producción de CLEAs utilizando el extracto crudo de <i>Ylip</i> NRRL 7817; (B) Evaluación de la termorresistencia de los CLEA obtenidos (% de actividad residual después de 2 h a 55 °C). <i>Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.</i> .....	102

## Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades físicoquímicas y datos generales del isoPro (Api <i>et al.</i> , 2025). .....	3
Tabla 2. Sumario de los sistemas de reacción empleados en la síntesis de isoPro reportados en la literatura. ....	18
Tabla 3. Sumario de actividades realizadas durante cada etapa del proyecto. ....	25
Tabla 4. Componentes generales del sistema sólido/gas empleado. ....	30
Tabla 5. Deconvolución del balance total de materia (μmoles) de los ensayos realizados con a <sub>w</sub> 0.11. ....	39
Tabla 6. Capacidad de adsorción de reactivos (isoB y aciP) y producto (isoPro) en CalB-IP y ECR. ....	44
Tabla 7. Resumen de resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la concentración de BSA y GA en la preparación de CalB-CLEA con BSA como “ <i>co-feeder</i> ”. ....	66
Tabla 8. Métricas verdes y sostenibilidad basadas en masa .....	84
Tabla 9. Determinación de proteína por masa de soporte posterior al proceso de fermentación, determinada por el método de Bradford. <i>Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer (p&lt;0.05)</i> . .....	93

## Abreviaturas

S/G	Sólido/Gas (Sistema de reacción)
isoB	Isobutanol
aciP	Ácido propiónico
isoPro	Isobutil propionato
CalB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
<i>Ylip</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
ECR	Resina polimérica ECR1030M (Purolite)
$a_w$	Actividad de agua
PMMA	Polimetilmetacrilato
DVB	Divinilbenceno
$Q_{N_2}$	Flujo volumétrico de nitrógeno ( $\text{mL min}^{-1}$ )
$M_{in-i}$	Flujo másico de la especie $i$ a la entrada ( $\text{mg min}^{-1}$ )
$M_{out-i}$	Flujo másico de la especie $i$ a la salida ( $\text{mg min}^{-1}$ )
$N_{in-i}$	Flujo molar de la especie $i$ a la entrada ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
$N_{out-i}$	Flujo molar de la especie $i$ a la salida ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
$C_{in-i}$	Concentración de la especie $i$ en el flujo de entrada ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
$C_{out-i}$	Concentración de la especie $i$ en el flujo de salida ( $\text{mg mL}^{-1}$ )
$q_{max i}$	Capacidad máxima de adsorción de la especie $i$ por masa de sólido ( $\text{mg g}^{-1} \text{ S}$ )
$q_{r i}$	Cantidad residual de la especie $i$ en el sólido post desorción ( $\text{mg g}^{-1} \text{ S}$ )
BSA	Seroalbúmina bovina
GA	Glutaraldehído
CLEA	<i>Crosslinked enzyme aggregates</i> / Agregados enzimáticos entrecruzados
TTN	<i>Total turnover number</i> / Número total de recambios catalíticos (mol de producto $\text{mol}^{-1}$ enzima)
STY	<i>Space Time Yield</i> / Productividad volumétrica (g de producto $\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
CalB-IP	Producto comercial CalB Immo Plus <sup>TM</sup> (Purolite)

CalB-CLEA	Agregados entrecruzados de CalB con BSA como <i>co-feeder</i>
CalB-CLEA-C <sub>x</sub> G <sub>y</sub>	Tratamientos variación de concentración de x: mg mL <sup>-1</sup> BSA; y: % GA.
AE	<i>Atom Economy</i> / Economía Atómica
RME	<i>Reaction Media Efficiency</i> / Eficiencia del medio de reacción
MP	<i>Mass Productivity</i> / Productividad másica
CE	<i>Carbon Economy</i> / Economía de Carbono
PUF	Espuma de poliuretano
PU-Q	Composito basado en poliuretano y fibra de queratina
U	Unidad de actividad enzimática de hidrólisis (μmol <i>p</i> -NP min <sup>-1</sup> )
U <sub>s</sub>	Unidad de actividad enzimática de síntesis (μmol isoPro min <sup>-1</sup> )
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPAc	<i>p</i> -nitrofenil acetato (cadena C2)
<i>p</i> -NPBu	<i>p</i> -nitrofenil butirato (cadena C4)
<i>p</i> -NPOc	<i>p</i> -nitrofenil octanoato (cadena C8)
<i>p</i> -NPDe	<i>p</i> -nitrofenil decanoato (cadena C10)
<i>p</i> -NPMi	<i>p</i> -nitrofenil miristato (cadena C14)
BSA-CLEA	Agregados entrecruzados del extracto crudo de <i>Ylip</i> con BSA como protector
Q-CLEA	Agregados entrecruzados del extracto crudo de <i>Ylip</i> con quitosano como protector

## Resumen

La producción de ésteres volátiles es de gran interés en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Una alternativa verde a los procesos tradicionales utilizados para su obtención (síntesis química y extracción directa de plantas o frutas), es hacer uso de procesos biotecnológicos como la biocatálisis sólido/gas (S/G). En donde se hace uso de enzimas como las lipasas o células completas con actividad lipolítica como biocatalizadores, mismos que deben encontrarse inmovilizados en un soporte sólido para ser empacado dentro de un reactor tubular por donde fluyen los sustratos en fase gaseosa con la ayuda de un acarreador. El uso del sistema S/G presenta diversas ventajas sobre otros sistemas mono o bifásicos, principalmente referentes a altos rendimientos de conversión acompañados de altas tasas de producción, así como fenómenos de transferencia de masa más eficientes y, en particular, evita el uso de solventes líquidos, lo cual brinda facilidad para recuperar el producto de interés y el mismo biocatalizador.

En este proyecto se utilizó un biorreactor tubular de lecho empacado en sistema S/G para la obtención de isobutil propionato (isoPro), un éster con aroma y sabor a ron “afrutado”. Su síntesis se llevó a cabo utilizando ácido propiónico (aciP) e isobutanol (isoB) como sustratos y nitrógeno como gas acarreador. Para ello, se evaluaron tres biocatalizadores: CalB Immo Plus™ (CalB-IP), *crosslinked enzyme aggregates* de CalB con BSA (CalB-CLEA) e inmovilizados de células/enzimas de la levadura *Yarrowia lipolytica* NRLL 7817 (*Ylip*) obtenidos mediante fermentación bifásica. En este contexto, CalB hace referencia a la lipasa B de *Candida antárctica*, enzima de importancia industrial que se puede encontrar en el mercado de forma libre o inmovilizada en resinas poliméricas como la de polimetacrilato-divinilbenceno (Ej. Novozym 435®, CalB Immo Plus™). En primera instancia, al evaluar el sistema S/G con el producto comercial CalB-IP se logró alcanzar rendimientos de conversión > 97 % al incrementar la relación molar de 1:1 a 4:1 (alcohol:ácido respectivamente) y disminuir a 0.11 el valor de  $a_w$  del catalizador, ese porcentaje de conversión fue superior a lo reportado en otros sistemas de reacción ( $\text{CO}_2$  supercrítico y libre de solventes) basados en el mismo producto y enzima, logrando además, trabajar de forma continua durante 10 h manteniendo la producción en estado estacionario a dicho nivel de conversión. En este mismo apartado, se identificó y elucidó un importante fenómeno de interacción vía adsorción física entre los sustratos y la resina polimérica, lo cual limitó la velocidad inicial de reacción durante los ensayos, pero que brindó información sumamente relevante sobre el papel del tiempo característico de adsorción-desorción de sustratos/productos y los mecanismos de difusión intrapartícula, en las tasas de producción en sistema S/G.

Por otro lado, se buscaron alternativas a dicho biocatalizador comercial utilizando CalB e inmovilizándola mediante el método de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA: por sus siglas en inglés de *crosslinked enzyme aggregates*) junto con seroalbúmina bovina (BSA) y glutaraldehído (GA) como agente entrecruzante, dando como resultado un biocatalizador más verde y sostenible, debido a su

naturaleza totalmente proteica, lo que resultó en una productividad (*total turnover number* “TTN”) en sistema S/G aproximadamente seis veces superior a CalB-IP por cada mol de enzima utilizada ( $12.13 \pm 0.15 \times 10^3$  mol de isoPro mol<sup>-1</sup> CalB) y un valor promedio de productividad volumétrica específica (*space time yield* “STY” mg<sup>-1</sup> CalB) 4 veces superior ( $0.652 \pm 0.02$  g isoPro L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> CalB), con rendimientos de conversión >90 %, sin perder < 50 % de dicha actividad tras 25 h de uso. A diferencia de lo obtenido con CalB-IP se observó un efecto negativo de la disminución del valor de  $a_w$ , encontrando los mejores rendimientos con  $a_w$  0.52 y el tratamiento con 10 mg mL<sup>-1</sup> BSA - 3 % GA. En el sentido general, se obtuvo un proceso más sostenible y eco-amigable tras obtener métricas másicas de verdor superiores a las obtenidas con CalB-IP y con la misma CalB-CLEA en medio orgánico, mostrando superioridad tanto a nivel de sistema catalítico como de biocatalizador respecto a los sistemas alternativos mencionados anteriormente.

Además, se probaron biocatalizadores obtenidos directamente del secado de los sólidos recuperados de cultivos bifásicos de *Ylip*, logrando identificar la capacidad de su maquinaria enzimática en el mismo proceso de síntesis, en la búsqueda de un proceso más rentable, al evitar la necesidad de adquirir una enzima comercial. Se identificó la superioridad de la espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte para los cultivos; 72 h de cultivo fue el tiempo seleccionado para recuperar los biocatalizadores tomando como criterio la actividad de hidrólisis y síntesis en medio orgánico. Afín a esto, se observó especificidad por sustratos de cadena mediana C8 (*p*-NPOc) al cuantificar su actividad hidrolítica y rendimientos de conversión a isobutil propionato de ~ 20 %. En contraparte, sólo se alcanzó un rendimiento de conversión de ~ 2 % en sistema S/G. Aunque es un valor relativamente bajo, se tiene como principal ventaja la capacidad de trabajar en continuo y la relativamente fácil obtención del biocatalizador.

Finalmente, se produjeron CLEAs utilizando directamente el extracto crudo obtenido tras el tiempo de fermentación mencionado. En este sentido, se evaluaron de forma independiente la BSA y otro biopolímero biodegradable con alta densidad de grupos funcionales reactivos, el quitosano (Q); como agentes protectores o *co-feeders*, identificándose al alcohol isoamílico como el precipitante más eficaz en presencia de ambos materiales. Siendo la BSA con la que se obtuvieron los mejores rendimientos de inmovilización (> 95 %) y termorresistencia (~ 80 % de actividad recuperada tras 2 h a 55 °C). En este sentido, se obtuvo una novedosa alternativa de biocatalizador verde y rentable para ser evaluada en un futuro en el sistema biocatalítico S/G.

## Abstract

The enzymatic production of volatile esters has garnered significant interest across the food, cosmetic, and pharmaceutical industries. As a sustainable alternative to conventional methods (chemical synthesis and direct natural extraction), biotechnological approaches such as solid/gas biocatalysis (S/G) have emerged as promising strategies. In this system, enzymes (e.g., lipases) or whole cells exhibiting lipolytic activity are employed as biocatalysts. These must be immobilized onto a solid support and packed within a tubular reactor, where the gaseous substrates are introduced and transported via an inert carrier gas. The S/G configuration offers several advantages over conventional monophasic or biphasic systems, including enhanced conversion efficiencies, elevated space time yields, improved mass transfer dynamics, and most notably, the elimination of liquid solvents. This solvent-free operation not only facilitates the downstream recovery of both the target ester and the biocatalyst but also aligns with green chemistry principles.

In this study, a gas-phase packed-bed tubular bioreactor was employed for the synthesis of isobutyl propionate (isoPro), a fruity ester characterized by a rum-like aroma and flavor. The esterification reaction was conducted using propionic acid (aciP) and isobutanol (isoB) as substrates, with nitrogen gas serving as the carrier. Three different biocatalysts were evaluated: CalB Immo Plus™ (CalB-IP), CalB/BSA crosslinked enzyme aggregates (CalB-CLEA), and immobilized cells/enzymes of the yeast *Yarrowia lipolytica* NRLL 7817 (*Ylip*), obtained via biphasic fermentation. Here, CalB denotes *Candida antarctica* lipase B, a widely utilized industrial enzyme available commercially in both free and immobilized forms, the latter typically supported on polymeric resins such as polymethacrylate-divinylbenzene (e.g., Novozym® 435, CalB Immo Plus™). Initial assessments of the S/G system using the commercial CalB-IP demonstrated conversion yields exceeding 97 % by increasing the molar ratio of alcohol to acid from 1:1 to 4:1 and by lowering the water activity ( $a_w$ ) of the biocatalyst to 0.11. These results outperformed those reported for other systems employing the same enzyme and substrates, including supercritical CO<sub>2</sub> and solvent-free liquid-phase reactions. Furthermore, continuous operation under steady-state conditions was sustained for up to 10 hours without significant loss in conversion efficiency. A noteworthy phenomenon of substrate–resin interaction via physical adsorption was also observed and characterized. This interaction initially limited the reaction rate but yielded valuable insights into the role of adsorption–desorption kinetics and intraparticle diffusion in determining the overall productivity of the S/G system.

As an alternative to the commercial biocatalyst, the same *Candida antarctica* lipase B (CalB) was used in its free form and subsequently immobilized via crosslinked enzyme aggregates (CLEA) method, employing bovine serum albumin (BSA) as a co-feeder and glutaraldehyde (GA) as the crosslinking agent. This approach yielded a fully protein-based, greener, and more sustainable biocatalyst. Remarkably, CalB-

CLEA exhibited approximately sixfold higher capacity per mole of enzyme (in terms of Total Turnover Number “TTN”) ( $12.13 \pm 0.15 \times 10^3$  mol of isoPro mol<sup>-1</sup> CalB) and a specific volumetric productivity (space time yield “STY” mg<sup>-1</sup> CalB) fourfold higher compared to CalB-IP ( $0.652 \pm 0.02$  g isoPro L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> CalB), while maintaining conversion yields above 90 % under S/G conditions. Furthermore, it retained over 50 % of its initial activity after 25 hours of continuous operation. Contrary to observations with CalB-IP, the performance of CalB-CLEA was negatively affected by decreasing water activity ( $a_w$ ), with optimal conversion achieved at  $a_w = 0.52$ , using a CLEA preparation containing 10 mg mL<sup>-1</sup> BSA and 3 % glutaraldehyde. Overall, the process employing CalB-CLEA not only delivered improved green metrics relative to the CalB-IP in S/G system but also outperformed the same CLEA formulation when used in organic media, highlighting its superior catalytic and environmental profile within the context of sustainable esterification technologies.

Finally, whole-cell biocatalysts were obtained directly by drying the solid fractions recovered from biphasic cultures of *Ylip*, aiming to develop a more cost-effective alternative that circumvents the need for commercially available enzymes. The intrinsic catalytic capacity of the *Ylip* enzymatic machinery was demonstrated during the esterification process. Among various inert culture supports evaluated, polyurethane foam (PUF) was identified as the most effective. A cultivation time of 72 h was selected for biocatalyst recovery based on measurements of both hydrolytic and synthetic activity in organic media. Notably, substrate specificity toward medium-chain esters (particularly *p*-nitrophenyl octanoate C8) was observed in hydrolytic assays, and the conversion yield to isobutyl propionate in batch reactions reached approximately 20 %. In contrast, under S/G conditions, the same biocatalyst achieved only ~2 % conversion yield. Despite its lower efficiency, its main advantages lie in its potential for continuous operation and the simplicity and reproducibility of its production process.

Additionally, CLEAs were synthesized directly from the crude enzymatic extract obtained after the optimized fermentation period. In this context, both BSA and another biodegradable biomolecule with a high number of reactive groups, such as chitosan, were independently evaluated as “co-feeders” during precipitation, with isoamyl alcohol proving to be the most effective precipitant for both. Immobilization with BSA yielded superior results, with immobilization efficiencies exceeding 96 % and thermal stability maintaining approximately 80 % of residual activity after 2 hours of incubation at 55 °C. These findings underscore the potential of this novel, green, and low-cost biocatalyst for future applications in S/G phase biocatalysis.

## 1. Introducción

Los compuestos con aroma y sabor son moléculas que presentan pesos moleculares que rondan los 300 Da (rara vez superiores) y son volátiles a temperatura ambiente; generalmente están presentes en bajas concentraciones en bebidas y alimentos. Estos compuestos con aroma y sabor pueden presentar diferentes grupos funcionales dentro de su estructura, como lo son: ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, hidrocarburos, entre otros. Dentro de estos compuestos, los ésteres presentan olores frutales agradables que se utilizan en la industria alimentaria como aditivos que brindan sabor y aroma. También se suelen utilizar como esencias o fragancias artificiales y como disolventes industriales (Park *et al.*, 2009).

Los ésteres se forman por la unión de ácidos orgánicos con alcoholes y generalmente se obtienen por extracción directa de plantas o frutas, o mediante procesos que hacen uso de catalizadores químicos (Güvenç *et al.*, 2002). Tanto la extracción directa como la síntesis química presentan diferentes desventajas. En el primer caso, las plantas o frutas a menudo contienen bajas concentraciones de los compuestos deseados, lo que encarece la extracción; además, su uso depende de factores difíciles de controlar como las condiciones climáticas y las enfermedades de las plantas. En el segundo caso, la síntesis química normalmente requiere el uso de catalizadores tóxicos y condiciones de reacción de alta presión y temperatura; además, se puede encontrar una mezcla de productos resultantes de la falta de regio- y enantio- selectividad adecuada al sustrato. Por último, los compuestos obtenidos por esta vía suelen clasificarse como “artificiales”, lo que contrasta con la creciente demanda actual de alimentos con “etiqueta limpia”, en la cual se refleja el interés de los consumidores por productos más naturales (Mayurama *et al.*, 2021).

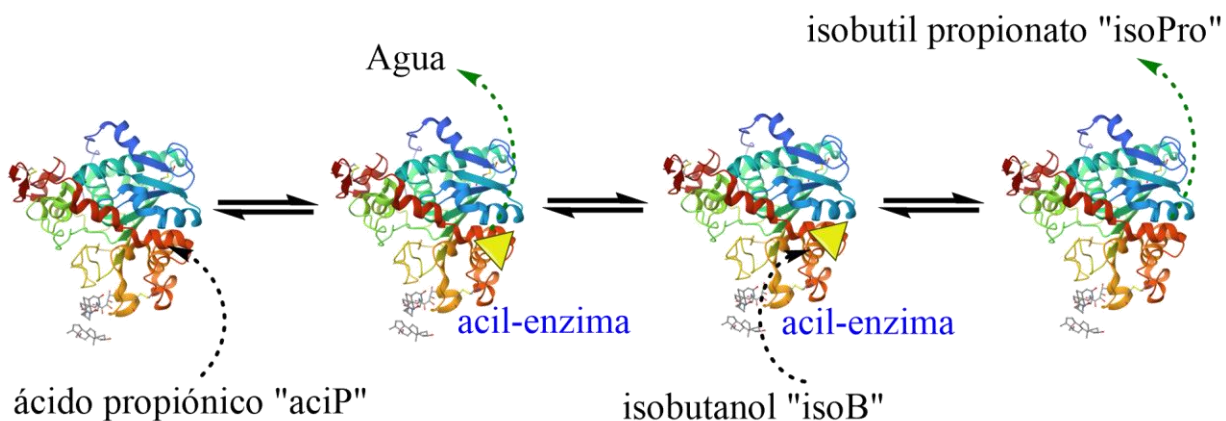
Una alternativa muy llamativa para la obtención de ésteres es mediante la aplicación de procesos biotecnológicos como la síntesis “*de novo*” o fermentación, en donde el éster de interés es intermediario o producto del metabolismo de un determinado microorganismo cultivado en un medio que puede ser sumergido o sólido. O bien, por biocatálisis, la cual se refiere a la reacción o modificación de la(s) molécula(s) precursora(s) para formar el éster deseado a través de uno o más pasos de reacción mediante el uso de enzimas o células completas como biocatalizadores. Estos procesos han reportado concentraciones de producto mucho más altas (orden de g L<sup>-1</sup>) que las observadas para la síntesis “*de novo*” (Fanaro *et al.*, 2016).

Dentro de los procesos de biocatálisis podemos encontrar aquellos que utilizan medios de reacción conocidos como “convencionales”, tales como soluciones amortiguadoras (buffers) o diluciones acuosas a presión normal y temperatura ambiente, y los “no convencionales” que incluyen el uso de solventes orgánicos o disolventes alternativos con baja toxicidad y presión de vapor. Por último, la llamativa alternativa de la aplicación de sistemas de reacción libre de disolventes, por ejemplo, la biocatálisis S/G (Cordero-Soto *et al.*, 2020).

Uno de los principales retos en la biocatálisis S/G es el desarrollo y la aplicación de nuevos biocatalizadores activos y estables, lo cual depende directamente del tipo de inmovilización enzimática o celular utilizada. Dadas las características del sistema S/G, es posible potenciar su desempeño global, reduciendo el volumen de trabajo del reactor, la cantidad de inmovilizado empleado y de enzima dentro del mismo, sin dejar de orientar el proceso hacia la mínima generación de residuos en todo momento. Por ello, resulta fundamental diseñar procesos económica y ambientalmente sostenibles, favoreciendo el uso de células completas o extractos enzimáticos con un mínimo de pasos de purificación, así como la incorporación de materiales biodegradables durante la inmovilización, con el fin de lograr biocatalizadores inmovilizados de manera eficiente, sencilla y respetuosa con el medio ambiente.

El presente estudio abordó la síntesis de isoPro, un éster aromático de carácter frutal que brinda aroma y sabor a ron, utilizando aciP e isoB como sustratos y empleando un biorreactor tubular de lecho empacado en sistema S/G (**Figura 1**). Para ello, se evaluaron 3 biocatalizadores: (1) CalB-IP; producto comercial basado en la enzima CalB inmovilizada por interacción hidrofóbica en la resina de polimetacrilatos-divinilbenceno ECR1030M (ECR), (2) CalB-CLEA; biocatalizador de fabricación propia basado en la inmovilización de CalB y BSA mediante agregados entrecruzados (CLEA, por sus siglas en inglés) y (3) células/enzimas lipolíticas de la levadura *Ylip* cultivadas e inmovilizadas de forma directa al secar los sólidos provenientes de cultivos en medio bifásico.

Este trabajo doctoral se divide formalmente en tres bloques, dentro de los cuales se identificaron los diversos parámetros catalíticos asociados a la síntesis de isoPro, por ejemplo: % de conversión, velocidad de reacción, número de recambio total, productividad volumétrica, entre otros. Considerando aquellos de mayor relevancia al hacer uso del sistema biocatalítico S/G con cada uno de los biocatalizadores mencionados. Además de la previa formulación, preparación, selección y evaluación de dos de ellos (**2 y 3**).



**Figura 1.** Reacción de esterificación objetivo del proyecto de investigación. Los sustratos fueron empleados en fase gaseosa y los biocatalizadores (CalB-IP, CalB-CLEA y enzimas/células de *Ylip*) inmovilizados en fase sólida.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Isobutil propionato

El isobutil propionato (**isoPro**) ( $C_7H_{12}O_2$ ) es un éster alifático de baja masa molecular con aplicaciones industriales, utilizado por su capacidad para generar notas aromáticas y gustativas similares a “ron afrutado”. De acuerdo con la *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA), el isoPro se emplea como agente saborizante en alimentos tales como bebidas, helados, dulces y productos horneados, en concentraciones de 5.4, 4.2, 25 y 35 ppm, respectivamente.

Se sabe que el isoPro se puede encontrar de forma natural en frutas como la uva, melón y manzana (Izci *et al.*, 2007); además de que puede ser sintetizado mediante reacciones como la esterificación entre isobutanol (**isoB**) ( $C_4H_{10}O$ ) y ácido propiónico (**aciP**) ( $C_3H_6O_2$ ) utilizando catalizadores como el ácido clorhídrico o sulfúrico a altas temperaturas, o bien, por la aplicación de biocatalizadores (enzimas o células) que requieren condiciones de reacción menos agresivas. En la *Tabla 1* se resumen las propiedades fisicoquímicas más relevantes del isoPro:

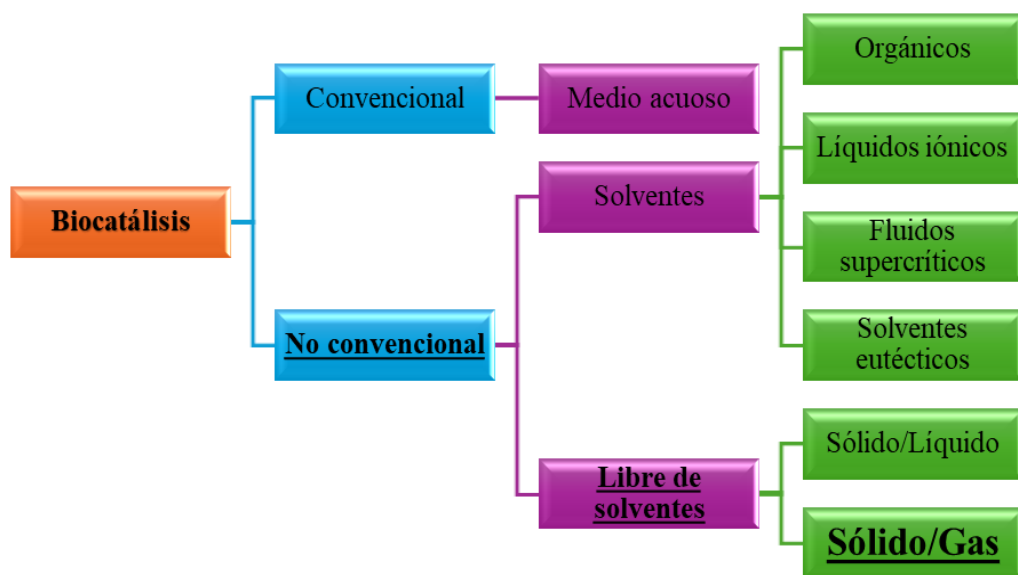
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y datos generales del isoPro (Api *et al.*, 2025).

<b>Peso molecular</b>	130.8 g mol <sup>-1</sup>
<b>Sinónimos</b>	Isobutil propanoato, 2-metil-1-propil propanoato, 2-metil-propil propionato.

<b>Punto de ebullición</b>	137 °C
<b>Solubilidad en agua (25 °C)</b>	1070 mg L <sup>-1</sup>
<b>Presión de vapor (25 °C)</b>	6.47 mm Hg
<b>Aspecto organoléptico</b>	Líquido incoloro con olor difusivo, etéreo, afrutado y dulce parecido al ron.

## 2.2. Ingeniería del medio de reacción en Biocatálisis

Tradicionalmente, las reacciones enzimáticas se han estudiado en medios de reacción acuosos a pH amortiguados mediante la aplicación de soluciones buffer. Sin embargo, este tipo de medios de reacción están limitados para sustratos solubles o parcialmente solubles. Si bien existían algunos informes previos sobre el uso de enzimas en medios orgánicos, fue el artículo seminal de Zaks y Klivanov en 1984, lo que marcó el comienzo de la era de la "enzimología no acuosa", ellos evaluaron la aplicación de la reacción reversible natural de la quimotripsina en solventes orgánicos anhidros como hexano, tolueno, dioxano, etc. (Gupta & Roy, 2004; Sheldon *et al.*, 2016). En el contexto de la biocatálisis, el término "no convencional" generalmente hace referencia a medios de reacción no acuosos; algunos ejemplos de ello son los mencionados disolventes orgánicos, además, disolventes eutécticos profundos (DES), líquidos iónicos (ILs), fluidos supercríticos y sistemas libres de solventes como el sistema S/G (**Figura 2**).



**Figura 2.** Principales medios de reacción involucrados en biocatálisis.

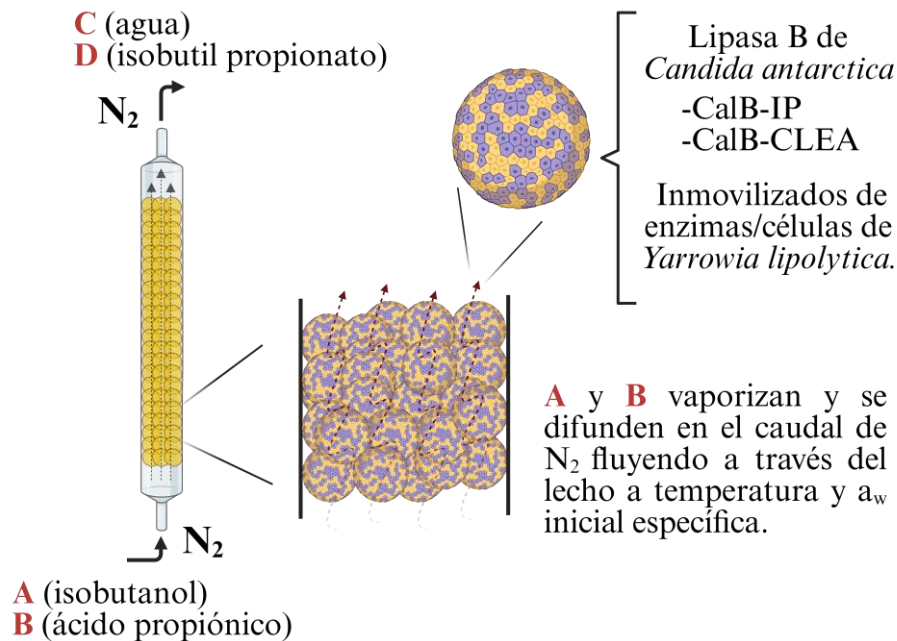
La aplicación de este tipo de medios resulta ventajosa para aumentar la concentración de sustrato(s), reducir los tiempos de reacción, desplazar a conveniencia el equilibrio de la reacción y, por lo tanto, aumentar la productividad de la biotransformación en general (Cananá *et al.*, 2024). Por otro lado, en este ámbito, la sostenibilidad es un factor clave, ya que, aunque el agua sea considerada un excelente disolvente ecológico, esta perspectiva cambia al considerar la producción a escala industrial, en donde el procesamiento de los volúmenes de agua residual afecta negativamente la sostenibilidad del proceso de forma global. En este sentido, el uso de disolventes no convencionales genera volúmenes limitados de aguas residuales o residuos en general, tras los procesos biocatalíticos y facilita su escalado, así como la integración de diversas cascadas químico enzimáticas en las síntesis existentes (Zhang *et al.*, 2024).

### 2.3. Biocatálisis sólido/gas (S/G)

La biocatálisis sólido/gas (S/G) es un sistema de reacción no convencional, libre de solventes, que aprovecha la capacidad de algunas enzimas, en estado sólido (liofilizadas o inmovilizadas en soportes sólidos), para catalizar reacciones con sustratos en fase gaseosa. El biocatalizador se empaca dentro de un biorreactor tubular por donde fluyen los sustratos vaporizados con la ayuda de un gas acarreador, siendo convertidos selectivamente en el producto de interés (Kulishova *et al.*, 2017; Cordero-Soto *et al.*, 2020) (**Figura 3**). La manipulación de los parámetros de reacción (temperatura, presión y flujo molar) en el sistema sólido/gas permite el control de la actividad termodinámica del agua y el sustrato, y la creación de un microambiente controlado para el biocatalizador (Kulishova *et al.*, 2017).

El sistema S/G presenta muchas ventajas en comparación con otros sistemas (líquidos mono o bifásicos), tales como: evitar la adición de solventes y, por tanto, limitar la producción de subproductos, presentar rendimientos de conversión altos acompañados de una alta tasa de producción, presentar transferencia de masa más eficiente (reducidas limitaciones de difusión) y mejor estabilidad del biocatalizador (Lamare *et al.*, 1993; Cantone *et al.*, 2007). Una de las grandes ventajas de este sistema es que se trabaja en reactores en continuo (producción estable y constante) evitando acumulación de productos y evitando a su vez una posible inhibición, por ejemplo, evita la alteración del equilibrio termodinámico de la reacción por el incremento de la actividad de agua debido a la acumulación de agua subproducto de la esterificación, lo cual estabiliza la actividad

del biocatalizador (Parvaresh *et al.*, 1992). En este sentido, también se facilita la recuperación del biocatalizador y, en particular, del producto de la mezcla de reacción, la cual se simplifica significativamente, ya que no hay necesidad de su extracción del disolvente. La separación de la mezcla gaseosa de sustrato y producto a menudo se puede lograr mediante condensación fraccionada.



**Figura 3.** Modo de operación del sistema de biocatálisis S/G en la reacción de esterificación objetivo.

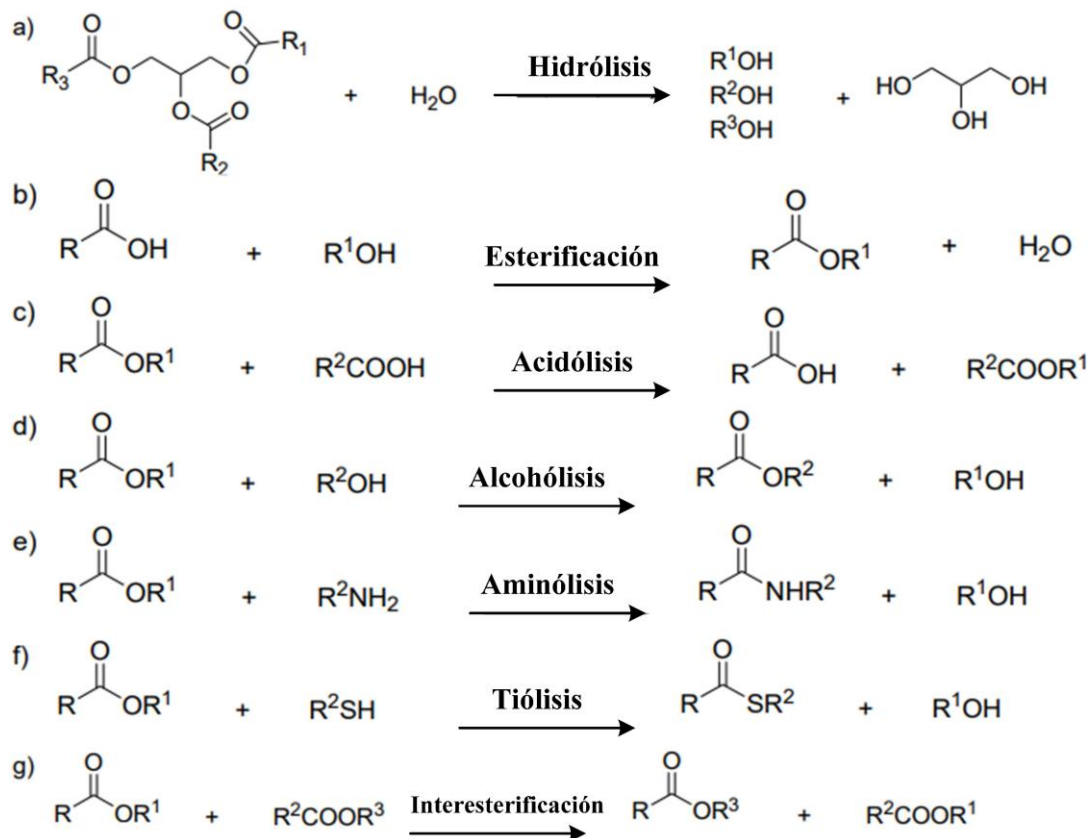
#### 2.4. Biocatalizadores: enzimas o células completas

Otro componente en los procesos de biocatálisis es el catalizador empleado. Dentro de los catalizadores biológicos más ampliamente utilizados a nivel laboratorio, piloto e industrial podemos encontrar las enzimas y células completas de diversos microorganismos. En general, las enzimas libres o inmovilizadas han mostrado rendimientos de producción muy superiores a los obtenidos utilizando células completas como catalizador. Sin embargo, su aplicación representa un costo más elevado y suele presentar relativa inestabilidad bajo condiciones industriales (Zaks *et al.*, 1997). La principal ventaja de la biocatálisis con células completas es su viabilidad económica, además de que el entorno intracelular se encuentra mejor controlado, dando así estabilidad operativa a su complejo enzimático. Otra ventaja es que los procesos de inmovilización con células

completas son relativamente más sencillas, ya que se puede hacer uso de la capacidad de algunos microorganismos de crecer y adherirse a algún soporte mientras se encuentran en el medio de cultivo, principalmente del tipo sólido.

En este sentido, las hidrolasas de ácidos carboxílicos (**E.C. 3.1.1**) constituyen una clase de enzimas de gran relevancia industrial debido a su alta estabilidad y versatilidad en medios no convencionales. Dentro de estas, las lipasas, denominadas formalmente *triacylglycerol acil hidrolasas* (**E.C. 3.1.1.3**) catalizan la ruptura de los enlaces éster presentes en -tri-, -di y monoglicéridos de cadena larga liberando ácidos grasos y glicerol. No obstante, también son activas ante una amplia gama de sustratos, no requieren ningún cofactor y pertenecen a la clase de las serina hidrolasas. Aunque este tipo de enlace también puede ser hidrolizado por enzimas como las *carboxil esterases* (**E.C.3.1.1.1**), habitualmente se diferencian debido a la naturaleza del sustrato (tamaño de cadena) así como a la presencia de zonas hidrofóbicas cercanas al sitio activo, ya que el primer criterio empleado para distinguir estos dos tipos de enzimas; la activación por la presencia de una interfase, también denominada «activación interfacial», resultó inadecuado para la clasificación de dichas enzimas, ya que algunas lipasas no presentaban dicho fenómeno. (Casas-Godoy *et al.*, 2012). El peso molecular de las lipasas se encuentra en el rango de 19 a 60 kDa y se reporta que son proteínas monoméricas, su actividad depende del pH, pero son estables en un rango entre 4.0 y 8.0. Con excepciones como las lipasas provenientes de *Chromobacterium viscosum*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus sp.* que son activas a pH más ácido, y *Paracoccus nitroaeducens* que produce una lipasa alcalina activa a pH 11 (Chandra *et al.*, 2020).

Una característica importante de las lipasas es que, en adición a su capacidad de hidrólisis, en condiciones termodinámicamente favorables (principalmente baja  $a_w$ ) puede realizar una gran variedad de reacciones de síntesis por hidrólisis inversa como la esterificación, aminólisis, tiólisis y transesterificación como acidólisis, alcoholólisis e interesterificación; además de ser altamente efectivas y específicas ya que pueden presentar quimio-, enantio- y regio selectividad (**Figura 4**). En general, las lipasas pueden ser producidas por una gran variedad de organismos, incluyendo animales, plantas y microorganismos. Sin embargo, debido a la facilidad de producción y abundancia, la mayoría de las lipasas estudiadas y utilizadas industrialmente se obtienen de fuentes microbianas. Cabe resaltar que, en comparación con las lipasas bacterianas, las lipasas obtenidas de levaduras GRAS (generalmente reconocidas como seguras) son ampliamente aceptadas y utilizadas en diversas industrias, incluyendo el procesamiento de alimentos (Vakhlu *et al.*, 2006).

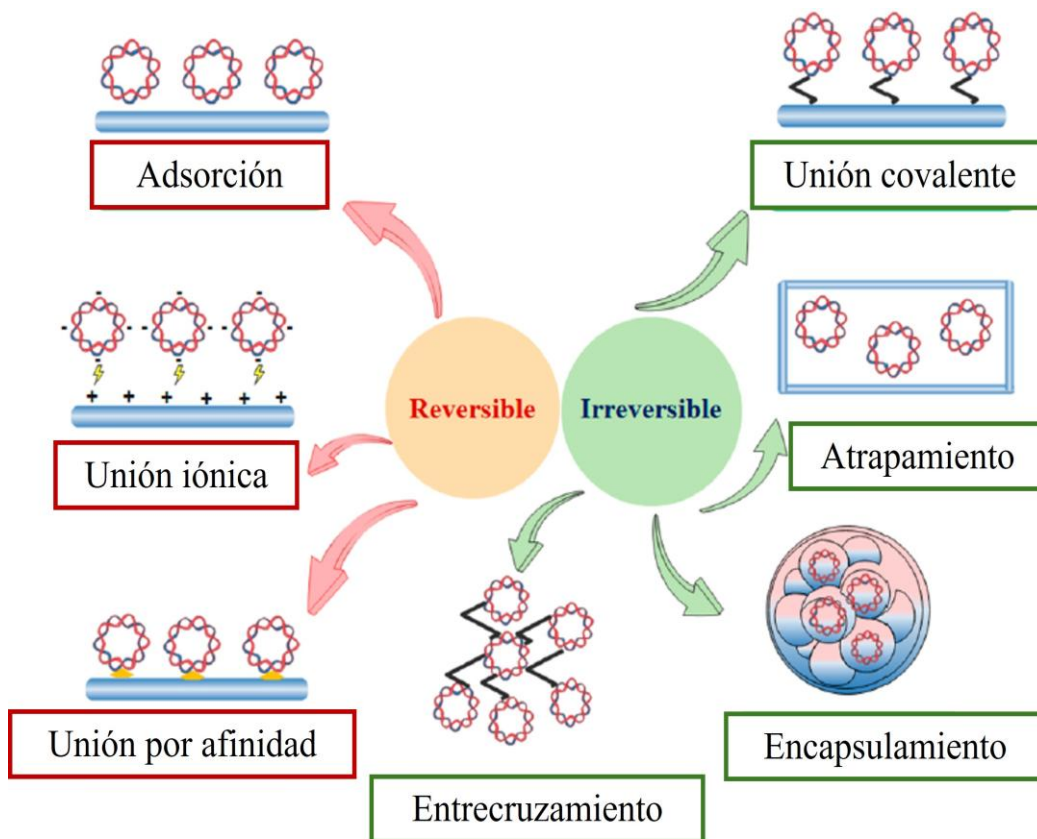


**Figura 4.** Reacciones catalizadas por lipasas. Modificado de Ramos-Sánchez *et al.* (2015).

## 2.5. Métodos de inmovilización enzimática y los *agregados enzimáticos entrecruzados* (CLEA)

La biocatálisis enzimática desempeña un papel fundamental en el desarrollo de muchas industrias químicas, como la energética, la alimentaria o la química fina. Para lograr este objetivo, la inmovilización enzimática es un requisito habitual como solución para obtener biocatalizadores reutilizables y, por lo tanto, reducir el precio de este componente, el cual es relativamente caro. Sin embargo, una técnica de inmovilización adecuada puede permitir mucho más que obtener una enzima reutilizable; puede utilizarse para mejorar el rendimiento enzimático al corregir algunas de sus limitaciones: pureza, estabilidad (incluida la posibilidad de reactivación), actividad, especificidad, selectividad o inhibiciones (García-Galán *et al.*, 2011). El surgimiento de la inmovilización de enzimas ha sido un tema de interés desde la década de 1960. La idea de la inmovilización de enzimas fue introducida por Nelson y Griffin en 1916 tras observar que la

invertasa podía hidrolizar la sacarosa tras ser absorbida en carbón. Desde entonces, se han introducido varios métodos reversibles/irreversibles de inmovilización enzimática que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas de las enzimas (**Figura 5**), lo que les permite su uso en diversas aplicaciones prácticas. La inmovilización reversible de enzimas implica métodos como la adsorción, unión a metales y unión iónica; y la inmovilización irreversible comprende el atrapamiento y la unión covalente (Maghraby *et al.*, 2023).



**Figura 5.** Principales métodos de inmovilización enzimática. Modificado de Maghraby *et al.* (2023).

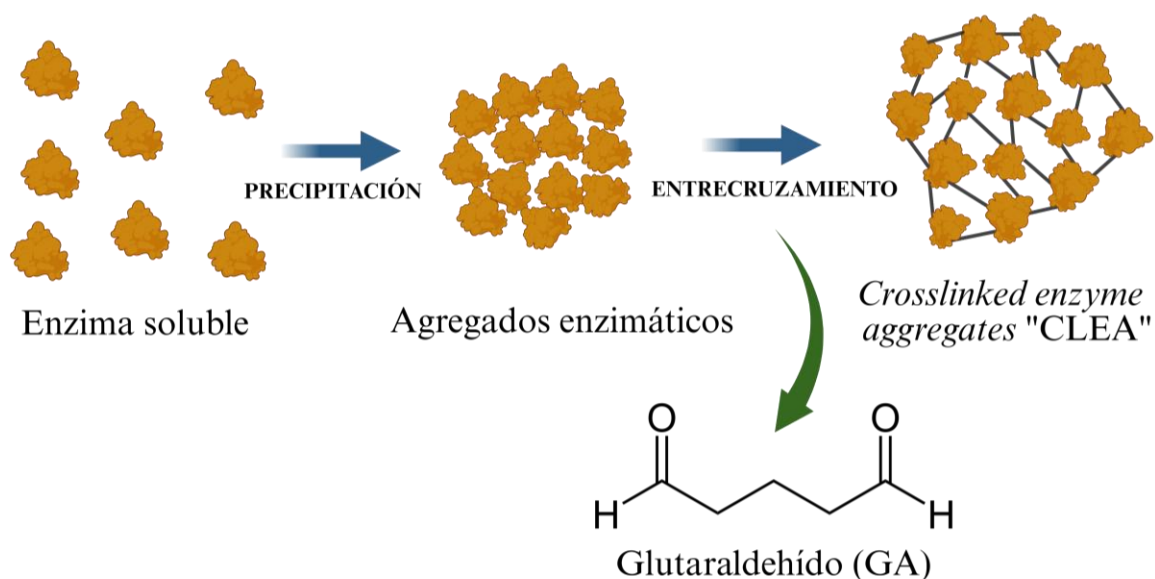
Por otro lado, el portador o “carrier” es clave para el éxito de los métodos; este debe poseer buena estabilidad, presentar estructuras porosas considerables y una gran área superficial para maximizar la eficiencia de la inmovilización. El material del portador también debe ser fácilmente modificable para facilitar la inmovilización de enzimas con características específicas. Además, debe ser económico, abundante y respetuoso con el medio ambiente. En general, el desarrollo de

nuevas estrategias de inmovilización de enzimas ha llevado a la producción de catalizadores personalizados, robustos y estables. (Baso & Serban, 2019; Liu *et al.*, 2020; Maghraby *et al.*, 2023).

Además del tipo de unión (reversible/irreversible), los métodos de inmovilización de enzimas pueden dividirse en tres tipos: unión a un portador, encapsulación en una matriz polimérica inorgánica u orgánica, o mediante entrecruzamiento de las moléculas de proteína con agentes químicos como el glutaraldehído (GA). Aunque el GA es considerado un compuesto tóxico agudo e irritante, empleado en el área clínica como potente bactericida, es un barato y eficiente agente entrecruzante debido a su alta reactividad. El GA es un compuesto homobifuncional alifático que contiene un residuo aldehído ( $-\text{COH}$ ) en ambos extremos de su cadena de 5 carbonos (**Figura 6**). Su reactividad principal está dada hacia grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) formando bases de Schiff, aunque la reacción puede ocurrir mediante más de un mecanismo y grupo funcional (Hermanson, 2013).

La unión o encapsulación en un portador conduce inevitablemente a una dilución de la actividad catalítica y, por consiguiente, a una menor productividad (kg de producto por kg de enzima) debido a la introducción de una gran proporción ( $> 90\%$  del total) de masa no catalítica (Sheldon *et al.*, 2011). Por el contrario, el entrecruzamiento de moléculas de enzima es un método sin soporte, en el que el biocatalizador inmovilizado resultante es insoluble y contiene una alta proporción de enzima activa. Generalmente se producen mediante el entrecruzamiento directo de enzimas disueltas (CLE), enzimas cristalizadas (CLEC) y enzimas agregadas (*crosslinked enzyme aggregates*, CLEA) (Velasco-Lozano *et al.*, 2015). Sin embargo, las enzimas solubles entrecruzadas (CLE) presentan baja retención de actividad, baja reproducibilidad y estabilidad mecánica y, debido a su naturaleza gelatinosa, son difíciles de manipular. Por otro lado, una desventaja inherente de los CLEC es la necesidad de cristalizar la enzima, un procedimiento laborioso y tardado que requiere una enzima de alta pureza. En contraparte, es sabido que la adición de sales, disolventes orgánicos o polímeros no iónicos a soluciones acuosas de proteínas provoca su precipitación como agregados, unidos por enlaces no covalentes sin perturbar su estructura terciaria. Esto provoca que los agregados permanezcan permanentemente insolubles, logrando entrecruzarlos manteniendo su superestructura reorganizada y, por ende, su actividad catalítica (**Figura 6**). Dado que la precipitación se utiliza a menudo para purificar enzimas, la metodología CLEA combina esencialmente la purificación y la inmovilización en una sola operación (Sheldon, 2007).

Las propiedades catalíticas de los CLEA dependen del agente precipitante (sales, solventes orgánicos, etc.). Diferentes agentes precipitantes inducen distintas conformaciones de los agregados enzimáticos, de modo que la selectividad de los CLEA depende en gran medida de la conformación de los agregados enzimáticos (Cao *et al.*, 2000). La cantidad de enzima y la concentración del agente entrecruzante juegan un papel determinante en el tamaño final del CLEA (tipo I ~ 1  $\mu\text{m}$  y tipo II < 0.1  $\mu\text{m}$ ). El GA es el agente entrecruzante más frecuentemente utilizado para la preparación de CLEAs, ya que logra una alta eficiencia de conversión, además de ser de bajo costo y tener alta disponibilidad en el mercado, aunque existen muchas alternativas como: dextrán polialdehído, *p*-benzoquinona, polietilenimina, entre otros (Velasco-Lozano *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Proceso general de preparación de un *agregado enzimático entrecruzado* (CLEA) y estructura química del glutaraldehído.

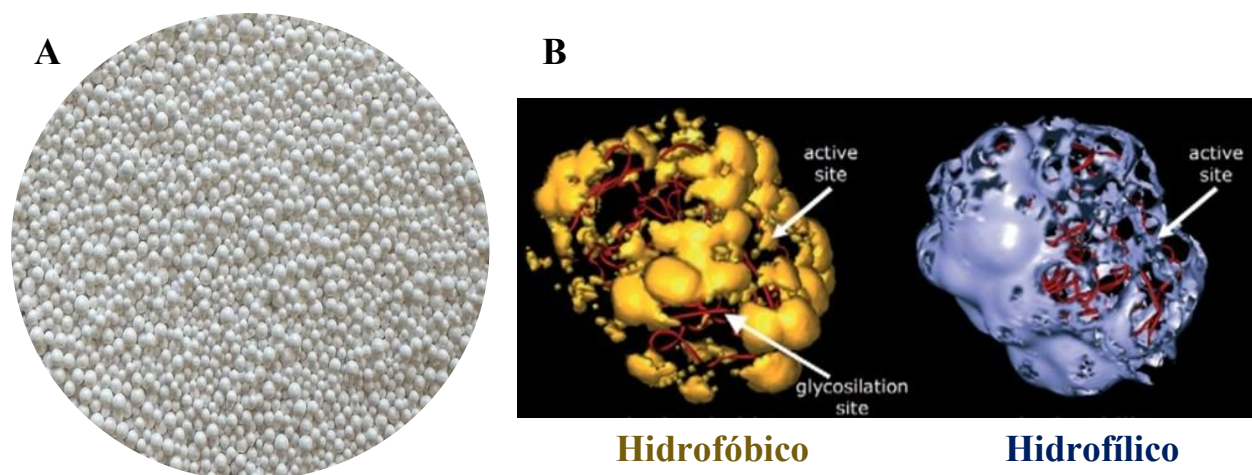
## 2.6. CalB Immo Plus™

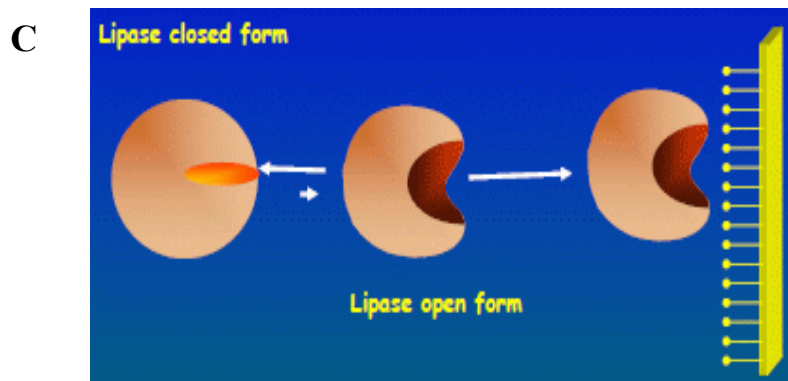
CalB Immo Plus™ (**CalB-IP**) es el nombre comercial que recibe el producto genérico de la compañía Purolite Lifetech basado en el producto novozym 435 de la compañía de Novozymes. Este producto está compuesto por la lipasa B de *Candida antarctica* (**CalB**) inmovilizada vía adsorción hidrofóbica en una resina con ésteres de polimetacrilato entrecruzada con divinil benceno llamada ECR 1030M (**ECR**) vendida de igual manera por Purolite (símil a Lewatit VP

OC 1600 en novozym 435). En general, se sabe que es una resina de naturaleza hidrofóbica que presenta un aspecto de perlas esféricas color blanco con un tamaño de partícula entre 300-710  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro aproximado de 250 Å (**Figura 7A**).

Entre las lipasas disponibles comercialmente que actualmente se expresan en grandes cantidades, CalB es uno de los biocatalizadores más utilizados tanto en investigación como en la industria; desde la modificación de triglicéridos hasta la producción de biodiésel, desde la resolución de mezclas racémicas hasta reacciones regioselectivas, producción y degradación de polímeros, reacciones promiscuas, etc. (Błaszczuk y Kielbasiński., 2020). CalB es una  $\alpha/\beta$ -hidrolasa que sigue el mismo mecanismo de acción que las demás serina hidrolasas, teniendo un sitio activo conformado por la triada catalítica Ser105-His224-Asp187 y una tapa muy pequeña que no puede aislar completamente el centro activo, que a su vez en sus cercanías presenta una superficie hidrofóbica considerable. Esta superficie hidrofóbica hace que la adsorción en portadores hidrofóbicos sea el proceso ideal para su inmovilización, manteniendo una alta capacidad catalítica debido al libre acceso al sitio activo.

Estructuralmente, CalB es una macromolécula con un peso molecular de aproximadamente 33 kDa proveniente de 317 residuos de aminoácidos en su cadena polipeptídica nativa (8 residuos de lisina) y punto isoelectrico de 6 (Ortiz Claudia *et al.*, 2019). Tiene un pH óptimo de 7.0 con una amplia estabilidad de pH (3.0 – 10.0). La forma nativa de la enzima es muy estable, lo que permite su uso a temperaturas de hasta 45 – 50 °C en sistemas acuosos, e incluso a temperaturas más altas en medios no acuosos (hasta 60 – 70 °C).





**Figura 7.** (A) Apariencia física del producto comercial CalB-IP; (B) Mapeo de zonas hidrofóbicas cercanas al sitio activo de CalB; (C) Método de inmovilización mediante interacción hidrofóbica entre CalB y las resinas poliméricas. **B:** Modificado de Basso *et al.* (2007).

## 2.7. *Yarrowia lipolytica*

*Yarrowia lipolytica* (***Ylip***) es una de las levaduras no convencionales más estudiadas. Es un microorganismo aerobio estricto que es capaz de producir metabolitos de importancia comercial manteniendo una intensa actividad secretora de los mismos, lo cual justifica su uso en la industria (como biocatalizador), en biología molecular y en estudios genéticos. Se considera no patógena y varios procesos basados en este organismo han sido clasificados como generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, EE. UU.). Además, *Ylip* ha sido considerada un modelo adecuado para estudios de dimorfismo, debido a que puede crecer tanto en forma de levadura (células redondas y esféricas) como en forma de hifas (estructura filamentosa). Por ende, suele utilizarse de forma eficiente como sistema de transformación mediante ingeniería genética (Coelho *et al.*, 2010).

Esta levadura se encuentra frecuentemente en ambientes con presencia de sustratos hidrofóbicos, por lo tanto, se han aislado varias cepas en suelos contaminados con petróleo, en ambientes marinos, en muestras de sedimentos oleosos y en aguas residuales (Zinjarde *et al.*, 2014). La levadura *Ylip* tiene la capacidad de crecer en sustratos como lípidos o grasas, debido a que el primer paso en la descomposición y el metabolismo de estos sustratos hidrofóbicos requiere la acción de enzimas lipolíticas. *Ylip* posee múltiples parálogos de genes dedicados a la metabolización de dichos sustratos hidrofóbicos. Entre ellos, se identificaron en el genoma de la levadura 16 genes que codifican lipasas; sin embargo, aún hay poca información sobre todos estos parálogos, los datos de microarrays sugieren que solo algunos de ellos podrían expresarse (Fickers

*et al.*, 2013). Las enzimas codificadas por los genes Lip2, Lip7 y Lip8 son las más estudiadas hasta el momento, obteniendo enzimas con pesos moleculares de 33.38, 39.30 y 40.08 kDa respectivamente. A diferencia de Lip2, que se secreta al final de la fase de crecimiento, Lip7 y Lip8 están ancladas a la membrana celular durante el ciclo de crecimiento, pero pueden liberarse al medio bajo condiciones de agotamiento de carbono en fase estacionaria (Spagnuolo *et al.*, 2018; 2000; Fickers *et al.*, 2004). Aunque Lip2 es el gen más expresado y su producto es la principal lipasa secretada (extracelular), las lipasas unidas a la membrana celular en este microorganismo representan un atributo interesante para su utilización en biotransformaciones como enzima inmovilizada naturalmente para reacciones de hidrólisis o síntesis, ya que, en esta ubicación, la lipasa está protegida contra condiciones adversas y orientada hacia la acción catalítica (Pereira-Meirelles., 2000).

### 3. Estado del arte

#### 3.1. Aplicaciones de la biocatálisis sólido/gas

Se ha reportado la evaluación de diferentes tipos de reacción utilizando el sistema de biocatálisis S/G, entre ellas: esterificación, transesterificación, alcoholisis y oxidorreducción enantioselectiva (Cordero-Soto *et al.*, 2020). A continuación, se muestra un recuento de aquellos en los que el tipo de reacción o biocatalizador tiene similitud con los intereses de este proyecto. Cabe destacar que en ninguno de ellos se ha utilizado la tecnología CLEA ni tampoco inmovilizados directos post-fermentación de algún microorganismo como biocatalizadores, lo cual aporta novedad al presente trabajo doctoral. Otro punto destacable es que, aunque son variadas las aplicaciones del sistema S/G, ninguno de los reportes mencionados ha reportado la producción del éster de interés para este proyecto (isoPro).

- ✘ De Bont *et al.* (1983) desarrollaron un biorreactor sólido/gas para la eliminación rápida y continua del óxido de etileno utilizando células completas de *Mycobacterium* Py1 inmovilizadas en perlas de alginato y arena.
- ✘ Parvaresh *et al.* (1992) utilizaron una lipasa pancreática porcina y una cutinasa de *Fusarium solani* para catalizar reacciones de transesterificación entre el propionato de metilo, el propionato de etilo y una serie de alcoholes primarios en temperaturas entre 40-100 °C. En donde se encontró

que la actividad enzimática depende esencialmente de la  $a_w$  de la preparación enzimática (siendo 0.29 y 0.84 las  $a_w$  óptimas para cada enzima).

- ✘ Bousquets *et al.* (2001) realizaron la alcoholólisis de propionato de metilo y *n*-propanol catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* soportada sobre Chromosorb P utilizando  $a_w$  de 0-0.5 y 70 °C en donde la cinética obtenida para la alcoholólisis se ajustó a un mecanismo de reacción Ping Pong Bi Bi con inhibición competitiva del alcohol. La  $V_{max}$  obtenida fue de 0.316  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .
- ✘ Maugard *et al.* (2001) estudiaron la producción simultánea de acetaldehído a partir de etanol y de hexanol a partir de hexanal utilizando células completas secas de *Saccharomyces cerevisiae*, en donde concluyeron que el grado de hidratación de la levadura y la actividad del etanol son los factores más importantes que afectan la actividad y estabilidad de la levadura, siendo con  $a_w$  0.57 y 65 °C donde se obtuvo la mejor estabilidad y tasas de conversión, obteniendo tasas iniciales de biotransformación de 10  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  para el sistema con hexanal y 0.3  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  para el etanol.
- ✘ Pires *et al.* (2002) inmovilizaron enzimas lipolíticas de diferentes fuentes (*Rhizopus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas cepacia*) en los poros de dos materiales mesoporosos y se utilizaron como catalizadores en la esterificación de ácido acético con etanol. Se concluyó que la introducción de enzimas en sólidos porosos con diámetros de poro cercanos al tamaño de la enzima puede dar como resultado biocatalizadores más activos y estables con una vida útil más prolongada en el reactor.
- ✘ Leonard *et al.* (2004) demostraron la viabilidad de la acilación enzimática enantioselectiva de R-2 pentanol en un reactor sólido/gas, comparando con la misma reacción realizada en sistemas líquido, la reacción fue catalizada por la CalB a través de la transesterificación de propionato de metilo y R-2-pentanol. Se demostró que trabajando en sistema gas y aun agregando un componente extra durante el proceso de catálisis no se afecta la enantioselectividad de la enzima y es similar que en sistema líquido.
- ✘ Grizon *et al.* (2004) utilizaron ruptura celular parcial de células completas de *Saccharomyces cerevisiae* por sonicación para mejorar la actividad oxidoreductora del alcohol deshidrogenasa, con etanol y butiraldehído como sustratos. Los resultados mostraron que la rotura celular parcial mejoraba el rendimiento máximo de conversión obteniendo los mejores resultados con 2 minutos

de sonicación, y se observó que la mejor relación de actividad y estabilidad catalítica se obtuvo con  $a_w$  0.57.

- ✘ Debeche *et al.* (2005) investigaron el efecto de dos soportes: fibra de vidrio y fibra de carbono, sobre las reacciones catalizadas por la lipasa de *Pseudomonas cepaciae*, observado que el soporte de fibra de carbono dio los mejores resultados y que la enzima inmovilizada mostró una alta termoestabilidad para catalizar reacciones hidrolíticas y de transesterificación en modo continuo (60 °C y 80 % HR). Este resultado confirmó que la inmovilización de lipasas sobre superficies hidrófobas sólidas promueve la activación interfacial.
- ✘ Erable *et al.* (2007) estudiaron la hidrólisis de sustratos halogenados volátiles en el alcohol correspondiente en un biofiltro sólido/gas donde se usaron cultivos bacterianos liofilizados como catalizador, mismos que contenían enzimas deshalogenasas para la hidrólisis de 1-clorobutano. El rendimiento de eliminación más alto se obtuvo utilizando la cepa *Escherichia coli* BL21 observándose una velocidad de reacción máxima de  $0.8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .
- ✘ Csanádi *et al.* (2012) realizaron la esterificación de acetato de etilo a partir de ácido acético y etanol utilizando la CalB inmovilizada (Novozyme 435) obteniendo los mejores resultados de conversión en condiciones de: caudal de gas acarreador  $\text{N}_2$ :  $2 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ , temperatura: 50 °C, cantidad de enzima utilizada: 11 g, Relación de sustratos ácido acético/ etanol: 75:25 mL mL<sup>-1</sup>. El % de conversión más alto obtenido fue de 92 % a 50 °C y la energía de activación del proceso fue  $E_a = 9.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  la cual fue menor que la de la misma reacción llevada a cabo en otros medios de reacción.
- ✘ Sherafatmand *et al.* (2015) estudiaron la actividad catalítica de las células completas de *Saccharomyces cerevisiae* para convertir acetaldehído a etanol de forma libre e inmovilizada. La estabilidad celular se detectó a una temperatura de 45 °C y una actividad de agua de 0.2-0.25 utilizando células libres. La inmovilización se realizó en nanotubos de carbono mejorando la actividad en un 6 % y la estabilidad de las células en un 43 % en comparación con la actividad y estabilidad de las células libres.
- ✘ Vitola *et al.* (2019) utilizaron la lipasa de *Candida rugosa* para producir ácido acético y etanol mediante acetato de etilo en fase vapor, inmovilizando en membranas de PVDF diferenciadas entre sí por la estrategia de inmovilización utilizada (iónica, covalente y covalente mediada por microgeles). Se observó una alta estabilidad y actividad catalítica continua para los tres casos (a

50 °C) a diferencia de la enzima libre, la cual se inactivó a la misma temperatura, confirmando la mejora del rendimiento de la enzima en un entorno de agua controlado.

Como se puede observar, la mayoría de los reportes enfocaron su investigación en la deducción de modelos cinéticos y el cálculo de las constantes de velocidad asociadas, así como en identificar el efecto de parámetros como la temperatura, la presión y la  $a_w$ . Que, si bien el último parámetro mencionado también se evaluó en este trabajo ( $a_w$  inicial), el enfoque general de cada sección fue muy diferente a lo ya reportado, partiendo de la identificación de los fenómenos de adsorción en el sistema al hacer uso de un biocatalizador comercial (CalB-IP) y su efecto en la velocidad de reacción de esterificación, así como la posterior búsqueda de un sistema de reacción más sostenible, verde, eficiente y viable, basado en la formulación de nuevos biocatalizadores aplicados al sistema S/G.

### 3.2. Síntesis de isoPro

En cuanto a la obtención del éster de interés para este proyecto, isoPro, no se ha reportado su síntesis mediante el uso de sistemas de biocatálisis S/G, pero sí en otro tipo de sistemas de reacción no convencionales como el libre de solventes, CO<sub>2</sub> supercrítico y en solvente orgánico (dioxano), todos ellos teniendo porcentajes de conversión  $\leq 95$  %, dando una pequeña brecha de mejoría en ese aspecto (*Tabla 2*). Desde esta perspectiva, el trabajo doctoral da un enfoque novedoso, no solo por la producción de isoPro en un nuevo medio de reacción (S/G), sino que se realizó ocupando 3 biocatalizadores distintos, brindando un panorama distintivo al análisis de los resultados obtenidos con ellos.

Izci *et al.*, (2007) estudiaron la esterificación de aciP con isoB en presencia de Amberlyst-15 como catalizador, utilizando 1,4 dioxano como disolvente y una relación molar de los sustratos de 1:1 en un biorreactor de tanque agitado. Encontrando que la energía de activación era de 52.03 kJ mol<sup>-1</sup> con una constante de equilibrio de 5.19 en un rango de temperatura de 45-75 °C.

Varma *et al.* (2010) estudiaron el efecto de utilizar 3 diferentes alcoholes en el proceso de esterificación con aciP, uno de ellos isoB, este proceso se realizó en CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente y la CalB Novozyme 435 como biocatalizador, obteniendo aproximadamente 95 % de conversión cuando se disminuía ligeramente la fracción de alcohol en el medio, de igual forma

obtuvieron una  $E_a=43 \text{ kJ mol}^{-1}$  y el comportamiento cinético fue explicado por el mecanismo Ping Pong Bi-Bi obteniendo una  $V_{\max}= 122 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Kuperkar *et al.* (2014) realizaron la síntesis de isoPro utilizando de igual forma la CalB inmovilizada sobre perlas de resina poliacrílica macroporosa (Novozyme 435) en un sistema libre de solventes, en donde la conversión máxima fue de 92.5% misma que se obtuvo a una temperatura de  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , carga de enzima 5 % p/p, relación molar de aciP:isoB de 1:3, velocidad de agitación de 300 rpm, reportando que la enzima inmovilizada se podía reutilizar siete veces sin ninguna pérdida significativa de actividad sintética. Por otro lado, evaluaron tres mecanismos bi-bi diferentes para el desarrollo de la cinética de esterificación, siendo el mecanismo de reacción Ping Pong Bi Bi el que mejor se ajustó obteniendo una  $V_{\max} = 0.5 \text{ Mmin}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de catalizador.

Jaiswal *et al.* (2018) utilizaron la CalB inmovilizada en perlas de poliacrilato en presencia de ultrasonido mostrando una conversión máxima de 95.14 % a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura, 4 % p/p de enzima, una relación 1:3 de aciP:isoB, 40 W de potencia, 25 kHz de frecuencia y una velocidad de 150 rpm en 3 h en comparación con las 10 h del método convencional utilizado por Kuperkar, de igual forma la carga de enzima óptima se redujo al 4 % p/p usando irradiación de ultrasonido en comparación con el 5 % p/p de la convencional.

Tabla 2. Sumario de los sistemas de reacción empleados en la síntesis de isoPro reportados en la literatura.

Sistema	Catalizador	% conversión	T [°C]	Modelo cinético y parámetros de interés.	Referencia
Solvente orgánico (Dioxano)	Amberlyst-15	ND	45-75	Pseudo-homogéneo $E_a = 52.03 \text{ kJ mol}^{-1}$	Izci <i>et al.</i> , 2007
CO <sub>2</sub> Supercrítico	CalB	95	30-60	Ping Pong Bi-Bi $E_a = 43 \text{ kJ mol}^{-1}$ $V_{\max} = 122 \text{ mmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$	Varma <i>et al.</i> , 2010

Libre de solventes	CalB	92.5	40	Ping Pong Bi-Bi $V_{\max} = 0.5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$	Kuperkar <i>et al.</i> , 2014
Libre de solventes + ultrasonido	CalB	95.14	60	Ping Pong Bi-Bi $V_{\max} = 50 \text{ M min}^{-1} \text{ g}^{-1}$	Jaiswal <i>et al.</i> , 2018

\*ND: No determinado.

Por último, como primer acercamiento teórico, García-Martínez *et al.* (2022) modelaron matemáticamente un biorreactor S/G para la producción de isoPro describiéndolo a nivel cinético, termodinámico y de fenómenos de transporte. En donde la termodinámica elucidó, por un lado, cómo el equilibrio de la conversión se vio afectado principalmente por la  $a_w$ . La cinética indicó que las tasas de bioconversión se favorecieron con una  $a_w$  alrededor de 0.2 y relaciones alcohol:ácido de entre 1:4 y 4:1; indicando que las tasas de reacción se vieron favorecidas con una alta concentración de sustratos en la entrada. Además, a nivel de biorreactor S/G, el uso de pellets no porosos y la dinámica de fluidos favorecieron la transferencia de calor a través del lecho, evitando la aparición de puntos calientes, temperaturas de alrededor de  $\sim 43 \text{ }^\circ\text{C}$  condujeron a la mayor conversión a través del lecho.

Como se evidencia anteriormente, la producción de isoPro ha sido posible en diversos medios de reacción, incluyendo incluso aquellos libres de solventes. En cada uno de ellos se consideró el análisis cinético como el foco de la investigación, brindando información sobre el mecanismo de reacción. Algo muy relevante a nivel de catálisis es la búsqueda de nuevos procesos más verdes y sostenibles, que sean eficientes pero que generen la menor cantidad de residuos posibles. Para ello, la búsqueda de una funcional relación entre el biocatalizador y el sistema de reacción es de relevancia, por ello, la determinación de diferentes métricas de verdor para un análisis objetivo toma importancia. En este sentido, ninguno de los anteriores trabajos realizó un análisis con un enfoque similar al mencionado, dejando de lado el aspecto de la química verde. Aunado a la novedad intrínseca de aplicar un sistema de reacción sólido/gas para la obtención de isoPro, en la segunda sección del trabajo se identificaron los parámetros de productividad y estabilidad operacional asociados a la síntesis, así como el cálculo de las métricas verdes basadas en masa del proceso.

### 3.3. Producción de CLEAs de CalB con BSA

La formulación y selección de los agregados entrecruzados de CalB y BSA (**CalB-CLEA**) producidos fue una etapa limitante durante el proyecto doctoral, aunque existe un par de referencias sobre la producción de CLEAs de CalB con BSA como “*co-feeder*”, ninguna de estas ha sido evaluada en el sistema S/G, incluso algunas ni siquiera se utilizaron específicamente para reacciones catalíticas de síntesis, sino que se enfocaron en la identificación, descripción y búsqueda de optimización del método de inmovilización. Además de ello, las concentraciones de BSA y GA, y el tiempo de entrecruzamiento utilizados en dichos ensayos se encontraban muy por debajo de las evaluadas en este trabajo. En este sentido, el presente trabajo brinda una novedosa aplicación catalítica de la tecnología CLEA, tras su evaluación como lecho empacado en un sistema catalítico S/G para la obtención de isoPro. Esto brinda grandes ventajas a nivel del “verdor” característico del biocatalizador propuesto, dada la aplicación de un biopolímero como la BSA como *co-feeder*, brindándole una mayor capacidad de degradación tras su tiempo de vida útil (incluso biodegradable) y una menor cantidad de residuos *per se*, sumado a las ventajas dadas tras su aplicación en un sistema “*solvent-free*” altamente eficiente como el S/G.

Aunque no utilizó BSA en la formulación, un antecedente importante es la aportación de Shoevaart *et al.* (2004), en donde realizaron el primer screening de precipitantes para la producción de CLEAs de CalB. Su investigación arrojó que tanto el *tert*-butanol, dimetil éter, sulfato de amonio y dimetilsulfóxido presentaban los mejores rendimientos de inmovilización al ser utilizados al 90% del volumen de trabajo.

Cruz *et al.* (2012), agregaron BSA a la preparación de CLEAs de CalB debido al bajo contenido de lisina superficial de la enzima y, por ende, el bajo rendimiento de inmovilización. En este trabajo intentaron optimizar la inmovilización mediante la metodología de superficie de respuesta, utilizando 3 niveles de: precipitante (*tert*-butanol, sulfato de amonio y dietiléter), concentración de BSA (3, 5 y 7 mg mL<sup>-1</sup>) y tiempo de reacción (15, 30 y 60 min). En general, el entrecruzamiento con GA resultó eficaz y permitió estabilizar en gran medida la enzima. Y tras dos diseños experimentales, las mejores condiciones para la preparación de CALB-BSA-CLEA fueron: concentración de proteína (3 mg mL<sup>-1</sup>), *tert*-butanol como precipitante, precipitación durante 60 min; concentración del precipitante: 50 % v/v; y concentración de GA (1.5 % p/v).

Por otro lado, Guauque Torres *et al.* (2014) sintetizaron CLEAs de CalB basados en la síntesis de un núcleo de BSA (30 % p/v) entrecruzado sobre el cual se inmovilizó posteriormente

una capa externa de lipasa utilizando sulfato de amonio como agente precipitante. La actividad catalítica de los inmovilizados fue evaluada en tres reacciones: esterificación de ácido oleico y etanol en ausencia de disolventes, esterificación de ácido oleico y heptanol en medio orgánico e hidrólisis de trioleína en medio emulsionado. Se evaluó el impacto de la relación masa de agente entrecruzante/proteína en la actividad de los CLEA a tres niveles: 1:1 1.39 y 1.67, la cantidad de entrecruzante utilizada resultó ser un parámetro clave para la evolución de la actividad catalítica de los CLEA durante su almacenamiento. El % de conversión más alto obtenido fue la síntesis a heptil oleato en medio orgánico (*n*-heptano), aunque tan sólo de ~50% considerando las mejores condiciones seleccionadas (relación 1:39 y 45 min de entrecruzamiento), evidenciando que es más eficiente la aplicación de CalB-CLEA secas (liofilizadas).

Por último, Saikia *et al.* (2021) evaluaron la incorporación de almidón a una preparación de CLEAs de CalB soportada en eupergit, con el fin de obtener biocatalizadores con mayor porosidad para su aplicación en la síntesis de ésteres de 5-hidroximetilfurfural (HMF). Los CLEA y los pCLEA de CalB se prepararon en condiciones optimizadas de pH 8.0, *tert*-butanol como precipitante, relación eupergit/proteína de 3:1, concentración de entrecruzante (GA) 50 mM y concentración de BSA 3.3 mg mL<sup>-1</sup> durante 4 h de reacción. La concentración óptima de almidón para los pCLEA fue del 0.20 % (m/v). El área superficial BET de los CLEAs y pCLEAs fue de 21.3 y 29.1 m<sup>2</sup>/g, respectivamente, y la eficiencia catalítica de los pCLEAs fue 2.2 veces mayor que la de los CLEAs, identificando el importante papel de la porosidad en el biocatalizador formulado. Posteriormente, los pCLEAs de CalB se utilizaron para la fabricación de ésteres de HMF, la conversión con pCLEAs CalB fue 1.41 y 1.25 veces mayor que con CalB libre y CLEAs CalB, respectivamente.

#### 3.4. *Yarrowia lipolytica* en biocatálisis.

Białecka-Florjańczyk *et al.* (2012) llevaron a cabo la esterificación de 2-feniletil acetato utilizando la biomasa de *Ylip* en un sistema de reacción en fase líquida, obteniendo porcentajes de bioconversión de 78 % y mostrando la actividad lipolítica directamente de la biomasa de la levadura.

Palmerín-Carreño *et al.* (2016) reportaron el uso de células completas de esta levadura en la bioconversión de (+) -valenceno a (+) -nootkatona en fase 100 % orgánica utilizando un

biorreactor de tanque agitado, consiguiendo una productividad de 0.86 g de (+) -nootkatona por g de (+) valenceno (bioconversión cercana al 82 %), la cual fue superior a las informadas anteriormente en los sistemas de reacción convencionales de dos y tres fases. De igual forma, demostraron que las altas concentraciones de sustrato y producto, así como la ausencia de agua libre en el sistema, no afectan el desempeño de *Ylip 2.2ab*.

Hernández-Guzmán *et al.* (2020) realizaron la bioconversión de naringenina en compuestos hidroxilados de alto valor añadido utilizando células completas de *Ylip 2.2ab* en cultivos superficiales y líquidos, produciendo siete compuestos de valor agregado en ambos cultivos, donde algunos de los compuestos producidos no habían sido reportados previamente, como la ampelopsina.

Como se observó, en todos los casos mencionados anteriormente se aplicó directamente la biomasa de *Ylip* durante el proceso de bioconversión; en este sentido, el presente trabajo brinda un aporte novedoso de la aplicación de inmovilizados producidos directamente del secado de sólidos obtenidos tras el proceso de fermentación con *Ylip*. Aunque actualmente existen reportes en donde se ha aplicado este tipo de idea, se han utilizado como soporte para fermentación materiales no inertes los cuales no tienen la capacidad de ser reutilizados, además de que el método de secado empleado requiere de equipos especializados como la liofilizadora, a diferencia de la sencilla aplicación de un caudal de aire seco empleado en este trabajo, por otro lado, es importante enfatizar que solo existe un reporte formal de la aplicación de biocatalizadores de esta naturaleza en reacciones de síntesis (ésteres de biodiesel) y fue aplicado únicamente en un medio de reacción orgánico.

A fin de las ideas y objetivos de este trabajo, da Silva *et al.* (2019) evaluaron el uso de un sólido fermentado liofilizado con actividad lipasa, como biocatalizador de bajo costo para reacciones de esterificación de ácidos grasos presentes en materias primas ácidas para la síntesis de biodiésel, utilizando salvado de soja y *Ylip* IMUFRJ 50682. Obtuvieron una conversión de ácido oleico superior al 85% tras 24 h, utilizando un 30% en peso del catalizador y una relación molar 1:1 etanol/ácido oleico, a 30 °C, en un medio de reacción con y sin disolvente (*n*-hexano). Y obtuvieron resultados similares con los ácidos esteárico (79 %), palmítico (82 %) y linoleico (90 %). Posteriormente y dentro del mismo grupo de trabajo, da Silva *et al.* (2024) evaluaron el mismo biocatalizador en la síntesis de etil oleato alcanzando un 81 % de conversión a 30 °C tras 240 h de reacción.

Por último, aunque no aplicado a un sistema de biosíntesis, da S. Pereira *et al.* (2019), evaluaron la producción de lipasas con tegumento fibroso de mango, en donde las condiciones óptimas para la producción de lipasas se lograron suplementando con extracto de levadura a pH 5.0; agitación 187 rpm; temperatura 27.9 °C y a una concentración de inóculo de 0.96 g L<sup>-1</sup>. Posteriormente, estas condiciones favorecieron la producción de lipasas a escala de biorreactor de 4 L, alcanzando una actividad máxima (2500 U L<sup>-1</sup>). En donde identificaron que existía adsorción y buena retención de la lipasa en el residuo, confirmando una inmovilización natural de la enzima durante la fermentación, con una actividad de 68.03 U g<sup>-1</sup> (hidrólisis).

## 4. Justificación

La producción biotecnológica de compuestos con aroma y sabor como los ésteres ha llamado la atención de los investigadores, debido a sus grandes aplicaciones dentro de la industria alimentaria (como aditivos), cosmética (como esencias o fragancias) y química (como aromatizantes y disolventes). Esta forma de producción es una alternativa sostenible y verde respecto a los métodos tradicionales de obtención que se basan en catálisis química o bien, en la extracción directa de la fuente natural, los cuales presentan problemas como lo son los residuos químicos producidos y una baja rentabilidad, respectivamente.

Aunque existen reportes de la producción de isoPro haciendo uso de biocatalizadores en medios de reacción no convencionales como CO<sub>2</sub> supercrítico y libre de solventes, el sistema S/G presenta diversas ventajas debido a que evita la adición de líquidos (sea sustrato o medio de reacción). Lo cual facilita la recuperación del producto y del catalizador, además de presentar rendimientos de conversión altos, una alta tasa de producción al trabajar en continuo y, en particular, presentar transferencia de masa más eficiente.

El panorama global se encuentra en la constante búsqueda de nuevos sistemas de reacción más eficientes y sostenibles. Estas necesidades se pueden cubrir con las características intrínsecas que el sistema S/G ofrece, pero no solo eso, sino además contribuye con la obtención de nuevos biocatalizadores más verdes (eco-amigables), de producción rentable, que sean biodegradables e incluso compostables, planteando las bases que, en un futuro, podrían permitir un posible cierre del ciclo de vida del proceso.

Por ello, este trabajo se centró en la búsqueda de alternativas que satisfagan algunas de dichas demandas, con el objetivo de identificar el vínculo sistema–biocatalizador que proporcione los mejores parámetros de desempeño técnico y ambiental. Para ello, se aplicaron enfoques no reportados previamente, incluyendo: el análisis del efecto de los fenómenos de adsorción sobre la esterificación en este tipo de sistemas; la aplicación de nuevos biocatalizadores evaluados a nivel operativo, de estabilidad e incorporando criterios de sostenibilidad; y la viabilidad económica, mediante el uso de biocatalizadores inmovilizados de manufactura propia, evitando la adquisición de enzimas comerciales.

## 5. Hipótesis

El manejo adecuado de las diferentes variables de operación del sistema sólido/gas en la síntesis de isobutil propionato con CalB o células/enzimas de *Yarrowia lipolytica* NRLL 7817 permitirá igualar o mejorar los parámetros de desempeño operativo y ambiental obtenidos en otros sistemas de reacción no convencionales.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

Evaluar la síntesis de isobutil propionato en un biorreactor de lecho empacado sólido/gas empleando distintos biocatalizadores.

### 6.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar el sistema S/G con la lipasa comercial inmovilizada CalB-IP.
  - a. Identificar el efecto de la  $a_w$  inicial y la relación molar de sustratos en la síntesis.
  - b. Analizar el impacto de los fenómenos de adsorción de sustratos y producto sobre la enzima y su soporte durante la síntesis.
- 2) Evaluar el sistema S/G con los CLEA de CalB y BSA (CalB-CLEA).
  - a. Preparar los biocatalizadores, evaluando el efecto de la concentración de BSA y GA.

- b. Determinar la capacidad de hidrólisis y síntesis en solvente orgánico de los CLEA, así como su termoresistencia y estabilidad operacional.
  - c. Identificar el efecto de la  $a_w$  inicial y la cantidad de biocatalizador empacado.
  - d. Determinar las métricas de sostenibilidad asociadas al proceso y compararlas con las obtenidas utilizando CalB-IP.
- 3) Evaluar el sistema S/G con inmovilizados directos post-fermentación bifásica de células/enzimas de *Ylip*.
- a. Evaluar diferentes soportes inertes para la fermentación.
  - b. Determinar la capacidad de hidrólisis y síntesis en solvente orgánico de los inmovilizados durante el tiempo de cultivo, identificando su especificidad a diferentes sustratos.
  - c. Evaluar la factibilidad de preparar *agregados enzimáticos entrecruzados* utilizando el extracto crudo recuperado de *Ylip* con BSA o quitosano.

## 7. Estrategia experimental y componentes del sistema S/G

A continuación, se presentan las etapas generales del proyecto doctoral junto con las actividades realizadas en cada una de ellas de forma desglosada (*Tabla 3*); por último, se presentan los componentes generales del sistema S/G. A partir de este punto, toda mención a la actividad de agua ( $a_w$ ) en relación con su efecto sobre la síntesis o la adsorción hará referencia al valor con el que los sólidos se equilibran inicialmente, es decir, al  $a_w$  al tiempo 0 ( **$a_w$  inicial**).

Tabla 3. Sumario de actividades realizadas durante cada etapa del proyecto.

ETAPA	ACTIVIDADES
I-A. EVALUACIÓN DE CalB-IP EN EL SISTEMA S/G	Evaluación del inmovilizado comercial CalB-IP en el sistema S/G, fijando la cantidad de catalizador y temperatura: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Efecto de la <math>a_w</math>: Curvas de progreso de síntesis de isoPro, determinación de velocidades de producción y rendimiento de conversión (%), fijando flujo de <math>N_2</math> y fracción molar de los sustrato.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Efecto de la relación molar de sustratos (isoB:aciP): Curvas de progreso de síntesis de isoPro, determinar velocidades de producción y % de bioconversión fijando valor de <math>a_w</math> seleccionado en el punto anterior.</li> <li>▪ Estabilidad operacional de CalB-IP en sistema S/G: Curva de progreso de 10 h en continuo, fijando actividad de agua y relación molar seleccionada.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>I-B.</b> FÉNOMENOS DE ADSORCIÓN EN EL SISTEMA S/G CON CalB-IP Y SU SOPORTE.</p>	<p>Análisis de los diferentes fenómenos de adsorción (sustratos/producto) identificados durante la evaluación de CalB-IP en el sistema S/G</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Curvas de ruptura de isoB y aciP (independientes) con incrementado el valor de <math>a_w</math>.</li> <li>▪ Curvas de ruptura de isoB y aciP (independientes) con el soporte de inmovilización (ECR1030M) a <math>a_w</math>: 0.11.</li> <li>▪ Curva de ruptura de isoB y aciP (simultáneo) con el soporte de inmovilización (Lewatit VP OC 1600) <math>a_w</math>: 0.11.</li> <li>▪ Curvas de desorción de isoB y aciP (independientemente) con CalB y soporte de inmovilización (ECR 1030M) a <math>a_w</math>: 0.11.</li> <li>▪ Curvas de progreso producción de isoPro: saturación de CALB con isoB ó aciP (independientes) y reacción con el sustrato faltante para la reacción.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>II-A</b> PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CLEAs de CalB/BSA Estancia en Universidad de Zaragoza, España.</p>	<p>Formulación de agregados enzimáticos entrecruzados de CalB evaluando la concentración de protector o “<i>co-feeder</i>” así como del agente entrecruzante (BSA y GA respectivamente).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluación de rendimiento de inmovilización (actividad de hidrólisis) y termoresistencia.</li> <li>▪ Evaluación de capacidad de síntesis de isoPro en <i>n</i>-heptano.</li> <li>▪ Evaluación del efecto de la <math>a_w</math> en la síntesis (tratamientos seleccionados previamente).</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluación de estabilidad operacional, mediante conservación de la actividad tras 10 ciclos catalíticos.</li> <li>▪ Caracterización del biocatalizador seleccionado mediante SEM.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>II-B</b> EVALUACIÓN DE CLEAs de CalB EN EL SISTEMA S/G</p>	<p>Evaluación del inmovilizado formulado CalB-CLEA en el sistema S/G, fijando la fracción molar de sustratos y temperatura:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluación del efecto de la <math>a_w</math>: Curvas de progreso de síntesis de isoPro, determinar velocidades de producción y rendimiento de conversión (%).</li> <li>▪ Evaluación del efecto de la cantidad de catalizador empacado: Curvas de progreso de síntesis de isoPro, determinar velocidades de producción y rendimiento de conversión (%).</li> <li>▪ Estabilidad operacional del inmovilizado formulado: Curva de progreso de 25 h en continuo, fijando actividad de agua y cantidad de biocatalizador seleccionado.</li> <li>▪ Comparación del TTN “total turnover number” (número de recambio; mol de isoPro mol<sup>-1</sup> CalB) y STY “Productividad volumétrica” (g de isoPro L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>); entre el inmovilizado comercial CalB-IP y el inmovilizado formulado.</li> <li>▪ Comparación de sostenibilidad mediante el cálculo de métricas verdes (máscas) de ambos biocatalizadores evaluados en el sistema S/G.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>III-A</b> PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE INMOVILIZADOS DIRECTOS DE <i>Ylip</i></p>	<p>Screening de soportes inertes para fermentación bifásica utilizando cepa de <i>Ylip</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Selección de soporte tomando como criterio la actividad de hidrólisis (3 sustratos de tamaño de cadena diferente) y síntesis a isoPro de los inmovilizados en medio orgánico (fijando tiempo de fermentación).</li> </ul> <p>Una vez seleccionado el soporte:</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cinética de especificidad de sustrato mediante actividad de hidrólisis. Evaluación del tiempo óptimo de cultivo en la síntesis de isoPro en medio orgánico</li> <li>▪ Evaluación del sistema S/G utilizando el inmovilizado obtenido, fijando la cantidad de catalizador, temperatura y <math>a_w</math>.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>III-B</b></p> <p style="text-align: center;">PRODUCCIÓN DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECRUZADOS DEL EXTRACTO CRUDO DE <i>Ylip</i></p>	<p>Formulación de agregados enzimáticos entrecruzados directamente del extracto crudo obtenido tras el tiempo de fermentación seleccionado previamente, evaluando el tipo de “<i>co-feeder</i>”: BSA y Q de bajo peso molecular.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evaluación de rendimiento de inmovilización (actividad de hidrólisis) y termoresistencia.</li> </ul>

### 7.1. Componentes del sistema S/G

Se empleó una modificación del sistema S/G propuesto por García-Martínez *et al.* (2020), utilizando columnas de vidrio con diferentes alturas y diámetro interno dependiendo de las características del biocatalizador empacado. Los componentes esenciales del sistema S/G se presentan en la *Tabla 4* y **Figura 8** acompañados de la siguiente descripción detallada:

- × Una cámara de acrílico aislada, equipada con calentadores por convección, diseñada para mantener condiciones térmicas precisas a 55 °C. El control de temperatura se realizó mediante un sistema Vernier y un programa basado en Arduino, que permitió la monitorización en tiempo real en múltiples puntos dentro de la cámara (dos cerca del biorreactor y dos cerca de los contenedores de sustrato).
- × El sistema se configuró de manera que un gas portador (nitrógeno de ultra alta pureza, N<sub>2</sub> 99.999 %, Linde) pasara a través de contenedores que contenían los reactivos en fase líquida, permitiendo que la corriente de gas se saturara con los sustratos vaporizados antes de ingresar al reactor de lecho empacado. Las tasas de vaporización del ácido propiónico

(aciP) y del isobutanol (isoB) se controlaron manteniendo constante la temperatura, la presión (585 mm Hg, correspondiente a la presión atmosférica en Ciudad de México) y el caudal de N<sub>2</sub>. Antes de conectar la columna empacada, el sistema se estabilizó durante 2 h hasta alcanzar condiciones de estado estacionario utilizando una columna vacía.

- × Se emplearon rotámetros para regular con precisión el flujo de N<sub>2</sub> en la entrada de la columna, asegurando un burbujeo estable y generación de vapor. La combinación de operación isotérmica, flujo controlado de gas portador y regulación de la temperatura de los sustratos mantuvo la relación molar deseada de aciP a isoB en la fase gaseosa durante toda la reacción.
- × La recuperación del producto y los reactantes residuales se realizó en microtubos utilizando 1 mL ó 0.5 mL de metanol, los muestreos se realizaron por lapsos de tiempo según fueron requeridos. Las muestras obtenidas se colocaron en viales y se analizaron por cromatografía de gases.

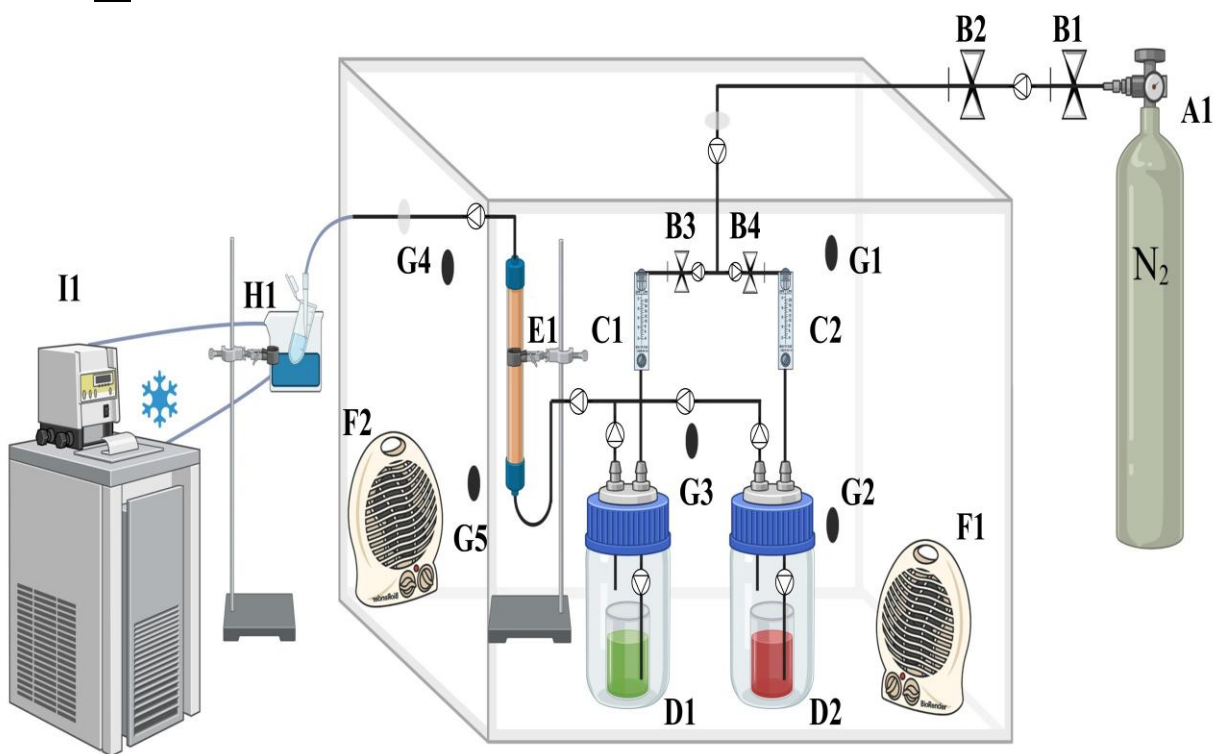
## 7.2. Análisis cromatográfico

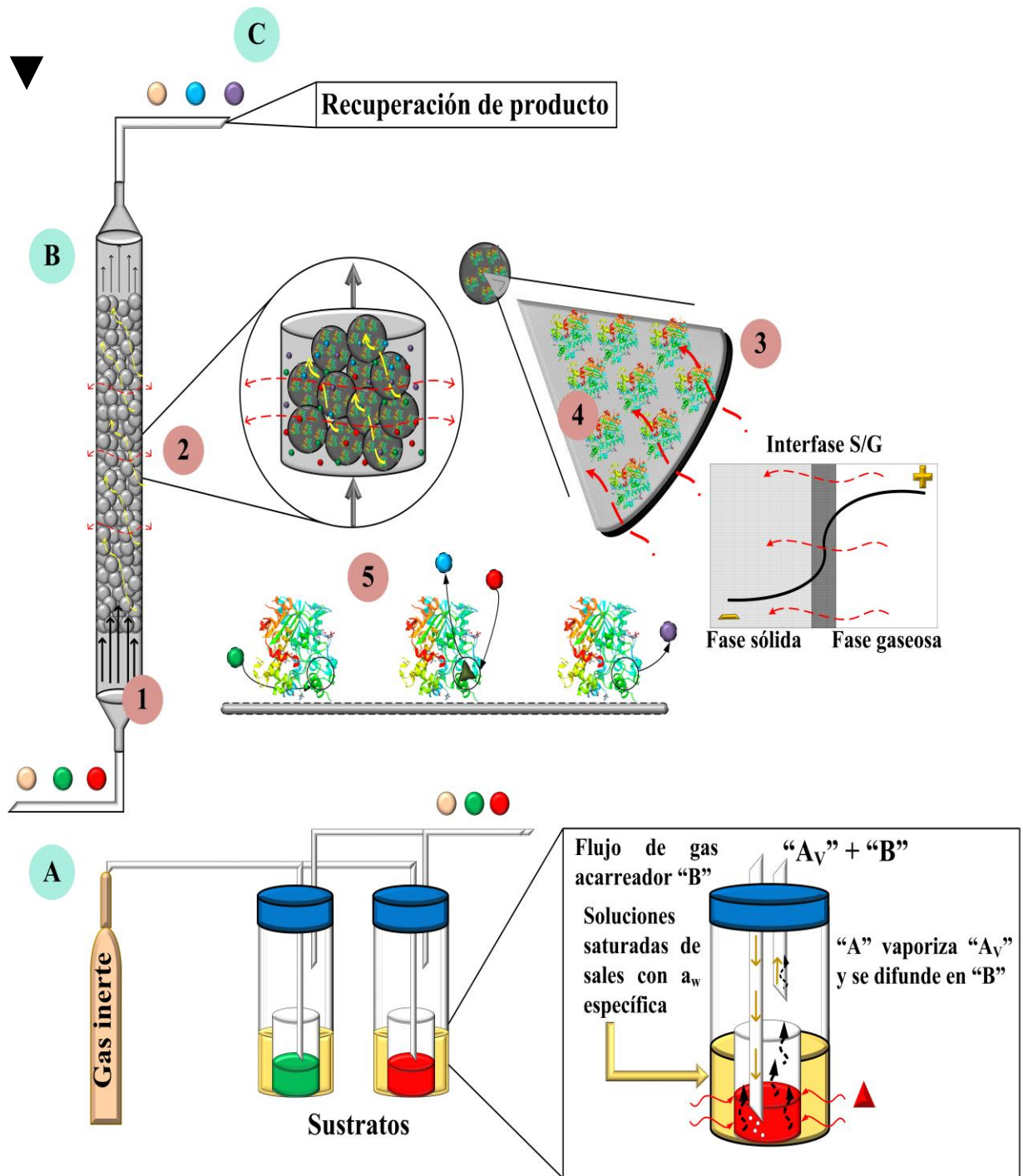
Las muestras de síntesis fueron analizadas utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7820 A equipado con un detector de ionización por llama. Para facilitar la separación, se empleó una columna DB-HEAVYWAX con dimensiones específicas (60 metros de longitud, 0.250 milímetros de diámetro interno y un espesor de película de 25 micrómetros), utilizando gas N<sub>2</sub> como medio de arrastre durante todo el proceso cromatográfico.

El programa de temperatura aplicado durante el análisis consistió en: una fase inicial con un mantenimiento isotérmico a 40 °C durante 5 min; posteriormente, un incremento de temperatura a una tasa de 25 °C por minuto hasta alcanzar 90 °C; y, finalmente, una rampa adicional a 30 °C por minuto hasta llegar a 200 °C, temperatura que se mantuvo durante 2 min. Tanto el detector como el inyector se mantuvieron constantemente a 200 °C, y cada muestra se introdujo en el sistema con un volumen de inyección de 1 µL. Los tiempos de retención fueron los siguientes: 4.65 min para metanol, 7.13 min para isoPro, 7.29 min para isoB y 10.85 min para aciP. La confiabilidad de la cuantificación se evaluó utilizando curvas de calibración externas individuales para cada compuesto, lo que permitió asegurar resultados precisos y reproducibles en todas las muestras.

Tabla 4. Componentes generales del sistema sólido/gas empleado.

NOMBRE	EQUIPO
A1	Tanque de nitrógeno
B1-B4	Válvulas
C1, C2	Rotámetros
D1, D2	Contenedor de reactantes
E1	Biorreactor de lecho empacado
F1, F2	Calentadores por convección
G1-G5	Termopares
H1	Condensador
I1	Chiller con recirculador





**Figura 8.** (■) Componentes generales del sistema S/G; (▼) Esquema general de operación del sistema S/G: (A) Saturación, Volatilización y acarreamiento de sustratos; (B) Biorreactor S/G y (C) Recuperación de producto. Mecanismos de transporte implicados en un biorreactor tubular sólido/gas: (1) Convección; (2) Dispersión (axial y radial); (3) Interpartícula; (4) Intrapartícula; y posteriormente, (5) Cinética enzimática. Modificado de Huerta-Ochoa *et al.* (2023).

## 8. Bloque A. Evaluación de CalB Immo Plus™ en el sistema S/G

### 8.1. Resumen

Esta sección del trabajo revisa el potencial de la biocatálisis S/G para la síntesis sostenible de isoPro a partir de aciP e isoB utilizando el producto comercial de PureLite CalB-IP, en el cual la lipasa CalB se encuentra inmovilizada en la resina polimérica ECR. La principal aportación de este bloque está dada por la identificación de diferentes fenómenos de adsorción de sustratos y producto durante la aplicación de dicho biocatalizador en el sistema S/G. Por lo que, el tema central de la investigación fue describir el papel de la adsorción-desorción y la transferencia de masa intrapartícula en la tasa de producción de isoPro. En donde se examinaron tres escenarios de reacción a 55 °C: introducción simultánea de ambos sustratos en el reactor; saturación de CalB-IP con isoB seguida del suministro de aciP; y viceversa, con saturación de aciP precediendo al suministro de isoB. Se realizaron experimentos de adsorción-desorción para determinar las curvas de ruptura características de isoB, aciP e isoPro sobre ECR o CalB-IP a 55 °C. ECR mostró una capacidad de adsorción significativa; aciP>isoPro>isoB, en un proceso reversible (adsorción física). En estado pseudoestacionario, aciP e isoB se adsorbían en un 86% y un 84%, respectivamente, en la ECR; mientras que el 14% y el 16% restantes, respectivamente, se adsorbían en la superficie de la enzima, lo que implicaba una unión irreversible. La experimentación también tuvo en cuenta la influencia de la actividad de agua ( $a_w$  0.11-0.75) en las respuestas experimentales. Teniendo como resultado que las tasas de producción y adsorción de isoPro e isoB fueron sensibles a la variación del valor de  $a_w$ , mientras que la adsorción de aciP permaneció insensible a  $a_w$ . A una  $a_w$  de 0.75, isoB se adsorbió un 35% menos sobre CalB-IP que a una  $a_w$  de 0.11. Además, a una  $a_w$  de 0.75, la producción de isoPro a la salida del biorreactor en el estado pseudoestacionario fue un 33.5% menor que cuando se disminuyó a una  $a_w$  de 0.11. Una vez elucidados los fenómenos de adsorción, y fijando el valor de  $a_w$  a 0.11 como el óptimo, se evaluó el efecto de la relación molar de los sustratos en la síntesis de isoPro, para ello se fijó la concentración de ácido y se fue variando la de alcohol. Estos resultados arrojaron que existe un efecto positivo del incremento de la relación molar sobre el rendimiento de conversión obteniendo ~ 98 % con la relación 1:4.5 (aciP:isoB respectivamente). Por último, una vez identificado el valor de  $a_w$  y la relación molar con el mejor nivel catalítico, se evaluó la estabilidad operacional del biocatalizador en el sistema S/G manteniendo el nivel de conversión mencionado en estado estacionario durante 10 h.

### 8.2.1. Especificaciones del sistema S/G

El biorreactor S/G utilizado en esta sección consistía en una columna cilíndrica de vidrio de 22 cm de altura y 0.8 cm de diámetro interno. Se empacó con 1 g de CalB-IP o ECR, lo cual brindó una altura de lecho de aproximadamente  $11 \pm 0.5$  cm, obteniendo una densidad de empaque de  $\sim 0.181$  g cm<sup>-3</sup>.

### 8.2.2. Control de la $a_w$

Para establecer el valor de la  $a_w$  inicial, se emplearon soluciones salinas saturadas con una  $a_w$  específica conocida. Estas soluciones incluían LiCl ( $a_w$ : 0.11), MgCl<sub>2</sub> ( $a_w$ : 0.32), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ( $a_w$ : 0.44) y NaCl ( $a_w$ : 0.75). Se pesó la cantidad requerida del sólido CalB-IP o ECR y se colocó en tubos de ensayo, los cuales se situaron dentro de un recipiente hermético que contenía 20 mL de la solución saturada correspondiente. Los tubos permanecieron a 4 °C durante 72 h, tiempo suficiente para que el sólido alcanzara el equilibrio con la atmósfera generada por la solución. La  $a_w$  de todas las muestras se confirmó con un instrumento Aqualab CX-2.

### 8.2.3. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de isoPro con CalB-IP en sistema S/G

La síntesis de isoPro se llevó a cabo en el sistema S/G, con distintos valores iniciales y de entrada de  $a_w$ : 0.11 - 0.75. La discusión de este apartado se centró en examinar el impacto de la adsorción y de la  $a_w$  tanto en la tasa de producción de isoPro como en la conversión de sustratos. Durante estos experimentos, se fijó una temperatura de reacción de 55 °C y un caudal volumétrico total de N<sub>2</sub> de 65 mL min<sup>-1</sup>. Los flujos molares de entrada se fijaron en  $\dot{n}_{isoB}$ : 17 y  $\dot{n}_{aciP}$ : 14 μmol min<sup>-1</sup> respectivamente (relación  $\sim 1:1$ , aciP:isoB). El muestreo a la salida del biorreactor se realizó durante 2 h, con muestras recogidas cada 10 minutos.

### 8.2.4. Curvas de ruptura de sustratos y producto

Para explorar el fenómeno de retención de los componentes de la reacción, se investigó el impacto de la adsorción en la síntesis biocatalítica de isoPro, se llevaron a cabo distintos experimentos destinados a generar curvas de ruptura para los reactantes (isoB y aciP) y el producto (isoPro). Estos experimentos se llevaron a cabo en condiciones constantes, con un caudal

volumétrico de  $65 \text{ mL min}^{-1}$  y una temperatura de reacción de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Durante estos ensayos, un recipiente se llenó con la especie objetivo (sustrato o producto en fase líquida), mientras que el otro recipiente permaneció desocupado. Los flujos molares de cada especie introducidos al biorreactor se mantuvieron en  $14$ ,  $17$  y  $11 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$  para aciP, isoB e isoPro, respectivamente. Con estos parámetros operativos definidos, se ejecutaron dos experimentos distintos. En el primer de ellos, se empacó  $1 \text{ g}$  de ECR o CalB-IP en el biorreactor a una  $a_w$  de  $0.11$ . Se tomaron muestras a intervalos de  $5$ - $10$  minutos durante un período de  $3 \text{ h}$  para isoB e isoPro (sólo para los experimentos con ECR), y cada  $20$  minutos para aciP durante un período de  $5 \text{ h}$ . En el experimento siguiente, la columna se empacó con  $1 \text{ g}$  de CalB-IP a una  $a_w$  de  $0.75$ . En este experimento, las curvas de ruptura se determinaron exclusivamente para los sustratos (independientes), manteniendo intervalos de muestreo coherentes con los empleados en el experimento inicial.

### 8.2.5. Experimentos de desorción de reactivos y producto

Para evaluar el mecanismo de desorción, CalB-IP y ECR fueron presaturados con isoB o aciP; luego fueron sometidos a un flujo volumétrico total de  $\text{N}_2$  de  $65 \text{ mL min}^{-1}$ . Los experimentos de desorción se llevaron a cabo a una temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . El muestreo se realizó cada  $5 - 10 \text{ min}$  durante  $2 \text{ h}$  en el caso de isoB y cada  $10 - 20 \text{ min}$  durante casi  $3 \text{ h}$  en el caso de aciP.

### 8.2.6. Ensayos de adsorción-desorción-reacción de sustratos

Se llevó a cabo la siguiente serie de experimentos para obtener una comprensión global de cómo influye la adsorción en las etapas de reacción y para sustentar de forma alternativa (vía no cinética) el concepto mecanicista Bi Bi Ping-Pong. En la primera serie de experimentos, el CalB-IP pre-saturado con isoB se sometió a un flujo volumétrico de  $\text{N}_2$  de  $65 \text{ mL min}^{-1}$  que contenía aciP. El caudal molar de entrada para aciP  $\dot{n}_{aciP}$ :  $14 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$ . En el segundo conjunto de experimentos, CalB-IP pre-saturado con aciP se expuso al mismo caudal volumétrico de  $\text{N}_2$  el cual contenía en este caso isoB. La tasa de flujo molar de entrada para isoB fue  $\dot{n}_{isoB}$ :  $17 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$ . Estos experimentos se llevaron a cabo a una temperatura controlada de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , con concentraciones iniciales y de entrada fueron fijadas a  $a_w 0.11$ . Todas las muestras se recogieron a intervalos regulares de  $10$  minutos desde la salida del biorreactor a lo largo de  $3 \text{ h}$  para controlar el progreso de cada experimento.

### 8.2.7. Efecto de la relación molar en la síntesis de isoPro y estabilidad operacional de CalB-IP en sistema S/G.

Se realizaron ensayos variando la relación molar de los reactantes con el fin de observar su efecto sobre las velocidades de producción y rendimientos de conversión (%) de isoPro. Para los ensayos del efecto de la relación molar (1:1, 1:2, 1:3 y 1:4.5; aciP:isoB respectivamente); se utilizó un flujo volumétrico de N<sub>2</sub>: 45 mL min<sup>-1</sup> lo que representó un flujo molar de  $\dot{n}_{aciP}$ : 6.3 μmol min<sup>-1</sup>, en el caso del isoB se utilizaron flujos de N<sub>2</sub> de 9, 11, 13 y 17 mL min<sup>-1</sup> lo que representó flujos molares de  $\dot{n}_{isoB}$ : 7.0, 13.4, 18.8 y 28.5 μmol min<sup>-1</sup>, todas las muestras se recogieron a intervalos regulares de 10 minutos desde la salida del biorreactor a lo largo de 3 h. Posteriormente, se analizó la estabilidad operacional en las condiciones de reacción óptimas seleccionadas (1:4.5 y a<sub>w</sub> 0.11) mediante cinéticas de producción de 10 h, en donde los muestreos se realizaron regularmente cada 20 min.

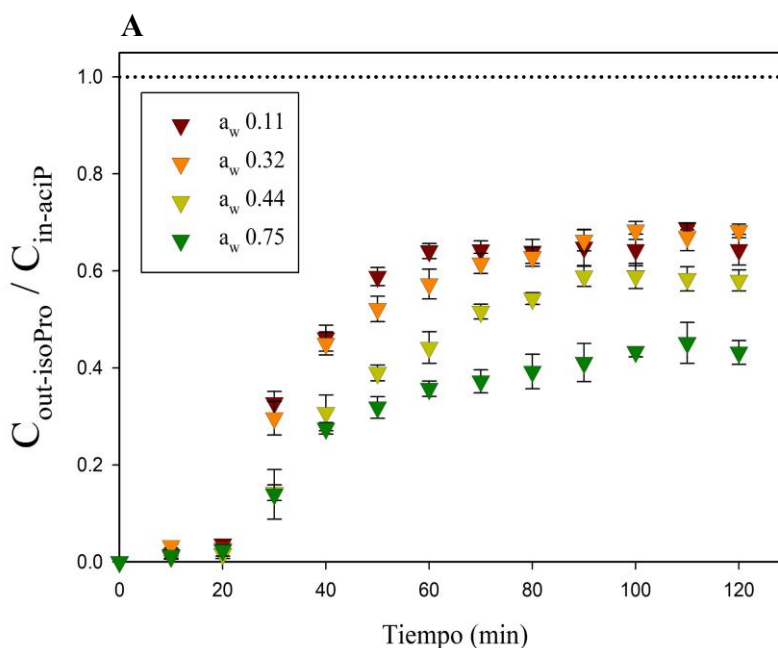
## 8.3. Resultados y discusión

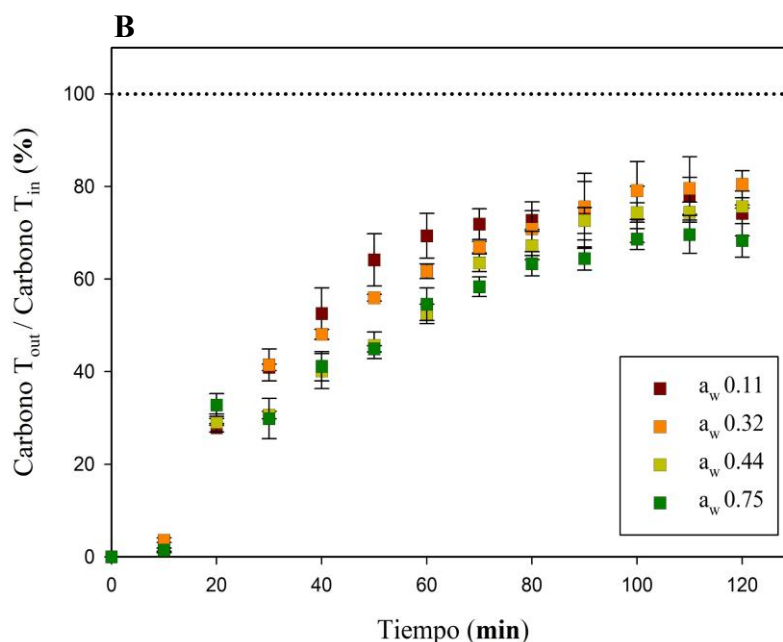
### 8.3.1. Efecto de la a<sub>w</sub> en la síntesis de isoPro con CalB-IP

Teniendo en cuenta el importante impacto de la a<sub>w</sub> tanto en el equilibrio termodinámico de las reacciones como en el rendimiento de las enzimas dentro de la biocatálisis S/G, se evaluó su efecto en el rendimiento catalítico de CalB-IP durante la síntesis de isoPro. La **Figura 9<sup>a</sup>** muestra las concentraciones adimensionales de isoPro ( $C_{out-isoPro} / C_{in-aciP}$ ) en donde  $C_{out-isoPro}$  es la concentración del producto isoPro a la salida del biorreactor, respecto a  $C_{in-aciP}$  que representa la concentración de entrada del reactivo limitante aciP, es decir, dichos valores multiplicándolos por 100 nos brindan el rendimiento de conversión (%). Por otro lado, la **Figura 9B** muestra el porcentaje de carbono total, incluyendo reactantes y productos, a la salida del biorreactor respecto al de entrada bajo las condiciones de operación especificadas en la sección 8.2.3. En primer lugar, las observaciones confirmaron la influencia significativa de la a<sub>w</sub> en la tasa de producción de isoPro. La mayor tasa de producción de isoPro se alcanzó con valores de a<sub>w</sub> de 0.11 y 0.32, lo que concuerda con los resultados de investigaciones anteriores como el de Cordero-Soto *et al.* (2020) y García-Martínez *et al.* (2022). Durante estos estudios observaron que valores más bajos de a<sub>w</sub> contribuyen a mejorar las propiedades estructurales de la enzima, aumentando así su estabilidad y, por tanto, sus propiedades catalíticas (Kermasha *et al.*, 2021). En el contexto de las reacciones de

esterificación, un exceso de agua también favorece la reacción de hidrólisis sobre la síntesis de isoPro, alineándose con los principios de Le Chatelier para reacciones reversibles (Khan *et al.*, 2021). Basado en la **Figura 9A**, en el estado pseudoestacionario, una  $a_w$  más grande condujo a una reducción del 33.5 % en la producción de isoPro, de tal manera que a una  $a_w$  de 0.75, el rendimiento de conversión fue de  $43.17 \pm 1.66$  % y a una  $a_w$  de 0.11 fue de  $65.59 \pm 2.19$  %, respectivamente.

Por otro lado, una vez iniciado el proceso de síntesis, los balances de masa de carbono total a la salida del biorreactor a lo largo del tiempo oscilaron entre el 3% y el 80% (**Figura 9B**). En los 10 minutos iniciales de la reacción, las especies basadas en el carbono, incluidos reactantes y productos ( $\text{Carbono total}_{\text{out}} / \text{Carbono total}_{\text{in}} * 100$ ), estaban casi ausentes de la salida del biorreactor ( $< 5\%$ ). Después, las especies empezaron a aparecer en la salida del biorreactor cerca de los 20 minutos, aunque con porcentajes de carbono total significativamente más bajos ( $< 40\%$ ) que los alimentados inicialmente al biorreactor. Al alcanzar un estado pseudoestacionario a los 120 minutos, el balance de carbono total se observó de nueva cuenta en cantidades inferiores a las esperadas ( $< 80\%$ ), lo que motivó a investigar los fenómenos que ocurrían en la superficie de CalB-IP para cada especie implicada en la reacción biológica de interés para este proyecto.





**Figura 9.** (A) Concentración adimensional de isoPro ( $C_{\text{out-isoPro}} / C_{\text{in-aciP}}$ ); valores multiplicados por 100 brindan el rendimiento de conversión (%); (B) Porcentaje de carbono total a la salida del bioreactor respecto al de entrada (Carbono  $T_{\text{out}} / \text{Carbono } T_{\text{in}}$ ), incluidos sustratos y productos. Condiciones de operación: Temperatura 55 °C,  $Q_{N_2}$ : 65 mL  $\text{min}^{-1}$ ,  $N_{\text{aciP}}$ : 14  $\mu\text{mol min}^{-1}$  y  $N_{\text{isoB}}$ : 17  $\mu\text{mol min}^{-1}$ . Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

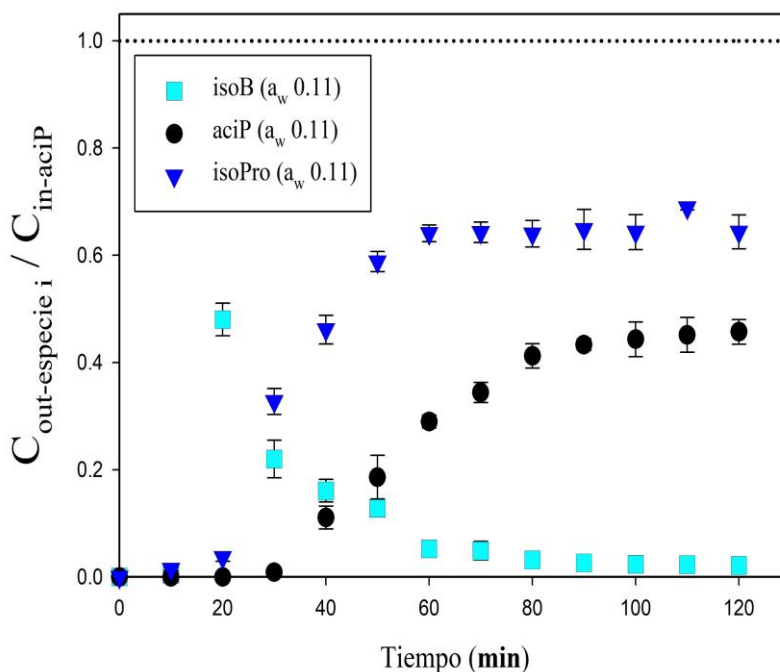
La **Figura 10** representa las curvas de progreso de la concentración adimensional de los reactantes (aciP e isoB) y del producto (isoPro) en relación con la concentración inicial del reactante limitante,  $C_{0\text{aciP}}$  a la salida del biorreactor, tomando como ejemplo los ensayos realizados con  $a_w$  0.11. Se puede observar que, durante los 10 minutos iniciales de la reacción, aciP, isoB e isoPro estuvieron ausentes de la salida del biorreactor. Posteriormente, a los 20 minutos, empezó a aparecer isoB e isoPro (menor proporción), pero aciP siguió ausente. No fue hasta cerca de los 40 minutos cuando aciP comenzó a identificarse en la salida del biorreactor, aunque en concentraciones considerablemente más bajas que las introducidas inicialmente en el biorreactor. Una vez alcanzado el estado pseudoestacionario respecto al producto isoPro (120 minutos), identificó que isoB se encontraba en concentraciones inferiores a las esperadas, mientras que el consumo de aciP coincidió con la producción de isoPro. Estas observaciones nos guiaron para realizar balances de masas de especies en las fases fluida y sólida a lo largo del tiempo, revelando

finalmente que no sumaban el 100% del valor alimentado como se representa en las **Figuras 9B** y **10** y se desglosa a detalle en la *Tabla 5*.

Los resultados del balance de especies basado en el carbono indicaron que las especies reactantes sufrieron varias interacciones durante la reacción, consumiéndose un cierto porcentaje para producir isoPro, saliendo otro porcentaje en el efluente y permaneciendo una parte temporalmente adsorbida dentro del soporte sólido. Por ejemplo, en el caso de la aciP, durante los primeros 20 minutos, aproximadamente el 95% de aciP introducido inicialmente en el reactor fue adsorbido por CalB-IP. Sin embargo, a los 60 minutos, sólo quedaba adsorbido alrededor del 6%, y a los 120 minutos, no había aciP adsorbido, lo que corresponde a una conversión de aproximadamente el 65%. Del mismo modo, en el caso de isoB, en los 10 minutos iniciales, aproximadamente el 98 % del isoB introducido en el biorreactor se adsorbió en el CalB-IP. Después, entre los 20 y los 120 minutos, la adsorción de isoB disminuyó del 54% al 44%.

En cuanto al producto, una vez producido, fue desorbido y transportado a la fase fluida del biorreactor, donde pudo detectarse a la salida del reactor. Los resultados anteriores no han sido descritos para la biocatálisis S/G en la producción de ésteres, utilizando enzimas comerciales inmovilizadas tales como CalB-IP. Además, solamente existe un estudio que, para diferentes aplicaciones, haya dilucidado, de forma macroscópica, cómo la adsorción de especies reactivas sobre el biocatalizador basado en la inmovilización de enzimas en soporte poroso impacta en el rendimiento de la reacción (Dimoula *et al.*, 2009). En particular, en esa investigación, los autores presentaron cómo la adsorción de reactivo y agua impactan en la reducción de acetofenona con oxidación concomitante de 2-propanol utilizando alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* depositada en seco. Su estudio se centró en la adsorción de sustrato en paralelo o en competencia con la adsorción de agua en el biocatalizador. Los autores observaron que la presencia de sacarosa en el preparado enzimático tiene una influencia crítica en la capacidad del lecho empacado para adsorber y retener agua. Aunque el 2-propanol no se adsorbió al preparado enzimático depositado a un nivel detectable, la acetofenona se adsorbió en una cantidad comparable a la del agua adsorbida. Sin embargo, su estudio seguía siendo macroscópico, concentrándose en la interacción de la enzima con las especies de reacción sin examinar a profundidad, para establecer conclusiones más sólidas. Para ello, en las siguientes secciones, esbozaremos nuestro enfoque al analizar los mecanismos de adsorción y su influencia en el mecanismo de reacción, el cual se basa en el

formalismo Bi-Bi Ping-Pong, bien documentado para este tipo de enzima, así como sobre la tasa de producción de isoPro durante la biocatálisis S/G.



**Figura 10.** Curvas de progreso de concentración adimensional de los reactantes aciP e isoB, y del producto isoPro en el efluente respecto a la concentración inicial del reactante limitante aciP ( $C_{in-aciP}$ ) a una  $a_w$  de 0.11. Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

Tabla 5. Deconvolución del balance total de materia ( $\mu\text{moles}$ ) de los ensayos realizados con  $a_w$  0.11.

Entrada ( $\mu\text{mol}$ )	isoB		aciP	
		168.67 $\pm$ 2.77		140.53 $\pm$ 4.51

Tiempo (min)	Salida ( $\mu\text{mol}$ )		Consumo* ( $\mu\text{mol}$ )		Adsorbido/Acumulado* ( $\mu\text{mol}$ )	
	isoB	aciP	isoB	aciP	isoB	aciP
10	0.703 $\pm$ 0.38	0	2.082 $\pm$ 0.35	2.261 $\pm$ 0.23	165.8 $\pm$ 0.73	138.2 $\pm$ 0.23
20	67.46 $\pm$ 4.25	0	5.124 $\pm$ 1.03	5.569 $\pm$ 0.98	96.08 $\pm$ 3.24	134.9 $\pm$ 0.98
30	30.92 $\pm$ 4.91	1.237 $\pm$ 0.50	45.99 $\pm$ 3.40	44.41 $\pm$ 2.85	91.75 $\pm$ 2.08	94.88 $\pm$ 2.34
40	22.61 $\pm$ 2.98	15.55 $\pm$ 2.98	64.80 $\pm$ 3.73	66.73 $\pm$ 2.33	81.25 $\pm$ 6.67	58.24 $\pm$ 0.65
50	17.96 $\pm$ 1.04	26.14 $\pm$ 5.75	82.66 $\pm$ 2.62	84.14 $\pm$ 0.82	68.04 $\pm$ 2.28	30.25 $\pm$ 4.93

<b>60</b>	7.369 ± 1.15	40.69 ± 1.70	90.04 ± 2.18	91.00 ± 2.01	71.25 ± 2.52	8.832 ± 3.71
<b>80</b>	4.480 ± 0.91	57.93 ± 3.18	89.91 ± 3.49	88.09 ± 2.13	74.27 ± 3.96	0
<b>100</b>	3.297 ± 0.21	62.28 ± 4.54	90.39 ± 4.60	91.97 ± 5.23	74.98 ± 4.41	0
<b>120</b>	3.020 ± 0.21	64.23 ± 3.23	90.44 ± 4.04	90.85 ± 5.21	75.20 ± 4.59	0

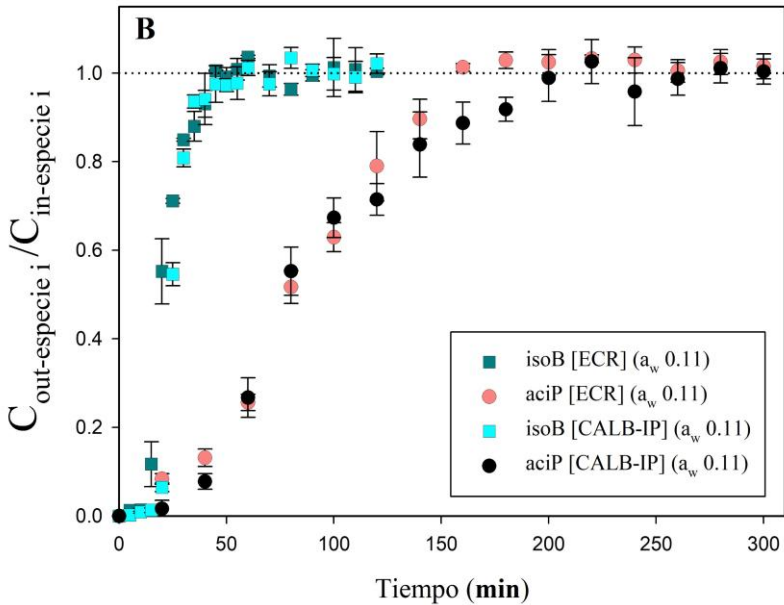
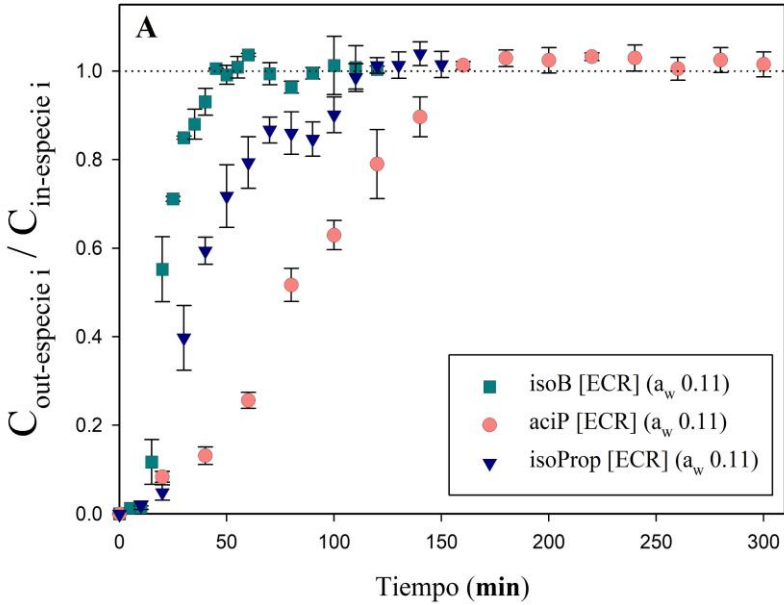
\* Estimado basado en mol de isoPro producido (salida); \*\* Estimado en base a (Entrada - Salida - Consumo).

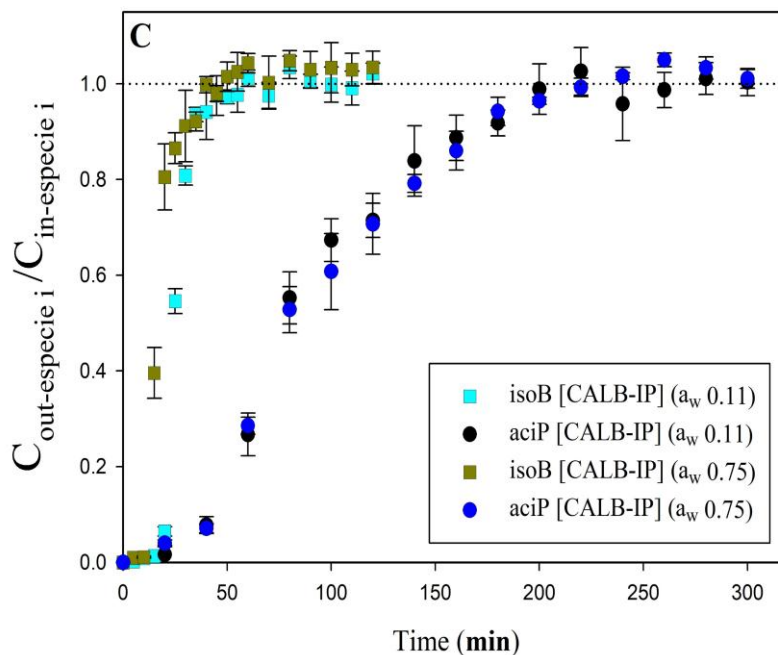
### 8.3.2. Análisis de la adsorción

El mecanismo de adsorción en los biocatalizadores se analizó mediante la determinación de las curvas de ruptura características de cada especie en dos materiales: ECR y CalB-IP. El objetivo fue comprender la contribución del soporte y de la enzima CalB en la sorción de las 3 diferentes especies relacionadas con la síntesis de isoPro. La **Figura 11** muestra las curvas de ruptura de aciP, isoB e isoPro sobre ECR y CalB-IP en las condiciones de operación aplicadas durante los escenarios de reacción: de 65 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 55 °C y valores de a<sub>w</sub> de 0.11 y 0.75.

La **Figura 11A** muestra que las tres especies fueron adsorbidas sobre ECR a un a<sub>w</sub> de 0.11, lo que resultó inesperado debido a la naturaleza hidrofílica de los reactivos y la naturaleza hidrofóbica moderada de ECR (Pauli *et al.*, 2022). Este fenómeno puede ser debido a la interacción con los metacrilatos dentro de la estructura de la resina tal y como se discutirá más adelante. El isoB tiene el tiempo de ruptura más corto, por lo que el ECR se satura completamente en aproximadamente 40 minutos con una capacidad de adsorción de 25.75 ± 0.58 mg isoB g<sup>-1</sup> ECR. La curva de ruptura, especialmente su pendiente, indica que el tiempo característico de adsorción es más significativo que los tiempos característicos de transporte de masa. Por lo tanto, las resistencias de transporte no tienen un impacto significativo, incluidos los fenómenos de convección, difusionales, interfaciales o de dispersión (Castillo-Araiza *et al.*, 2015). En cambio, para aciP, la ECR se saturó en 150 minutos, adsorbiendo 77.13 ± 4.37 mg aciP g<sup>-1</sup> ECR. La curva de ruptura para aciP indica que los mecanismos de difusión dentro de la ECR afectan al rendimiento de la adsorción, una característica que debe persistir durante la síntesis de isoPro (Castillo-Araiza *et al.*, 2015). Por último, en el caso de la isoPro, esta especie también se adsorbe en el ECR, con un tiempo de ruptura similar al de los reactantes. La curva de ruptura para isoPro muestra que el ECR alcanza la saturación completa en aproximadamente 110 minutos, con una capacidad de adsorción de 28.30 ± 0.09 mg isoPro g<sup>-1</sup> ECR. En cuanto a los sustratos, el tiempo característico de adsorción es superior al tiempo de residencia del reactor, por lo que representa la

etapa limitante cinética y operacionalmente en las condiciones de reacción evaluadas. En los experimentos de adsorción de esta fase, también se evaluó el mero efecto de la presencia de la CalB sobre la adsorción identificada. Las curvas de ruptura para aciP e isoB se obtuvieron utilizando CalB-IP en condiciones operativas similares a las de los experimentos de síntesis y adsorción de isoPro con ECR como material empacado en el biorreactor S/G a escala de banco.



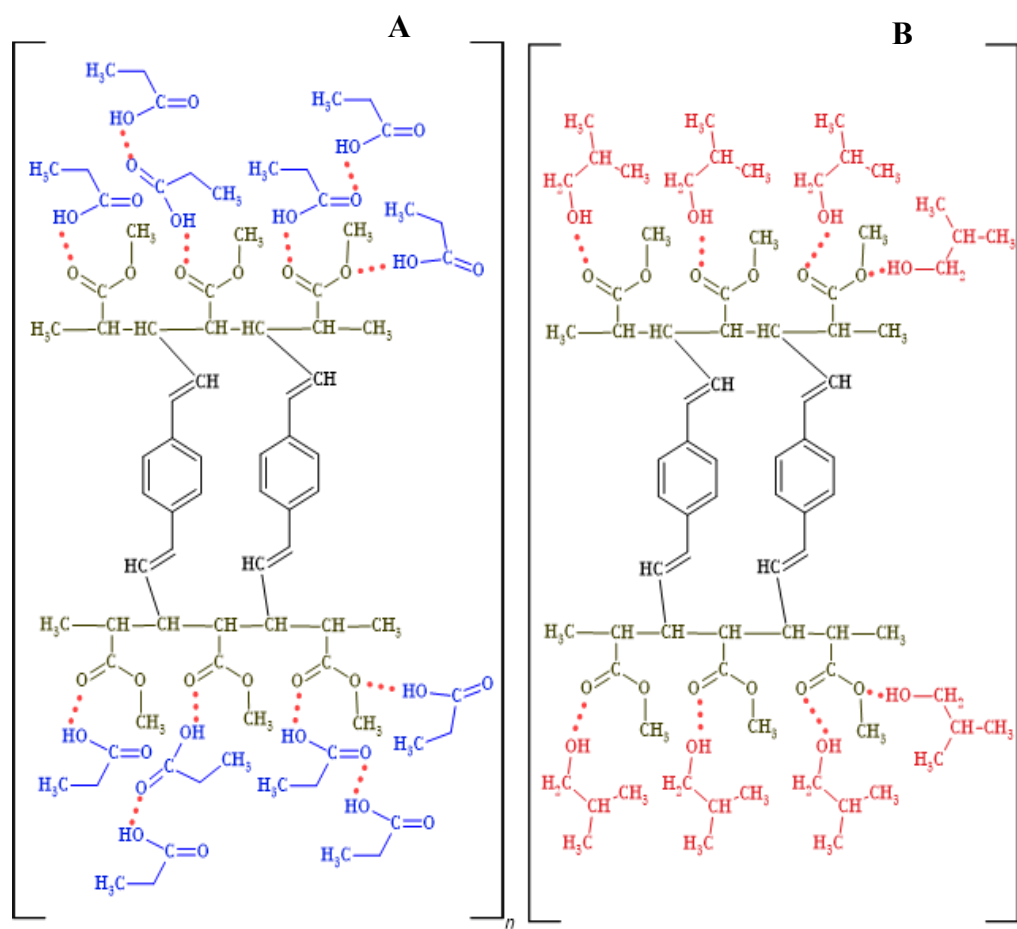


**Figura 11.** Curvas de ruptura de: (A) Sustratos isoB y aciP, y producto isoPro en ECR a una  $a_w$  de 0.11; (B) Sustratos isoB y aciP en ECR y en CalB-IP a una  $a_w$  de 0.11; (C) Sustratos isoB y aciP en CalB-IP a  $a_w$  de 0.11 y 0.75. Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

La **Figura 11B** muestra las curvas de ruptura obtenidas a una  $a_w$  de 0.11. Se observó una ligera diferencia en las curvas de ruptura para aciP e isoB, especialmente en términos de pendiente y tiempo de ruptura, entre ECR y CalB-IP. No obstante, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las diferencias de adsorción al utilizar ECR o CalB-IP a una  $a_w$  y CalB-IP a dos  $a_w$  diferentes (*Tabla 6*). Debido al impacto de la naturaleza hidrofóbica del soporte ECR en la adsorción de compuestos hidrofílicos implicados en la biorreacción catalítica, se evaluó la influencia de  $a_w$  en las curvas de progreso de los reactantes, como se muestra en la **Figura 11C**. Como se preveía a partir de los experimentos de reacción realizados a diferentes niveles de  $a_w$ , esta variable no ejerce influencia sobre los mecanismos de adsorción. En otras palabras, el ECR funciona como un depósito de reactivos y su capacidad de adsorción no se ve afectada por la  $a_w$ . Cabe señalar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las curvas de avance de la adsorción. Es probable que esta falta de diferencias se deba a que, a estos valores de  $a_w$ , las moléculas de agua no facilitan ni compiten con el sustrato en el proceso de adsorción sobre ECR. Los grupos funcionales de los metacrilatos contenidos en el ECR tienen una naturaleza ligeramente polar,

parecida a la de un éster, permitiendo interacciones con los grupos hidroxilo presentes en los compuestos (Uhl *et al.*, 2020). En este escenario, las especies reactivas pueden ser retenidas a través de interacciones de puentes de hidrógeno.

En la **Figura 12** se proponen las posibles interacciones dadas mediante puentes de hidrógeno entre los reactivos y el soporte. Aunque todas las especies reactivas pueden interactuar con el soporte, aciP se adsorbe en mayor medida. De hecho, se tiene la hipótesis de que debido a la naturaleza química de aciP no solo interactúa con el soporte, sino que también puede hacerlo con otras moléculas de aciP, formando potencialmente múltiples capas y aumentando así la cantidad de aciP retenida. Na Chat *et al.* (2022) demostraron cómo la remoción de aciP sobre una zeolita X sintetizada (0.5 HCl-X) derivada de la cascarilla de arroz en bayas de arroz está controlada por la cinética de adsorción a nivel de multicapas.



**Figura 12.** Posibles interacciones a través de puentes de hidrógeno entre reactivos y soporte. (Rojo): (A) aciP-ECR y (B) isoB-ECR. [PMMA (verde), DVB (negro), aciP (azul) e isoB (rojo)].

En la *Tabla 6* se presentan los resultados cuantitativos de adsorción para isoB, aciP e isoPro. Un valor  $a_w$  de 0.75 disminuyó la capacidad de adsorción de isoB sobre CalB-IP en aproximadamente un 35 % en comparación con el  $a_w$  de 0.11. No obstante, con esta  $a_w$  inferior, aproximadamente el 84 % de la capacidad de adsorción de CalB-IP puede atribuirse a ECR, mientras que las enzimas son responsables de adsorber el 16 % restante de isoB. Por el contrario, la capacidad de adsorción de CalB-IP para aciP no mostró diferencias significativas entre los distintos niveles de  $a_w$ . A una  $a_w$  de 0.11, similar a la de isoB, aproximadamente el 86 % de la capacidad de adsorción de CalB-IP se atribuye a ECR, y las enzimas representan alrededor del 14 % de la adsorción de aciP.

Como referencia, no relacionada con la biocatálisis S/G, cabe destacar que la capacidad de adsorción ECR para aciP fue inferior a la reportada anteriormente por Na Chat *et al.* (2022), que fue de  $516 \text{ mg g}^{-1}$  sobre Zeolita X sintetizada (0.5 HCl-X) a un tiempo de equilibrio de 30 min. Además, Vergili y Barlas en 2002 llevaron a cabo un estudio sobre las capacidades de adsorción de ECR, revelando mayores tasas de adsorción para compuestos farmacéuticos (carbamazepina, propifenazona y sulfametoxazol) en soluciones acuosas en comparación con los reactivos evaluados en este trabajo. Su estudio también dilucidó que la carbamazepina y la propifenazona presentaban formación de multicapas en la superficie del adsorbente, alcanzando una capacidad de adsorción de  $46.07 \text{ mg g}^{-1}$  para la carbamazepina, que tenía una solubilidad de  $179 \text{ mg L}^{-1}$  en el medio de solución. Cabe destacar que sus capacidades de adsorción fueron más significativas debido a las temperaturas evaluadas, las cuales fueron más bajas en comparación con las utilizadas en nuestros experimentos de adsorción, lo que favoreció sus resultados considerando la teoría termodinámica de adsorción.

Tabla 6. Capacidad de adsorción de reactivos (isoB y aciP) y producto (isoPro) en CalB-IP y ECR.

Compuesto	Sólido	$a_w$	$q_{\max}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Sólido	$a_w$	$q_{\max}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
isoB		0.11	$30.56 \pm 0.99$	CalB-IP		$30.56 \pm 0.99$
		0.73	$19.81 \pm 0.93$	ECR		$25.75 \pm 0.58$
aciP	CalB-IP	0.11	$89.40 \pm 1.25$	CalB-IP	0.11	$89.40 \pm 2.15$
		0.73	$87.01 \pm 3.01$	ECR		$77.13 \pm 4.37$
isoPro		ND	ND	ECR		$28.30 \pm 0.09$

\*ND: No determinado

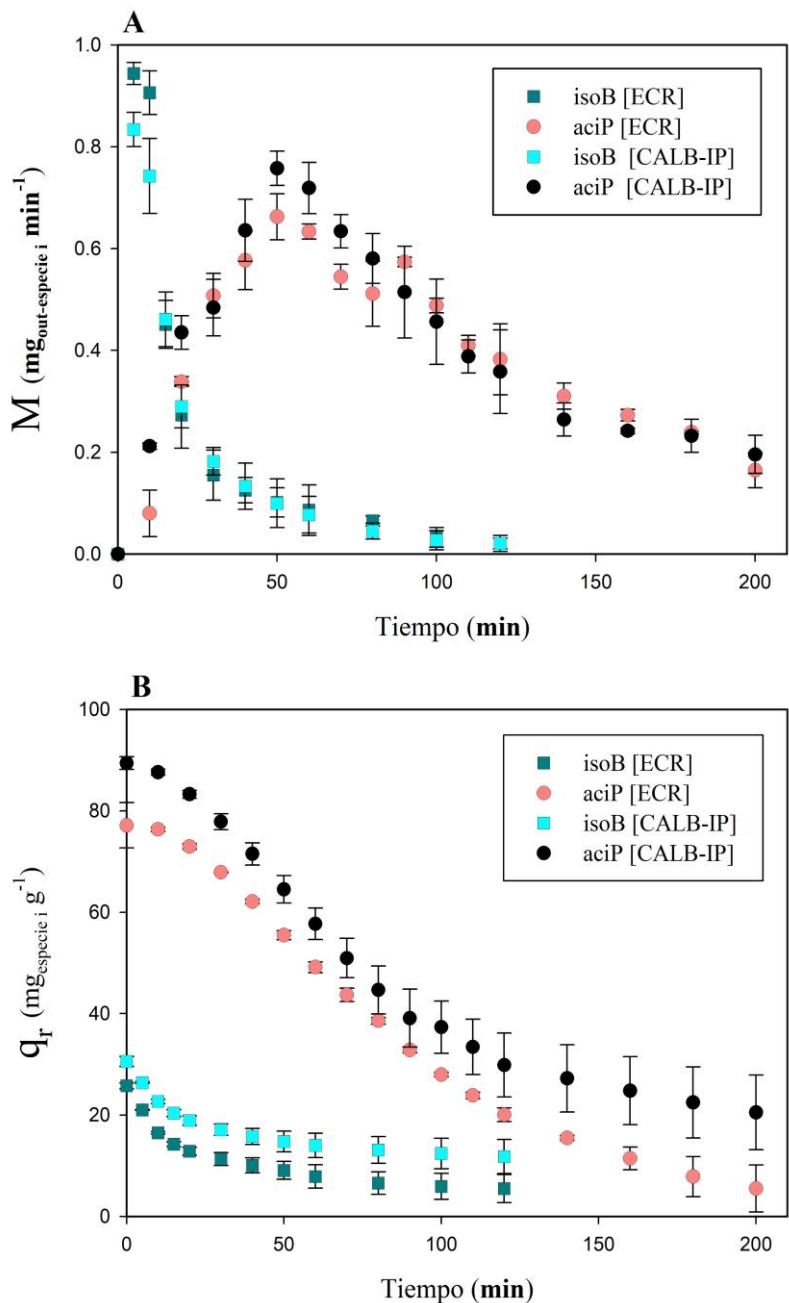
### 8.3.3. Papel de la adsorción y desorción en la cinética enzimática

Hasta este punto del proyecto, han surgido dos cuestiones que requieren de una investigación mediante experimentación y análisis fenomenológico. La primera está asociada con la desorción de las especies en cuestión, ya que no está claro si la desorción de especies reactantes de la ECR es termodinámicamente posible a la temperatura evaluada o si son necesarias temperaturas más altas para su desorción, considerando que este proceso es globalmente endotérmico (Durán-Pérez *et al.*, 2023). En este sentido, es esencial identificar si la adsorción de los reactantes en la superficie (soporte o enzima) se da de forma física, es decir, se basa en fuerzas tipo las de Van der Waals o si se da químicamente y están unidos al sitio activo de la enzima. Nótese que, dado que las curvas de progreso de la adsorción, en cuanto a tiempo y pendiente, son similares para ambos reactantes. No está claro qué especie se une primero o si se adsorben en la superficie concurrentemente y cómo afecta esto a la velocidad y mecanismo de reacción, particularmente en lo que se refiere al formalismo Bi-Bi Ping-Pong para reacciones enzimáticas de esterificación (Yazdi *et al.*, 2017; Jaiswal *et al.*, 2018). Así, la segunda pregunta está relacionada con ella, intentando elucidar el papel de la adsorción y la desorción en las velocidades de reacción y el mecanismo de reacción enzimática característico de CalB. En los siguientes renglones, se discuten los experimentos diseñados en torno a estas preguntas para establecer una base sólida para entendimiento y diseño de la tecnología propuesta.

En la **Figura 13** se muestran las curvas de ruptura de desorción de isoB y aciP tanto de ECR como de CalB-IP bajo condiciones específicas de operación: flujo de gas acarreador 65 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 55 °C y  $a_w$  de 0.11. Nótese que los materiales utilizados para estas evaluaciones fueron saturados previamente según los resultados arrojados por las curvas de ruptura mostradas en la **Figura 11**. En estos experimentos se introdujo nitrógeno como único flujo de alimentación en el biorreactor. Las especies reactivas adsorbidas sobre ECR se desorbieron por completo, mientras que las asociadas a CalB-IP permanecieron aparentemente unidas a la superficie de la enzima. Esta observación sugiere que el proceso de adsorción sobre ECR es reversible a la temperatura estudiada, impulsado simplemente por fuerzas de van der Waals. Sin embargo, sobre CalB-IP se identifica un fenómeno de biosorción, impulsado por enlaces químicos. No obstante, la influencia de la adsorción y la desorción en la reacción enzimática sigue sin estar clara.

Además, las pendientes de ruptura de la desorción, como se muestra en la **Figura 13A**, son coherentes y consistentes con el patrón obtenido en las observaciones de las curvas de ruptura de

la adsorción representadas en la **Figura 11**. En este contexto, es evidente que aciP encuentra resistencia difusional tanto en ECR como en CalB-IP, lo que resulta en tiempos de desorción prolongados e incluso la imposibilidad de desorber por completo las especies en el caso de CalB-IP (Figura 13B).



**Figura 13.** Curvas de progreso del proceso de desorción de las especies isoB y aciP de ECR y CalB-IP, (A) concentración de la especie en el efluente; (B) cantidad residual de la especie adsorbida en el sólido “ $q_r$ ”. Condiciones de operación ( $a_w$  de saturación: 0.11,  $Q_{N_2}$ : 65 mL  $\text{min}^{-1}$  y 55 °C). Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

En la **Figura 14** se presentan las curvas de progreso para dos escenarios de reacción distintos que involucran los fenómenos de adsorción-desorción descritos previamente, los cuales fueron llevados a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales: flujo de gas acarreador 65 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 55 °C, y  $a_w$  de 0.11. En la **Figura 14A**, CalB-IP se saturó inicialmente con isoB y, posteriormente, se introdujo aciP en el biorreactor. En la **Figura 14B**, el escenario se invirtió, con CalB-IP inicialmente saturado con aciP e introduciendo isoB en el biorreactor. Antes de analizar estos resultados, es esencial referirse a investigaciones previas en la literatura sobre el mecanismo de reacción de este tipo de enzimas (García-Martínez *et al.*, 2022; Jaiswal *et al.*, 2018; Kuperkar *et al.*, 2014).

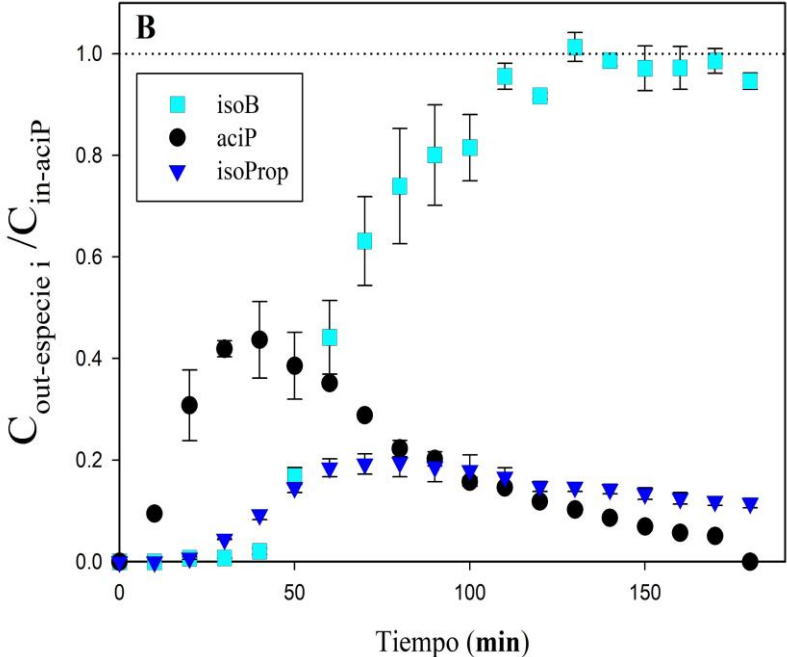
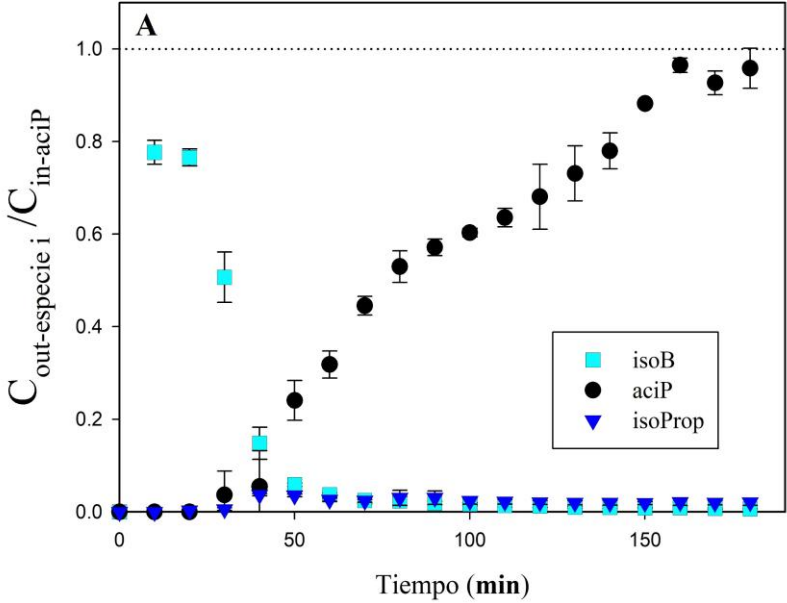
Hasta donde sabemos, los experimentos y las respuestas mostradas en la **Figura 14** no se han llevado a cabo previamente para el análisis de la producción de ésteres mediante biocatálisis S/G. Macroscópicamente, a través del análisis de regresión multirrespuesta y multiparámetro, se sabe que el mecanismo de reacción que siguen las lipasas se asocia con el formalismo Bi-Bi Ping-Pong, en el que el ácido en cuestión (aciP, en este caso) es el primer reactivo que se adsorbe sobre el sitio activo de la enzima formando un complejo enzimático químicamente modificado de la misma al retener el grupo acilo de dicho ácido, a la par se forma y libera el primer producto: agua, seguido de la incorporación del alcohol (isoB) atacando el complejo enzimático formado para producir y liberar el éster (isoPro). En el escenario en el que CalB-IP se satura inicialmente con isoB, y posteriormente se introduce aciP, el comportamiento esperado se alinea con los hallazgos de los experimentos de adsorción (**Figura 11**) y desorción (**Figura 13**). En este caso el aciP alimentado se adsorbe sobre ECR y la enzima; y el isoB se desorbe y es arrastrado de forma instantánea fuera del biorreactor por el gas acarreador. La producción de isoPro comienza unos 30 minutos después de que los reactivos interactúen por primera vez con la superficie del material, lo que indica que los tiempos característicos de adsorción y desorción son más cortos que el de la reacción.

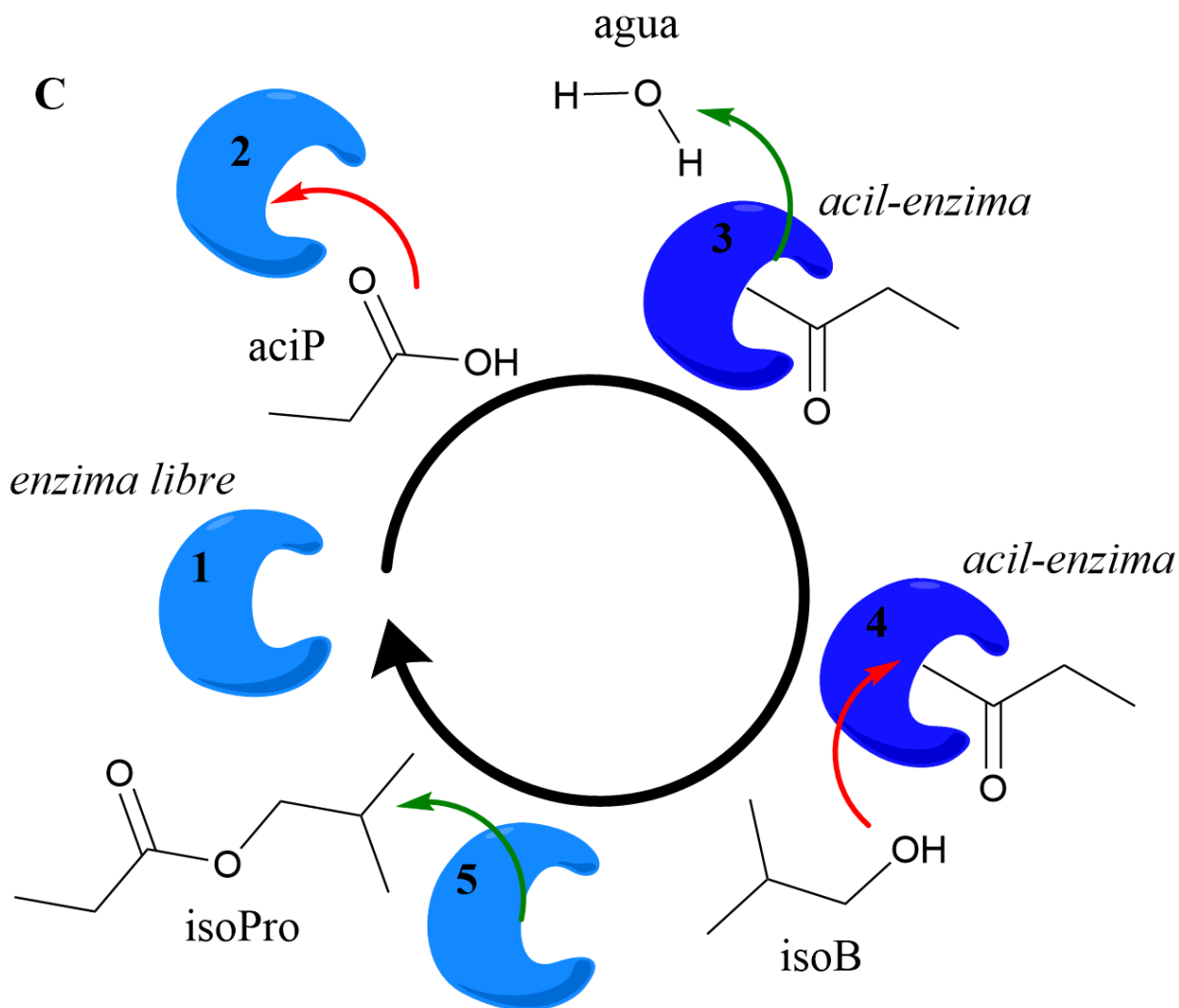
Como se ha dilucidado a partir de los experimentos de ruptura de adsorción y desorción, la desorción de isoB no presenta resistencias difusionales, mientras que la adsorción de aciP presenta tales limitaciones. La tasa de producción de isoPro alcanza su máximo a los 40 minutos y disminuye gradualmente hasta aproximadamente los 80 minutos, tras lo cual permanece casi constante. En contraparte, cuando CalB-IP se saturó inicialmente con aciP, y posteriormente se introdujo isoB, el comportamiento fue inverso. En este escenario, la isoB comienza a adsorberse

mientras que la aciP se desorbe, y la producción de isoPro comienza alrededor de los 20 minutos. Su tasa de producción máxima se alcanza aproximadamente a los 80 minutos, observándose un ligero descenso hasta los 180 minutos. En cuanto a la adsorción de isoB, no presenta resistencias difusionales. Al mismo tiempo, la desorción de aciP presenta este tipo de limitación de transporte, lo que conduce a un mayor tiempo de residencia en CalB-IP. Comparando ambos escenarios de adsorción-desorción-reacción, se alcanzaron mayores tasas de producción de isoPro cuando CalB-IP se saturó inicialmente con aciP.

Estos fenómenos pueden atribuirse a tres importantes factores hipotéticos y a su efecto combinado: (1) El tiempo de residencia prolongado de aciP dentro del biorreactor. Lo cual se atribuye a su tasa de desorción más lenta sobre CalB-IP, que es coherente con las resistencias difusionales observadas e identificadas en las curvas de ruptura de adsorción (**Figura 11**) y desorción (**Figura 13**). Este fenómeno se observó en todos los experimentos realizados tanto en condiciones de reacción como de no reacción utilizando ECR o CalB-IP. En este sentido, aciP permanece en el biorreactor durante aproximadamente 170 minutos, por lo tanto, la alimentación constante de isoB en el reactor resulta en una producción ininterrumpida de isoPro, incluso si no se suministra aciP al biorreactor. (2) La difusión de aciP a través de los poros y en la superficie sólida de CalB-IP. En el experimento en el que CalB-IP se satura inicialmente con aciP, donde se sabe que un % del total de este reactivo se transporta a los sitios catalíticos de la enzima, donde se quimisorbe y posteriormente reacciona con la isoB alimentada continuamente en el biorreactor. Para ello, el tiempo característico asociado a la difusión dentro del CalB-IP, que abarca tanto la superficie sólida como los huecos de los poros, compite con el tiempo de la reacción enzimática. Debido al mecanismo de adsorción-desorción y a la difusión de los reactantes adsorbidos en el ECR, las tasas de producción de isoPro se extienden hasta 180 minutos. De hecho, para apoyar esta hipótesis, es esencial tener en cuenta que la adsorción y desorción de reactantes son los procesos más rápidos tal y como se mostró anteriormente. Al mismo tiempo, la reacción se inicia al cabo de 20-30 minutos una vez introducido cualquiera de los reactantes en el biorreactor. (3) En línea con la literatura, la mayor producción de isoPro observada en experimentos en los que CalB-IP se satura inicialmente con aciP se alinea con las tasas de adsorción-desorción y el formalismo del mecanismo Bi-Bi Ping-Pong, en el que aciP experimenta quimisorción en el sitio activo de la enzima debido al ataque nucleofílico de la serina presente en el mismo, dando así la formación de un complejo químicamente modificado de la misma al mantener el grupo acilo del aciP y liberando

a su vez el primer producto agua, posteriormente dicho intermediario es atacado por isoB, resultando en la formación de isoPro y la liberación de la enzima. Estos hallazgos aportan información valiosa que puede servir para futuros estudios, permitiendo la optimización del diseño de biorreactores S/G, incluyendo la estrategia operativa y el diseño del material de soporte en términos de su química superficial y diámetro de poro.





**Figura 14.** Escenarios de reacción durante los ensayos de adsorción-reacción-desorción, (A) CalB-IP se satura inicialmente con isoB, y posteriormente, se introduce aciP en el biorreactor; (B) CalB-IP inicialmente saturado con aciP, y posteriormente, se introduce isoB en el biorreactor; (C) Representación del mecanismo de reacción “Ping-Pong Bi-Bi” de la lipasa B de *Candida antarctica* en la síntesis de isobutil propionato “isoPro” a partir de ácido propiónico “aciP” e isobutanol “isoB”. Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

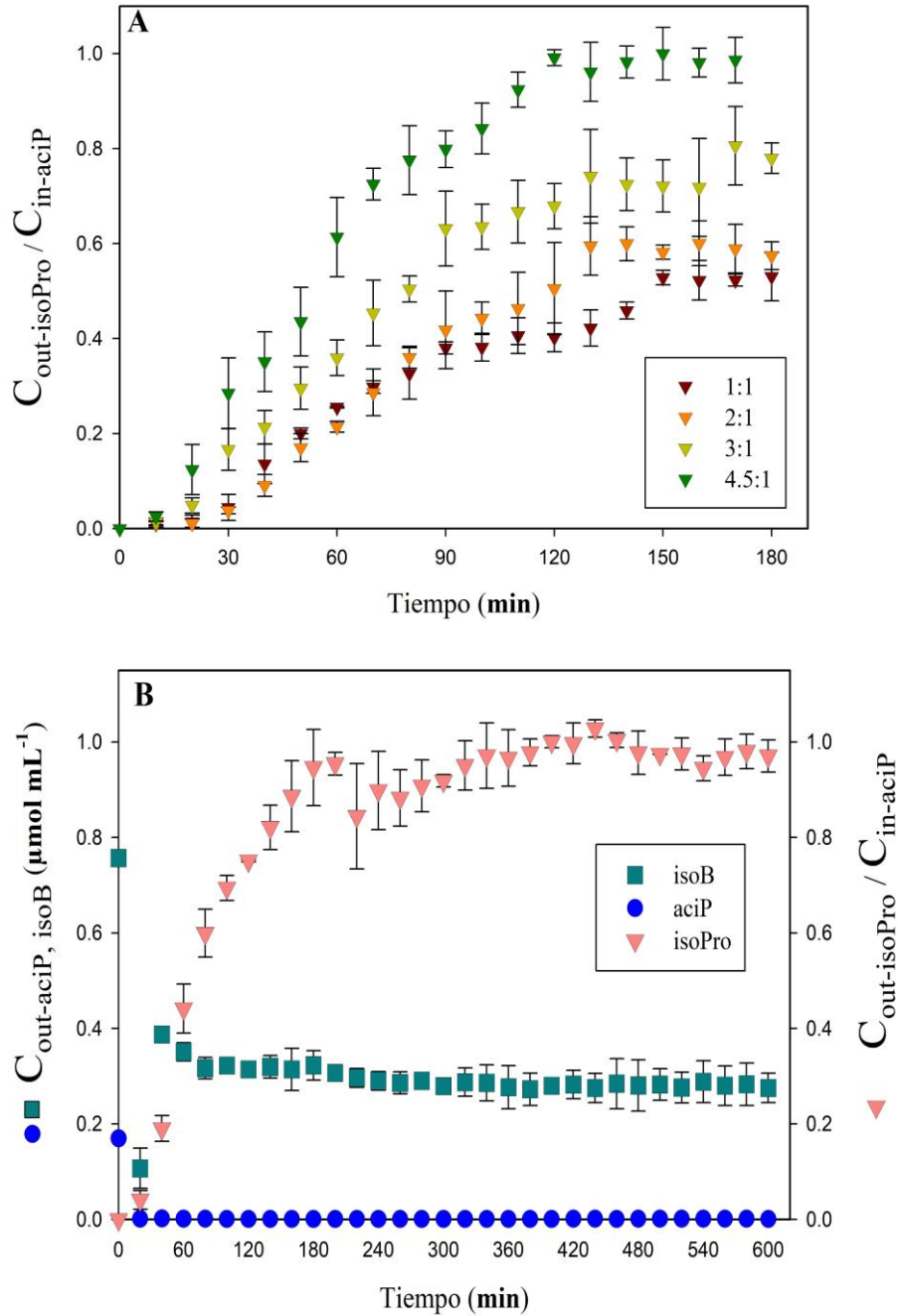
#### 8.3.4. Efecto de la relación molar de sustratos y estabilidad operacional de CalB-IP.

Como última etapa del estudio de la producción de isoPro en sistema S/G utilizando CalB-IP, se evaluó el efecto de la relación molar isoB:aciP en la síntesis de isoPro. Así como, la estabilidad operacional en las mejores condiciones según los resultados de las etapas anteriores.

Para ello durante este apartado se realizaron diferentes curvas de progreso fijando el flujo de alimentación, y por ende la concentración de aciP en la alimentación e incrementando los respectivos valores de isoB. Para ello, se utilizó un flujo de N<sub>2</sub> en el tanque de aciP de aproximadamente ~1/3 del utilizado en los ensayos previos con el fin de evitar afectar el rendimiento en la recolección de muestra debido al incremento en los flujos totales.

Como se puede observar en la **Figura 15A** existió un efecto positivo del incremento de la relación molar de isoB en el flujo de alimentación sobre el rendimiento de conversión a isoPro, ya que conforme se fue incrementando la concentración de isoB se incrementó la velocidad de producción de isoPro, obteniendo las mejores concentraciones adimensionales  $C_{\text{out-isoPro}}/C_{\text{in-aciP}}$  con la relación molar más alta de 4.5:1 la cual fue de  $0.983 \pm 0.038$ . Lo que representó un rendimiento de conversión del 98.3 % durante el estado estacionario, el cual comenzó alrededor de los 120 min, seguida de las velocidades obtenidas con la relación 3:1 que fueron de  $0.731 \pm 0.075$  (73.1 %), con 2:1 fueron de  $0.578 \pm 0.058$  (57.8 %), y por último, las velocidades promedio más bajas de obtuvieron con relación equimolar la cual fue de  $0.476 \pm 0.057$ . Aunque durante el estado estacionario las velocidades de producción promedio fueron más altas en la relación 2:1 respecto a la 1:1 se puede apreciar que el comportamiento durante toda la curva de progreso fue muy similar, de hecho, estadísticamente no existió diferencia significativa entre ellas.

El comportamiento observado durante estos ensayos va de la mano a lo reportado para reacciones de esterificación siguiendo el fundamento del principio de Le Chatelier. En donde, haciendo uso de enzimas como catalizador y al incrementar la concentración del alcohol en cuestión se modifica el equilibrio químico de la reacción hacia los productos y aumenta la velocidad de reacción, hasta un punto en donde puede causar inhibición (García-Martínez *et al.*, 2022; Zhong *et al.*, 2013). En este caso en particular parece ser que dicha inhibición no se alcanzó y todos los incrementos de concentración de isoB reflejaron un incremento en la velocidad de producción de isoPro. Kuperkar *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la relación molar en la síntesis de isoPro en un sistema libre de solventes, obteniendo resultados similares. Los mejores rendimientos de conversión se obtuvieron con una relación molar aciP:isoB de 1:4, aunque sin una amplia diferencia con lo obtenido con 1:3, y reportando el papel inhibitorio del isoB en la reacción a altas concentraciones.



**Figura 15.** (A) Curvas de progreso del efecto de la relación molar en la producción de isoPro (aciP:isoB → 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4.5); (B) Estabilidad operacional de CalB-IP en el sistema S/G durante 10 h de operación continua. (Condiciones de operación: 55 °C,  $a_w$  0.11). Los resultados muestran la media de tres réplicas con barras de error que representan una desviación estándar del valor medio.

Por otro lado, un dato relevante es que, aunque isoB puede en algún momento, llegar a ser un inhibidor de la enzima, la forma tradicional de empujar el equilibrio de la reacción hacia adelante en este tipo de reacciones es aumentar la concentración de nucleófilos ya que con ello habrá más moléculas disponibles para reaccionar con el complejo enzimático modificado que contiene el grupo acilo (primer paso del mecanismo Bi Bi Ping-Pong, **Figura 14C**). En contraparte, es bien sabido en la literatura del efecto negativo del incremento de la concentración del ácido sobre la enzima debido a la disminución en el pH, su efecto inhibidor durante la segunda etapa de la reacción (“Pong”) e incluso irreversiblemente desnaturizante (Krishna & Karanth, 2001; Van Hecke *et al.*, 2024). Por último, en la **Figura 15B** se muestra que, utilizando las condiciones operacionales previamente seleccionadas como las mejores, tales como la  $a_w$  0.11 y la relación molar isoB:aciP (4.5:1 respectivamente), es posible mantener la reacción de síntesis de isoPro por lo menos durante 10 h. Manteniendo dicha producción aproximadamente durante 7 h en el estado estacionario, el cual inicio a los 160 min teniendo una relación  $C_{out-isoPro} / C_{in-aciP}$  de aproximadamente  $0.982 \pm 0.034$ , lo que brindó rendimientos de conversión con valores entre el 92-100%.

Estos resultados son prometedores ya que se podría mantener dicha velocidad de producción en continuo durante una mayor cantidad de tiempo, manteniendo el rendimiento de conversión a producto a un alto nivel. Esto se puede corroborar observando el eje Y izquierdo de la **Figura 15B** en donde a la salida del reactor la concentración del reactivo limitante aciP es prácticamente 0 y la cual se mantiene en el tiempo. Es de suma importancia mencionar que una gran ventaja del sistema S/G es que, trabajando en continuo, tanto los sustratos no consumidos como ambos productos de reacción (isoPro y agua) se liberan constantemente del reactor evitando así acumulación de estos y por consiguiente evita una posible inhibición de la reacción, esto es de gran ayuda ya que el sistema catalítico se mantiene trabajando sin disminución significativa en la velocidad de producción (Cordero-Soto *et al.*, 2020).

#### 8.4. Conclusiones

En esta primera etapa del proyecto se evaluó el potencial de la biocatálisis S/G como vía alternativa en la síntesis de ésteres, centrándose explícitamente en la producción de isoPro a partir de aciP e isoB utilizando el producto comercial CalB-IP como catalizador. Los resultados

obtenidos elucidaron el papel de los mecanismos de adsorción, desorción y difusión intrapartícula en las tasas de producción de isoPro, proporcionando información sobre el mecanismo de reacción S/G implicado en la aplicación de CalB-IP. Los experimentos nos permitieron determinar la capacidad de adsorción tanto de ECR como de CalB-IP para las especies reactantes, evaluando la reversibilidad de la adsorción e identificando el tipo de sorción (física o biológica) que se produce en ambos casos. Los resultados indicaron que la ECR presenta una capacidad de adsorción física significativa, debido a que fue reversible a la temperatura de reacción estudiada (55 °C). Además, se reconocieron diferencias sustanciales importantes en el comportamiento de adsorción entre aciP e isoB, al evaluar la influencia de  $a_w$  en las respuestas del biorreactor. Se observó que los valores más altos de  $a_w$  presentaron un efecto negativo en la adsorción de isoB y de la producción de isoPro principalmente. Por el contrario, la adsorción de aciP mostró insensibilidad a las variaciones de  $a_w$ .

Los experimentos de adsorción-desorción pusieron de manifiesto que las resistencias al transporte difusional intrapartícula eran más pronunciadas en aciP que las limitaciones mínimas observadas en isoB. En consecuencia, este efecto repercutió de manera significativa en las velocidades de adsorción, desorción y reacción. En cuanto a la reacción, se corroboró el fundamento del mecanismo de reacción Bi-Bi Ping-Pong para la síntesis de isoPro, identificando el impacto de los tiempos característicos de adsorción, desorción y transporte de masa intrapartícula en las tasas de producción de isoPro lo que puede atribuirse a las propiedades estructurales del ECR a pesar de su naturaleza hidrofóbica. Por último, se identificó un efecto positivo del incremento de la relación molar de isoB:aciP en el medio de reacción, pasando de un rendimiento de conversión de 47.62 % a uno de 98.37 % al incrementar 4.5 veces la relación molar de isoB. Considerando el efecto observado del cambio en los valores de  $a_w$  y relación molar, se evaluó la estabilidad operacional del sistema S/G con el biocatalizador comercial logrando la producción de isoPro durante 10 h, en las cuales 7 h de estas se permaneció en estado estacionario manteniendo un alto rendimiento de conversión en las condiciones seleccionadas  $a_w$  0.11 y relación isoB:aciP 4.5:1.

## 9. Bloque B. Evaluación de agregados entrecruzados de CalB con BSA (CalB-CLEA) en el sistema S/G

### 9.1. Resumen

En este 2do bloque de investigación se examinó la viabilidad y eficacia de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA por sus siglas en inglés) de la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como “*co-feeder*” o protector y glutaraldehído (GA) como agente entrecruzante. Se presenta el biocatalizador CalB-CLEA como alternativa verde, eco-amigable y sostenible al biocatalizador comercial CalB-IP utilizado durante el bloque A para la producción de isoPro en sistema S/G. Debido a la naturaleza del sistema, se incorporó BSA al inmovilizado con el fin de conferir cuerpo al CLEA y permitir ser empacado. Como primera etapa se evaluó el efecto del volumen de cuerpo y nivel de entrecruzamiento de los CalB-CLEA utilizando 5 niveles de concentración de BSA y 3 niveles de GA; tomando como criterio de selección la capacidad de los CalB-CLEA para sintetizar isoPro en *n*-heptano (medio de reacción), su estabilidad térmica y operativa, y su actividad hidrolítica. Se seleccionó la formulación de 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA y 3% de GA para su posterior evaluación en sistema S/G. Posteriormente, se evaluó el efecto de la actividad de agua en sistema S/G empacando 200 mg de CalB-CLEA, el rendimiento de conversión más alto fue de 48.68 % obtenido a una *a<sub>w</sub>* de 0.52. Después se evaluó el efecto del incremento de la cantidad de catalizador empacado en el biorreactor, identificando que con 600 mg de la CalB-CLEA el rendimiento de conversión a producto se aumentó hasta un 91.71 % al valor de *a<sub>w</sub>* previamente seleccionado. Las condiciones de reacción en el sistema S/G incluyeron un caudal de nitrógeno de 62 mL min<sup>-1</sup>, relación molar de 1:4 (aciP:isoB) a 55 °C y 585 mm Hg de presión. Condiciones de reacción a las cuales se logró mantener una correcta estabilidad operacional al sostener la síntesis de isoPro durante 25 h de forma continua sin perder el 50 % de su capacidad catalítica. Los resultados obtenidos al evaluar CalB-CLEA en sistema S/G se compararon con los identificados en el bloque A al empacar 1.0 g de CalB Immo Plus™ (CalB-IP). La comparación se realizó en primera instancia considerando la Productividad volumétrica (STY) y el número de recambio total (TTN) (mol de producto mol<sup>-1</sup> de enzima) durante el estado estacionario, y el cual fue ocho veces menor que el obtenido con CalB-CLEA. Por último, se compararon 3 procesos a nivel de métricas verdes (o verdor) en unidad de masa (CalB-CLEA en *n*-heptano y en sistema S/G y CalB-IP en sistema S/G). Los resultados demostraron que la

biocatálisis S/G utilizando CalB-CLEA elimina los costes de eliminación de la resina, obteniendo rendimientos de conversión similares con cargas enzimáticas más bajas, y que a su vez se obtienen mejores métricas verdes. Lo que en global lo define como un proceso más sostenible ampliamente llamativo en la búsqueda de esteres como el isoPro a nivel industrial, disminuyendo los residuos asociados al proceso dada la naturaleza biodegradable del biocatalizador propuesto y a las características intrínsecas del sistema biocatalítico S/G.

## 9.2. Metodología

### 9.2.1. Producción de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) a partir de CalB.

El objetivo de esta sección fue evaluar cómo afecta el uso de BSA y la concentración del agente entrecruzante GA en el cuerpo (tamaño de partícula) de la CLEA. Es esencial aumentar el tamaño de las partículas para su aplicación en el sistema S/G y lograr empacarlas en el interior del biorreactor S/G garantizando al mismo tiempo que la actividad catalítica de la enzima no se vea comprometida. Para producir la CLEA se utilizaron cinco concentraciones de BSA (5, 10, 15, 20 y 40 mg mL<sup>-1</sup>) y tres concentraciones de GA (0.5, 1 y 3 % v/v). En primer lugar, se colocó el peso requerido de BSA sólida en tubos Eppendorf de 2 mL. Antes de la inmovilización, la CalB Lipozyme™ comercial se intercambió a un buffer fosfato sódico (50 mM, pH 7) y se realizaron lavados utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial (Amicon Ultra-15) equipado con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa, eliminando eficazmente los excipientes. A continuación, se añadieron 70 µL de solución de CalB (7% V<sub>T</sub>; la carga enzimática ofrecida fue de 4 U mL<sup>-1</sup> – 19 U mg<sup>-1</sup> de proteína, la cual se determinó mediante el método de Bradford) y el volumen de buffer necesario de fosfato sódico (50 mM, pH 7) para alcanzar el 10% del volumen total (considerando el volumen de GA dentro del mismo 10%). La BSA se disolvió completamente con la solución de CalB utilizando un Mini Spin. A continuación, se añadieron 900 µL de *tert*-butanol (agente precipitante), se agitó vigorosamente durante 30 segundos, se añadió el volumen necesario de GA y se agitó vigorosamente durante otros 30 segundos. A continuación, se colocó la mezcla en un agitador rotatorio (Biosan "Multi Bio RS-24") a 40 rpm y se incubó durante 3.5 h a temperatura ambiente, agitando cada 30 segundos en un ángulo de 60°. Tras el tiempo de entrecruzamiento, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm y 25 °C durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante y el GA no reaccionado. La CLEA (pellet) se lavó tres veces (900 µL x 3 veces)

utilizando buffer fosfato sódico (50 mM, pH 7). Después de cada lavado, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm y 4 °C, y se recogieron los sobrenadantes para cuantificar la enzima liberada durante el lavado. Se evaluaron las actividades de hidrólisis y síntesis de la CalB-CLEA resultante para valorar la eficacia del proceso de inmovilización. Posteriormente, se seleccionaron las muestras que presentaban las mejores características en cuanto a capacidad de síntesis y estabilidad térmica.

A continuación, se evaluó el impacto de la actividad del agua ( $a_w$ ) en la síntesis y el número de ciclos catalíticos para valorar la posible pérdida de actividad y determinar la estabilidad del biocatalizador.

### 9.2.2. Actividad de hidrólisis y estabilidad térmica del biocatalizador

Durante el proceso de inmovilización, la actividad hidrolítica tanto de la CalB soluble como de la inmovilizada se midió utilizando un ensayo colorimétrico con *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPBu) como sustrato. La mezcla de reacción estaba compuesta por 0.5 mM de *p*-NPBu en 50 mM de buffer fosfato sódico a pH 7 con un 1% v/v de acetonitrilo (utilizado para preparar la solución madre concentrada de 50 mM de *p*-NPBu). Para el ensayo, se colocaron 10 µL de suspensión de CalB-CLEA soluble o inmovilizada en una microplaca de 96 pocillos, seguidos de 200 µL de la mezcla de reacción. A continuación, la placa se incubó a 30 °C con agitación continua. Para cuantificar el *p*-nitrofenol liberado, se registró la absorbancia a 348 nm utilizando un lector de microplacas BioTek Epoch2 durante al menos 5 minutos.

La actividad CalB-CLEA ( $U\ mL^{-1}$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\Delta A V_T}{\varepsilon l V_e}$$

Donde:  $A$  es la actividad CalB-CLEA ( $U\ mL^{-1}$ ),  $\Delta A$  es la pendiente ( $\min^{-1}$ ),  $V_T$  es el volumen total de reacción (mL),  $V_e$  es el volumen de enzima (mL),  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon$  para *p*-nitrofenol =  $5.4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ ), y  $l$  es la longitud del pocillo, donde 360 µL corresponden a 1.0 cm. Una Unidad (U) se definió como la cantidad de biocatalizador necesaria para producir 1.0 µmol *p*-nitrofenol por minuto. Tras determinar la actividad ( $U\ mL^{-1}$ ) se calculó la actividad específica del biocatalizador dividiendo  $U\ mL^{-1}$  por la masa (mg) de CalB presente en el CLEA.

Para las pruebas de estabilidad térmica, se resuspendieron 150 µL de suspensión de CalB-CLEA en 250 µL de buffer fosfato sódico (50 mM, pH 7), se incubaron a 55 °C durante 2 h en un termobloque y, finalmente, se midió la actividad enzimática residual de la forma antes descrita.

### 9.2.3. Actividad de síntesis de CalB-CLEA utilizando *n*-heptano

Los CalB-CLEA obtenidos mediante el procedimiento descrito en la subsección 9.2.1 se equilibraron a una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.11 incubándolos a 4 °C con una solución acuosa saturada de LiCl durante 48 h dentro de un recipiente sellado. Los CLEA se colocaron por separado dentro del contenedor, asegurando la exposición a la humedad controlada generada por la solución de LiCl sin contacto directo con la fase líquida. La actividad de síntesis de CalB-CLEA se evaluó midiendo la producción de isoPro utilizando el contenido de CalB-CLEA presente en 200  $\mu$ L de suspensión posterior a la eliminación del agua presente mediante lavados con disolvente orgánico (*n*-hexano). El medio de reacción consistió en 1 mL de *n*-heptano que contenía 400 mM de isoB y 100 mM de aciP (relación molar 4:1). La reacción se llevó a cabo a 55 °C y 180 rpm durante 3 h. Posteriormente, se determinó la concentración del éster producido (isoPro) mediante cromatografía de gases (GC). La actividad de síntesis ( $U_s$ ) se expresó como el total de micromoles de isoPro producidos por miligramo de enzima inmovilizada ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$ ) por minuto, junto con el rendimiento del producto en relación con el reactivo limitante (aciP).

### 9.2.4. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de isoPro en *n*-heptano

Para investigar el impacto de la actividad del agua ( $a_w$ ) en la síntesis de isoPro, se pesaron 5 mg de CalB-CLEA previamente liofilizada y se dejaron equilibrar durante 48 h a 4 °C con soluciones saturadas de sales con valores de  $a_w$  conocidos: LiCl (0.11),  $\text{MgCl}_2$  (0.32),  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  (0.52) y NaCl (0.75). Después, se añadió 1 mL de 400 mM de isoB y 100 mM de aciP (relación molar 4:1) en *n*-heptano. A continuación, la mezcla se mantuvo independientemente a 55 °C y 180 rpm durante 30, 90, 180 y 270 minutos. Se tomaron muestras duplicadas en cada momento y, tras el tiempo de reacción requerido, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nailon (0.45  $\mu\text{m}$ ) y se analizó por CG.

### 9.2.5. Reciclabilidad de los CalB-CLEA

Para evaluar la reciclabilidad, se utilizaron 5 mg de CalB-CLEA liofilizado y se dejaron equilibrar con la solución saturada elegida en la etapa anterior ( $a_w$  0.52) durante 48 h a 4 °C. Posteriormente, se añadió 1 mL del mismo medio de reacción (400 mM de isoB y 100 mM de aciP en *n*-heptano) y se incubó a 55 °C durante 2 h y 180 rpm. Después, la mezcla se centrifugó, y el

sobrenadante se filtró y analizó por CG. El pellet de CalB-CLEA formado se lavó dos veces con *n*-heptano (1 mL en cada lavado), con pasos de centrifugación intermedios. Por último, se añadió 1 mL de medio de reacción nuevo y se repitió el proceso hasta completar diez ciclos de reacción.

### 9.2.6. Especificaciones sistema S/G

El biorreactor S/G utilizado en esta sección consistía en una columna cilíndrica de vidrio de 22 cm de altura y 0.8 cm de diámetro interno. Se empacó inicialmente con 100, 200, 400 o 600 mg de CalB-CLEA liofilizada (tratamiento 10 mg mL<sup>-1</sup> BSA y 3 % GA “CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub>”) según lo requerido por el experimento.

### 9.2.7. Efecto de la $a_w$ y de la carga de biocatalizador en el sistema S/G

Para establecer la  $a_w$  inicial, se utilizaron las mismas soluciones salinas saturadas aplicadas en el análisis de medio orgánico [LiCl (0.11), MgCl<sub>2</sub> (0.32), Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.52) y NaCl (0.75)]. 200 mg de CalB-CLEA liofilizado se llevaron a equilibrio con estas soluciones durante 72 h a 4 °C (se corroboró la  $a_w$  de todas las muestras utilizando un instrumento Aqualab CX-2) y posteriormente se empacaron en la columna. Las condiciones de operación del sistema S/G incluyeron un flujo total  $Q_{N_2}$  de 62 mL min<sup>-1</sup>, reflejándose en caudales molares de  $\dot{n}_{isoB}$ : 27.72 y  $\dot{n}_{aciP}$ : 7.23 μmol min<sup>-1</sup> respectivamente (relación ~1:4, aciP:isoB). Para la evaluación de la carga biocatalítica, se empacaron en el biorreactor S/G 100, 200, 400 y 600 mg de CalB-CLEA previamente equilibrados  $a_w$  0.52, lo que brindó alturas de lecho empacado de ~2.5, 5.2, 8.5 y 14.6 cm, respectivamente. Ambas pruebas se realizaron a 55 °C y 585 mm Hg tomando muestras cada 10 min durante 180 min.

### 9.2.8. Estabilidad y reciclabilidad de CalB-CLEA en el sistema S/G.

Para evaluar la estabilidad y reciclabilidad en el sistema S/G, se equilibraron 600 mg de CalB-CLEA liofilizado con la solución saturada seleccionada ( $a_w$  0.52) durante 72 h a 4 °C, y posteriormente se empacaron en la columna. Las condiciones del sistema S/G incluyeron un flujo total  $Q_{N_2}$  de 62 mL min<sup>-1</sup>, lo que corresponde a flujos molares de  $N_{isoB}$ : 36.52 y  $N_{aciP}$ : 9.17 μmol min<sup>-1</sup>, respectivamente. Las velocidades de reacción de la producción de isoPro se monitorearon continuamente durante 9 h. Después de cada ciclo, la columna empacada se desconectó del flujo de sustratos y se almacenó a 4 °C, equilibrándose de nuevo con la misma solución saturada. Al día

siguiente, se volvió a conectar la columna y se repitió el ensayo cinético durante otras 9 h. Este ciclo se repitió diariamente hasta que el biocatalizador perdió el 50% de su actividad. Todos los experimentos se realizaron a 55 °C y 585 mm Hg, y se tomaron muestras cada 20 min.

### 9.2.9. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM (aplicación de haz focalizado de electrones para escanear la superficie de una muestra) para la caracterización de los CalB-CLEAS se obtuvieron con el apoyo y asistencia del laboratorio de microscopía electrónica de barrido de la UAM-Iztapalapa utilizando un SEM Jeol 7600F. Debido a que la muestra no es conductora, se realizó un recubrimiento de oro, lo cual favorece la generación y emisión de electrones secundarios para producir imágenes con mejor contraste y resolución superficial. Los parámetros de distribución del tamaño de partícula y de análisis por SEM se determinaron con la ayuda del software ImageJ.

### 9.2.10. Cálculo de parámetros operativos y ambientales basados en masa

○ Rendimiento de conversión (%):  $\frac{\text{Moles de producto}}{\text{Moles de reactivo limitante}} * 100$

○ STY:  $\frac{\text{Masa de producto}}{\text{Volumen de reactor} * \text{Tiempo}}$

○ TTN:  $\frac{\text{Moles de producto}}{\text{Moles de enzima}}$

○ Modelo de desactivación 1<sup>er</sup> orden:  $\frac{dA}{dt} = -k_d A \rightarrow A = A_0 e^{-k_d t}$

● Factor E:  $\frac{\text{Masa total de residuos}}{\text{Masa del producto final}}$

● Economía atómica "AE" (%):  $\frac{\text{Masa molar del producto}}{\text{Suma de masas molares de reactivos}} * 100$

● Rendimiento másico de reacción "RME" (%):  $\frac{\text{Masa del producto}}{\text{Masa total de reactivos}} * 100$

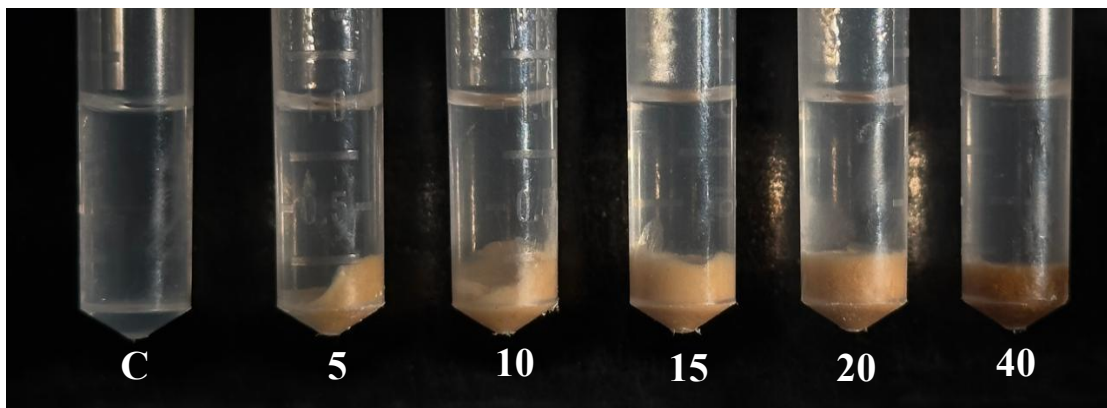
● Productividad másica "MP" (%):  $\frac{\text{Masa del producto}}{\text{Masa total de reactivos (incluyendo solventes)}} * 100$

● Economía de Carbono "CE" (%):  $\frac{\text{Carbono en el producto}}{\text{Carbono total en reactivos}} * 100$

### 9.3.1. Actividad de hidrólisis y termoestabilidad

Los CalB-CLEA se obtuvieron utilizando *tert*-butanol como agente precipitante y GA como agente entrecruzante, ya que estos reactivos se habían empleado con éxito para este fin en estudios anteriores como el de Schoevaart *et al.* (2004). Debido a su naturaleza hidrofóbica y a su estructura voluminosa y ramificada, el *tert*-butanol ejerce un efecto más suave sobre la conformación nativa de la enzima en comparación con otros precipitantes. Este promueve una precipitación rápida pero que a la vez favorece la formación de agregados compactos y homogéneos (como se mostrará en la **Figura 20**), preservando una conformación activa mediante interacciones entre la región hidrofóbica cercana al sitio activo de CalB y el precipitante (Park *et al.*, 2019). Los agregados físicos generados tras la precipitación enzimática se estabilizan por enlaces no covalentes derivados de interacciones con el agente precipitante. En este sentido Díaz-Vidal *et al.* (2019) reportaron que precipitantes como acetona, etanol y acetonitrilo resultan en una pobre retención de la actividad catalítica, atribuible a los estados conformacionales adoptados por la enzima.

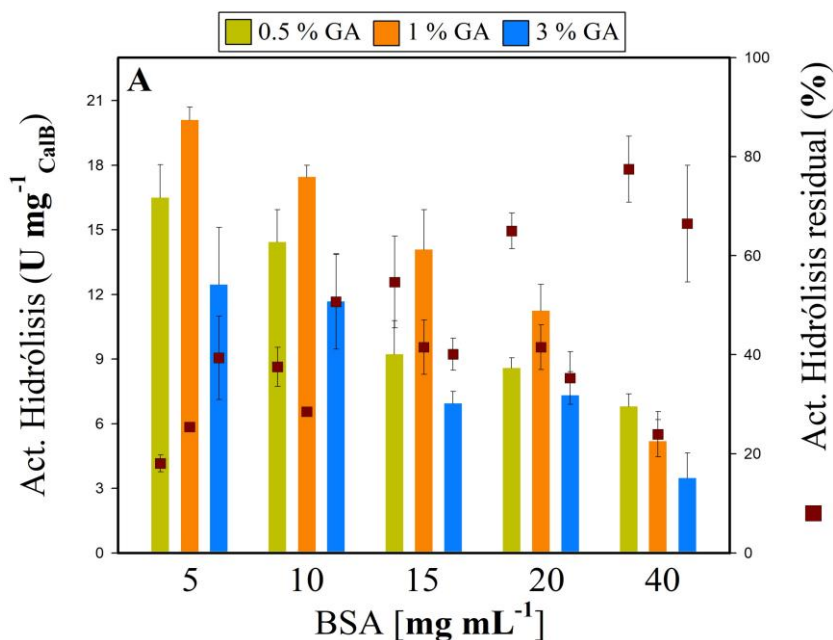
El objetivo principal de la incorporación de BSA en este apartado fue aumentar tanto la masa corporal como la porosidad de los CalB-CLEA manteniendo la actividad enzimática y asegurando su aplicabilidad en un sistema biocatalítico S/G. Para conseguirlo, se evaluó el efecto de las concentraciones de BSA y GA sobre el aumento de la masa corporal y el rendimiento catalítico del biocatalizador CLEA final. Dada la alta solubilidad de la BSA (~400-500 mg mL<sup>-1</sup> en agua), evaluamos concentraciones de 5, 10, 20 y 40 mg mL<sup>-1</sup> y 3 concentraciones de GA (0.5, 1.0 y 3.0%). Esto dio lugar a una variedad de biocatalizadores denominados como CalB-CLEA-B<sub>x</sub>G<sub>y</sub> dependiendo del tratamiento, donde *x* representa la concentración de BSA, *y* corresponde a la concentración de GA. Por ejemplo, CalB-CLEA-B<sub>5</sub>G<sub>0.5</sub> refiere al biocatalizador preparado con 5 mg mL<sup>-1</sup> de BSA y 0.5% de GA. Bajo las condiciones de entrecruzamiento utilizadas, todos los CalB-CLEAs producidos alcanzaron rendimientos de inmovilización superiores al 95% (*Tabla 7*). Además, fue visible que el aumento de la masa corporal de los CalB-CLEAs y la intensidad del color naranja adquirido debido a la reacción con GA fueron directamente proporcionales a los aumentos de las concentraciones de BSA y GA respectivamente, obteniendo los inmovilizados más robustos con CalB-CLEA-B<sub>40</sub> con los diferentes niveles de GA (**Figura 16**).

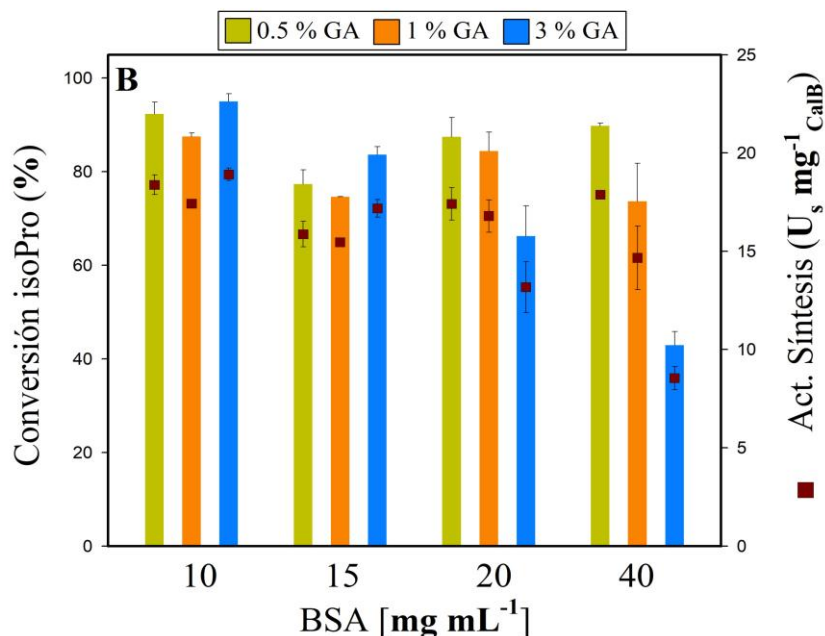


**Figura 16.** Efecto de la concentración de BSA [ $\text{mg mL}^{-1}$ ] en el cuerpo de los CLEA producidos utilizando 3 % GA (C: CalB sin BSA).

En la **Figura 17A** y la *Tabla 7* se muestran la actividad hidrolítica y la estabilidad térmica de los CalB-CLEA preparados con los tratamientos al variar las concentraciones de BSA y GA. Se observa un efecto negativo entre la carga proteica (aumento de la masa corporal) y la actividad hidrolítica, tal y como se muestra en el eje Y izquierdo. La mayor actividad obtenida fue de  $20.09 \pm 0.60 \text{ U mg}^{-1}$  la cual se alcanzó con CalB-CLEA-B<sub>5</sub>G<sub>1</sub>, que utilizó la menor concentración de BSA. Por el contrario, CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>3</sub>, preparado con la mayor concentración de BSA, mostró la actividad más baja, la cual fue aproximadamente 6 veces inferior a la antes mencionada. Por el contrario, el incremento en la concentración de GA del 0.5 al 1 % durante la inmovilización de CalB mejoró la actividad hidrolítica. Sin embargo, aumentos superiores al 1% de GA condujeron a una disminución de la misma en todos los tratamientos, excepto para el CalB-CLEA preparado con  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  de BSA, donde la actividad disminuyó consistentemente con el aumento general de la concentración de GA. Guauque Torres *et al.* (2014) investigaron la síntesis de CalB-CLEA utilizando BSA como proteína co-alimentadora “*co-feeder*” y GA como entrecruzante, evaluando el efecto de la relación de masa GA-proteína sobre la actividad CLEA. Encontraron que el aumento de la concentración de GA mejoraba la actividad catalítica recuperada, con el valor más alto observado en una relación de 1.67 mg de GA por mg de CalB (equivalente a aproximadamente 120 mg de GA, estimado, reportado). Estos resultados coinciden con los obtenidos en este apartado del trabajo. De hecho, nuestro trabajo amplía estos conocimientos al demostrar que pueden utilizarse concentraciones de GA aún más elevadas (hasta  $\sim 200 \text{ mg}$  de GA por mg de CalB) sin comprometer la actividad catalítica, lo que ofrece información valiosa sobre los posibles límites de concentración al aplicar GA en la preparación de CLEA.

El aumento de la masa corporal en CalB-CLEA (directamente proporcional a la concentración de BSA) mejora la estabilidad térmica, que se determinó como el porcentaje de actividad recuperada o retenida después de 2 h de incubación a 55 °C (**Figura 17A**, eje Y del lado derecho). Estos resultados coinciden con reportes en el estado del arte, en los que el efecto de la BSA tiene un impacto positivo en la estabilidad térmica de los CLEA formulados (Guauque Torres *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2012). Esto puede atribuirse a la capa protectora formada por la BSA entrecruzada, que mejora la estabilidad de la enzima al incorporar mayor número de grupos funcionales de cuales echar mano durante la reacción con GA. El biocatalizador más termoestable fue el CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub> manteniendo un  $77.4 \pm 6.7$  % de actividad residual, mientras que el menos estable fue el CalB-CLEA-B<sub>5</sub>G<sub>0.5</sub> reteniendo sólo un  $18.1 \pm 1.7$  %. Además, el aumento de la concentración de GA tiene un efecto positivo sobre la termoestabilidad, pero sólo hasta aquellos que contenían 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA. Más allá de este umbral, la tendencia se invierte, con una disminución de la actividad retenida a medida que la concentración de GA aumenta del 0.5 al 3 %. Esta disminución puede atribuirse a un entrecruzamiento excesivo de la enzima con la BSA, que podría perturbar las interacciones intramoleculares esenciales para mantener la estructura tridimensional de la enzima. Esta desestabilización estructural probablemente conduce a una reducción de la actividad catalítica, un fenómeno observado previamente en estudios similares con enzimas de otra naturaleza (Velasco-Lozano *et al.*, 2014).





**Figura 17.** (A) Efecto de las concentraciones de BSA y GA sobre la actividad de hidrólisis (barras) y la estabilidad térmica de las CalB-CLEA tras 2 h de incubación a 55 °C (■); (B) Actividad de síntesis de CalB-CLEA en *n*-heptano (400 mM isoB y 100 mM aciP) durante 3 h a 55 °C y 180 rpm, con las diferentes concentraciones de BSA y GA. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

Las tendencias observadas en la **Figura 17A** sirvieron como algunos de los criterios de selección, permitiéndonos evaluar el impacto del aumento de la masa corporal y el grado de entrecruzamiento en la determinación de las mejores condiciones de preparación. Aunque los CalB-CLEAs preparados con la menor concentración de BSA (5 mg mL<sup>-1</sup>) mostraron la mayor actividad de hidrólisis, estos biocatalizadores fueron descartados debido a su baja estabilidad térmica y a la insuficiente masa corporal de CLEA, ambos factores críticos para las condiciones de síntesis en sistema S/G. Por el contrario, aunque los CalB-CLEAs preparados con 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA mostraron una menor actividad, su estabilidad térmica fue significativamente mayor y obtuvieron el doble de masa corporal, lo cual fue un factor determinante para su selección. Por otro lado, consideramos la actividad de síntesis en disolvente orgánico del CalB-CLEA obtenido, ya que era necesario evaluar la actividad enzimática objetivo (producción de isoPro) para su aplicación en el sistema de biocatálisis S/G.

### 9.3.2. Actividad de síntesis en disolvente orgánico

Los diferentes CalB-CLEA preparados en la sección anterior se evaluaron para la síntesis de isoPro en *n*-heptano, lo que nos permitió evaluar el impacto de las concentraciones de BSA y GA en el rendimiento catalítico de los biocatalizadores en la reacción de síntesis de interés para este trabajo. Como se muestra en la **Figura 17B**, tras 3 h de reacción a 55 °C, los biocatalizadores preparados con concentraciones de BSA de 10 y 15 mg mL<sup>-1</sup> mostraron una correlación positiva entre el aumento de la concentración de GA y el rendimiento de la síntesis de isoPro. Entre ellos, CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> consiguió el mayor rendimiento de conversión a producto alcanzando 95.0 ± 1.62 %. Posteriormente, se observó un efecto negativo del aumento de la concentración de GA durante el entrecruzamiento a medida que aumentaba el contenido de BSA en el CLEA. En general, una vez rebasados los 15 mg mL<sup>-1</sup> de BSA los rendimientos de producto más bajos se obtuvieron con biocatalizadores preparados con 3 % de GA, identificando la disminución más pronunciada a 40 mg mL<sup>-1</sup> de BSA, que mostró el rendimiento de producto más bajo con 42.9 ± 2.93 %. En particular, aunque CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> alcanzó el mayor rendimiento de isoPro, siete de los doce biocatalizadores formulados de CalB-CLEA dieron lugar a rendimientos de isoPro superiores al 80%. Esto pone de manifiesto la notable capacidad de síntesis y estabilidad térmica de los CalB-CLEA producidos, enfatizando el efecto de las variables evaluadas.

En todas las pruebas de síntesis en *n*-heptano, los datos indican que tanto las concentraciones de GA como las de BSA influyen significativamente en el rendimiento de síntesis de los CalB-CLEA. Concretamente, a bajas concentraciones de BSA, se requiere una mayor concentración de GA para mejorar la estabilidad del biocatalizador. Por el contrario, a medida que aumenta la concentración de BSA, disminuye la estabilidad del biocatalizador debido al mayor grado de entrecruzamiento causado por el mayor contenido de la proteína BSA (un aumento de 4 veces al pasar de 10 a 40 mg mL<sup>-1</sup>). Este excesivo entrecruzamiento puede restringir la flexibilidad y movilidad de la enzima, lo que en primera instancia mermaría su eficacia catalítica. Estos resultados son consistentes con los reportados por Cui *et al.* (2016), quienes demostraron que los CLEAs formulados de la lipasa pancreática bovina, preparados con BSA como co-alimentador, exhibieron una actividad mejorada, alcanzando un máximo a 0.05 mg mL<sup>-1</sup> de BSA. Sin embargo, por encima de esta concentración, la actividad disminuyó a niveles incluso inferiores a los de los CLEAs preparados sin BSA. Además, informaron que concentraciones de GA superiores al 1%

v/v en su procedimiento inducen un entrecruzamiento excesivo, lo que limita la accesibilidad al sitio activo y, en consecuencia, reduce la actividad catalítica de los CLEAs resultantes.

Tabla 7. Resumen de resultados obtenidos de la evaluación del efecto de la concentración de BSA y GA en la preparación de CalB-CLEA con BSA como “co-feeder”.

CLEA	BSA (mg mL <sup>-1</sup> )	GA (% v/v)	Ψ (%) <sup>a</sup>	Actividad esp. recuperada (%) <sup>b</sup>	Estabilidad térmica (%) <sup>c</sup>	Rendimiento isoPro (%) <sup>d</sup>
A	5	0.5	99.7	89.5 ± 8.3	18.1 ± 1.7	-
B	10	0.5	99.3	78.3 ± 8.2	37.5 ± 3.9	92.3 ± 2.5
C	15	0.5	99.6	53.0 ± 9.0	54.7 ± 9.2	79.7 ± 3.3
<b>D</b>	<b>20</b>	<b>0.5</b>	<b>99.1</b>	<b>46.5 ± 2.6</b>	<b>65.0 ± 3.6</b>	<b>87.4 ± 4.1</b>
<b>E</b>	<b>40</b>	<b>0.5</b>	<b>95.6</b>	<b>36.9 ± 3.2</b>	<b>77.4 ± 6.7</b>	<b>89.8 ± 0.6</b>
F	5	1.0	99.7	96.2 ± 2.9	25.4 ± 0.8	NE
G	10	1.0	99.5	83.5 ± 2.6	28.5 ± 0.9	87.5 ± 0.7
H	15	1.0	97.3	80.9 ± 10.7	41.5 ± 5.5	77.6 ± 0.2
I	20	1.0	99.3	53.8 ± 5.8	41.5 ± 4.5	84.4 ± 4.1
J	40	1.0	98.1	24.8 ± 4.7	23.9 ± 4.6	73.6 ± 8.1
K	5	3.0	99.4	59.6 ± 12.5	39.3 ± 8.4	NE
<b>L</b>	<b>10</b>	<b>3.0</b>	<b>99.7</b>	<b>55.9 ± 10.6</b>	<b>50.7 ± 9.6</b>	<b>95.0 ± 1.6</b>
M	15	3.0	99.4	39.8 ± 3.2	40.1 ± 3.2	86.3 ± 2.2
N	20	3.0	99.4	35.0 ± 5.3	35.3 ± 5.3	66.2 ± 6.5
O	40	3.0	99.4	16.6 ± 5.6	66.6 ± 11.8	42.9 ± 2.9

<sup>a</sup> Rendimiento de inmovilización ( $\Psi$ ) = [(actividad soluble inicial - actividad en el sobrenadante) / actividad soluble inicial] x 100. <sup>b</sup> La actividad recuperada se calculó como el porcentaje de actividad hidrolítica (con *p*-NPBu como sustrato), en relación con la actividad específica inicial de la enzima soluble. <sup>c</sup> La estabilidad térmica se indica como actividad residual tras 2 h de incubación a 55 °C. <sup>d</sup> El rendimiento de conversión a isoPro se evaluó en *n*-heptano a 55 °C y 180 rpm. NE: No evaluado.

En primera instancia, en la **Figura 17B** se muestra la actividad de síntesis con base en el rendimiento de isoPro alcanzado en *n*-heptano a 55 °C durante un periodo de reacción de 2 h (eje Y izquierdo). Por otro lado, en el eje Y derecho se presenta la actividad de síntesis específica de CalB-CLEA, la cual se obtuvo al dividir la masa molar total del isoPro

---

producido por la masa del biocatalizador empleado, considerando únicamente la masa de la enzima y excluyendo la de BSA. Los resultados se expresan en unidades de actividad de síntesis ( $U_S$ ), definidas como  $\mu\text{mol}$  de isoPro por minuto y por miligramo de CalB inmovilizada en la forma CLEA. El efecto de las concentraciones de BSA y GA sobre la actividad de síntesis de los CLEA en *n*-heptano siguió una tendencia similar a la observada para la actividad hidrolítica con *p*-NPBu como sustrato (**Figura 16B, eje Y derecho**). El biocatalizador más activo sintéticamente fue CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> con un valor de  $18.91 \pm 0.32 U_S \text{ mg}^{-1}$  mientras que el menos activo fue CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> el cual presentó una actividad específica 2.22 veces menor. El aumento de la concentración de GA tiene un efecto perjudicial más pronunciado sobre CalB-CLEAs a concentraciones más altas de BSA, reduciendo la actividad específica de  $17.88 \pm 0.11$  a  $8.54 \pm 0.58 U_S \text{ mg}^{-1}$  (B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub> a B<sub>40</sub>G<sub>3</sub> respectivamente). Es crucial destacar esta información, ya que para futuras optimizaciones podrían explorar la posibilidad de aumentar la concentración de enzima durante la preparación de biocatalizadores inmovilizados, preservando al mismo tiempo la integridad estructural lograda en este estudio. Este enfoque podría aumentar la actividad enzimática y, en última instancia, mejorar la productividad por masa de CalB-CLEA.

Por último, la *Tabla 7* resume los resultados de todos los biocatalizadores CalB-CLEA preparados. D, E y L (resaltados en negrita) se identificaron como los candidatos más adecuados para su potencial aplicación en el sistema de biocatálisis S/G. Su selección consideró como criterios su actividad de síntesis en disolvente orgánico (*n*-heptano), su estabilidad térmica y la facilidad para cuantificar su actividad hidrolítica manteniendo una alta capacidad de esta. Los tratamientos seleccionados para las pruebas posteriores fueron: CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub>, CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> y CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub> respectivamente.

### 9.3.3. Efecto de la actividad del agua ( $a_w$ ) en la síntesis de isoPro en *n*-heptano

Una vez seleccionados los mejores biocatalizadores, investigamos el efecto de la  $a_w$  en la síntesis de isoPro en *n*-heptano durante 4.5 h de cinética de reacción. Los resultados demostraron que un aumento de  $a_w$  influyó positivamente en la velocidad de síntesis de CalB-CLEA (**Figura 18**). Este hallazgo contrasta fuertemente con informes previos de varios autores (Cruz-Martínez *et al.*, 2024; Belén *et al.*, 2015; García-Martínez *et al.*, 2022), donde informaron que la disminución de  $a_w$  mejora notablemente las tasas de síntesis en reacciones catalizadas por lipasas,

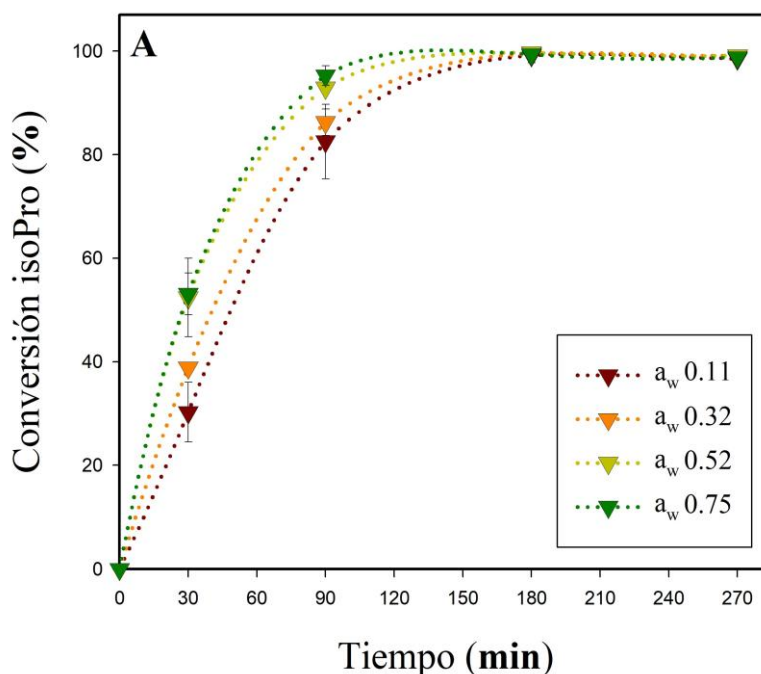
específicamente en reacciones como la esterificación. Una disminución de la  $a_w$  afecta directamente a la termodinámica de la reacción al desplazar el equilibrio hacia la síntesis de productos debido a la reducción del contenido de agua (López-Martínez *et al.*, 2020). Además, dichas moléculas de agua están estrechamente relacionadas con la movilidad y flexibilidad de la conformación de la enzima, que son críticas para la interacción con el sustrato. Las lipasas suelen requerir un contenido mínimo de agua para mantener su actividad, y una mayor rigidez se ha asociado a un mejor rendimiento sintético (Lamare *et al.*, 2004; Kulishova *et al.*, 2017).

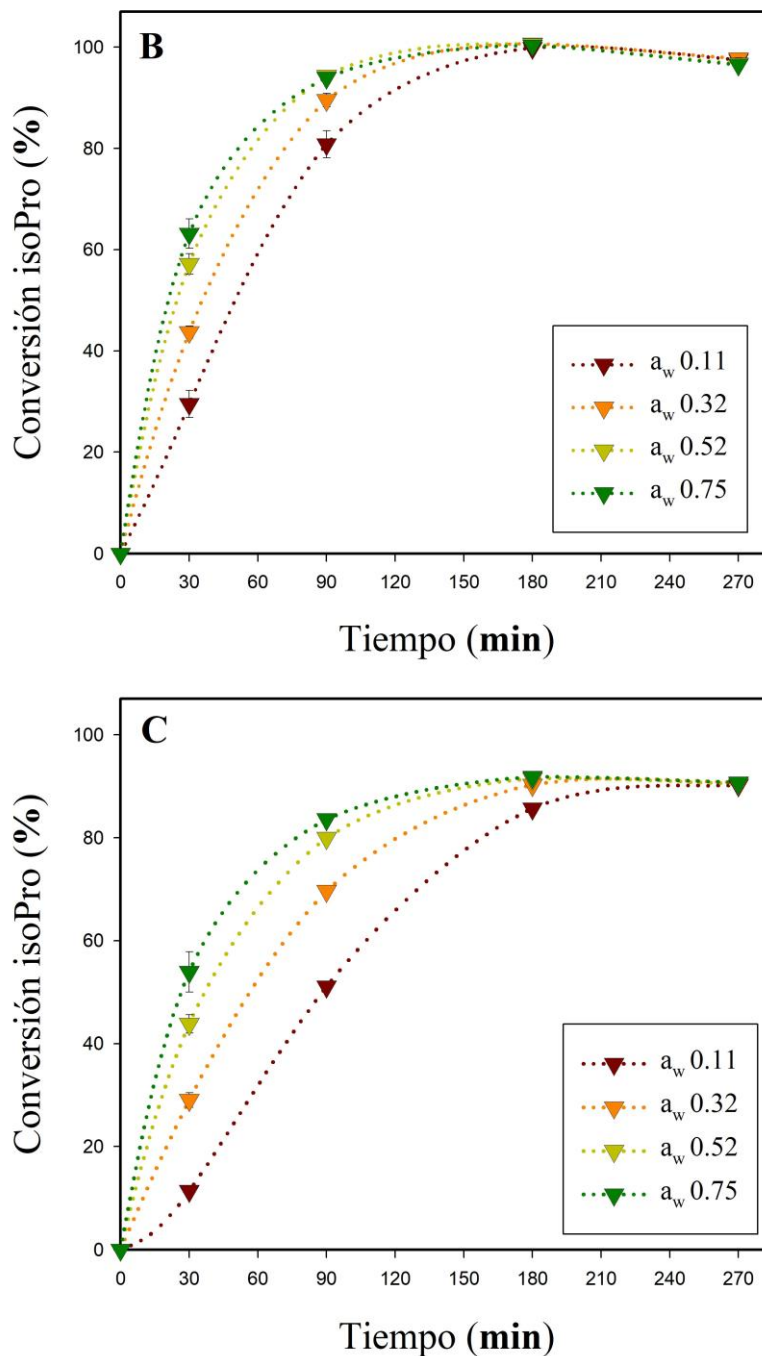
Después de 250 minutos de reacción, todos los biocatalizadores evaluados alcanzaron rendimientos de isoPro comparables, en un rango de 98 a 100 %, excepto las muestras de CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub>, que alcanzaron un máximo de aproximadamente 90 %. Sin embargo, en tiempos de reacción más cortos, la velocidad de síntesis durante los primeros 90 minutos varió dependiendo del biocatalizador utilizado y del contenido de  $a_w$ , como se detalla más adelante. La mayor velocidad de síntesis se obtuvo con CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> con la mayor  $a_w$  (0.75), alcanzando rendimientos superiores al 60 % en tan solo 30 minutos (**Figura 18A**), con una velocidad inicial de reacción de  $3.30 \pm 0.15 \mu\text{mol min}^{-1}$ . Le siguieron CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> ( $a_w$  0.52) y CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> ( $a_w$  0.75 y 0.52) (**Figura 18B**), con velocidades iniciales de  $2.92 \pm 0.15$ ,  $2.70 \pm 0.19$  y  $2.60 \pm 0.2 \mu\text{mol min}^{-1}$ , respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre estos valores.

Parece que, a concentraciones de BSA superiores a  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  en la masa del CLEA, las velocidades iniciales de reacción disminuyeron de forma significativa. En este contexto, el valor más bajo se observó con CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub> ( $a_w$  0.11), con  $0.74 \pm 0.21 \mu\text{mol min}^{-1}$  (**Figura 18C**). Cabe destacar que el incremento en la concentración de BSA dentro de la matriz del biocatalizador dio lugar a un aumento pronunciado en la diferencia entre las velocidades iniciales obtenidas a  $a_w$  0.75 respecto a las de 0.11, las cuales fueron 1.74-, 2.22- y 3.60 veces mayores con CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub>, CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> y CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub>, respectivamente. Estos resultados sugieren que altas cargas de BSA incrementan la densidad y rigidez del CLEA, reduciendo su porosidad interna y ralentizando la difusión del sustrato. Bajo condiciones de baja actividad de agua ( $a_w$ ), este efecto se ve exacerbado por una hidratación enzimática insuficiente, lo que limita aún más la flexibilidad conformacional y la accesibilidad al sitio activo (Cruz *et al.*, 2012). En conjunto, estos factores explican la disminución observada en la eficiencia catalítica y el aumento en la relación de velocidades iniciales a diferentes actividades de agua entre los biocatalizadores evaluados.

En concordancia con esta discusión y considerando el punto anterior, puede asumirse que una cantidad excesiva de BSA (por ejemplo, 40 mg mL<sup>-1</sup>) entrecruzada con una baja concentración de GA (0.5 % v/v) podría dejar grupos hidrofílicos sin reaccionar expuestos, lo que aumentaría su capacidad de adsorción de agua y, en consecuencia, favorecería fenómenos como los previamente descritos.

En general, la actividad del agua influye en la velocidad de reacción sólo durante la fase inicial de la reacción, pero no afecta significativamente a la capacidad máxima de síntesis ni al rendimiento de conversión en tiempos de reacción prolongados. Sin embargo, una cantidad excesiva de BSA disminuye el rendimiento del producto de reacción del biocatalizador en aproximadamente un 10%. Aunque no se observaron diferencias significativas en el comportamiento cinético con  $a_w$  0.75 y 0.52 en la mayoría de los casos evaluados, se seleccionó  $a_w$  0.52 para los experimentos posteriores. Desde una perspectiva termodinámica, esta elección garantiza la menor actividad de agua posible, favoreciendo el equilibrio de la reacción hacia la formación de producto en estudios posteriores. Esta consideración es especialmente relevante ya que los ensayos realizados hasta ahora se llevaron a cabo en sistemas batch sin eliminar el agua producida durante la esterificación. Sin embargo, esta limitación puede no ser tan crítica en sistemas continuos, como el sistema S/G.

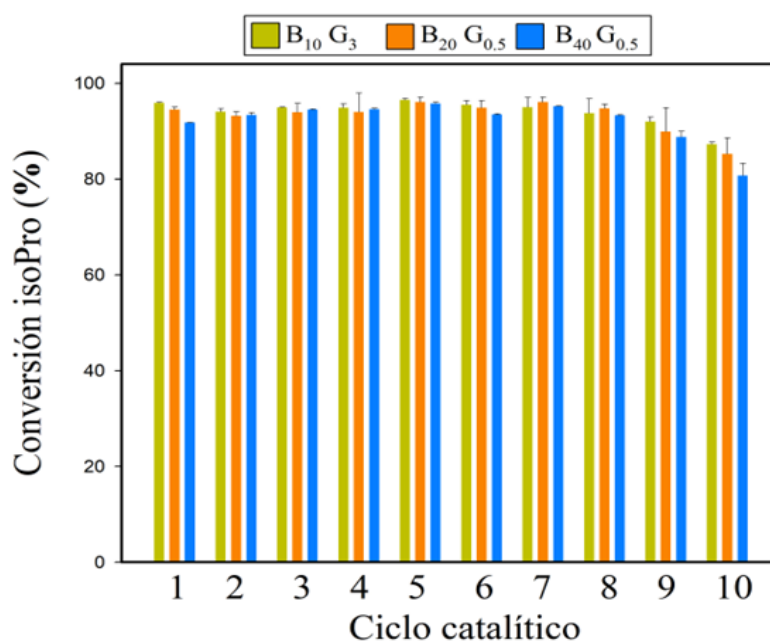




**Figura 18.** Efecto de la  $a_w$  en la síntesis de isoPro con 5 mg de CalB-CLEA (400 mM de isoB y 100 mM de aciP en *n*-heptano) durante 270 min a 55 °C y 180 rpm. A) CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub>, B) CalB-CLEA-B<sub>20</sub>G<sub>0.5</sub> y C) CalB-CLEA-B<sub>40</sub>G<sub>0.5</sub>. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

Por último, evaluamos la estabilidad operativa de los biocatalizadores CalB-CLEA mediante la repetición de ciclos de reacción por lotes para la síntesis de isoPro en *n*-heptano. Los

tres biocatalizadores probados demostraron una estabilidad operativa sobresaliente, reteniendo más del 80% de su actividad catalítica tras 10 ciclos de reacción, cada uno de ellos tuvo una duración de 2 h a una temperatura de 55 °C y 180 rpm (tiempo en el que ya se encontraba en estado estacionario), obteniendo un total de 20 h de reacción (**Figura 19**). Considerando todos los resultados mencionados, así como su sencilla manipulación experimental, su práctica aplicación y en consonancia con los objetivos de este trabajo, se seleccionó CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> como el biocatalizador más adecuado para su aplicación en el sistema S/G.

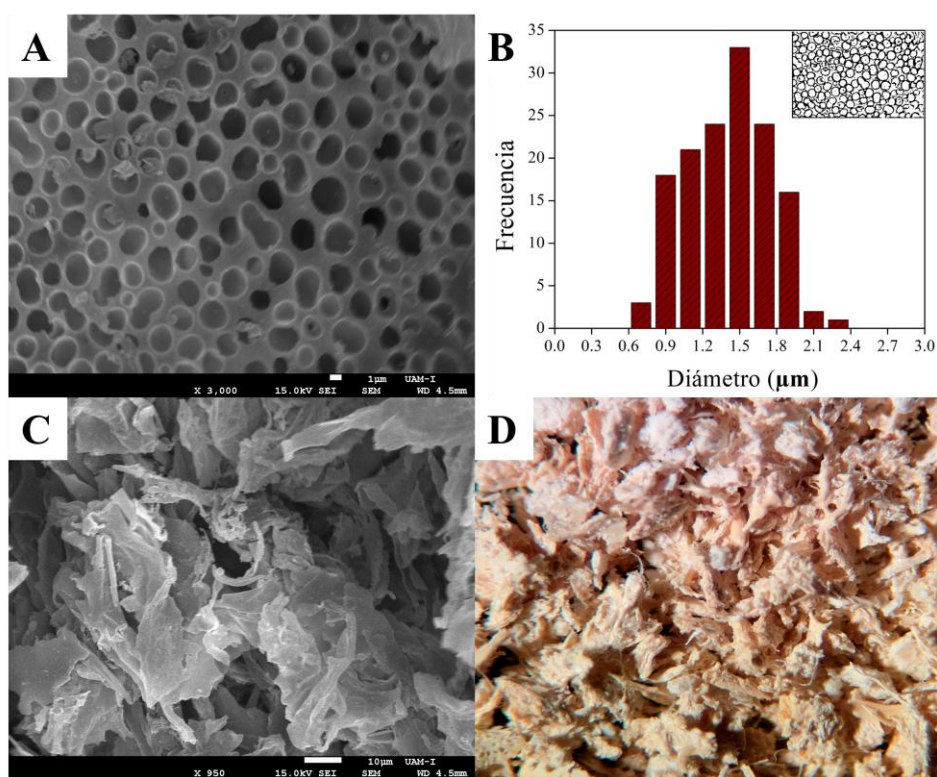


**Figura 19.** Estabilidad operativa de los CalB-CLEA durante ciclos repetidos de síntesis a isoPro de 2 h. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

Finalmente, se examinó la morfología y estructura de dicho CalB-CLEA mediante la captura de imágenes SEM y mediante el uso de un estereoscopio. Parece ser que el biocatalizador forma agregados enzimáticos que varían aproximadamente de 0.77 a 2.30  $\mu\text{m}$ , con un área promedio de  $1.64 \pm 0.75 \mu\text{m}^2$  y un diámetro promedio de  $1.41 \pm 0.34 \mu\text{m}$ . El índice de polidispersidad calculado de 0.058 [ $\text{PDI} = (\text{desviación estándar}/\text{diámetro promedio del agregado})^2$ ] indica una baja polidispersidad, cercana a la monodispersidad. Además, todos los agregados fueron claramente identificados completamente recubiertos por BSA (**Figura 20A y 20B**). El tamaño y la

forma de estos agregados han sido descritos anteriormente por Shoevaart *et al.* (2004), aunque sin la presencia de BSA. La presencia de BSA parece contribuir a la formación de agregados ligeramente más homogéneos y robustos. Los vacíos negros observados podrían indicar espacios libres creados cuando algunos agregados de CalB se liberan y se pierden durante los múltiples pasos de lavado.

Por el contrario, la **Figura 20C** ilustra la morfología del CalB-CLEA, revelando estructuras plegadas en forma de lámina de diversos tamaños, que se estima que oscilan entre aproximadamente 10-100  $\mu\text{m}$ . Saikia *et al.* (2021) informaron previamente de tamaños de partículas de alrededor de 50  $\mu\text{m}$  utilizando una concentración de BSA inferior a la aplicada en este estudio. Por último, en la **Figura 20D** se presenta el CalB-CLEA liofilizado en forma macromolecular, observado bajo un estereoscopio, donde se aprecia la presencia de láminas y su entrecruzamiento en múltiples puntos. El área superficial específica teórica (geométrica) del biocatalizador se estimó a partir del diámetro medio de los agregados mencionados anteriormente y de la densidad de empaque promedio ( $0.081 \text{ g cm}^{-3}$ ), obteniéndose un valor de  $52.5 \pm 5.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .



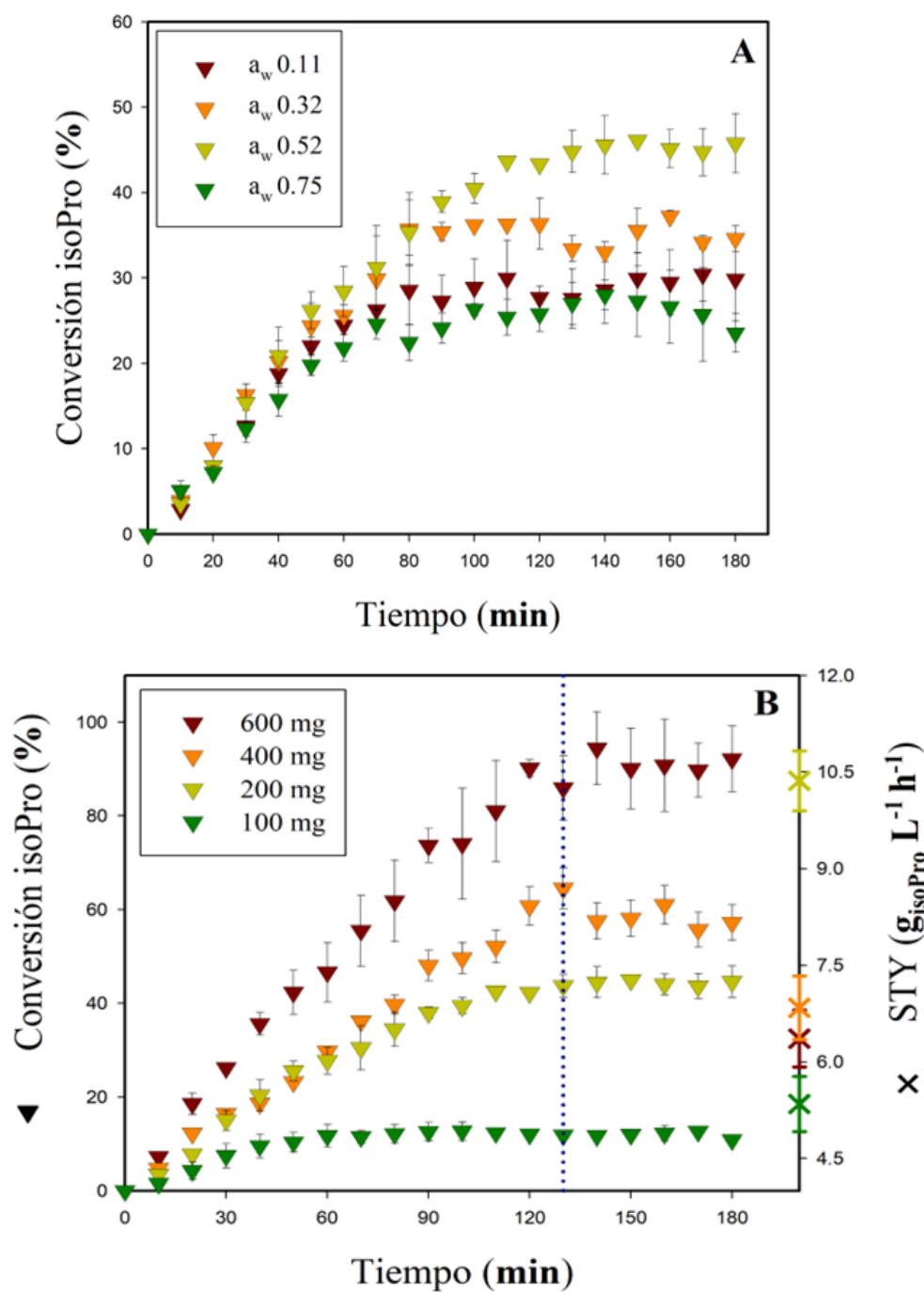
**Figura 20.** Imágenes SEM de CalB-CLEA: (A) escala de 1  $\mu\text{m}$  con aumento x 3000, (B) distribución de tamaño de los agregados de CalB, (B) escala de 10  $\mu\text{m}$  con aumento x 950, y (C) imagen macromolecular obtenida mediante estereoscopio.

#### 9.3.4. Síntesis de isoPro catalizada por CalB-CLEA en sistema S/G

Para continuar este estudio, evaluamos el efecto de la  $a_w$  sobre la síntesis de isoPro pero ahora en sistema S/G. Para ello, se empacaron dentro del biorreactor 200 mg de CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> liofilizado, previamente equilibrado al valor de  $a_w$  específica. Los resultados mostraron que el aumento de  $a_w$  influyó positivamente en el rendimiento de conversión a isoPro, alcanzando el mayor rendimiento promedio con  $48.68 \pm 1.06$  % a  $a_w$  de 0.52 durante el estado estacionario, el cual se alcanzó aproximadamente a los 120 minutos (**Figura 21A**). Sin embargo, más allá de este valor de  $a_w$ , la actividad catalítica de los biocatalizadores en el sistema S/G disminuyó, obteniendo la conversión promedio más baja de isoPro con  $31.13 \pm 1.40$  % a  $a_w$  de 0.75, donde el estado estacionario se alcanzó en 90 minutos.

Este resultado contrasta con los hallazgos obtenidos en experimentos realizados en un medio orgánico con  $a_w = 0.52$  y  $0.75$ , donde se alcanzaron las mayores velocidades de formación del producto, el estado estacionario se logró más rápidamente y los rendimientos promedio se aproximaron al 100%. Se hipotetiza que la disminución de la actividad catalítica observada a  $a_w \geq 0.75$  en el sistema S/G surge de la formación de películas líquidas transitorias debidas a la condensación capilar del agua (Billings *et al.*, 2006). Dichas películas probablemente son eliminadas por el flujo gaseoso, generando micro dominios acuosos donde compiten las reacciones de esterificación e hidrólisis (Yoshimoto *et al.*, 2017), lo que resulta en conversiones bajas, similares a las observadas incluso a  $a_w = 0.11$ . Este fenómeno no ocurre en el disolvente apolar *n*-heptano, ya que su baja constante dieléctrica actúa como una barrera hidrofóbica, reduciendo la actividad efectiva del agua en la fase interfacial. La capa delgada de agua ligada resultante es más estable porque el *n*-heptano no compite por los sitios polares, permitiendo que las moléculas de agua adsorbidas en la superficie enzimática permanezcan intactas. Estos hallazgos destacan el papel crítico de la actividad del agua en la reacción y cómo sus efectos difieren de los observados en el sistema S/G. Para estudios posteriores, se fijó  $a_w = 0.52$  como la mejor condición de operación.

Tras evaluar el efecto de la actividad del agua en el biorreactor S/G, analizamos el efecto de la cantidad de masa de biocatalizador empacada en la columna, con el fin de observar la posibilidad de maximizar el rendimiento al producto isoPro, buscando valores cercanos al 100% de conversión. Aumentando la carga de biocatalizador a 600 mg se obtuvo el mayor rendimiento de producto ( $91.31 \pm 3.21$ %), mientras que previamente con una carga de 200 mg solo se alcanzó el  $43.81 \pm 0.95$  % (**Figura 21B**, eje izquierdo).



**Figura 21.** (A) Efecto de la  $a_w$  en la síntesis de isoPro en sistema S/G con 200 mg de CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> (liofilizado). (B) Efecto de la carga de biocatalizador en la síntesis de isoPro en el sistema S/G; STY: productividad volumétrica (valor promedio durante el estado estacionario; inicio señalado con línea azul punteada). Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que representan la desviación estándar de la media.

En este sentido, se debe destacar que duplicar o dividir la cantidad de biocatalizador empacado no condujo a un aumento proporcional de la velocidad de reacción ni del rendimiento de producto. Por ejemplo, utilizando 100 mg de biocatalizador se obtuvo un rendimiento de producción de isoPro de sólo  $8.04 \pm 0.353\%$ , valor significativamente inferior a la mitad de lo obtenido con 200 mg durante el estado estacionario. Csanádi *et al.* (2012) obtuvieron resultados similares utilizando un biorreactor S/G para la producción de acetato de etilo con CalB inmovilizada como biocatalizador. Identificaron que triplicar la carga enzimática inicial multiplicó por 4 el rendimiento del producto, pero duplicarla solo supuso una mejora mínima.

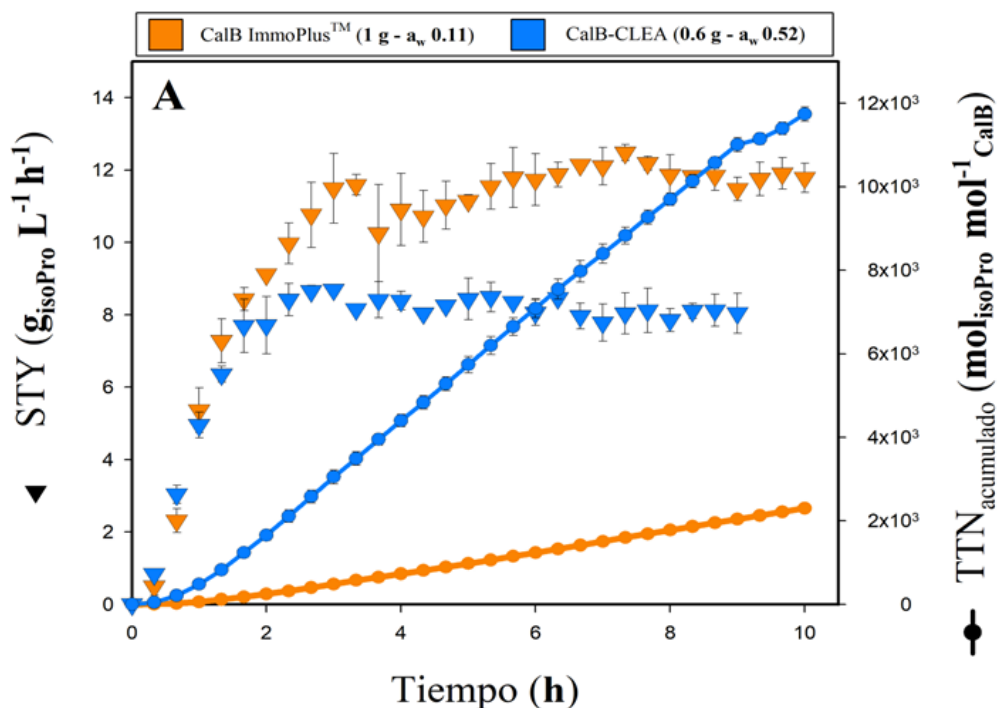
Por otro lado, este efecto también se vio reflejado en la productividad volumétrica (STY), que exhibió su máximo a 200 mg de biocatalizador con un valor de  $10.258 \pm 0.44$  g de isoPro  $L^{-1} h^{-1}$  (**Figura 21B**, eje derecho). Sin embargo, con esta masa, el sistema sólo alcanzó el 40% del rendimiento de isoPro con una tasa fija de alimentación de los sustratos, como se vio anteriormente. Se piensa que la diferencia observada en el rendimiento del biocatalizador se vio influenciada principalmente por el tiempo de residencia en el lecho empacado y el ciclo característico de adsorción-reacción-desorción necesario para que la enzima llevara a cabo la síntesis. Es decir, cuando se empaca muy poca CalB-CLEA, el tiempo de residencia parece ser insuficiente para alcanzar una conversión eficiente. El aumento de la altura del lecho parece mejorar el rendimiento de isoPro al ampliar el tiempo de residencia, ya que una mayor cantidad de catalizador mejora de forma natural la interacción con el sustrato. Sin embargo, este efecto parece estancarse en un punto crítico (no determinado en este estudio), más allá del cual el tiempo de adsorción-reacción-desorción se convierte en el factor dominante en la cinética de reacción. Esto puede explicar la mínima diferencia de conversión entre 200 mg y 400 mg. Según los resultados de este trabajo, el proceso de adsorción-reacción-desorción presenta un tiempo característico que no puede obviarse, incluso cuando se duplica la cantidad de catalizador. Aunque esto no impide un aumento de la eficiencia de conversión, sí impone limitaciones al análisis de la velocidad de reacción inicial. Este tiempo característico se ve afectado no solo por la actividad catalítica de la enzima, sino también por la elevada proporción de BSA en el catalizador formulado. Debido a sus propiedades intrínsecas, la BSA puede interactuar con compuestos orgánicos a través de interacciones hidrofílicas y enlaces de hidrógeno, afectando potencialmente las interacciones con los sustratos isoB y aciP, así como al producto isoPro. Estas interacciones pueden ralentizar la reacción y retrasar la liberación del producto en el efluente. Este comportamiento se ve respaldado por la

observación de que al triplicar la carga de catalizador hasta 600 mg mejora la formación de producto hasta que se alcanza un umbral, tras el cual el producto acumulado se libera más rápidamente. Este tipo de fenómeno se puede justificar ampliamente considerando los hallazgos obtenidos durante el primer bloque de investigación, en donde se utilizó CalB-IP como biocatalizador (Cruz-Martínez *et al.*, 2024).

Considerando lo anterior, comparamos el rendimiento del nuevo biocatalizador CalB-CLEA contra los resultados obtenidos al utilizar CalB-IP para la síntesis de isoPro en el biorreactor S/G. Para ello, se compararon las curvas de progreso de la producción de isoPro bajo las condiciones experimentales óptimas identificadas en cada caso (**Figura 22**). El eje Y derecho muestra la producción de isoPro en relación con la carga de enzima inmovilizada, expresada como el número de recambio total acumulado (TTN por sus siglas en inglés), calculado como los moles de isoPro producidos por cada mol de enzima. Según Wunschick *et al.* (2022), el CalB-IP contiene aproximadamente un 10% en peso de enzima. En ese sentido, durante los experimentos del bloque A, esto corresponde a una carga enzimática de unos 100 mg de enzima debido a que siempre se utilizó 1 g de biocatalizador. En cambio, la formulación CalB-CLEA contiene solo  $\sim 21$  mg de enzima por gramo de biocatalizador. Es destacable que, a pesar del menor contenido de enzima, CalB-CLEA alcanzó rendimientos de producto comparables, lo que pone en perspectiva la superior eficacia catalítica del enfoque de inmovilización mediante entrecruzamiento. En particular, es importante denotar que el sistema CalB-CLEA proporcionó seis veces más moles acumulados de isoPro por mol de enzima en el mismo tiempo de reacción (10 h), manteniendo la productividad volumétrica (STY por sus siglas en inglés) sólo 1.5 veces inferior al del sistema con el biocatalizador comercial. En concreto, CalB-CLEA alcanzó  $12.13 \pm 0.15 \times 10^3$  mol de isoPro mol<sup>-1</sup> de CalB y  $8.185 \pm 0.28$  g de isoPro L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, mientras que CalB-IP alcanzó  $2.30 \pm 0.09 \times 10^3$  mol de isoPro mol<sup>-1</sup> de CalB y  $11.79 \pm 0.40$  g de isoPro L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente. Un aspecto esencial es que, considerando un parámetro específico de productividad volumétrica (STY<sub>spe</sub>) (g de isoPro L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de CalB), CalB-CLEA mostró un valor 4.4 veces mayor que el obtenido con CalB-IP ( $0.652 \pm 0.02$  y  $0.147 \pm 0.01$ , respectivamente), lo que proporciona una medida normalizada de la eficiencia catalítica intrínseca y demuestra el rendimiento superior del biocatalizador propuesto en este estudio.

Como consideración final, a diferencia de CalB-IP, donde la actividad enzimática se encuentra mayormente confinada a la superficie de la partícula, el catalizador CalB-CLEA presenta

una distribución más homogénea de la enzima a lo largo de toda la partícula, lo que permite un mejor acceso del sustrato y una utilización más eficiente de los sitios activos. Por otro lado, está bien establecido que la naturaleza hidrofóbica de ECR1030M puede limitar aún más el acceso del sustrato mediante impedimentos estéricos y/o interacciones específicas como el enlace de hidrógeno (Cruz-Martínez *et al.*, 2023).



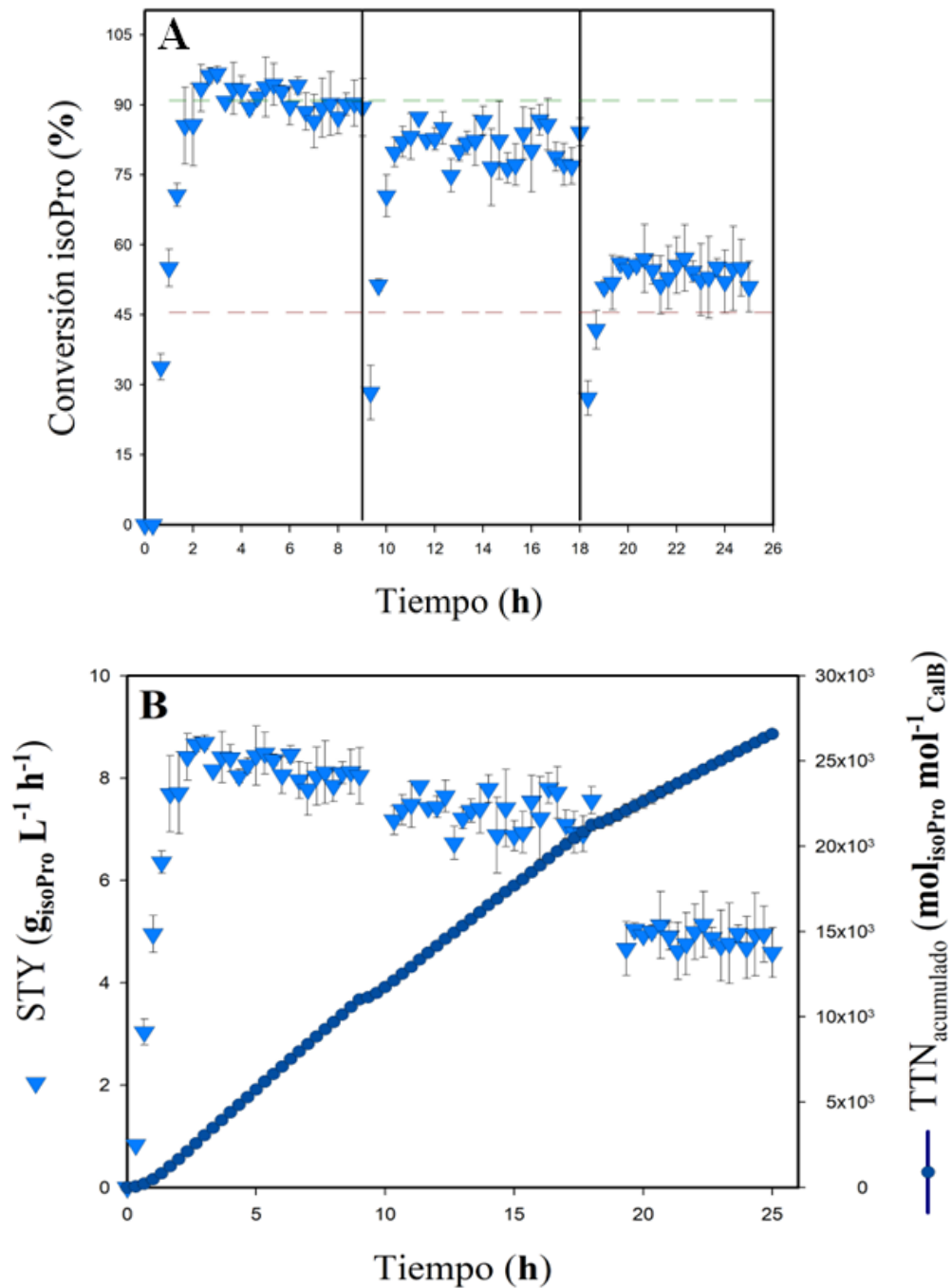
**Figura 22.** (A) Comparación de la productividad volumétrica (STY) y el número total de recambio (TTN) para la síntesis de isoPro utilizando CalB-IP y CalB-CLEA, producidos bajo cinéticas de 10 h en sus respectivas condiciones óptimas de reacción en el sistema S/G.

Por último, evaluamos la estabilidad y reciclabilidad del biocatalizador inmovilizado en el sistema S/G. El biocatalizador formulado mostró una elevada estabilidad operacional, manteniendo su mayor producción de isoPro durante 9 h en las condiciones de temperatura y presión especificadas anteriormente (**Figura 23A**). En particular, 7 h de esta operación se mantuvieron en estado estacionario, dando lugar a la máxima producción de isoPro con una conversión media de  $91.2 \pm 3.16\%$ . Después de este período, tuvimos que apagar el reactor, ya que nuestro sistema de suministro de gas aún no está automatizado para el funcionamiento durante toda la noche. Para ello, se retiró del sistema de flujo la columna de vidrio que contenía el biocatalizador empaquetado y se almacenó a 4 °C hasta el día siguiente (sin desempacar el catalizador). Al día siguiente, se

reconectó la columna empacada al flujo de sustratos, el reactor alcanzó un rendimiento de isoPro en estado estacionario del  $81.35 \pm 3.63\%$ , lo que indica una ligera disminución de la capacidad de síntesis menor al 10 % tras un total de 18 h de funcionamiento. Al tercer día, se alcanzó una conversión promedio del  $54.01 \pm 1.97\%$  para posteriormente detener el ensayo debido a la visible disminución de la capacidad catalítica que se aproximaba al valor que representa el 50 % de la actividad catalítica inicial. Como resultado, se logró una cinética de 25 h de operación en continuo.

Se infiere firmemente, que la producción de isoPro podría mejorarse significativamente optimizando el diseño del sistema S/G para permitir una operación totalmente continua (sin desconexión de columna), evitando así interrupciones en el proceso cinético, que en nuestro caso tuvieron un efecto perjudicial sobre la actividad del biocatalizador. En este sentido, se sugiere que para posteriores ensayos se mantenga el biocatalizador el menor tiempo posible en contacto con los sustratos adsorbidos sin el flujo constante de  $N_2$  ya que se tiene la hipótesis de que es el principal motivo de la reducción en su rendimiento catalítico tras la reconexión.

A pesar de las limitaciones operativas, los resultados obtenidos son prometedores. El STY durante el periodo cinético evaluado alcanzó una media de  $8.11 \pm 0.18$  g de isoPro  $L^{-1} h^{-1}$  durante el estado estacionario del primer día (**Figura 23B**). Este valor disminuyó a  $7.33 \pm 0.33$  g de isoPro  $L^{-1} h^{-1}$  el segundo día y luego descendió a  $4.88 \pm 0.16$  g de isoPro  $L^{-1} h^{-1}$  el último día. Ajustando estos datos al modelo de desactivación de Arrhenius, se determinó un tiempo de vida media del biocatalizador de 25.86 h, acumulando un valor TTN de  $26.580 \pm 0.015 \times 10^3$  mol de isoPro  $mol^{-1}$  CalB. El logaritmo natural de este dato arrojó un valor de 10.18, el cual se aproxima al límite inferior propuesto para un catalizador heterogéneo “altamente estable” ( $\ln TTN > 11.25$ ), según el mapa bidimensional de métricas que definen la productividad y estabilidad operativa de enzimas inmovilizadas en operaciones continuas reportado por Bolívar y López-Gallego (2020). Cabe destacar que, utilizando el mismo mapa de métricas mencionado, el valor del logaritmo natural de STY obtenido fue de 2.11, indicando una baja actividad catalítica debido a su posición por debajo del límite inferior propuesto ( $\ln STY > 4.7$ ). Aunque las métricas iniciales puedan parecer algo negativas a primera vista, es imprescindible tener en cuenta factores que no se habían abordado anteriormente, como la naturaleza del compuesto, el precio del producto y el tamaño de mercado de este. Estos elementos sirven como puntos de referencia cruciales y ofrecen valiosas perspectivas.



**Figura 23.** (A) Evaluación de la estabilidad operacional con 600 mg de CalB-CLEA en sistema S/G, ciclos catalíticos de 9 h; (B) Estabilidad del reactor en continuo y métricas de actividad para la síntesis de isoPro bajo 25 h usando 600 mg de CalB-CLEA a una  $a_w$  de 0.52 en sistema S/G. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

Teniendo en cuenta este tema, Meissner y Woodley (2022) informaron de rangos para valores métricos típicos esperados para procesos biocatalíticos económicamente viables. El precio de mercado del isoPro es de aproximadamente 110-155 \$ kg<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, TCI América), lo que lo convierte en un producto considerado de alto precio o valor (> 100 \$ kg<sup>-1</sup>). Teniendo en cuenta lo anterior, las métricas operacionales obtenidas con el biocatalizador formulado y evaluado en el sistema S/G se situaron dentro de los rangos óptimos descritos que incluyen: Tasa o STY (producto másico/volumen de reacción/tiempo de reacción) de 1-10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (8.11 ± 0.18 g isoPro L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), Rendimiento de conversión (producto en masa/masa de sustrato limitante) de > 90 (91.2 ± 3.16 %), y Rendimiento específico (masa producto/masa enzima) de 50-500 g g<sup>-1</sup> de proteína (104.871 ± 0.06 g isoPro g<sup>-1</sup> CalB de TTN descrito anteriormente). En general, la aplicación de los CalB-CLEA en el sistema S/G representa una alternativa prometedora para la producción sostenible y económicamente viable de ésteres naturales en la industria, tal y como isoPro.

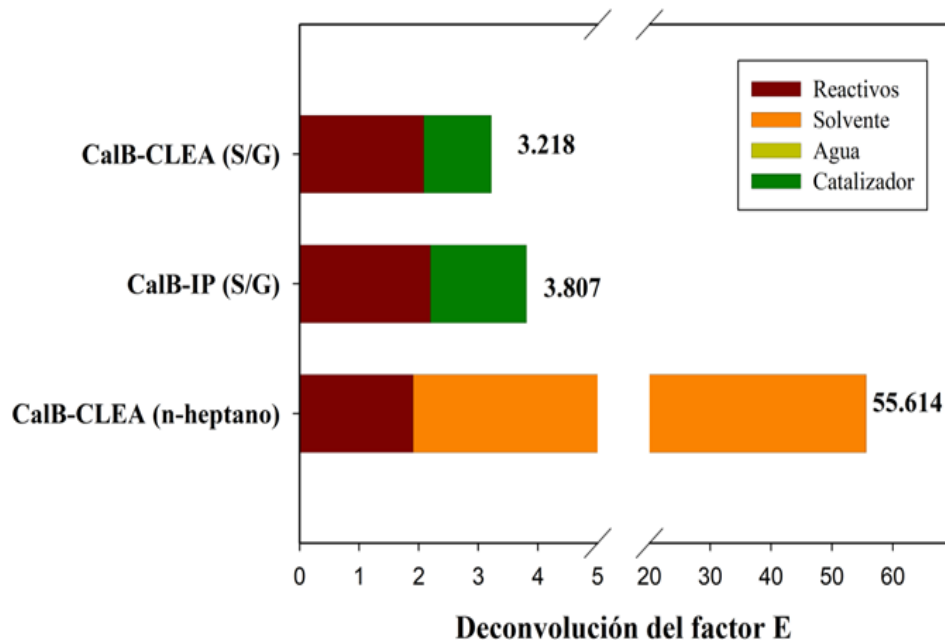
### 9.3.5. Métricas verdes y de sostenibilidad

Debido al excelente rendimiento de CalB-CLEA en la síntesis de isoPro, se determinaron indicadores de química verde asociados al biocatalizador CalB-CLEA y se compararon con los obtenidos con CalB-IP, además del rendimiento de conversión a producto. Se calcularon métricas basadas en masa (resumen de resultados en la *Tabla 8*) para tres procesos: CalB-CLEA (5 mg en *n*-heptano y 600 mg en sistema S/G) y CalB-IP (1 g), y se evaluaron la eficiencia de la masa de reacción (RME), la productividad de la masa (MP) y la economía del carbono (CE). La RME y la MP se definen como la relación entre la masa del producto y la masa total solo de reactantes, y la masa total incluidos los biocatalizadores y los disolventes, respectivamente. CE se define como la relación entre la masa total de carbono en el producto y la masa total de carbono en los reactantes. Además, se calcularon la economía atómica (AE) y el factor estequiométrico (SF) de los sistemas comparados para evaluar su eficiencia global. Las métricas verdes calculadas sirven como puntos de referencia para evaluar la eficiencia de la síntesis. Tanto el biocatalizador CalB-CLEA (600 mg) como CalB-IP (1 g) en sistema S/G demostraron el mejor rendimiento global, aunque dentro de ellos, los valores más bajos observados fueron los parámetros RME y MP % (*Tabla 8*). Esta reducción se debe principalmente a la relación molar utilizada en la síntesis (1:4), que requiere un exceso de isoB para alcanzar rendimientos óptimos de isoPro, dejando así una cantidad considerable de isoB sin reaccionar.

Para el cálculo del factor E (kg de residuos/kg de producto) y de la productividad másica (MP) de cada proceso se consideró una perspectiva especial debido a la naturaleza poco convencional del sistema S/G, que funciona sin disolventes y utiliza nitrógeno como gas portador inerte. Para reflejar mejor el impacto medioambiental del proceso propuesto en este trabajo, se realizaron cálculos de ambos parámetros incluyendo y sin incluir el nitrógeno, ya que consideramos poco preciso clasificar el nitrógeno atmosférico (78.08 % de la composición del aire) como un disolvente convencional o residuo tal y como lo es el *n*-heptano. El CalB-CLEA en el sistema S/G alcanzó un factor E de 3.218, aproximadamente 17 veces inferior al aplicar el mismo biocatalizador en *n*-heptano (55.614), lo que demuestra su superior sostenibilidad para la síntesis de isoPro. Además, la recuperación del producto es sencilla, ya que solo coexiste con los sustratos que no han reaccionado, lo que permite una alta pureza mediante condensación fraccionada. Además, el agua no afecta al factor E en esta configuración, lo que mejora aún más el perfil ecológico del sistema. Aunque CalB-IP mostró un factor E inferior al de CalB-CLEA en *n*-heptano (3.807 frente a 55.614), sigue siendo 1.2 veces superior al de CalB-CLEA en el sistema S/G. Por último, la **Figura 24** ilustra el efecto comparativo de cada componente de la reacción sobre la deconvolución del factor E determinado. Como se mencionó, el valor más alto fue 55.614 el cual se obtuvo con CalB-CLEA en *n*-heptano. Esto es debido a que está influenciado en gran medida por la cantidad de disolvente utilizado en la reacción, el cual incluso seguirá aumentando a medida que avancen los ciclos catalíticos, a diferencia del sistema S/G, en donde no ocurre este fenómeno.

Por otro lado, el valor E más bajo, 3.2, se registró con CalB-CLEA en el sistema S/G, seguido de 3.807 con CalB-IP. En ambos casos, el área asociada al reactivo es similar; sin embargo, el área del catalizador para CalB-IP es mayor. Aunque denotar este hecho podría considerarse ventajoso debido a la mayor cantidad de catalizador utilizada durante las pruebas con CalB-IP, es crucial destacar lo que representan estas áreas de catalizador en ambos casos. En primera instancia, es bien sabido que el 90% de la masa del producto comercial CalB-IP procede de su soporte polimérico sintético no biodegradable (basado en metacrilatos-divinilbenceno). En cambio, CalB-CLEA está formado casi en su totalidad por proteína, lo que le brinda carácter más biodegradable e incluso comestible. Esto ofrece claras ventajas en cuanto a reducción de residuos, sostenibilidad operativa y rendimiento general del proceso.

Finalmente, comparamos nuestro biocatalizador CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> en el sistema S/G con estrategias previamente reportadas para la síntesis de isoPro en medios no convencionales.



**Figure 24.** Deconvolución del Factor E (Masa total de residuos/Masa de producto final) Masa de biocatalizador empleada: 5 mg de CalB-CLEA en *n*-heptano, 1 g de CalB-IP en sistema S/G y 600 mg de CalB-CLEA en sistema S/G.

Varma *et al.* (2009) emplearon CO<sub>2</sub> supercrítico con CalB Novozym 435 (análogo a CalB-IP) a 50 °C y 100 bar, alcanzando una conversión del 95% después de 2.5 h. A pesar de la conversión comparable, su STY fue ligeramente menor que la nuestra (7.1 vs. 8.2 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), mientras que su proceso generó sustancialmente más residuos, con un factor E 14 veces mayor (45.5 vs. 3.2) y una cantidad total de desechos 40 veces superior (67.6 g vs. 1.7 g). Además, la operación a alta presión introduce demandas energéticas significativas y una mayor complejidad del proceso, lo que limita su escalabilidad. Su sistema también alcanzó un TTN 1.2 veces menor que el nuestro (20,921 mol isoPro mol<sup>-1</sup> CalB vs. 26,580 mol isoPro mol<sup>-1</sup> CalB).

Kuperkar *et al.* (2019) reportaron un sistema de reacción libre de disolvente utilizando CalB Novozym 435, alcanzando una conversión del 92.5 % después de 5 h a 40 °C y 200 rpm. Aunque su sistema logró un STY 5.9 veces mayor (48.4 vs. 8.2 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), esto se consiguió mediante el uso extensivo de isoB tanto como sustrato como solvente, lo que resultó en una productividad másica comparable (32.7 % vs. 31.3 %) pero con 15.7 veces más residuos (26.7 g vs. 1.7 g). Si bien su TTN fue 3.8 veces mayor que el de nuestro sistema CalB-CLEA el proceso de recuperación

del producto conlleva desventajas notorias, además es importante señalar que nuestro montaje S/G no está optimizado para una operación continua y prolongada; la columna empacada tuvo que desconectarse cada 9 h, almacenarse a 4 °C y posteriormente reconectarse, lo cual puede afectar negativamente la estabilidad y el rendimiento del biocatalizador.

En conjunto, estas comparaciones destacan que CalB-CLEA-B<sub>10</sub>G<sub>3</sub> en el sistema S/G combina una conversión competitiva (91.2 %) con un desempeño ambiental superior, reduciendo sustancialmente la generación total de residuos y el factor E en comparación con otros medios. Cabe resaltar que, si se excluye la masa del co-alimentador de origen biológico y biodegradable (BSA) empleado en la preparación del CLEA, el factor E disminuye aún más de 3.2 a 2.1, reforzando la ventaja de este enfoque como una ruta más verde y escalable para la síntesis de isoPro (resumen de resultados en *Tabla 8*).

#### 9.4. Conclusiones

Esta sección del trabajo subraya el potencial de los agregados entrecruzados de la lipasa CalB junto con BSA (CalB-CLEA) como un biocatalizador prometedor para la síntesis sostenible de ésteres en sistema S/G. Los resultados obtenidos demostraron que CalB-CLEA presenta una importante actividad hidrolítica, una excelente estabilidad térmica y operativa, y un alto rendimiento catalítico de síntesis. Además, nuestros resultados indican que la síntesis de isoPro en disolventes orgánicos (utilizando *n*-heptano) mejoró significativamente al aumentar la concentración de GA, lo que condujo a rendimientos de conversión competitivos de isoPro cercanos o similares al 100 %. Además, el aumento del cuerpo del biocatalizador debido a la presencia de BSA en CalB-CLEA facilitó la formación de una estructura porosa, mejorando su rendimiento catalítico y aplicabilidad en el sistema S/G. Esta modificación permitió al biocatalizador CLEA alcanzar un porcentaje de conversión competitivo en tiempos de operación comparables a los obtenidos con el producto comercial CalB-IP en condiciones de operación similares, utilizando una menor cantidad de biocatalizador, pero aún más importante, de enzima.

Por lo tanto, se considera que CalB-CLEA emerge como un biocatalizador altamente eficaz y sostenible para la síntesis de ésteres en el sistema S/G. Y que, debido a su naturaleza verde, su rentable elaboración y su capacidad para sustituir a las costosas resinas tradicionales, lo posicionan como una alternativa superior para aplicaciones industriales en biocatálisis.

Tabla 8. Métricas verdes y sostenibilidad basadas en masa.

Métrica	5 mg CalB-CLEA ( <i>n</i> -heptano)	1 g CalB-IP (Sistema S/G)	600 mg CalB- CLEA (Sistema S/G)	10 mg Novozym 435 (CO <sub>2</sub> supercrítico) Varma <i>et al.</i> (2009)	1.85 g Novozym 435 (Libre de solventes) Kuperkar <i>et al.</i> (2014)
<b>AE</b> <sup>a</sup> (%)	87.9	87.9	<b>87.9</b>	87.9	87.9
<b>Rendimiento conversión</b> <sup>b</sup> (%)	97.8	98.2	<b>91.3</b>	95.0	92.5
<b>STY</b> (g <sub>isoPro</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	6.2	11.8	<b>8.2</b>	7.1	24.2
<b>RME</b> <sup>c</sup> (%)	34.4	31.3	<b>32.4</b>	83.5	32.7
<b>MP</b> <sup>d</sup> sin N <sub>2</sub> (%)	1.8	31.3	<b>32.4</b>	2.2	32.7
<b>CE</b> <sup>e</sup> (%)	36.0	32.6	<b>34.0</b>	95.0	34.2
<b>Factor E</b> <sup>f</sup> sin N <sub>2</sub>	55.65	3.8	<b>3.2</b>	45.5	2.2
<b>Factor E</b> sin N <sub>2</sub> y BSA	55.60	3.8	<b>2.1</b>	45.5	2.2
<b>Residuo total</b> sin N <sub>2</sub> (g)	7.131	2.4	<b>1.7</b>	67.7	26.8
<b>Residuo total</b> sin N <sub>2</sub> y BSA (g)	7.126	2.4	<b>1.1</b>	67.7	26.8

**a** Economía atómica “AE” (%) = (mol de peso del producto/suma de mol de reactivos)\*100; **b** Rendimiento conversión (%) = (mol de producto isoPro/mol de reactivo limitante aciP)\*100; **c** Eficiencia de masa de reacción “RME” (%) = (Masa de producto / Masa total de reactivos) \*100; **d** Productividad másica “MP” (%) = (Masa del producto/Masa total incluidos los disolventes)\*100; **e** Economía de carbono “CE” (%) = (Carbono en el producto/Carbono total en los reactantes)\*100; **f** Factor E = Masa total de residuos/Masa del producto final.

## 10. Bloque C. Evaluación de inmovilizados de *Yarrowia lipolytica* en el sistema S/G y producción de CLEAs utilizando extracto crudo.

### 10.1. Resumen

En este apartado del trabajo se formularon y aplicaron biocatalizadores obtenidos directamente del secado de los sólidos recuperados de cultivos bifásicos de *Yarrowia lipolytica* (*Ylip*), logrando identificar la capacidad de su maquinaria enzimática (incluyendo células completas), en el proceso de síntesis de isobutil propionato (isoPro), en la búsqueda de un proceso más económico y rentable, al evitar la necesidad de adquirir enzimas comerciales. Se identificó la superioridad de la espuma de poliuretano (PUF) como soporte inerte para los cultivos, se seleccionó un tiempo de 72 h para la recuperación de los biocatalizadores, basándose en los valores más altos de actividad en hidrólisis y síntesis en medio orgánico. Asimismo, se observó especificidad hacia sustratos de cadena media como el *p*-nitrofenil octanoato (C8, *p*-NPOc) al cuantificar su actividad hidrolítica y un rendimiento de conversión a isoPro de  $20.94 \pm 2.43$  % en *n*-hexano. En contra parte, solo se alcanzó un rendimiento de conversión de  $1.96 \pm 0.10$  % en sistema sólido/gas (S/G) durante el estado estacionario, alcanzado aproximadamente a los 105 min, tiempo en el cual el valor promedio de la productividad volumétrica (STY) fue de  $12.45 \pm 0.62$   $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$ , aunque es un valor relativamente bajo se tiene como principal ventaja la capacidad de trabajar en continuo, la fácil-constante obtención del biocatalizador y su bajo coste de producción.

Por último, se produjeron *crosslinked enzyme aggregates* (CLEA) utilizando directamente el extracto crudo obtenido tras el tiempo de fermentación mencionado, en este sentido se evaluó tanto seroalbúmina bovina (BSA) como quitosano (Q) como protector o “*co-feeder*”, identificando al alcohol isoamílico como el mejor precipitante con ambos protectores, siendo con BSA con el que se obtuvo los mejores rendimientos de inmovilización al recuperar  $> 96$  % de la actividad libre ( $0.84 \pm 0.02$  U mL<sup>-1</sup>) y una alta termoresistencia ( $\sim 80$  % de actividad recuperada tras 2 h a 55°C). En este sentido, se obtuvo una alternativa novedosa de biocatalizador verde y económicamente viable, que podrá evaluarse en el futuro en el sistema biocatalítico S/G.

### 10.2.1. Propagación de microorganismo

La cepa de *Yarrowia lipolytica* NRRL 7817 se activó en medio YDP estéril con la siguiente formulación en [g L<sup>-1</sup>]: extracto de levadura (10), glucosa (20) y peptona de caseína (20), durante 24 h a 150 rpm a 30 °C. Posterior al proceso de activación de la cepa, se añadió 0.5 mL del caldo obtenido en agar papa dextrosa (PDA) a 30 °C durante 7 días. La preparación de la suspensión celular o inóculo, se realizó a partir de la agitación mecánica de los cultivos con una solución de Tween 80 (0.01 % p/v).

### 10.2.2. Preparación de los soportes para fermentación

Los soportes inertes utilizados para la obtención de lipasas mediante fermentación fueron: composito de poliuretano/queratina (PU-Q), espuma de poliuretano (PUF), carbón activado, alúmina activada y perlita, todos los soportes se tamizaron hasta obtener un tamaño aproximado de 1.19-2.35 mm (PU-Q y PUF se molieron previamente), posteriormente se lavaron dos veces con agua caliente y dos veces con agua fría para posteriormente ser secados a 65 °C durante 48 h. La elaboración del composito PU-Q se realizó según lo reportado por Cordero-Soto *et al.* (2017), utilizando biofibras de queratina proveniente de bárbulas de pluma de pollo, poli propilenglicol (PPG), agua y diisocianato de tolueno (TDI).

### 10.2.3. Producción de lipasas con diferentes soportes y evaluación del tiempo de cultivo

Los obtención de los biocatalizadores se realizó mediante cultivos bifásicos, considerados de esta forma debido a que dentro del cultivo hay un componente sólido que actúa como soporte inerte, pero en él, existe un exceso de líquido que el sólido no puede retener (medio de cultivo libre), por lo que no puede ser considerado formalmente como fermentación sólida (30-70 % humedad) ni sumergida, pues el sólido no está nadando en el medio (Pandey *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2013). Se utilizó 10 % v/v de la suspensión celular obtenida de *Ylip* NRLL 7817 como inóculo, empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo emulsificado con la siguiente composición [g L<sup>-1</sup>]: Triptona de caseína (12.5), extracto de levadura (2), alcohol polivinílico (1.5), con aceite de oliva como agente inductor (20) a pH a 6. Posteriormente, se agregaron cantidades específicas de cada soporte para alcanzar ~100% de humedad relativa (HR):

5 g de PU-Q, 1 g de PU, 7.5 g de agrolita, 27 g de carbón activado y 45 g de alúmina activada y se dejaron a 30 °C y 150 rpm durante 72 h siguiendo lo reportado por Pereira-Meirelles *et al.* (2000).

Después del tiempo de cultivo, se procedió a secar los sólidos obtenidos mediante la inyección de aire seco a una columna donde se tenían empacados los sólidos en lecho fijo (flujo de aire: 0.6 L min<sup>-1</sup>). Ya secos, se realizaron las determinaciones pertinentes. Una vez seleccionado el soporte con las mejores aptitudes según el criterio de actividad de hidrólisis y síntesis de isoPro, se realizaron cultivos independientes durante 24, 48, 72, 96 y 144 h a 30 °C y 150 rpm con el fin de seleccionar el tiempo con la mejor producción enzimática, así como describir la maquinaria encargada de dichos procesos.

#### **10.2.4. Obtención de agregados enzimáticos entrecruzados a partir de extracto crudo de *Ylip* utilizando BSA y Q como protector o “co-feeder”.**

Una vez ubicado el tiempo óptimo de cultivo (72 h) se realizó un lote de producción de tamaño considerable con el soporte seleccionado (PUF), posteriormente se realizó la extracción de las enzimas producidas durante la fermentación utilizando 50 mL de buffer de fosfato de sodio (100 mM, pH 7), con 0.01 % v/v de Triton X-100 por cada matraz utilizado, se agitó vigorosamente de forma manual en un tubo de centrífuga cónico y posteriormente, el líquido se recuperó mediante la compresión del material sólido asistido por una bomba de vacío. El extracto crudo (EC) obtenido se centrifugó a 7,000 rpm en una centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra X-12R por 30 min a 4 °C para retirar la biomasa producida. El sobrenadante recuperado se filtró al vacío utilizando filtros de celulosa de 0.45 µm, intentando retirar la totalidad del aceite de oliva no consumido, y posteriormente el extracto enzimático se concentró hasta un valor de 3.5 ± 0.35 mg mL<sup>-1</sup> de proteína (determinado por el método de Bradford) utilizando un Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 10 kDa MWCO.

Una vez obtenido el EC concentrado, se procedió a realizar el método de inmovilización mediante entrecruzamiento. Para ello, se realizó un *screening* de agentes precipitantes (AP) empleando: acetona, etanol, sulfato de amonio, metanol, 2-propanol, acetonitrilo y alcohol *tert*-amílico. El volumen total de trabajo fue de 1.130 mL, utilizando 10 mg mL<sup>-1</sup> de BSA o Q según fuera el caso; se pesó la cantidad necesaria de cada sólido y se disolvió totalmente añadiendo 100 µL de EC. Una vez obtenida una solución homogénea, se añadió 1 mL del AP y se agitó vigorosamente al instante con la ayuda de un vórtex. Posteriormente, se añadieron 30 µL de GA

(70 % v/v) y se volvió a agitar de forma vigorosa durante 1 min. Por último, las muestras se dejaron en agitación en un agitador rotatorio a 45 rpm durante 3 h a 4 °C.

Una vez terminado el tiempo de entrecruzamiento, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm y 4 °C durante 5 min para retirar el agente precipitante y el GA. Posteriormente, se realizaron 3 lavados a los pellets recuperados utilizando 1 mL de buffer de fosfato de sodio (25 mM, pH 7), recuperando el sobrenadante de dichos lavados para la determinación del rendimiento de inmovilización.

### **10.2.5. Determinación de actividad enzimática de hidrólisis**

#### **10.2.5.1. Soportes post-fermentación**

La actividad de hidrólisis de los soportes se evaluó utilizando ésteres de *p*-nitrofenol con diferente tamaño de cadena C en el radical (acetato, butirato, octanoato, decanoato y miristato) según fuera el caso, para ello se prepararon stocks de 10 mM en 2-propanol con 0.01 % de Triton X-100, a esta solución se le llamó A. Posteriormente, se utilizaron 1:20 volúmenes de buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7), NaCl 150 mM y Triton X-100 (0.01 % v/v), por cada volumen de solución A, obteniendo la solución B la cual siempre se preparó al momento. En tubos de ensayo se añadieron 800 µL de solución B manteniendo una relación 1:1 con el volumen de EC, se colocaron en baño maría a 37° C durante 10 min y para finalizar la reacción los tubos se colocaron en baño frío y se añadió 300 µL de NaOH 0.2 M. Las absorbancias se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a 405 nm considerando una unidad de actividad enzimática de hidrólisis (U) como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones específicas.

#### **10.2.5.2. CLEAs del extracto enzimático de *Ylip* con BSA o Q.**

Durante el proceso de inmovilización mediante agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA por sus siglas en inglés), se midió la actividad hidrolítica del EC obtenido, tanto soluble como posteriormente inmovilizado, mediante un ensayo colorimétrico con *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPBu) como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 0.5 mM de *p*-NPBu en una solución buffer de fosfato de sodio (50 mM, pH 7) con acetonitrilo al 1 % (utilizada para preparar la solución madre concentrada de *p*-NPBu 50 mM). Para el ensayo, se colocaron 10 µL de EC concentrado o

de la suspensión de CLEA en una microplaca de 96 pocillos, seguidos de 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción. A continuación, la placa se incubó a 30  $^{\circ}\text{C}$  con agitación continua. Para cuantificar el *p*-nitrofenol liberado, se registró la absorbancia a 405 nm con un lector de microplacas BioTek ELx808 durante al menos 15 min.

La actividad de CLEA ( $\text{U mL}^{-1}$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$A = \frac{\Delta A V_T}{\varepsilon l V_e}$$

Donde:  $A$  es la actividad CLEA ( $\text{U mL}^{-1}$ ),  $\Delta A$  es la pendiente ( $\text{min}^{-1}$ ),  $V_T$  es el volumen total de reacción (mL),  $V_e$  es el volumen de enzima (mL),  $\varepsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon$  para *p*-nitrofenol =  $5.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), y  $l$  es la longitud del camino, donde 360  $\mu\text{L}$  corresponden a 1 cm. 1 Unidad ( $\text{U}_C$ ) se definió como la cantidad de biocatalizador necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrofenol por minuto determinado en condiciones de microplaca. Tras determinar la actividad ( $\text{U mL}^{-1}$ ) se calculó la actividad específica del biocatalizador dividiendo  $\text{U mL}^{-1}$  por la masa (mg) de proteína presente en la CLEA excluyendo la BSA.

Para las pruebas de estabilidad térmica, se resuspendieron 200  $\mu\text{L}$  de suspensión de CLEA en 300  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato sódico (50 mM, pH 7) y se incubaron a 55  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 h al baño maría controlado. Posteriormente, se midió la actividad enzimática residual utilizando el método antes mencionado.

## 10.2.6. Determinación de la capacidad de síntesis de isoPro

### 10.2.6.1. Solvente orgánico

La actividad de síntesis se determinó mediante la producción de isoPro en medio orgánico utilizando *n*-hexano como solvente, la reacción se llevó a cabo a 55 $^{\circ}$  y 150 rpm durante 48 h utilizando cantidades específicas de cada catalizador, previamente equilibrados con una solución saturada de LiCl ( $a_w$ : 0.11), durante 72 h a 4  $^{\circ}\text{C}$  (ej. 0.05 g de biocatalizador PUF), posteriormente se utilizaron 6 mL de 400 mM de isoB y 100 mM de aciP (relación molar 4:1) en *n*-hexano, la concentración del éster producido en el medio de reacción se determinó por cromatografía de gases. La actividad de síntesis ( $\text{U}_s$ ) se expresó como el total de micromoles de isoPro producidos por gramo de biocatalizador ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) por min, junto con el rendimiento del producto en relación con el reactivo limitante (aciP).

### 10.2.6.2. Sistema S/G

El biorreactor S/G utilizado en esta sección consistía en una columna cilíndrica de vidrio de 22 cm de altura y 5 cm de diámetro interno. Se empacó con 1 g del biocatalizador PUF, lo cual brindó una altura de lecho de aproximadamente  $18 \pm 0.5$  cm. El biocatalizador empacado fue previamente equilibrado con una solución saturada de LiCl ( $a_w$ : 0.11) durante 72 h a 4 °C. Una vez iniciada la cinética de producción a isoPro, se muestreó a la salida del biorreactor cada 15 min durante 3 h, las muestras obtenidas se analizaron por cromatografía de gases.

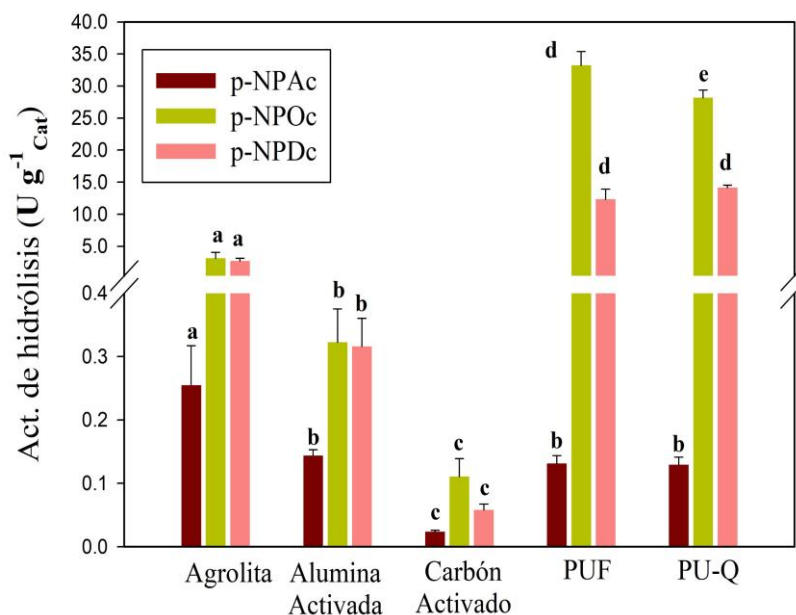
## 10.3. Resultados y discusión

### 10.3.1. Selección del soporte para el biocatalizador mediante el criterio de actividad de hidrólisis y síntesis de isoPro en medio orgánico.

Se analizaron distintos soportes inertes para la producción de lipasas mediante fermentación bifásica, dichos soportes cumplían con las características de ser accesibles (\$), prácticos y fáciles de conseguir a granel. Los sólidos evaluados fueron: un composito basado en poliuretano-queratina (PU-Q) hecho en casa según lo reportado por Cordero-Soto et al. (2017), espuma de poliuretano (PUF), perlita, carbón y alúmina activados. En la **Figura 25** se muestra el comparativo de la actividad enzimática de hidrólisis determinada por cada gramo de sólido posterior a la extracción. Para ello, se utilizaron 3 ésteres de *p*-nitrofenol: acetato, octanoato y decanoato; identificando y analizando la preferencia de la maquinaria inmovilizada presente en el biocatalizador por un tamaño de radical específico, considerándose de forma global como actividad lipolítica, pero haciendo la distinción general que con sustratos con  $C \leq 8$  la actividad será del tipo esterasa y  $C > 9$  será actividad lipasa, como muchos autores ha reportado (Chahinian *et al.*, 2002; Ficker *et al.*, 2005).

Respecto a la actividad obtenida con *p*-NPAc, el catalizador de perlita fue el que tuvo la actividad promedio más alta con  $0.25 \pm 0.06$  U g<sup>-1</sup><sub>Cat</sub>, seguido por la de alúmina activada, PUF y PU-Q entre los cuales no existió diferencia significativa obteniendo valores de  $0.14 \pm 0.01$ ,  $0.13 \pm 0.02$  y  $0.12 \pm 0.01$  U g<sup>-1</sup><sub>Cat</sub> respectivamente y, por último, el de carbón activado con  $0.023 \pm 0.002$  U g<sup>-1</sup><sub>Cat</sub>. Por otro lado, la media de las actividades obtenidas con *p*-NPOc presentaron diferencia significativa entre cada uno de los soportes utilizados; el biocatalizador con PUF fue el que presentó la actividad promedio más alta con  $33.23 \pm 2.75$  U g<sup>-1</sup><sub>Cat</sub>, seguido por el de PU-Q con  $28.19 \pm 1.18$

$U\ g^{-1}_{Cat}$ , posteriormente el de agrolita con  $3.14 \pm 0.93\ U\ g^{-1}_{Cat}$ , seguido del de alúmina activada con  $0.32 \pm 0.05\ U\ g^{-1}_{Cat}$  y, por último, de nuevo el carbón activado con  $0.11 \pm 0.02\ U\ g^{-1}_{Cat}$ . En este sentido, es importante resaltar la superioridad entre la actividad obtenida con *p*-NPOc respecto a la obtenida con *p*-NPAc con cada uno de los soportes. Por último, la actividad obtenida con *p*-NPDe los catalizadores PUF y PU-Q tuvieron las medias más altas sin existir diferencia significativa entre sí, con actividades de  $12.34 \pm 1.56$  y  $14.17 \pm 0.36\ U\ g^{-1}_{Cat}$ , respectivamente, seguido del catalizador en perlita con  $2.68 \pm 0.45\ U\ g^{-1}_{Cat}$ , posteriormente el de alúmina activada con  $0.32 \pm 0.04\ U\ g^{-1}_{Cat}$  y, por último, el de carbón activado con  $0.058 \pm 0.009\ U\ g^{-1}_{Cat}$ , manteniendo un patrón similar a lo obtenido con el *p*-NPOc.



**Figura 25.** Actividad de hidrólisis de los biocatalizadores obtenidos mediante el uso de diferentes soportes en fermentación bifásica: *p*-nitrofenil: acetato, octanoato y decanoato (Actividad de hidrólisis del tipo: esterasa y lipasa) (Condiciones de operación: 37 °C, pH 7 durante 10 min). Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Hasta este punto, parece que la maquinaria enzimática de los biocatalizadores obtenidos tiene preferencia por sustratos de cadena mediana (C6-C9), ya que, aunque con *p*-NPDe presentó mayor actividad en comparación con *p*-NPAc, dicha actividad siguió siendo menor a la obtenida con *p*-NPOc. Por ejemplo, en el caso del PUF la actividad con *p*-NPOc fue 2.69 y 252 veces superior a *p*-NPDe y *p*-NPAc respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por

Zhao *et al.* (2011), en donde, utilizando una lipasa recombinante de *Ylip* CGMCC 2.1405 (Lip9) se identificó que la actividad enzimática obtenida fue preferencial por sustratos de *p*-nitrofenol con radicales de cadena mediana. En este caso, se observó mayor actividad con el sustrato de C10 (decanoato). Otro punto importante, es que en la literatura existen diferentes estudios referentes a la producción de lipasas de *Ylip* pero en cada uno de ellos el soporte utilizado durante la fermentación suelen ser materiales no inertes en la gran mayoría de los casos. Por ejemplo, Imandi *et al.* (2010) reportaron la producción de lipasas *Ylip* NCIM 3589 utilizando torta de semilla de palma (*Elaeis guineensis*) consiguiendo una actividad máxima tras cuatro días de fermentación (96 h) de  $18.58 \text{ U g}^{-1}_{\text{Cat}}$  de sustrato fermentado seco, utilizando como sustrato *p*-NPalmiato.

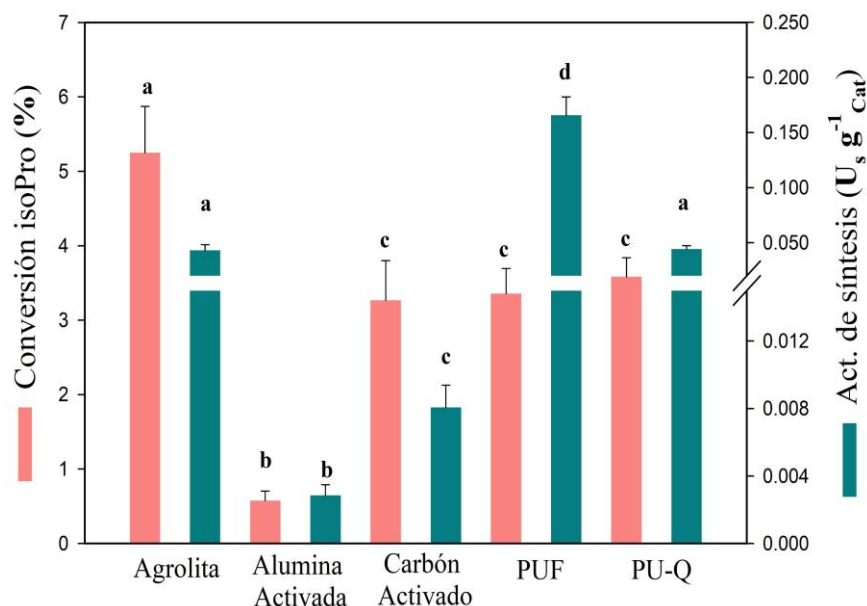
Por último, en la *Tabla 9* se muestran los mg de proteína obtenidos por g de soporte, dicha proteína fue asociada a la productividad enzimática, pero de igual forma da una idea indirecta del crecimiento de *Ylip* sobre los mismos. El soporte con la proteína promedio más alta fue PUF con  $32.65 \pm 6.20$ , seguido de PU-Q con  $15.62 \pm 1.49$  y perlita con  $11.06 \pm 0.93$  mg proteína  $\text{g}^{-1}$  sólido respectivamente, los soportes alúmina y carbón activados fueron los que presentaron los valores promedio más bajos, sin existir diferencia significativa entre sí. Estos resultados se pueden entrelazar directamente con los obtenidos durante las determinaciones de actividad hidrolítica en donde dichos soportes fueron a su vez los que presentaron los valores promedio más bajos con cada uno de los sustratos, siendo considerados soportes deficientes para el crecimiento del microorganismo y, por ende, la producción de las enzimas de interés. En contraparte, el PUF que presentó el valor de proteína más alto fue el que presentó la actividad enzimática más elevada. Algo llamativo de esta aseveración es que, aunque con PUF se obtuvo prácticamente el doble de proteína por cada g de sólido respecto a lo obtenido con PU-Q, los valores de actividad no se comportaron de la misma forma, pudiendo intuir que la maquinaria enzimática producida en PUF es mucho más variada, acompañada por enzimas asociadas a crecimiento (proteasas) comparada a la observada en PU-Q la cual se infiere presenta mayor actividad específica.

El bajo rendimiento observado con carbón y alúmina activada podría atribuirse a propiedades intrínsecas de estos soportes, como su estructura micro- y mesoporosa, que, aunque proporciona una alta área superficial, puede limitar la difusión interna y la colonización de la levadura debido al tamaño de poro. Además, pese a su elevada capacidad de adsorción, presentan una baja retención de humedad, lo que reduciría la disponibilidad del medio inductor en su interior y, por tanto, la eficiencia de crecimiento. En este sentido, Pandey *et al.* (2000), reportaron que

soportes con alta porosidad macroscópica y retención de humedad, como ejemplo, PUF, bagazo y perlita, favorecen la producción de enzimas extracelulares (lipasas, proteasas) frente a materiales como carbón, con microorganismos de origen fúngico.

Tabla 9. Determinación de proteína por masa de soporte posterior al proceso de fermentación, determinada por el método de Bradford. *Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).*

Soportes	mg proteína g <sup>-1</sup> sólido
PU-Q	15.62 ± 1.49 <b>a</b>
PUF	32.65 ± 6.20 <b>b</b>
Agrolita	11.06 ± 0.93 <b>c</b>
Carbón activado	0.16 ± 0.05 <b>d</b>
Alúmina activada	0.89 ± 0.20 <b>d</b>



**Figura 26.** Actividad de síntesis ( $U_s$ ) de los biocatalizadores obtenidos mediante el uso de diferentes soportes inertes en fermentación bifásica y rendimiento de conversión a isoPro (%) (Medio y condiciones de reacción: 100 mM aciP y 400 mM isoB en *n*-hexano durante 48 h a 55 °C). *Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).*

En cuanto a la actividad de síntesis de isoPro en *n*-hexano, se puede observar en la **Figura 26** que el % de conversión más alto obtenido tras 48 h de reacción se obtuvo con la perlita con un

valor de  $5.250 \pm 0.620$  %, seguido de los porcentajes obtenidos con carbón activado, PUF y PU-Q entre los cuales no existió diferencia significativa, con valores de  $3.26 \pm 0.53$ ,  $3.35 \pm 0.33$  y  $3.58 \pm 0.25$  % respectivamente y, por último, el porcentaje obtenido con alúmina activada de  $0.57 \pm 0.12$  %. Aunque esta figura (eje Y derecho) nos da una idea de la capacidad de síntesis que se puede obtener utilizando cantidades específicas de los soportes, no brinda una noción real de la capacidad específica (g de biocatalizador) de cada uno de ellos. Dentro de la misma figura (eje Y izquierdo) se puede observar la actividad específica de síntesis de isoPro considerada por g de catalizador; esta sección brinda información concisa para poder seleccionar uno de los soportes inertes.

La actividad de síntesis promedio más alta se obtuvo con el PUF con valores de  $0.16 \pm 0.02$   $U_s \text{ g}^{-1}_{\text{Cat}}$ , seguido de lo obtenido con la PU-Q y agrolita, en los cuales no existió diferencia significativa entre sí, con valores de  $0.044 \pm 0.003$  y  $0.043 \pm 0.005$   $U_s \text{ g}^{-1}_{\text{Cat}}$  respectivamente, seguidos de lo obtenido con el carbón y alúmina activados, en los cuales, tampoco existió diferencia significativa entre sí, con valores de  $0.008 \pm 0.001$  y  $0.002 \pm 0.001$   $U_s \text{ g}^{-1}_{\text{Cat}}$ , respectivamente. Los datos presentados anteriormente muestran que fue posible sintetizar el producto de interés mediante la aplicación de los biocatalizador obtenidos haciendo uso de un solvente orgánico como medio de reacción, aunque la conversión y la producción de isoPro fueron bajas, es importante notar que las cantidades utilizadas de cada uno de los biocatalizadores también lo fueron (Valores en g: PUF=0.05, PU-Q=0.2, Agrolita=0.3, carbón activado=1 y alúmina activada=0.5), siendo en su gran mayoría entre el 5 a 10 % del sólido total recuperado tras el tiempo de fermentación, teniendo la posibilidad de utilizar una mayor cantidad del mismo para mejorar la síntesis. Los resultados obtenidos arrojaron que el PUF fue el soporte con las mejores capacidades para su posterior análisis y aplicación en el sistema S/G, ya que su capacidad de síntesis de isoPro respecto a PU-Q, perlita, carbón activado y alúmina activada fue de aproximadamente 3.74, 3.83, 20.55 y 58.20 veces mayor respectivamente.

En general, los resultados obtenidos, están por debajo de los reportados por da Silva *et al.* (2019), en donde utilizaron biocatalizadores provenientes del secado directo de los sólidos obtenidos tras la fermentación de salvado de soja con *Ylip* IMUFRJ 50682. En donde se investigó la posibilidad de realizar la reacción de esterificación del etanol y los ácidos: oleico, linoleico, esteárico y palmítico, obteniendo rendimientos de conversión de 85, 90, 79 y 82 % respectivamente tras 24 h, utilizando un 30% en peso del sólido fermentado seco y una relación molar 1:1, a 30 °C,

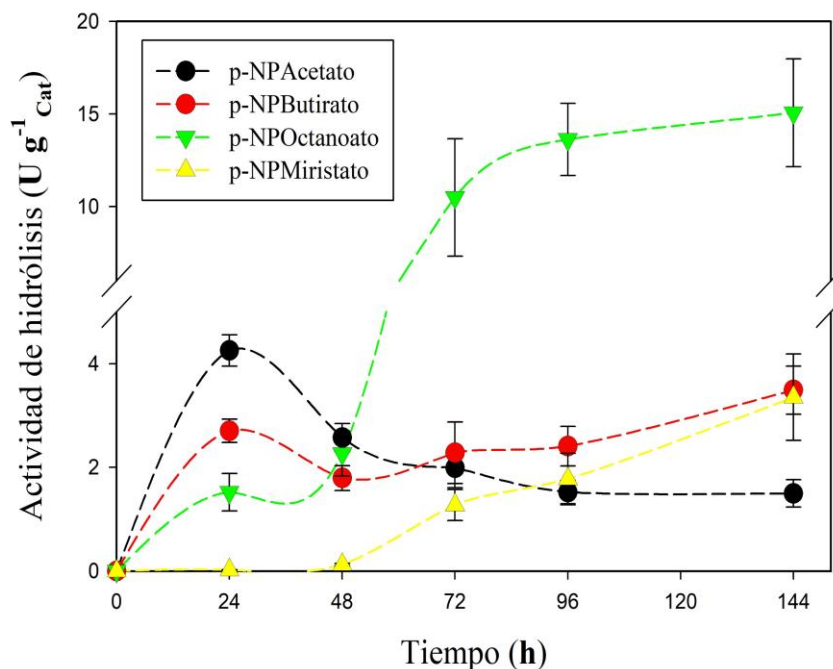
en un medio de reacción con y sin disolvente (*n*-hexano). Aunque los rendimientos de conversión mostrados anteriormente son ampliamente superiores a los obtenidos en este trabajo, la cantidad de biocatalizador empleado también lo fue, además de utilizar un soporte no inerte durante el proceso de fermentación, lo cual se ve reflejado en que el biocatalizador quizá pueda reutilizarse para otro ciclo catalítico, pero no así el soporte para una nueva fermentación.

### 10.3.2. Cinética de producción de enzimas lipolíticas con PUF como soporte

#### 10.3.2.1. Actividad de hidrólisis (especificidad de sustrato)

Una vez seleccionado el PUF como soporte, se llevó a cabo una cinética de crecimiento con el fin de establecer la duración de cultivo que maximiza la producción enzimática e identificar la especificidad de las enzimas producidas. En la **Figura 27** se puede observar el patrón de especificidad de las enzimas secretadas e inmovilizadas en el PUF hacia sustratos de éster de *p*-nitrofenol con radicales de diferente tamaño, se observa que existe una producción predominante de enzimas con actividad tipo esterasa hasta las primeras 24 h ( $4.25 \pm 0.30 \text{ U g}^{-1}_{\text{Cat}}$ ), aunque dentro de la composición química del aceite de oliva (agente inductor) se tienen principalmente ácido oleico, linoleico, esteárico (ácidos de cadena larga), se sabe que *Ylip* produce enzimas de forma constitutiva o basal tales como esterasas y proteasas (Madzak *et al.*, 2004).

Posteriormente, a partir de las 48 h de cultivo, parece comenzar la inducción formal, pues es aquí donde se incrementa la velocidad de producción de enzimas con actividad tipo lipasa y disminuye drásticamente la actividad esterasa. Además, el sustrato con el que se obtuvo la mayor actividad fue con *p*-NPOc haciendo notoria la preferencia de la levadura por sustratos de cadena mediana (C8) sin presentar diferencia significativa entre la actividad obtenida a los 96 y 144 h ( $13.62 \pm 1.94$  y  $15.06 \pm 2.90 \text{ U g}^{-1}_{\text{Cat}}$  respectivamente). Asimismo, no existió diferencia entre la actividad obtenida con los sustratos C4 y C14 a las 144 h. Algo interesante es que, considerando las actividades obtenidas con el sustrato de mayor cantidad de carbonos *p*-NPMi (C14), parece seguir una tendencia de crecimiento constante durante todo el cultivo. Derivado de este comportamiento, queda pendiente mencionar qué enzimas podrían estar actuando durante cada etapa del cultivo. En este sentido, se puede intuir que durante las primeras horas de la curva de progreso la enzima encargada de la hidrólisis podría ser la enzima Lip15, Gurung *et al.* (2013) reportaron dicha preferencia de Lip15 por sustratos como ésteres de cadena corta (C2-C4) mencionando que esta enzima presenta características más del tipo esterasa que de una lipasa real.



**Figura 27.** Perfil de especificidad (actividades de hidrólisis) durante la fermentación del biocatalizador PUF obtenido mediante fermentación bifásica. Sustratos: ésteres de *p*-nitrofenol de diferente tamaño de radical, a 37 °C, pH 7 durante 10 min. Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

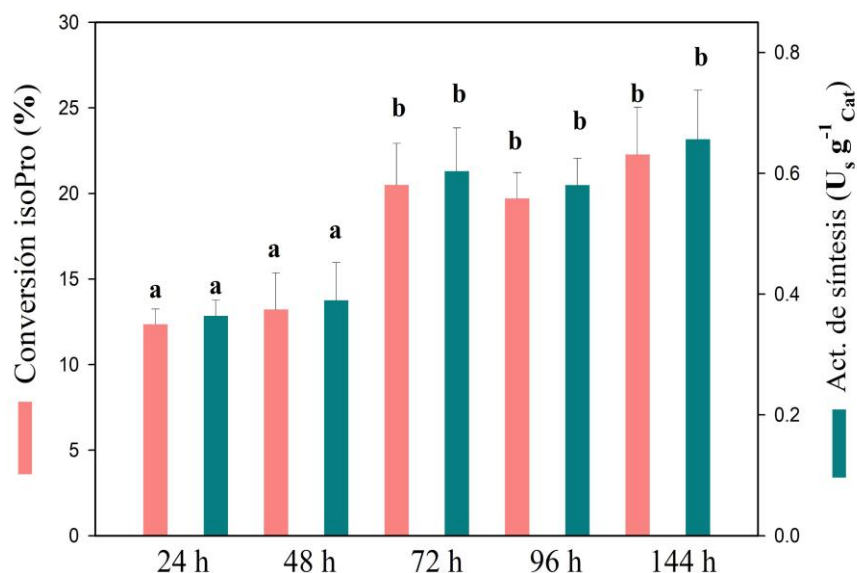
Otros estudios han demostrado que enzimas como Lip4, Lip5 y Lip7 presentan mayor afinidad por cadenas medianas de entre C6-C8, así como Lip8 y Lip13 por cadenas de C10-C15, respectivamente. Las cuales, según los resultados mostrados anteriormente, podrían ser las encargadas de hidrolizar durante las horas posteriores (Fickers *et al.*, 2005; Syal *et al.*, 2017). Lip2 es la principal lipasa extracelular de *Ylip* que se ha aislado y caracterizado. Fabiszewska *et al.* (2024) demostraron que esta enzima tiene preferencia por sustratos con cadena C4, pero que a su vez es altamente eficiente con sustratos C8 y C18.

Por otro lado, trabajos como los de Sheng *et al.* (2012) y Kumari *et al.* (2012) mencionan que esta enzima tiene una mayor especificidad por ésteres de *p*-NP con C12 o C16 respectivamente. Por lo que en general, parece ser que Lip2 es activa con un amplio rango de sustratos. En este sentido, es importante mencionar que trabajos como los de Pignede *et al.* (2000) y Brígida *et al.* (2014), reportaron la máxima producción de Lip2 aproximadamente a las 72 h de cultivo, utilizando aceites o triglicéridos como agente inductor. Estos resultados van de la mano con los obtenidos en esta sección en donde la máxima actividad se dio a las 72 h con *p*-NPOc (C8) por lo

que la Lip2 o bien, el efecto combinado de Lip2 y las serie de enzimas mencionadas anteriormente sean las encargadas de realizar dicha actividad.

### 10.3.2.2. Capacidad de síntesis del catalizador PUF en medio orgánico y sistema S/G.

Por otro lado, en la **Figura 28** se presentan las capacidades de síntesis de los biocatalizadores durante cada tiempo de cultivo; cada uno de ellos logró realizar la síntesis de isoPro tras 24 h de reacción, obteniendo el mayor % de conversión con los soportes recuperados a las 144 h ( $25.21 \pm 3.10$  %) pero sin existir diferencia significativa con lo obtenido a 96 y 72 h ( $22.29 \pm 1.74$  % y  $23.18 \pm 2.75$  %, respectivamente). Este fenómeno se puede conectar directamente con el comportamiento observado durante los ensayos de hidrólisis y atribuir el incremento de conversión a partir de las 72 h al incremento en la presencia de actividad lipasa asociada a Lip2. Aunque, por otro lado, parece que debido al tamaño de los sustratos isoB (4C) y aciP (3C) de igual forma fue posible la síntesis por la simple presencia de las esterasas durante las primeras 24 y 48 h. Por lo que se puede intuir que los resultados de conversión obtenidos en 72, 96 y 144 h sean un efecto combinado de ambas enzimas y que para fines prácticos 72 h son más que suficientes para obtener los catalizadores.

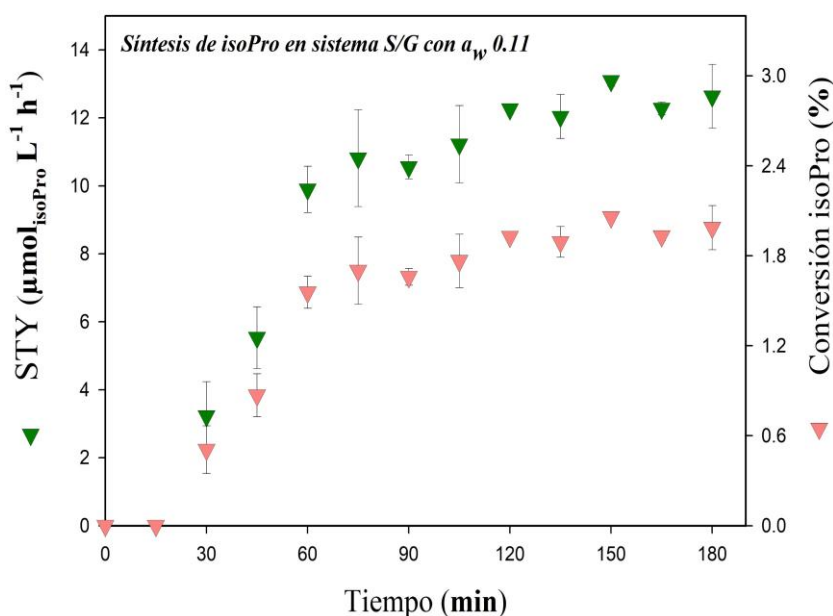


**Figura 28.** Capacidad de síntesis del biocatalizador PUF durante la curva de crecimiento. (100 mM aciP, 400 mM isoB en *n*-hexano durante 144 h a 55 °C a 180 rpm). Letras diferentes representan diferencia significativa mediante comparación múltiple de medias Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Otro aspecto que resaltar es que la actividad de síntesis obtenida con el catalizador PUF fue prácticamente 20 veces menor que la actividad de hidrólisis analizada previamente ( $0.60 \pm 0.05 \text{ U}_s \text{ g}^{-1}_{\text{Cat}}$  y  $15.06 \pm 2.90 \text{ U g}^{-1}_{\text{Cat}}$ , visto de forma general, ya que no es considerada la diferencia intrínseca en el sustrato utilizado. Este fenómeno se fundamenta en la termodinámica de la reacción (Lee y Dordick, 2002), pues en medio acuoso el agua que actúa como nucleófilo se encuentre en exceso favoreciendo constantemente la reacción hacia el producto de hidrólisis, a diferencia de la reacción de síntesis, donde el equilibrio se desplaza (no en la misma proporción) solamente debido al incremento de isoB en el medio de reacción, dicho exceso a su vez se podría reflejar en una posible inhibición si la maquinaria enzimática no es robusta y tolerante al sustrato en cuestión, además de que suelen requerir condiciones de reacción más específicas (Wehtje *et al.*, 1997; Stergiou *et al.*, 2013). De igual forma, otro punto a remarcar es que la actividad de síntesis obtenida durante el análisis de la curva de crecimiento fue  $\sim 3$  veces superior a la obtenida en durante el comparativo de los soportes presentado en el apartado anterior, lo cual se debe a que se duplicó la cantidad de biocatalizador en el medio de reacción, dando indicio que utilizando una mayor cantidad del inmovilizado se podrían alcanzar rendimientos de conversión más competitivos.

Por último, se evaluó el biocatalizador obtenido con PUF en el sistema S/G, en la **Figura 29** se observa que éste fue capaz de producir el éster de interés, isoPro. Este resultado es particularmente relevante desde un punto de vista práctico, ya que solo fue necesario empacar directamente 1 g del soporte seco proveniente de la fermentación, sin requerir la purificación previa de la enzima. En el eje Y izquierdo se presentan los valores de productividad volumétrica, expresados como la propiedad intensiva STY, a lo largo de 180 min de reacción. El estado estacionario se alcanzó aproximadamente a los 105 min, con valores STY promedio de  $12.45 \pm 0.62 \mu\text{mol de isoPro} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . En el eje Y izquierdo se muestran la curva de progreso de los rendimientos de conversión alcanzados, se puede observar que el valor promedio durante el estado estacionario fue de  $1.95 \pm 0.09 \%$  respecto a aciP, aunque tanto dicho valor de conversión así como el STY obtenido son bajos comparados a los resultados obtenidos al evaluar el sistema S/G en la producción de isoPro con la enzima comercial CalB inmovilizada de 2 formas distintas (90-98%;  $\text{STY} \sim 8 \text{ g de isoPro L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Cruz-Martinez *et al.*, 2024; Cruz-Martínez *et al.*, 2025) brinda una alternativa llamativa rentable debido al bajo coste de producción del biocatalizador además de su facilidad obtención. Sumado a ello, el soporte utilizado durante la fermentación (PUF) puede ser reutilizado de forma constante ya que basta con una serie de lavados para su posterior aplicación,

evitando la constante producción de residuos. Por otra parte, una ventaja del sistema S/G es que se puede trabajar en continuo, por lo que una vez mejorado el rendimiento de conversión considerando la evaluación de cambios en parámetros como la  $a_w$  o la cantidad de biocatalizador empacado, se podría trabajar de forma estable y continua. Esta sección del trabajo brinda el primer acercamiento y deja las puertas abiertas para la evaluación de las condiciones requeridas para la optimización y mejoramiento de la producción de isoPro e incluso de otros ésteres de interés comercial utilizando sistemas no convencionales como el S/G, mediante la aplicación de la inmovilización directa de células/enzimas provenientes de fermentación bifásica.



**Figura 29.** Capacidad de síntesis del biocatalizador PUF en sistema S/G. (Condiciones de reacción: flujo de  $\text{N}_2$  total:  $65 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $N_{\text{isoB}}$ :  $30.67 \mu\text{mol min}^{-1}$ ,  $N_{\text{aciP}}$ :  $6.86 \mu\text{mol min}^{-1}$  (relación  $\sim 4:1$  isoB:aciP respectivamente, a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $1 \text{ atm}$ ;  $1 \text{ g}$  de biocatalizador PUF a  $a_w 0.11$  con una altura de lecho de  $18 \text{ cm}$ ). Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

### 10.3.3. Screening de precipitantes para la obtención de CLEAs a partir del extracto crudo de *Ylip* con BSA o Q como *co-feeder*.

Un problema general del sistema de inmovilización directa utilizado durante los ensayos anteriores es la facilidad con la que las células o enzimas se desprenden del mismo. Aunque es una gran ventaja poder utilizar los biocatalizadores directamente de la fermentación, su aplicación puede verse mermada por su capacidad de reutilización (el soporte puede reutilizarse fácilmente,

pero no el biocatalizador en su conjunto). Por lo tanto, se buscó una alternativa a este problema, se planteó la elaboración de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA) por sus siglas en inglés), aprovechando el extracto crudo obtenido tras el tiempo de fermentación. Lo que se consiguió realizando simples pasos de centrifugación y filtración, evitando así posteriores pasos de purificación más específicos como los cromatográficos (exclusión, intercambio iónico, etc.).

Es sabido que los CLEA suelen presentar cierta fragilidad una vez producidos, pero varios autores han hecho uso de protectores o co-alimentadores “*co-feeders*” orgánicos como la BSA, clara de huevo, Q, entre otros. Los cuales tienen como característica común una alta cantidad de grupos amino libres (residuos de Lys, Arg e His en la BSA y grupos amino en la *n*-glucosamina en el Q). Estos *co-feeders* tienen un papel muy relevante para mejorar la reacción de entrecruzamiento y, por lo tanto, mejorar las capacidades catalíticas y de estabilidad del inmovilizado. (Shah *et al.*, 2006; Cruz J *et al.*, 2012; Velasco-Lozano *et al.*, 2020; Mageed *et al.*, 2019).

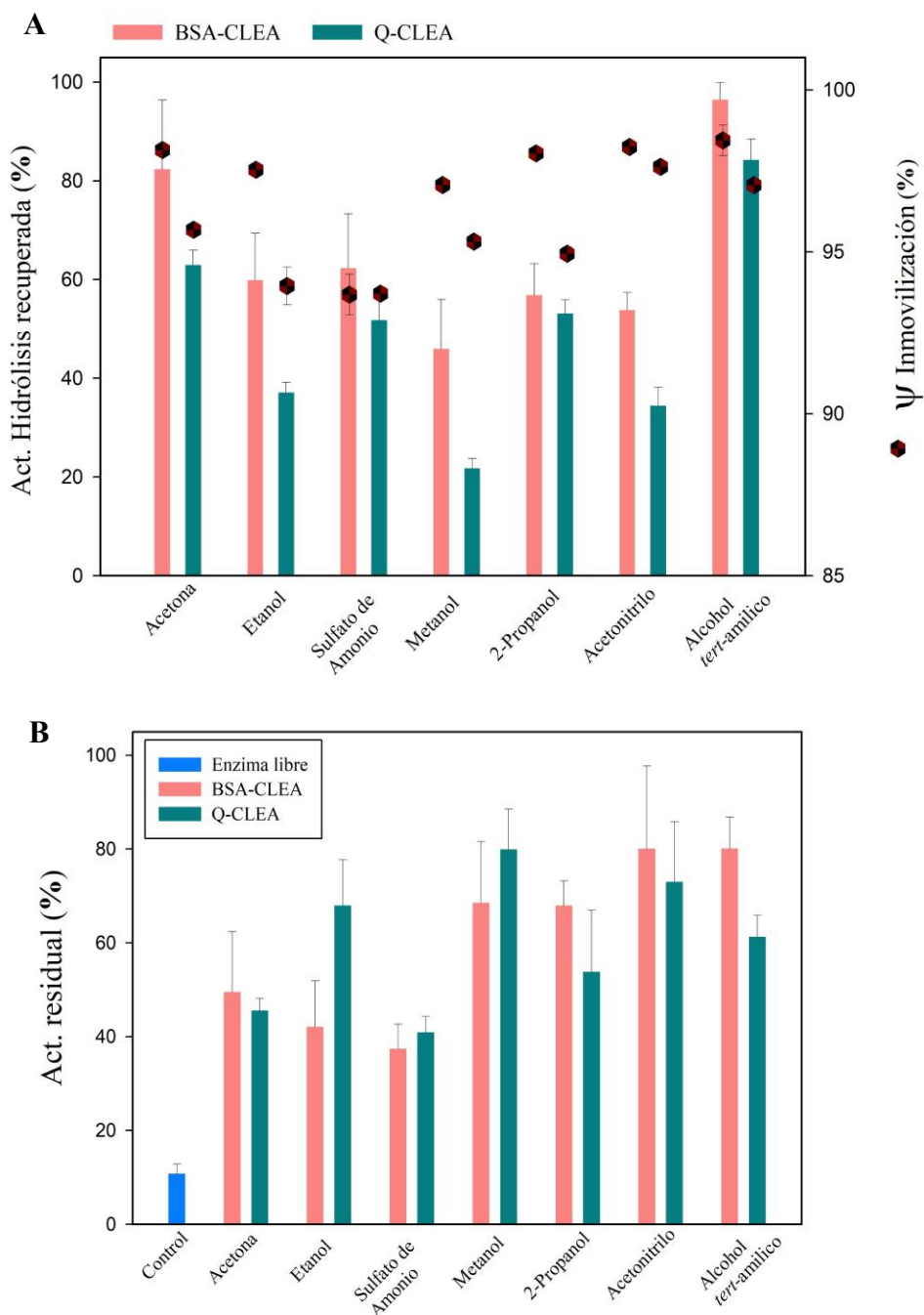
Considerando todo lo mencionado, se realizó un screening de precipitantes para evaluar el rendimiento de inmovilización y la actividad recuperada utilizando BSA y quitosano como *co-feeders*. En la **Figura 30A**, en el eje Y de lado derecho se puede observar el rendimiento de inmovilización obtenido en cada tratamiento, en donde para cada uno de los ensayos los valores se mantuvieron en un rango entre 93.68 % - 98.44 % con BSA y 93.71 % - 97.62 % con quitosano, respectivamente. Dichos porcentajes son buenos ya que son cercanos al 100, por lo que el método de CLEA hasta este punto se podría considerar como un método potencialmente eficiente para este tipo de enzimas si es que las mismas no pierden posteriormente su capacidad catalítica debido al alto nivel de entrecruzamiento. En otras palabras, que la posible pérdida de actividad observada en el inmovilizado resultante será debida directamente al método y no así, a ausencia o desnaturalización de la enzima. Por otro lado, en la **Figura 30A** eje Y izquierdo, se puede observar que tanto los CLEAs con BSA y quitosano obtenidos utilizando alcohol *tert*-amílico como agente precipitante fueron los que obtuvieron la actividad de hidrólisis promedio recuperada más alta con  $96.43 \pm 10.45$  % y  $84.21 \pm 4.23$  % respectivamente, seguido de los valores obtenidos con acetona con  $82.36 \pm 14.02$  % y  $62.96 \pm 3.0$  %, en ambos casos (BSA y Q), el peor precipitante fue metanol, con el que se obtuvieron valores promedio de  $45.92 \pm 10.06$  % y  $21.71 \pm 2.03$  %. Dichos valores fueron calculados tomando como base la actividad del extracto crudo soluble utilizando *p*-NPBu como sustrato, la cual fue de  $0.84 \pm 0.02$  U mL<sup>-1</sup>. Como se mencionó anteriormente, la diferencia

en los valores obtenidos parece estar dada por la configuración estérica adoptada por el *co-feeder*. La enzima y la mezcla obtenida de estos, al estar en contacto con los precipitantes, pueden incidir directamente en la forma o posición en la que ocurrirá el entrecruzamiento, llegando a limitar la reacción debido a la imposibilidad de la enzima de captar los sustratos. O bien, directamente por la desnaturalización de la enzima debido a la naturaleza del precipitante.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares o en varios casos superiores a los presentados en diversos estudios. En este sentido, Cunha *et al.* (2008) utilizaron extracto crudo liofilizado de un cultivo sumergido de *Ylip*, determinaron el efecto de diferentes métodos de inmovilización, en los cuales tuvo rendimientos de inmovilización del 71<sup>1</sup>, 90<sup>2</sup>, 97<sup>3</sup> y 0<sup>4</sup> %; así como una retención de actividad de 34<sup>1</sup>, 50<sup>2</sup>, 61<sup>3</sup> y 0<sup>4</sup> % mediante el uso de adsorción hidrofóbica (octil-agarosa<sup>1</sup> y octadecyl-Sepabead<sup>2</sup>), adsorción iónica<sup>3</sup> y por enlace covalente<sup>4</sup>, respectivamente. Por otro lado, Cui *et al.* (2013), reportaron rendimientos de inmovilización de 76.5 % y una retención de actividad 1.7 veces superior a la enzima libre utilizando espuma de poliuretano para la inmovilización de la lipasa Lip2 de *Ylip* (purificada) mediante recubrimiento de polietilenimina (PEI) y acoplamiento con GA. Y, por último, Pereira *et al.* (2019) reportaron rendimientos de inmovilización del 96.7 % con una retención de actividad de entre 70-75 % utilizando un método de microencapsulamiento basado en alginato, quitosano y CaCl<sub>2</sub>, utilizando directamente el extracto crudo libre de células proveniente de cultivos sumergidos con *Ylip* IMUFRJ 50682.

Por último, se evaluó la termoresistencia de los inmovilizados obtenidos; se colocaron 200 µL de CLEA en suspensión con 300 µL de buffer de fosfato de sodio (25 mM, pH 7) y se dejaron 3 h a 55 °C para posteriormente determinar la actividad residual. En la **Figura 30B** se puede observar que cada uno de los inmovilizados mejoró la termoresistencia en comparación con la enzima libre, ya que con dicho tratamiento solo se logró recuperar 10.77 ± 2.07 % de la actividad inicial. En contra parte, el tratamiento con el que se obtuvo el valor promedio más alto de actividad residual fue con BSA usando acetonitrilo y alcohol *tert*-amílico con un 80.05 ± 17.66 % y 80.10 ± 6.73 %, respectivamente, seguido de lo obtenido con quitosano usando metanol y acetonitrilo con un 79.91 ± 8.64 % y 72.98 ± 12.84 %, respectivamente. En este caso en particular, es importante mencionar que, aunque con metanol fue el tratamiento con el que se recuperó un mayor % de actividad residual, el valor de actividad que representa dicho 79.91 % es muy bajo comparado con

la actividad enzimática que representaría el 61.30 % de actividad residual obtenida con alcohol *tert*-amílico.



**Figura 30.** (A) Rendimiento de inmovilización y retención de actividad hidrolítica durante el screening de precipitantes en la producción de CLEAs utilizando el extracto crudo de *Ylip* NRRL 7817; (B) Evaluación de la termorresistencia de los CLEA obtenidos (% de actividad residual después de 2 h a 55 °C). Los resultados representan la media de tres réplicas independientes, con barras de error que indican la desviación estándar de la media.

En general, parece ser que el mejor precipitante para obtener biocatalizadores competentes con extractos crudos de *Ylip* es el alcohol *tert*-amílico, observando de igual forma que aquellos inmovilizados hechos con BSA como *co-feeder* obtuvieron mejores resultados de forma general. Sin embargo, experimentalmente el manejo de los sólidos fue más sencillo al utilizar quitosano, ya que este le brindaba un cuerpo con mayor rigidez, lo que facilitaba la recuperación durante su elaboración y aplicación.

#### 10.4. Conclusiones

Esta última sección del trabajo doctoral remarca el potencial de la aplicación de inmovilizados de *Ylip* NRLL 7817 obtenidos directamente del secado de los sólidos, PUF, recuperados mediante fermentación bifásica, como biocatalizador prometedor para la síntesis de ésteres en medio orgánico (*n*-hexano) y en particular de manera más sostenible en el sistema S/G. Por otro lado, basados en la caracterización de la actividad de hidrólisis obtenida, los resultados demuestran que los inmovilizados presentan una importante actividad sobre sustratos de cadena mediana como la presente en la estructura del *p*-nitrofenil octanoato, teniendo el máximo a las 72 h de cultivo. Debido a ello, se puede intuir que, aunque la actividad puede considerarse del tipo esterasa, los resultados demostraron que en tiempos posteriores a las 48 h existe un efecto cooperativo y sinérgico de toda la maquinaria enzimática (esterasas y lipasas), teniendo como protagonista a la enzima Lip2. Aunque los rendimientos globales de conversión tanto en el sistema orgánico como en S/G no son del todo llamativos, ya que no fueron optimizados (~25 y ~2 respectivamente). La aplicación de este tipo de inmovilizado brinda ventajas a nivel de su fácil preparación, obtención y reutilización (soporte), además del bajo costo que representa su producción; al no requerir pasos extra de purificación, así como evitar la necesidad de adquirir una enzima comercial. Aunado a esto, se suman las diversas ventajas operacionales y sostenibles que presenta la aplicación de sistemas de reacción más verdes como lo es el sistema S/G.

Por último, se identificó el potencial de la aplicación del método de inmovilización de agregados enzimáticos entrecruzados en la búsqueda de nuevos catalizadores eficientes basados en BSA o quitosano como protector o alimentador. Para ello, se considera que el alcohol *tert*-amílico es un precipitante altamente efectivo para su producción. En general, esta propuesta aporta la idea de biocatalizadores más “verdes”, de fácil elaboración (no requiere pasos de purificación).

Biocatalizadores en donde la mayor proporción de sus componentes en masa tienen una naturaleza biodegradable (aplicación de BSA o quitosano), lo que disminuye la generación de residuos de difícil degradación como algunos soportes tradicionales.

## 11. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos durante este trabajo de investigación brindaron información relevante sobre la aplicación del sistema biocatalítico S/G en la producción de ésteres frutales como el isoPro evidenciando sus ventajas operacionales, su versatilidad al lograr evaluar 3 diferentes biocatalizadores, y la facilidad para evaluar diversos parámetros de impacto directo en el rendimiento de la reacción como lo son la  $a_w$ , la relación molar de sustratos y la carga de biocatalizador.

En este sentido, la aplicación de las propuestas formuladas durante este trabajo; CalB-CLEA y los inmovilizados de *Ylip* NRLL 7817 (y su maquinaria enzimática) surgen como una alternativa a la aplicación de productos comerciales ya inmovilizados (CalB-IP), evitando así el costo y masa residual asociado a las resinas poliméricas utilizadas, y en segundo caso, evitando la necesidad de adquirir el biocatalizador *per se*. En general, ambos biocatalizadores presentados tienen un potencial importante para su aplicación en la producción industrial de este tipo de productos de valor agregado (cada uno en la medida de sus capacidades), ya que de manera global CalB-CLEA presentó características llamativas en cuanto a la obtención de un proceso más verde, sostenible y eco-amigable al ser un biocatalizador basado en masa proteica, consiguiendo rendimientos de conversión similares al producto comercial CalB-IP pero requiriendo una menor cantidad de catalizador, y más importante de carga enzimática en el biocatalizador. En cuanto al inmovilizado directo de células/enzimas de *Ylip* NRLL 7817, aún quedan experimentos y parámetros por evaluar para lograr optimizar la producción en el sistema S/G (en solvente orgánico presentó resultados competentes), es importante denotar que identificar la capacidad de síntesis de este biocatalizador en el sistema fue el primer objetivo a cumplir y el cual se logró con éxito. Aunado a esto, durante la etapa final del proyecto se propuso una alternativa biocatalítica más con los BSA-CLEA del extracto crudo de *Ylip* NRLL 7817 los cuales reúnen las mejores características de ambos mundos al presentar una masa de naturaleza orgánica y la utilización de enzimas de producción propia.

Para concluir con este trabajo de investigación doctoral, se debe de mencionar que durante el mismo, no sólo se logró la síntesis de un éster frutal como el isoPro en un sistema de reacción no descrito previamente, sino que se lograron abordar enfoques de investigación que no se habían reportados durante dicha síntesis, como lo fue en primera instancia el análisis de los fenómenos de adsorción en el sistema S/G, así como un enfoque centrado en la química verde y en la relación existente entre el medio de reacción y el biocatalizador en la misma síntesis, y por último, la búsqueda de un proceso más viable económicamente aplicando biocatalizadores de producción y manufactura propia. Si bien se obtuvieron resultados prometedores en comparación con sistemas de reacción no convencionales como el de CO<sub>2</sub> supercrítico reportado anteriormente, aún queda trabajo por hacer en cuanto a la optimización del funcionamiento del sistema S/G para poder trabajar de forma totalmente continua y lograr alcanzar las productividades volumétricas y operacionales de sistemas como el libre de solventes. Un panorama bastante alentador es que, comparado con ambos sistemas mencionados, se obtuvo un rendimiento de conversión a producto similar, pero con la ventaja de la aplicación de un proceso de síntesis más verde y con una generación de residuos mucho menor, basado en los resultados de métricas verdes.

## 12. Referencias

- [1] Balen, M., Silveira, C., Kratz, J. M., Simões, C. M. O., Valério, A., Ninow, J. L., Nandi, L. G., Di Luccio, M., & de Oliveira, D. (2015). Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 514–520. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.008>
- [2] Barrera-Rivera, K. A., & Martínez-Richa, A. (2017). *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase Lip2 as biocatalyst for the ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone. *Molecules*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111917>
- [3] Barzana, E., Klibanov, A. M., & Karel, M. (1987). Enzyme-catalyzed, gas-phase reactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 15, 25–34. <https://doi.org/10.1007/BF02798504>
- [4] Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- [5] Billings, S. W., Bronlund, J. E., & Paterson, A. H. J. (2006). Effects of capillary condensation on the caking of bulk sucrose. *Journal of food engineering*, 77(4), 887–895. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.031>
- [6] Bolivar, J. M., & López-Gallego, F. (2020). Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow reactors. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 25, 100349. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.010>

- [7] Bousquet-Dubouch, M. P., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2001). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1550(1), 90–99. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00271-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00271-6)
- [8] Brígida, A. I. S., Amaral, P. F. F., Coelho, M. A. Z., & Gonçalves, L. R. B. (2014). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (Vol. 101). <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.016>
- [9] Cananà, S., De Nardi, F., Blangetti, M., Parisotto, S., & Prandi, C. (2024). Biocatalysis in non-conventional media: Unlocking the potential for sustainable chiral amine synthesis. *Chemistry—A European Journal*, 30(52), e202304364. <https://doi.org/10.1002/chem.202304364>
- [10] Cantone, S., Hanefeld, U., & Basso, A. (2007). Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chemistry*, 9(9), 954–971. <https://doi.org/10.1039/B618893A>
- [11] Castillo-Araiza, C. O., Che-Galicia, G., Dutta, A., Guzmán-González, G., Martínez-Vera, C., & Ruíz-Martínez, R. S. (2015). Effect of diffusion on the conceptual design of a fixed-bed adsorber. *Fuel*, 149, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.09.023>
- [12] Chahinian, H., Belle, V., Fournel, A., & Carrière, F. (2003). The role of pancreatic lipase C2-like domain in enzyme interaction with a lipid-water interface. *European journal of lipid science and technology*, 105(10), 590–600.
- [13] Cordero-Soto, I. N., Castillo-Araiza, C. O., García-Martínez, L. E., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2020). Solid/Gas biocatalysis for aroma production: An alternative process of white biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107767. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107767>
- [14] Cordero-Soto, I., Rutiaga-Quiñones, O., Huerta-Ochoa, S., Saucedo-Rivalcoba, V., & Gallegos-Infante, A. (2017). On the understanding of the adsorption of 2-phenylethanol on polyurethane-keratin based membranes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 15(5). <https://doi.org/10.1515/ijcre-2017-0103>
- [15] Cruz, J., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R., Torres, R., & Ortiz, C. (2012). Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 80, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.04.003>
- [16] Cruz-Martínez, Y. A., Castillo-Araiza, C. O., Castillo-Rosales, E., & Huerta-Ochoa, S. (2024). Effect of adsorption/desorption of substrates/products during isobutyl propionate synthesis over CalB Immo Plus™ in solid/gas biocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*, 208, 109341. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109341>
- [17] Csanádi, Z., Kurdi, R., & Bélafi-Bakó, K. (2012). Ethyl-acetate synthesis in gas phase by immobilized lipase. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, 39–44. <https://doi.org/10.1515/316>
- [18] Cui, C., Tao, Y., Li, L., Chen, B., & Tan, T. (2013). Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.03.001>

- [19] Cunha, A. G., Fernández-Lorente, G., Bevilaqua, J. v., Destain, J., Paiva, L. M. C., Freire, D. M. G., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2008). Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - A comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1–3). <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8073-3>
- [20] da S. Pereira, A., Fontes-Sant’Ana, G. C., & Amaral, P. F. F. (2019). Mango agro-industrial wastes for lipase production from *Yarrowia lipolytica* and the potential of the fermented solid as a biocatalyst. *Food and Bioproducts Processing*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.002>
- [21] da Silva, J. R., Pedro, K. C., da Silva, G. A., Castro, A. M., Coelho, M. A. Z., Ribeiro, B. D., Henriques, C. A., & Langone, M. A. (2024). Exploring lipase-based biocatalysts derived from *Yarrowia lipolytica* for fatty acid ethyl esters synthesis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 1-16.
- [22] de Souza, C. E. C., Ribeiro, B. D., & Coelho, M. A. Z. (2019). Characterization and application of *Yarrowia lipolytica* lipase obtained by solid-state fermentation in the synthesis of different esters used in the food industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(3). <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03047-5>
- [23] Dimoula, K., Pohl, M., Büchs, J., & Spiess, A. C. (2009). Substrate and water adsorption phenomena in a gas/solid enzymatic reactor. *Biotechnology Journal*, 4, 712–721. <https://doi.org/10.1002/biot.200800291>
- [24] Durán-Pérez, J. F., Rivera de la Cruz, J. G., & Castillo-Araiza, C. O. (2023). Elucidating selective and total oxidation elementary reactions over a Ni-based catalyst for sustainable ethylene production via oxidative dehydrogenation of ethane: Microkinetic analysis. *Chemical Engineering Journal*, 470, 143939. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143939>
- [25] Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0992-X>
- [26] Fabiszewska, A., Zieniuk, B., Jasińska, K., Nowak, D., Sasal, K., Kobus, J., & Jankiewicz, U. (2024). Extracellular lipases of *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing plant oils—studies supported by the design of experiment methodology. *Applied Sciences*, 14(23), 11449. <https://doi.org/10.3390/app142311449>
- [27] Fanaro, G. B., Fontanille, P., Maróstica, M. R., & Bicas, J. L. (2016). Biotechnological aroma compounds. *Biotechnological Production Of Natural Ingredients For Food Industry* (pp. 255-287). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/97816810826531160101>
- [28] Fickers, P., Fudalej, F., le Dall, M. T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P., & Nicaud, J. M. (2005). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(3). <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.12.003>
- [29] Fickers, P., Marty, A., & Nicaud, J. M. (2011). The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
- [30] Gamayurova, V. S., Zinoveva, M. E., Shnaider, K. L., & Davletshina, G. A. (2021). Lipases in esterification reactions: A review. *Catalysis in Industry*, 13, 58–72. <https://doi.org/10.1134/S2070050421010025>

- [31] Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., & Mukesh, D. (2000). Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis Reviews: Science and Engineering*, 42(4), 439–480. <https://doi.org/10.1081/CR-100101953>
- [32] Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- [33] García-Martínez, L. E., Castillo-Araiza, C. O., Quijano, G., & Huerta-Ochoa, S. (2022). On the modelling and surface response analysis of a non-conventional wall-cooled solid/gas bioreactor with application in esterification. *Chemical Engineering Journal*, 437, 135063. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135063>
- [34] Graber, M., Bousquet-Dubouch, M. P., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2003). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: Effects of water on kinetic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1648(1–2), 24–32. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00038-3)
- [35] Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P. W. M., & Wyss, M. (2014). *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 40, Issue 3). <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770386>
- [36] Guauque Torres, M. P., Foresti, M. L., & Ferreira, M. L. (2014). CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 135063. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.004>
- [37] Gupta, M. N., & Roy, I. (2004). Enzymes in organic media: forms, functions and applications. *European Journal of Biochemistry*, 271(13), 2575-2583. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04163.x>
- [38] Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- [39] Hermanson, G. T. (2013). Homobifunctional Crosslinkers. In *Bioconjugate techniques*. Academic press (3rd ed., Chapter 5). <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
- [40] Huerta-Ochoa, S., Castillo-Araiza, C. O., Cordero-Soto, I. N., Cruz-Martínez, Y. A., Prado-Barragán, L. A., & Rutiaga Quiñones, O. M. (2023). Fundamentals and applications of solid/gas biocatalysis. In M. N. Gupta (Ed.), *Some key topics in chemistry & biochemistry for biotechnologists* (pp. 65–90). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003287599>
- [41] I.S. Brígida, A., F.F. Amaral, P., R.B. Gonçalves, L., M. da Rocha-Leão, M. H., & A.Z. Coelho, M. (2013). *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase production in a multiphase bioreactor. *Current Biochemical Engineering*, 1(1). <https://doi.org/10.2174/22127119113019990005>
- [42] Imandi, S. B., Karanam, S. K., & Garapati, H. R. (2010). Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(02). <https://doi.org/10.4236/abb.2010.12016>
- [43] Izci, A., & Hosgün, H. L. (2007). Kinetics of synthesis of isobutyl propionate over amberlyst-15. *Turkish Journal of Chemistry*, 31(5).

- [44] Jaiswal, K. S., & Rathod, V. K. (2018). Acoustic cavitation promoted lipase catalysed synthesis of isobutyl propionate in solvent free system: Optimization and kinetic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, *40*, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.026>
- [45] Kermasha, S., & Gill, J. K. (2021). Biocatalysis of enzymes in nonconventional media. En S. Kermasha & M. N. A. Eskin (Eds.), *Enzymes: Novel biotechnological approaches for the food industry* (pp. 171–201). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800217-9.00007-1>
- [46] Khan, Z., Javed, F., Shamair, Z., Hafeez, A., Fazal, T., Aslam, A., Zimmerman, W. B., & Rehman, F. (2021). Current developments in esterification reaction: A review on process and parameters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *103*, 80–101. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.07.018>
- [47] Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, *409*(6817), 241–246. <https://doi.org/10.1038/35051619>
- [48] Kulishova, L. M., & Zharkov, D. O. (2017). Solid/Gas biocatalysis. *Journal of Biochemistry (Moscow)*, *82*(2), 196–207. <https://doi.org/10.1134/S000629791702002X>
- [49] Kulishova, L., Dimoula, K., Jordan, M., Wirtz, A., Hofmann, D., Santiago-Schübel, B., & Spiess, A. C. (2010). Factors influencing the operational stability of NADPH-dependent alcohol dehydrogenase and an NADH-dependent variant thereof in gas/solid reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *67*(3–4), 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.09.014>
- [50] Kumar Verma, D., Al-Sahlany, T. G., Niamah, A. K., Thakur, M., Shah, N., Singh, S., Baranwal, D., Patel, A. R., Utama, G. L., & Aguilar, C. N. (2022). Recent trends in microbial flavour compounds: A review on chemistry, synthesis mechanism and their application in food. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(3), 1565–1576. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.010>
- [51] Kumari, A., Verma, V. V., & Gupta, R. (2012). Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1120-4>
- [52] Kundys, A., Białecka-Florjańczyk, E., Fabiszewska, A., & Małajowicz, J. (2018). *Candida antarctica* lipase B as catalyst for cyclic esters synthesis, their polymerization and degradation of aliphatic polyesters. *Journal of Polymers and the Environment*, *26*, 396–407. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0945-1>
- [53] Kuperkar, V. v., Lade, V. G., Prakash, A., & Rathod, V. K. (2014). Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *99*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.024>
- [54] Lamare, S., & Legoy, M. D. (1993). Biocatalysis in the gas phase. *Trends in Biotechnology*, *11*(10), 413–418. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90004-S](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90004-S)
- [55] Lamare, S., Caillaud, B., Roule, K., Goubet, I., & Legoy, M. D. (2001). Production of natural esters at the pre-industrial scale by solid/gas biocatalysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, *19*, 361–377. <https://doi.org/10.3109/10242420108992024>

- [56] Lamare, S., Legoy, M. D., & Graber, M. (2004). Solid/gas bioreactors: Powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chemistry*, 6, 445–458. <https://doi.org/10.1039/b405869k>
- [57] Lamy, H., Bullier-Marchandin, E., Pointel, C., Echalard, A., Ladam, G. D., & Lutzweiler, G. (2024). Kinetic study of the esterase-like activity of albumin following condensation by macromolecular crowding. *Biomacromolecules*, 25(5), 2803–2813. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01431>
- [58] Lee, M.-Y. and Dordick, J.S. (2002). Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 376–384. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00337-3).
- [59] Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M. D., & Graber, M. (2004). Enantioselective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32(1–2), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.09.007>
- [60] Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. In *Food Technology and Biotechnology* (Vol. 44, Issue 3).
- [61] López-Martínez, J. E., Romero, R., Natividad, R., Torres, C. F., García, H. S., & Baeza-Jiménez, R. (2020). Enzymatic preparation of structured triacylglycerides containing  $\gamma$ -linolenic acid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101680. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101680>
- [62] Lu, X., Wang, Y., Zong, H., Ji, H., Zhuge, B., & Dong, Z. (2016). Bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by the novel stress-tolerant yeast *Candida glycerinogenes* WL2002-5. *Bioengineered*, 7, 418–423. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1171437>
- [63] Madzak, C. (2015). *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 99, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>
- [64] Mageed, H. A., Ezz, N. A., & Radwan, R. (2019). Bio-inspired trypsin-chitosan cross-linked enzyme aggregates: A versatile approach for stabilization through carrier-free immobilization. *Biotechnologia*, 100(3). <https://doi.org/10.5114/bta.2019.87589>
- [65] Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- [66] Maruyama, S., Streletskaya, N. A., & Lim, J. (2021). Clean label: Why this ingredient but not that one?. *Food Quality and Preference*, 87, 104062. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104062>
- [67] Meissner, M. P., & Woodley, J. M. (2022). Mass-based biocatalyst metrics to guide protein engineering and bioprocess development. *Nature Catalysis*, 5, 2–4. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00728-5>
- [68] Na Chat, N., Sangsuradet, S., Tobaramseekul, P., & Worathanakul, P. (2022). Modified hierarchical zeolite X derived from riceberry rice husk for propionic acid adsorption. *Materials Chemistry and Physics*, 282, 125933. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.125933>

- [69] Nagayama, K., Spieß, A. C., & Büchs, J. (2012). Enhanced catalytic performance of immobilized *Parvibaculum lavamentivorans* alcohol dehydrogenase in a gas phase bioreactor using glycerol as an additive. *Chemical Engineering Journal*, 207, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.129>
- [70] Nian, B., & Li, X. (2022). Can deep eutectic solvents be the best alternatives to ionic liquids and organic solvents: A perspective in enzyme catalytic reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 217, 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.044>
- [71] Ortiz, C. S., Luján Ferreira, M., Barbosa, O., dos Santos, J. C. S., Rodrigues, R. C., Berenguer Murcia, Á., Briand, L. E., & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst?. *Catalysis Science & Technology*, 9, 2380–2391. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>
- [72] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., & Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science* (Vol. 77, Issue 1). <https://www.jstor.org/stable/24102923>
- [73] Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D., & Legoy, M. D. (1992). Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 39(4), 467–473. <https://doi.org/10.1002/bit.260390412>
- [74] Pauli, O., Ecker, A., Cruz-Izquierdo, A., Basso, A., & Serban, S. (2022). Visualizing hydrophobic and hydrophilic enzyme interactions during immobilization by means of infrared microscopy. *Catalysts*, 12(9), 989. <https://doi.org/10.3390/catal12090989>
- [75] Pereira, A. da S., Diniz, M. M., de Jong, G., Gama Filho, H. S., dos Anjos, M. J., Finotelli, P. v., Fontes-Sant’Ana, G. C., & Amaral, P. F. F. (2019). Chitosan-alginate beads as encapsulating agents for *Yarrowia lipolytica* lipase: Morphological, physico-chemical and kinetic characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.009>
- [76] Pereira-Meirelles, F. v., Rocha-Leão, M. H. M., & Sant’Anna, G. L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnology Letters*, 22(1). <https://doi.org/10.1023/A:1005672731818>
- [77] Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M., & Nicaud, J. M. (2000). Characterization of all extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 182(10). <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2802-2810.2000>
- [78] Pires, E. L., Miranda, E. A., & Valença, G. P. (2002). Gas-phase enzymatic esterification on immobilized lipases in MCM-41 molecular sieves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98–100(1–9), 963–975. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:963>
- [79] Remonato, D., Miotti, R. H., Jr., Monti, R., Bassan, J. C., & Veloso de Paula, A. (2022). Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. *Process Biochemistry*, 114, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>
- [80] Rod, T. H., & Nørskov, J. K. (2002). The surface science of enzymes. *Surface Science*, 500, 678–698. [https://doi.org/10.1016/S0039-6028\(01\)01537-0](https://doi.org/10.1016/S0039-6028(01)01537-0)
- [81] Saikia, K., Rathankumar, A. K., Vaithyanathan, V. K., Cabana, H., & Vaidyanathan, V. K. (2021). Preparation of highly diffusible porous cross-linked lipase B from *Candida antarctica* conjugates: Advances

- in mass transfer and application in transesterification of 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, *170*, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.210>
- [82] Sampaio, C. S., Angelotti, J. A. F., Fernandez-Lafuente, R., & Hirata, D. B. (2022). Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *215*, 434–449. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139>
- [83] Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., van Rantwijk, F., van der Wielen, L. A. M., & Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, *87*(6), 754–762. <https://doi.org/10.1002/bit.20184>
- [84] Sena, B., Aceña, J. L., Novella Robisco, J. L., Monje Martínez, B., Martí Montaner, L., & Fernández-Bachiller, M. I. (2023). Effectiveness of different immobilized *Candida antarctica* lipase B (iCaLB) in the production of biobased oligoester derivatives from poly(butylene succinate) (PBS) and poly(butylene adipate) (PBA). *European Polymer Journal*, *201*, 112575. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112575>
- [85] Shah, S., Sharma, A., & Gupta, M. N. (2006). Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder. *Analytical Biochemistry*, *351*(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.028>
- [86] Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA@s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, *35*(6). <https://doi.org/10.1042/BST0351583>
- [87] Sheldon, R. A. (2016). Biocatalysis and biomass conversion in alternative reaction media. *Chemistry–A European Journal*, *22*(37), 12984–12999. <https://doi.org/10.1002/chem.201601940>
- [88] Sheldon, R. A. (2017). The E factor 25 years on: The rise of green chemistry and sustainability. *Green Chemistry*, *19*, 18–43. <https://doi.org/10.1039/c6gc02157c>
- [89] Sheldon, R. A. (2018). Metrics of green chemistry and sustainability: Past, present, and future. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(1), 32–48. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03505>
- [90] Sheldon, R. A. (2019). Cleas, combi-cleas and ‘smart’ magnetic cleas: Biocatalysis in a bio-based economy. *Catalysts*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/catal9030261>
- [91] Sheng, J., Wang, F., HaiYing Wang, & Sun, M. (2012). Cloning, characterization and expression of a novel lipase gene from marine psychrotrophic *Yarrowia lipolytica*. *Annals of Microbiology*, *62*(3). <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0348-9>
- [92] Simko, I., Roriz, E., Gramblička, M., Illeová, V., & Polakovič, M. (2015). Adsorption separation of 2-phenylethanol and L-phenylalanine on polymeric resins: Adsorbent screening, single-component and binary equilibria. *Food and Bioprocess Processing*, *95*, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.11.005>
- [93] Sousa, R. R. d., Silva, A. S. d., Fernandez-Lafuente, R., & Ferreira-Leitão, V. S. (2021). Simplified method to optimize enzymatic esters syntheses in solvent-free systems: Validation using literature and experimental data. *Catalysts*, *11*, 1357. <https://doi.org/10.3390/catal11111357>
- [94] Stergiou, P.-Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L. G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., & Papamichael, E. M. (2013). Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, *31*, 1846–1859. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.006>

- [95] Syal, P., & Gupta, R. (2017). Heterologous expression of lipases YLIP4, YLIP5, YLIP7, YLIP13, and YLIP15 from *Yarrowia lipolytica* MSR80 in *Escherichia coli*: Substrate specificity, kinetic comparison, and enantioselectivity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(6). <https://doi.org/10.1002/bab.1542>
- [96] Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146-161. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- [97] Velasco-Lozano, S., Jackson, E., Ripoll, M., López-Gallego, F., & Betancor, L. (2020). Stabilization of  $\omega$ -transaminase from *Pseudomonas fluorescens* by immobilization techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.003>
- [98] Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C., & Favela-Torres, E. (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis*, 1, 166–177. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0012>
- [99] Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Vázquez-Duhalt, R., Mateos-Díaz, J. C., Guisán, J. M., & Favela-Torres, E. (2014). Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking. *Biomacromolecules*, 15(5), 1896–1903. <https://doi.org/10.1021/bm5001669>
- [100] Verdasco-Martín, C. M., Villalba, M., dos Santos, J. C. S., Tobajas, M., Fernandez-Lafuente, R., & Otero, C. (2016). Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. *Biochemical Engineering Journal*, 111, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.004>
- [101] Vergili, I., & Barlas, H. (2009). Removal of selected pharmaceutical compounds from water by an organic polymer resin. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 68, 417–425.
- [102] Wehtje, E., & Adlercreutz, P. (1997). Lipases have similar water activity profiles in different reactions. *Biotechnology Letters*, 19(6). <https://doi.org/10.1023/A:1018385203375>
- [103] Wunschik, D. S., Lorenz, A., Ingenbosch, K. N., Gutmann, J. S., & Hoffmann-Jacobsen, K. (2022). Activation and stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on polymer brushes with optimized surface structure. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, 3384–3399. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03913-9>
- [104] Yazdi, Z. K., & Alemzadeh, I. (2017). Kinetic mechanism of conjugated linoleic acid esterification and production of enriched glycerides as functional oil. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 95(11), 2078–2086. <https://doi.org/10.1002/cjce.22833>
- [105] Yoshimoto, Y., Hori, T., Kinefuchi, I., & Takagi, S. (2017). Effect of capillary condensation on gas transport properties in porous media. *Physical Review E*, 96(4), 043112. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.96.043112>
- [106] Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(7). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69054-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69054-4)
- [107] Zhang, N., Domínguez de María, P., & Kara, S. (2024). Biocatalysis for the synthesis of active pharmaceutical ingredients in deep eutectic solvents: state-of-the-art and prospects. *Catalysts*, 14(1), 84. <https://doi.org/10.3390/catal14010084>

- [108] Zhao, H., Zheng, L., Wang, X., Liu, Y., Xu, L., & Yan, Y. (2011). Cloning, expression and characterization of a new lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 33(12). <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0711-8>

### 13. Trabajos derivados del proyecto de investigación

#### Publicaciones

- ✘ Huerta-Ochoa, S., Castillo-Araiza, C. O., Cordero-Soto, I. N., **Cruz-Martínez, Y. A.**, Prado-Barragán, L. A., & Rutiaga Quiñones, O. M. (2023). Fundamentals and applications of solid/gas biocatalysis. In M. N. Gupta (Ed.), *Some Key Topics in Chemistry & Biochemistry for Biotechnologists* (pp. 65–90). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003287599>
- ✘ **Cruz-Martínez, Y. A.**, Castillo-Araiza, C. O., Castillo-Rosales, E., & Huerta-Ochoa, S. (2024). Effect of adsorption/desorption of substrates/products during isobutyl propionate synthesis over CalB Immo Plus™ in solid/gas biocatalysis. *Biochemical Engineering Journal*, 208, 109341. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109341>
- ✘ **Cruz-Martínez, Y. A.**, Castillo-Araiza, C. O., Castillo-Rosales, E., Velasco-Lozano, S., & Huerta-Ochoa, S. (2025). Solid/Gas synthesis of isobutyl propionate catalyzed by packed-bed CalB cross-linked enzyme aggregates (CLEA). **A 14/11/2025: aceptado y en pruebas de galera en ACS Omega.**
- ✘ **Cruz-Martínez, Y. A.**, Castillo-Araiza, C. O., Castillo-Rosales, E., Velasco-Lozano, S., & Huerta-Ochoa, S. (202X). Isobutyl Propionate Production in Organic Media and Solid–Gas System Using *Yarrowia lipolytica* Lipolytic Enzymes and novel Crude Extract-Based CLEA. **El manuscrito correspondiente se encuentra en etapas finales de edición y será sometido a la revista *Biochemical Engineering Journal*.**

## Congresos



Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ  
"La Ingeniería Química,  
la Sostenibilidad y la Economía Circular"

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

**RECONOCIMIENTO**

a:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales, Sergio Huerta Ochoa

**Por la presentación del trabajo en modalidad cartel:**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN LA SÍNTESIS DE ISOBUTIL PROPIONATO EN UN BIORREACTOR SÓLIDO/GAS

ID: 448

XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ  
Puerto Vallarta, Jal., México. 23 al 26 de agosto de 2022

  
Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz  
PRESIDENTE DE LA AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR

  
Dr. Tomás Miertris García  
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



**XLIV**  
ENCUENTRO NACIONAL DE LA  
AMIDIQ

Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades  
para la Ingeniería Química en México

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química A.C.

otorga el presente

**RECONOCIMIENTO**

a:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Sergio Huerta Ochoa, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales.

**Por la presentación del trabajo:**

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA RELACIÓN MOLAR EN LA SÍNTESIS DE ISOBUTIL PROPIONATO EN UN BIORREACTOR SÓLIDO/GAS

En el área de BIOTECNOLOGÍA en modalidad CARTEL  
ID: 707

XLIV Encuentro Nacional de la AMIDIQ

  
Dr. Sergio Romo Hernández  
Presidente del Comité Organizador

  
Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz  
Presidente Nacional de la AMIDIQ

  
Dr. Tomás Miertris García  
Presidente del Comité Técnico

**UDLAP**

Huautlco, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

## LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

### EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales, Sergio Huerta Ochoa

### Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ISOBUTIL PROPIONATO EN UN BIORREACTOR SÓLIDO/GAS CON CALB IMMO PLUS

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023

  
 DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
 PRESIDENTA MDN 2022-2024

  
 DR. LUIS FLORES COTERA  
 PRESIDENTE DEL CONGRESO

  
 DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN  
 SECRETARIA MDN 2022-2024





Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química (AMIDIQ)

Otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

a:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Susana Velasco Lozano, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales, Sergio Huerta Ochoa

Por la presentación del trabajo

PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CALB/BSA PARA LA OBTENCIÓN DE ISOBUTIL PROPIONATO EN MEDIO ORGÁNICO.

En el área de BIOTECNOLOGÍA, en la modalidad CARTEL

Id: 469

Presentado en el XLVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, La Ingeniería Química ante los desafíos ambientales y energéticos, realizado en San José del Cabo, Baja California Sur, México, del 13 al 16 de mayo de 2025.

Dra Nelly Ramírez Corona  
Presidenta  
Consejo Directivo de la AMIDIQ  
y Comité Organizador

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia  
Presidente  
Comité Técnico



Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química (AMIDIQ)

Otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

a:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales, Sergio Huerta Ochoa

Por la presentación del trabajo

EVALUACIÓN DE CÉLULAS DE Yarrowia lipolytica INMOVILIZADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ISOBUTIL PROPIONATO EN MEDIO ORGÁNICO Y SÓLIDO/GAS.

En el área de BIOTECNOLOGÍA, en la modalidad CARTEL

Id: 474

Presentado en el XLVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, La Ingeniería Química ante los desafíos ambientales y energéticos, realizado en San José del Cabo, Baja California Sur, México, del 13 al 16 de mayo de 2025.

Dra Nelly Ramírez Corona  
Presidenta  
Consejo Directivo de la AMIDIQ  
y Comité Organizador

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia  
Presidente  
Comité Técnico

## Premios

  
Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería  
Ixtapa Zihuatanejo, México  
**CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**  
11 - 15 de SEPTIEMBRE 2023

  
40 Aniversario

**LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

Otorga el  
Premio al 2º lugar del 11 de septiembre de 2023  
En el marco del concurso de carteles

**Cartel:**

EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ISOBUTILPROPIONATO EN UN BIORREACTOR SÓLIDO/GAS CON CALB IMMO PLUS

**Con autoría de:**

YAHIR ALEJANDRO CRUZ MARTINEZ, CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA,  
EDMUNDO CASTILLO ROSALES, SERGIO HUERTA OCHOA

Por su labor realizada en la Biotecnología o Bioingeniería en México  
XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería  
Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, 11 al 15 de septiembre, 2023

  
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
PRESIDENTA MDN 2022-2024

  
DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMÉNEZ  
PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE PREMIOS DE LA SMBB

  
Universidad Zaragoza  
1542

  
iSQCH  
Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea

  
CSIC  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**2<sup>nd</sup> Prize Poster Presentation**  
Awarded to

*Yahir Alejandro*

*for the outstanding performance presenting his/her research results at the*

**III Symposium in Molecular Chemistry and Catalysis**

Dr. Pablo J. Sanz Miguel  
Chairman of Organizing Committee  
in Zaragoza, 7<sup>th</sup> June 2024

  
Irene Gallego Merino

  
Facultad de Ciencias  
Universidad Zaragoza



Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia  
en Ingeniería Química (AMIDIQ)

Otorga el presente

### RECONOCIMIENTO

a:

Yahir Alejandro Cruz Martínez, Susana Velasco Lozano, Carlos Omar Castillo Araiza, Edmundo Castillo Rosales, Sergio Huerta Ochoa

Por haber obtenido una mención honorífica, en su trabajo titulado:

PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE AGREGADOS ENTRECruzADOS DE CALB/BSA PARA LA OBTENCIÓN DE ISOBUTIL PROPIONATO EN  
MEDIO ORGÁNICO.

En el área de BIOTECNOLOGÍA, en la modalidad CARTEL

ID: 469

Presentado en el XLVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, La Ingeniería Química ante los desafíos ambientales y energéticos,  
realizado en San José del Cabo, Baja California Sur, México, del 13 al 16 de mayo de 2025.

Dra. Nelly Ramírez Corona  
Presidenta  
Consejo Directivo de la AMIDIQ  
y Comité Organizador

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia  
Presidente  
Comité Técnico



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00299

Matrícula: 2192802281

Evaluación de biocatalizadores producidos utilizando CalB o células/enzimas de *Yarrowia lipolytica* para la síntesis de isobutil propionato en un biorreactor de lecho empacado Sólido/Gas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:30 horas del día 21 del mes de noviembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DR. GUSTAVO FIDEL GUTIERREZ LOPEZ  
DR. MIQUEL GIMENO SECO  
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

DE: YAHIR ALEJANDRO CRUZ MARTINEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



YAHIR ALEJANDRO CRUZ MARTINEZ  
ALUMNO

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. GUSTAVO FIDEL GUTIERREZ LOPEZ

VOCAL

DR. MIQUEL GIMENO SECO

SECRETARIO

DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA