



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Proyecto de Innovación

Convocatoria 2022/2023

Nº de proyecto: 244

Biocatálisis aplicada: catálisis efectiva para un desarrollo sostenible

Miguel Ladero Galán

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Ingeniería Química y Materiales

1. Objetivos propuestos en la presentación del proyecto

Este es un Proyecto de Innovación Educativa orientado al Aprendizaje a través de Proyectos (ABP) y, en particular, al Aprendizaje Basado en Investigación (ABI). El Objetivo General ha sido el diseño de cuatro pequeños proyectos de investigación que abarca desde la obtención de enzimas con microorganismos (microbiología industrial) a la aplicación de las mismas en bioprocesos, pasando por su purificación parcial (Biocatálisis, enzimología industrial, ingeniería química) para lo que se elaborarán diversos materiales y herramientas docentes para una serie de materias que forman parte fundamental de las áreas de Bioquímica, Microbiología e Ingeniería Química. Para lograr este Objetivo General, se ha acometido, con diverso grado de desarrollo, la consecución de los diversos objetivos parciales, basados en el carácter autodidacta, emprendedor y colaborativo de los estudiantes de la Generación Z:

- a) Crear un clima de compromiso de los estudiantes, dado su conocido activismo social y preocupación global, mediante videos explicativos de los problemas a tratar de solucionar, de las estrategias disponibles y otros recursos didácticos ad-hoc. Es preciso interesar al estudiante en los problemas del mundo actual, en particular en la necesidad de analizar los procesos industriales actuales, sus consecuencias, la necesidad de mejorarlos y las posibilidades que la Química y la Ingeniería Verde abren. En particular, incidiremos en el uso de enzimas como biocatalizadores que permiten la obtención de productos de interés con un bajo consumo de materia y energía, utilizando la gran actividad y selectividad enzimática, disolventes de bajo o nulo impacto medioambiental, sistemas sin disolvente, etc.
- b) Establecer herramientas, protocolos y recursos que faciliten el aprendizaje colaborativo, permitiendo de esta forma potenciar las habilidades de los estudiantes. En este sentido, el trabajo de laboratorio en pequeños grupos en los que se distribuye el trabajo y se alienta la rotación en las tareas viene siendo común. Se potenciará aún más en este PIE.
- c) Desarrollar herramientas de autoaprendizaje que motiven a los estudiantes. Es de gran relevancia ayudar a los estudiantes a buscar información utilizando varias herramientas disponibles en Internet.
- d) Facilitar el acceso de los estudiantes a la información técnica y científica en el marco de los mini proyectos presentados y de la problemática que pretenden solucionar. En particular, conviene dirigir a los estudiantes en el uso de herramientas disponibles en la Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid (Scifinder-n en particular).
- e) Establecer unas directrices que permitan la evaluación crítica de la información de forma previa a la experimentación y, a posteriori, facilitando el análisis y la síntesis. En este sentido, se facilitará al estudiante una serie de trabajos disponibles y realizados por los profesores que firman la presente propuesta y por sus colaboradores en años anteriores.
- f) Elaborar prácticas *hands-on* de laboratorio simples y progresivas orientadas a cuatro casos prácticos de gran relevancia actual que abarquen, en lo posible, las diversas tareas de los miniproyectos. Así se promueve el aprendizaje a través de la propia experiencia (*learning by doing*). En particular, se basarán en dos prácticas de cinética enzimática ya aplicadas en diversas asignaturas del Grado de Bioquímica, del Doble Grado de Bioquímica y Química, del Máster en Biotecnología Industrial y Ambiental y del Máster en Ingeniería Química e Ingeniería de Procesos de la Universidad Complutense de Madrid.
- g) Elaborar simuladores simples basados en software disponible en la UCM o de acceso libre y videos explicativos que constituyan prácticas virtuales (online) y/o herramientas de análisis matemático de los resultados obtenidos y de otros disponibles en la literatura científica. Estas herramientas permitan aprovechar las

cualidades como nativos digitales de los estudiantes actuales. Queremos promocionar el aprendizaje clásico de los estudiantes por comparación de resultados con otros investigadores, tanto aquí como en el anterior objetivo.

- h) Desarrollar herramientas de autoevaluación y evaluación externa que permita comprobar los niveles de aprendizaje y capacitación alcanzados por los estudiantes. Se pretende favorecer un aprendizaje progresivo basado en una evaluación continua. En este caso, estas herramientas se están desarrollando en estos últimos años y se seguirán desarrollando en los venideros, en un esfuerzo continuo de mejora de los laboratorios de cinética enzimática por parte de los profesores del grupo “Físico-química de Procesos Industriales y Medioambientales (FQPIMA)”.

La siguiente figura da una idea de las líneas de trabajo a desarrollar e indica la distribución de responsabilidades de los miembros del equipo de investigación.

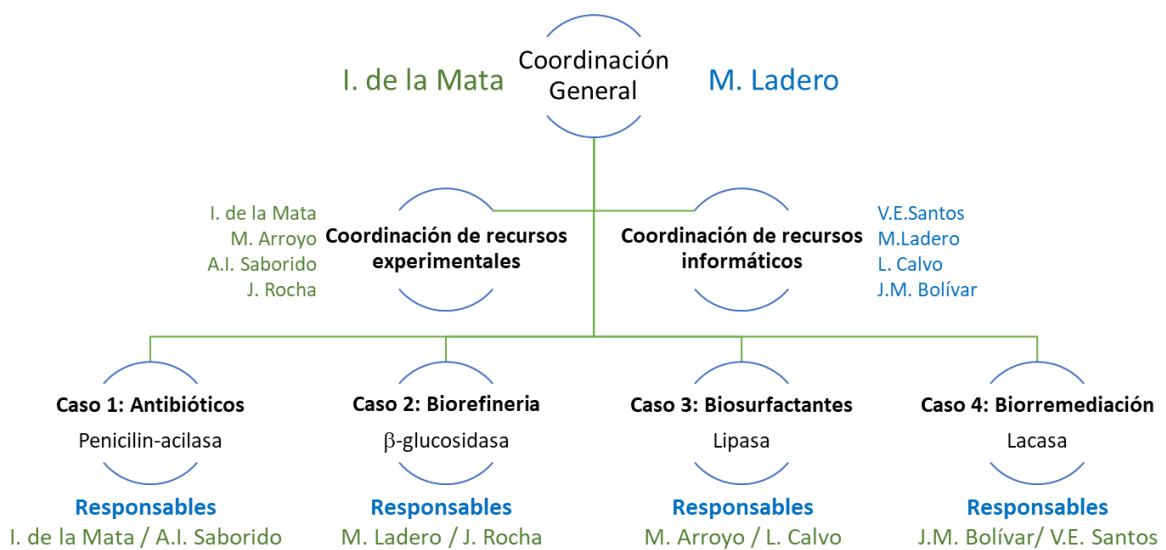


Figura 1: Organización del Proyecto de Innovación Educativa Aprendizaje Basado en Investigación Biotecnológica

La figura que se muestra a continuación indica el flujo de trabajo de cada pequeña línea de investigación.

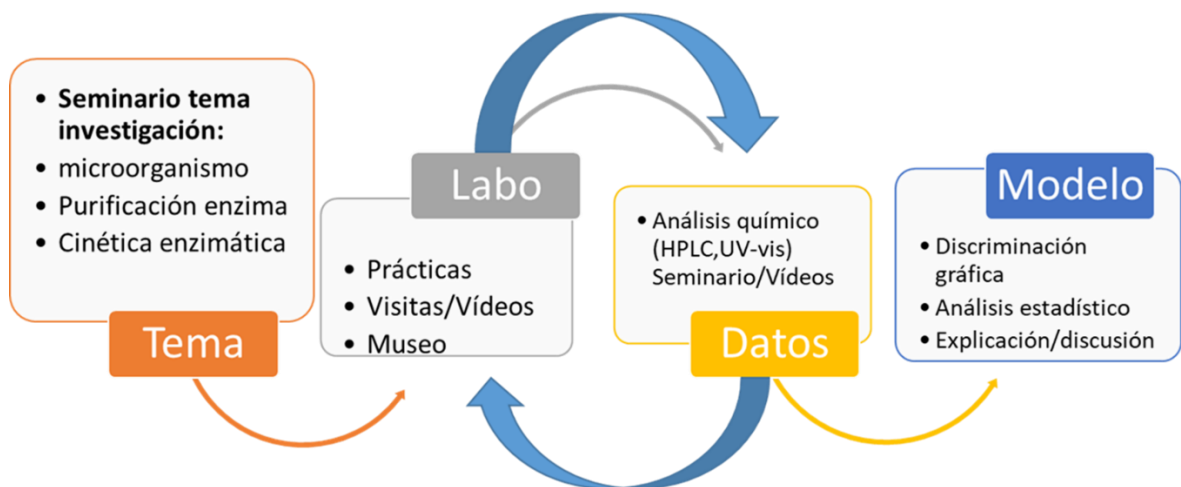


Figura 2: Etapas del desarrollo de cada pequeño tema o línea de investigación

2. Objetivos alcanzados

Durante la ejecución del proyecto se siguió el esquema planteado en la propuesta original, implementándose dos de las prácticas de laboratorio en diferentes asignaturas del Máster de Biotecnología Industrial y Ambiental (Bioprocesos y Biorreactores, asignatura obligatoria del primer cuatrimestre, del Grado en Bioquímica, del Doble Grado en Química y Bioquímica (en estos dos títulos en la asignatura obligatoria compartida denominada Fundamentos del Diseño de Biorreactores), y del Máster de Ingeniería Química: Ingeniería de Procesos (en la asignatura obligatoria anual de primer curso Análisis Avanzado de Reacciones y Reactores). Las etapas que se han seguido se pueden ver en la siguiente figura:

Tareas del Proyecto	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Tarea 1. Recopilación y análisis de materiales y herramientas existentes y propuesta de nuevos recursos a elaborar												
Tarea 2. Elaboración de las herramientas docentes												
Subtarea 2.1. <i>Elaboración de materiales de guía experimental y de motivación</i>												
Subtarea 2.2. <i>Desarrollo de guías de uso de herramientas informáticas</i>												
Subtarea 2.3. <i>Elaboración de materiales y procedimientos para el autoaprendizaje</i>												
Subtarea 2.4. <i>Elaboración de cuestionarios.</i>												
Tarea 3. Integración de las diversas herramientas y materiales docentes creados												
Tarea 4. Evaluación crítica del material elaborado y diseño de un plan de futuro												
Tarea 5. Escritura del informe final del proyecto												

Figura 3: Tareas acometidas a lo largo del proyecto de innovación educativa 244

En principio, con el objeto de extender lo ya desarrollado para asignaturas asociadas a la Ingeniería Química y, en particular, a la Cinética Química Aplicada (modelización cinética avanzada), se planteó la posibilidad de obtener las enzimas o biocatalizadores a partir de bacterias y hongos cultivados en matraz Erlenmeyer en condiciones estériles y desarrollar procedimientos sencillos de purificación por precipitación fraccionada (choque térmico, gradiente con sales de amonio, adición progresiva de antisolventes orgánicos). Sin embargo, la complejidad de su implementación, apreciada en las primeras reuniones del equipo de trabajo, y la conveniencia de las asignaturas arriba citadas para progresar en el desarrollo de herramientas de Cinética Química Aplicada, aconsejó progresar por esta vía, seleccionando varias enzimas de tipo industrial con la colaboración de D. Ramiro Martínez, *Account Manager* en España de la multinacional Novozymes, con la que hace muchas décadas que los profesores de este equipo colaboran.

Se partía de dos prácticas desarrolladas según el esquema de la Figura 2 y relativas a la deslactosación de leche desnatada y a la isomerización enzimática de glucosa y fructosa, ya que ambas reacciones son de una enorme importancia en industria alimentaria. La primera reacción que catalizada por una β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis* y Novozyme la comercializa con el nombre de Lactozym Pure 6000 HG. El segundo proceso es clave para la producción de jarabes ricos en fructosa (HCFS) a partir de la glucosa obtenida por hidrólisis enzimática de almidón y dextrosas (probablemente el proceso enzimático de mayor tonelaje hoy en día). A partir de este material, se decidió centrar el trabajo en enzimas de tipo industrial que procedían de Novozymes o de una pequeña empresa alemana (ASA Spezialenzymes GmbH), abordando tres prácticas concretas:

- a) La hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* suministrada por ASA Spezialenzymes GmbH.
- b) La síntesis de ésteres de ibuprofeno y glicerina con la lipasa B de *Candida antarctica*, una enzima bien conocida y comercializada por Novozymes en su forma soluble con el nombre de Lipozyme CALB-L.
- c) La degradación oxidativa de catecol, un conocido contaminante aromático de la familia de los fenoles, mediante el uso de una lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae* también comercializada por Novozymes denominada Novozym 51003.

En estas prácticas se han alcanzado diversos objetivos:

- 1) Estudio de la situación previa mediante análisis de la bibliografía y de los recursos que ya poseía el grupo de trabajo.
- 2) Desarrollo de guiones detallados de laboratorio, tanto en lo que se refiere a la introducción teórica de cada tema, como en el trabajo práctico en laboratorio y posterior de análisis cinético de los datos obtenidos.
- 3) Desarrollo de vídeos basados en las clases habituales que se imparten en presencial para el desarrollo de cálculos cinéticos a partir de los datos experimentales obtenidos por los estudiantes.
- 4) Implementación de prácticas en asignaturas de Títulos de Máster y Grado.
- 5) Análisis inicial de los resultados obtenidos, integrándolos en las tendencias observadas y comparadas entre prácticas habituales de laboratorio (“clásicas”, donde nos centramos en la docencia de un concepto concreto) y las nuevas prácticas orientadas al Aprendizaje Basado en Investigación (ABI).

En los cursos próximos, el objetivo es ir ampliando e integrando estas prácticas ABI en las diversas asignaturas mencionadas y, en un futuro, extenderlas a otras del Máster de Biotecnología Industrial y Ambiental.

3. Metodología empleada en el proyecto

Para la realización de este Proyecto de Innovación Educativa se siguieron las siguientes pautas:

- 1) Identificación de información previa:** se analizaron los recursos disponibles para el grupo de trabajo, bien porque fueran trabajos de investigación previos del grupo o artículos generados a partir de dichos trabajos, bien disponibles de forma libre y general a partir de bases de datos bibliográficas.
- 2) Reuniones y contactos con socios colaboradores:** en este caso, una vez planteados los diversos temas de investigación, se contactó con Novozymes Spain SL y con ASA Spezialenzymes GmbH para determinar que preparaciones enzimáticas estarían a disposición de forma sencilla para la implementación de prácticas en diversas asignaturas.
- 3) Desarrollo de guiones de laboratorio:** tanto de las sesiones experimentales como de las sesiones de cálculo, para los casos que se pudieran plantear a partir de la disponibilidad habitual de enzimas industriales tanto de Novozymes Spain SL como de ASA Spezialenzymes GmbH.
- 4) Desarrollo de vídeos de soporte:** sobre todo para las sesiones de cálculo, tanto de análisis gráfico como de análisis numérico.

4. Recursos humanos

El equipo que ha desarrollado el presente Proyecto de Innovación Educativa es Interfacultativo e Interdepartamental, ya que sus miembros pertenecen al Departamento de Ingeniería Química y Materiales de la Facultad de Ciencias Químicas y al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, en particular, a la Sección departamental BBM en Biología (Facultad de Biología y Geología de la Universidad Complutense de Madrid). La siguiente lista muestra los datos fundamentales de los investigadores, profesores y PAS que han participado:

Responsable	Miguel Ladero Galán	PDI Complutense mladerog@ucm.es
Miembro	Iván Aldama Amado	PAS Complutense ivan.aldama@estumail
Miembro	Celia Álvarez González	Estudiante cealva03@ucm.es
Miembro	Itziar Arias Escanciano	Estudiante Doctorado / Doctora itziaria@ucm.es
Miembro	Miguel Arroyo Sánchez	PDI Complutense arroyo@bbm1.ucm.es
Miembro	Juan Manuel Bolívar Bolívar	PDI Complutens juanmbol@ucm.es
Miembro	Lourdes Calvo Garrido	PDI Complutense lcalvo@pdi.ucm.es
Miembro	M ^a Isabel De La Mata Riesco	PDI Complutense idlmata@pdi.ucm.es
Miembro	Alberto García Martín	Estudiante albega13@ucm.es
Miembro	Jorge García Montalvo	Estudiante jorgar10@ucm.es
Miembro	Álvaro Lorente Arévalo	Estudiante alvalore@estumail.ucm
Miembro	Víctor Martín Domínguez	Estudiante vicmartindominguez@gmail.com
Miembro	Tomas Pedregal Garrido	PAS Complutense tpedrega@ucm.es
Miembro	Javier Rocha Martín	PDI Complutense javrocha@ucm.es
Miembro	Ana Isolina Saborido Modia	PDI Complutense asaborid@ucm.es
Miembro	Victoria Eugenia Santos Mazorra	PDI Complutense vesantos@pdi.ucm.es

5. Desarrollo de las actividades

Durante la ejecución de este Proyecto de Innovación Educativa se han seguido las etapas y tareas reflejadas en la Figura 2. Se pueden clasificar en los siguientes apartados:

1) Estudio de la situación previa mediante análisis de la bibliografía y de los recursos que ya poseía el grupo de trabajo

En una primera reunión en la facultad de Ciencias Químicas se presentaron las prácticas ya elaboradas y desarrolladas en cursos académicos anteriores que seguían la filosofía de Aprendizaje Basado en Investigación. En esencia, eran prácticas de aplicación de enzimas industriales habitualmente donadas por Novozymes Spain SL, empresa con la que se colabora en investigación en biocatálisis desde hace décadas, orientadas a la deslactosación de leche y a la isomerización de glucosa en fructosa (y viceversa, aunque la reacción reversa no tiene interés industrial, siempre está presente. Estas dos prácticas tenía en común varios aspectos relevantes: los productos y procesos son de interés industrial, la metodología es común tanto en lo que respecta al análisis de muestras por HPLC –un método relativamente complejo para un nivel de Grado e, incluso, en un Máster universitario- como en el análisis de los datos por métodos estadísticos de regresión y, finalmente, están orientados a resolver problemas relevantes para la sociedad tanto en el sector de alimentación como en el de salud. De esta forma, se trata de unas prácticas de laboratorio que, por su naturaleza, podrían suscitar un profundo interés en el alumnado. En esa misma reunión se propusieron varias prácticas más y se consideró que, dado que era de interés implantar alguna de ellas en alguna asignatura relevante de Grado o de Máster, era mejor centrarse en el uso de enzimas industriales. Así, se quedó en contactar con las empresas para conocer cuáles serían las enzimas más fácilmente disponibles en la práctica. También se quedó en recoger la bibliografía y los recursos que ya estaban a disposición en lo relativo a los temas que se eligieran en función de la disponibilidad de preparados industriales.

2) Desarrollo de guiones detallados de laboratorio, tanto en lo que se refiere a la introducción teórica de cada tema, como en el trabajo práctico en laboratorio y posterior de análisis cinético de los datos obtenidos

Se seleccionaron tres prácticas al disponer de preparados enzimáticos tanto de ASA Spezialenzymes como de Novozymes Spain SL, bien a bajo precio, bien de forma gratuita siempre en cantidad adecuada incluso para grupos numerosos de estudiantes: la hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa, la síntesis de un profármaco de ibuprofeno y glicerina con efecto surfactante mediante el uso de una lipasa, y la oxidación biocatalítica de catecol con una lacasa. A partir de aquí, se obtuvo más bibliografía, mucha ya disponible porque ya había Tesis Doctorales y Trabajos Fin de Máster del grupo sobre estos temas. También se elaboraron guiones de prácticas tanto en lo relativo al trabajo experimental de laboratorio, como a la interpretación gráfica y estadística de los datos obtenidos, según se detalla en el anexo que acompaña a este informe.

3) Desarrollo de vídeos basados en las clases habituales que se imparten en presencial para el desarrollo de cálculos cinéticos a partir de los datos experimentales obtenidos por los estudiantes

A partir de la experiencia que tuvimos durante el primer y segundo curso bajo la pandemia de COVID 19, elaboramos vídeos con las clases de presentación de las prácticas y de los cálculos que fueran fáciles de seguir por el estudiante. Para ello utilizamos la función de grabación de voz de PowerPoint y sus herramientas de generación de vídeos porque, en nuestra experiencia, este software es habitual en docencia, sencillo en su manejo y evita la generación de retrasos entre la imagen y la voz, un aspecto importante cuando se usa el puntero láser.

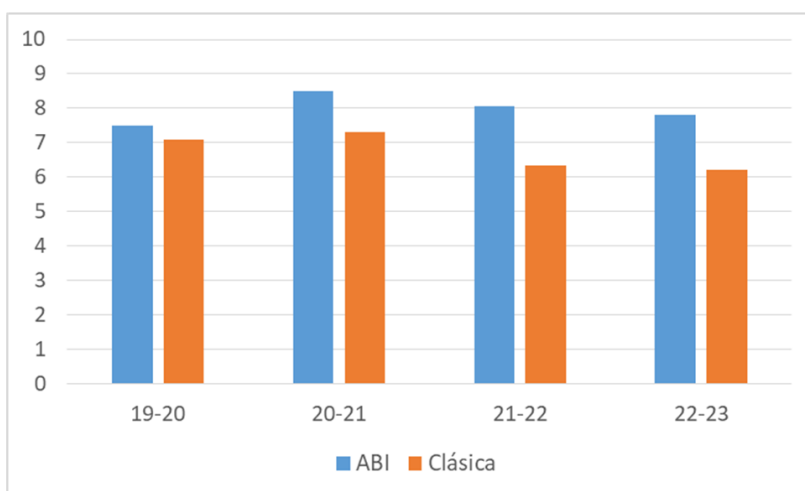
4) Implementación de prácticas en asignaturas de Títulos de Máster y Grado

En el primer cuatrimestre del curso pasado, 2022/23, ya teníamos disponible el material para la práctica de síntesis del profármaco de ibuprofeno como una estrategia de revalorización de glicerina. Decidimos implementarla como primera práctica de la asignatura “Bioprocesos y Biorreactores” del Máster de Biotecnología Industrial y Ambiental de la UCM, donde ya habíamos desarrollado prácticas similares en cursos anteriores. En este caso, se utilizó Berkeley Madonna v10.1 como herramienta de cálculo, más accesible a estudiantes con un menor uso de este tipo de programas. Esta misma práctica se utilizó también en el segundo cuatrimestre en la asignatura “Análisis Avanzado de Reacciones y Reactores”. En este caso, con un alumnado mucho menos heterogéneo y muy habituado a utilizar software de simulación de procesos industriales, se optó por explicarles el uso del programa Aspen Custom Modeler v12.1, de la suite Aspen Plus.

ALGUNOS RESULTADOS ANTERIORES (2019/20-2022/23)

Máster de Biotecnología Industrial y Ambiental UCM

Asignatura (obligatoria): Bioprocesos y Biorreactores

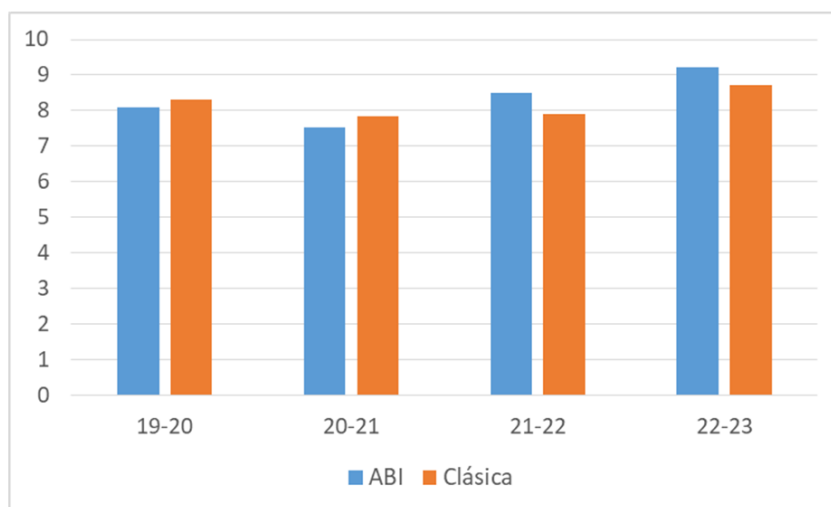


Formación: Grado en Biología (50-60%), Bioquímica, Ingeniería Química, Biotecnología

Nota de entrada: media (6-7) **Conviene profundizar en la estrategia ABI**

Grado en Bioquímica / Doble Grado en Química-Bioquímica (desde 21-22)

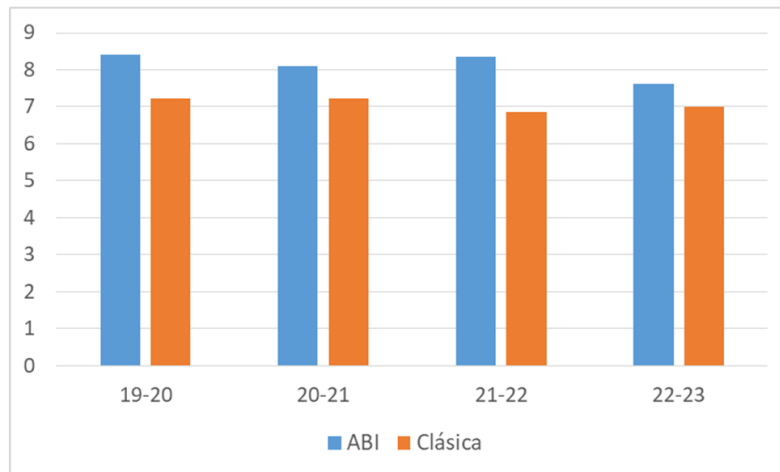
Asignatura (obligatoria): Fundamentos del Diseño de Biorreactores



Nota de entrada: alta (12-13/14)

El ABI tiende a mejorar la implicación y la nota progresivamente

Máster de Ingeniería Química: Ingeniería de Procesos UCM
Asignatura (obligatoria): Análisis Avanzado de Reacciones y Reactores



Formación: Grado en Ingeniería Química

Nota de entrada: media (6-7) **La estrategia ABI ofrece mejores resultados en términos medios. Hay que ligarla a retos tecnológicos.**

Figura 4: Análisis preliminar del impacto de prácticas de laboratorio
Basadas en sistema ABI previas y desarrolladas en este PIE

Para los estudiantes del Doble Grado de Química y Bioquímica y del Grado en Bioquímica, que cursan juntos la asignatura “Fundamentos del Diseño de Biorreactores” se desarrolló la práctica de oxidación de catecol mediante lacasas. En este caso, ya que estos estudiantes están acostumbrados a protocolos complejos de trabajo en laboratorio, se extendió la parte experimental. Además, se disponía de sistemas de toma de datos online, evitando el uso de HPLC, y obteniendo numerosos datos. Se pudo utilizar enzima libre y también inmovilizar la enzima y, de esa forma, comparar la capacidad catalítica de ambas formas enzimáticas. De nuevo, para el análisis, se aplicó un pequeño programa implementado en Berkeley Madonna 10.4.

5) Análisis inicial de los resultados obtenidos, integrándolos en las tendencias observadas y comparadas entre prácticas habituales de laboratorio (“clásicas”, donde nos centramos en la docencia de un concepto concreto) y las nuevas prácticas orientadas al Aprendizaje Basado en Investigación (ABI).

Finalmente, tal como se puede apreciar en la Figura 4, se hizo un análisis de las calificaciones obtenidas por diversos grupos de estudiantes para las prácticas aquí desarrolladas y prácticas similares anteriores, todas desarrolladas como ABI (lo que incluye trabajo en laboratorio, visita a instalaciones, búsqueda de bibliografía e interpretación cuantitativa de datos), en comparación con otra práctica habitual orientada a entender un determinado concepto, la transferencia de materia gas-líquido de oxígeno, una práctica más clásica y más sencilla.

En la figura se puede apreciar que las calificaciones con metodología ABI tienden a ser mejores que con prácticas clásicas simples. En este tipo de proyectos, con bastante experimentalidad y mucha interpretación de datos, los estudiantes más habituados a su manejo y aquellos con mayor nota de entrada (DG Química y Bioquímica; G Bioquímica) obtenían calificaciones algo más elevadas. Estos últimos mostraban un enorme, y creciente, interés en todas las actividades.

6. Anexos

Bibliografía y materiales previos

Los guiones de prácticas elaborados y en proceso se han basado en diversos trabajos previos de los componentes del grupo de trabajo. Por líneas de investigación y temas propuestos en el presente proyecto de investigación educativa, se mencionan las principales referencias.

1) **Hidrólisis de celobiosa** con β -glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (preparado enzimático de ASA Spezialenzymes con el nombre comercial β -Glucosidase 1000)

Mateusz Wojtusik, Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos. Tesis Doctoral UCM. Presentada en la Facultad de Ciencias Químicas el 7 de septiembre de 2018.
<https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/5d3664ce299952263c4d32a8>

Alvarez-Gonzalez, C., Santos, V. E., Ladero, M., Bolivar, J. M. (2022). Immobilization-stabilization of β -glucosidase for implementation of intensified hydrolysis of cellobiose in continuous flow reactors. *Catalysts*, 12(1), 80.

2) **Síntesis de ésteres de ibuprofeno y glicerina** con la lipasa B de *Candida antarctica*, una enzima bien conocida y comercializada por Novozymes en su forma soluble con el nombre de Lipozyme CALB-L

Marianela Ravelo Velasquez. Producción de monoglicérido de ibuprofeno catalizada por lipasas. Tesis Doctoral UCM. Presentada en la Facultad de Ciencias Químicas el 11 de marzo de 2016.
<https://produccioncientifica.ucm.es/documentos/5d1df63029995204f7663eb9>

Ravelo, M., Gallardo, M. E., Ladero, M., Garcia-Ochoa, F. (2022). Synthesis of Ibuprofen Monoglyceride Using Novozym® 435: Biocatalyst Activation and Stabilization in Multiphasic Systems. *Catalysts*, 12(12), 1531.

3) **Degradación oxidativa de catecol**, un conocido contaminante aromático de la familia de los fenoles, mediante el uso de una lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae* también comercializada por Novozymes denominada Novozym 51003.

Lorente-Arevalo, A., Garcia-Martin, A., Ladero, M., Bolivar, J. M. (2022). Chemical reaction engineering to understand applied kinetics in free enzyme homogeneous reactors. *Enzyme engineering: Methods and protocols*, 277-320.

Lorente-Arevalo, A., Ladero, M., Bolivar, J. M. (2021). Intensification of oxygen-dependent biotransformations catalyzed by immobilized enzymes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 32, 100544.

Guiones y material de laboratorio

1) Hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*

Guion de la práctica

Práctica de cinética enzimática: hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa

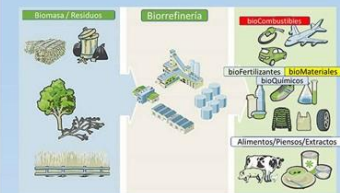
Biorrefinería.

Motor de la BioEconomía Circular.

Definición.

Consiste en el **proceso sostenible de biomasa** en un amplio espectro de **productos de interés comercial**.

International Energy Agency IEA

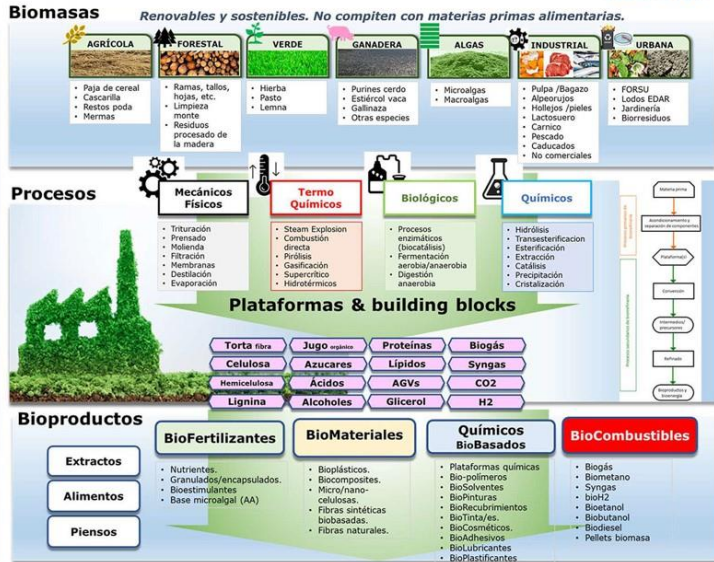


Características.

- o Instalación/proceso/**modelo** o idea.
- o Mono- o **multi-feedstock**.
- o **Multi-producto** (finales o intermedios/building blocks).
- o Productos **energéticos y no energéticos**.
- o **Procesos eco-eficientes**.
- o bioProductos con **baja huella ambiental**.
- o **Elevado ratio uso biomasa/s**.
- o Centralizada o **descentralizada** (modular).
- o Gran o **pequeña escala**.
- o **Ámbito agrícola o rural**.
- o **Nuevas cadenas de valor multi-sectorial**.

Fuente: <https://www.ainia.es/jornada-internacional-biorrefineria/>

ainia

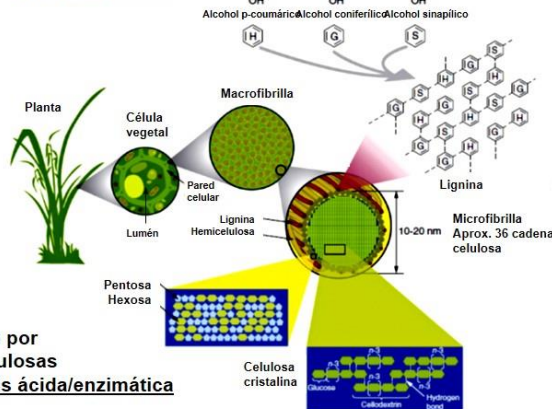


Práctica de cinética enzimática: hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa

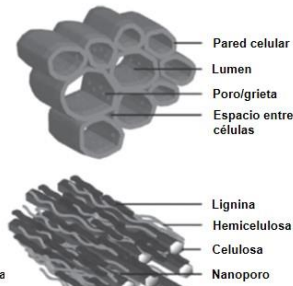
Biorefinería de segunda generación: componentes de la materia lignocelulósica: accesibilidad, interferencias

Adsorción inespecífica en la lignina

Deslignificación



Estructura interna



- > Lumen: poros 50-100 nm
- > Poros/grietas: 50 nm
- > Pared celular: 5-20 nm

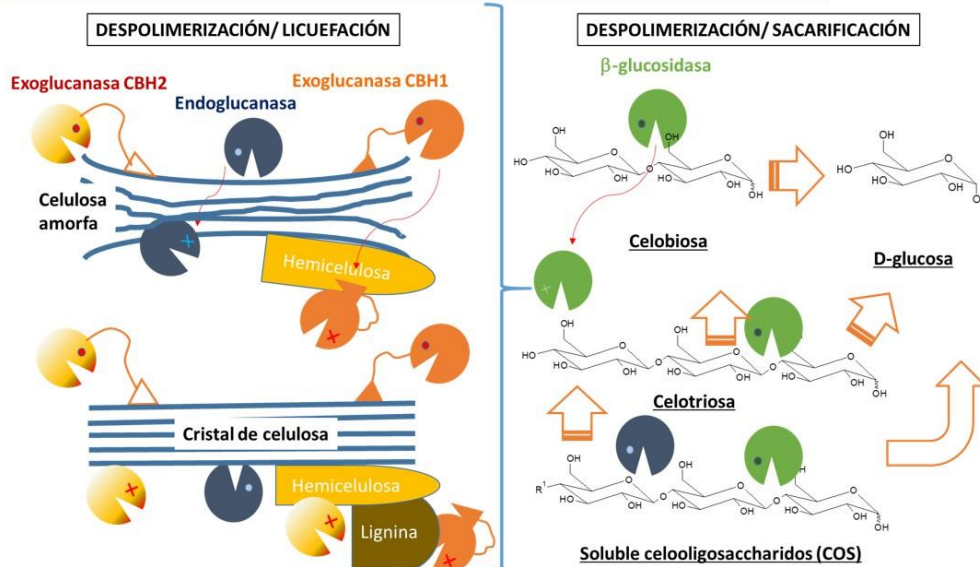
Control difusional interno

Necesita incremento porosidad

Fuente: Meng y Ragauskas. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. Current Opinion in Biotechnology 2014, 27:150–158

Práctica de cinética enzimática: hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa

Modo de acción de las celulasas en sistemas no complejados (generalmente, de hongos)



Práctica de cinética enzimática: hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa

Reactivos

Tampón citrato 50 mM pH 5.0

β -glucosidasa de ASA (glukosidase1000) diluida 1:10 (estará en un microtubo Eppendorf marcado con una E)

Solución HCl 0,6M (esta solución se ha preparado previamente diluyendo 20 veces el HCl 35% comercial)

Solución de celobiosa 100 g/L en el tampón citrato mencionado

Aparatos y materiales

Microtubos 1,5 mL

Vidrio: matraces Erlenmeyer de 100 mL, vasos de precipitado, probetas de 50 mL.

Viales de muestra para HPLC 1,5 mL

Pipetas automáticas de 200 y 1000 μ L

Puntas de pipeta adecuadas para cada volumen

Baño con agitación de vaivén y control PID de temperatura

HPLC Jasco con columna REZEX próton

Un detalle: recordad como utilizar una pipeta automática. Dos videos de YouTube:

https://www.youtube.com/watch?reload=9&v=1zdYAlx_CLU

<https://www.youtube.com/watch?v=IPbqqPXFtFc>

Práctica de cinética enzimática: hidrólisis de celobiosa con β -glucosidasa

Procedimiento

1. Se estima el volumen de solución de celobiosa 100 g/L que se necesita para obtener la concentración de este azúcar asignada.
2. Se añade dicho volumen en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se añade tampón citrato 50 mM pH 5.0 hasta llegar a los 20 mL de volumen final
3. Se coloca el matraz en el baño de vaivén con control de temperatura y agitación (a 150 rpm). Se deja 5 minutos agitando.
4. Se preparan, entretanto, 9 microtubos con 0,5 mililitros de la solución de clorhídrico 0,6 M en cada uno.
5. Se toma una muestra del matraz (0,5 mL) y se añade al primer microtubo. Se mezcla con la pipeta y se cambia la punta. Esta es la MUESTRA a TIEMPO CERO.
6. Una vez termostatzado el tampón con celobiosa en cada matraz, se añaden a este 140 μ L de la solución de enzima diluida (que tiene 7 μ g/ μ L de proteína). TIEMPO CERO: se pone a funcionar el cronómetro para ir controlando el tiempo de toma de muestra.

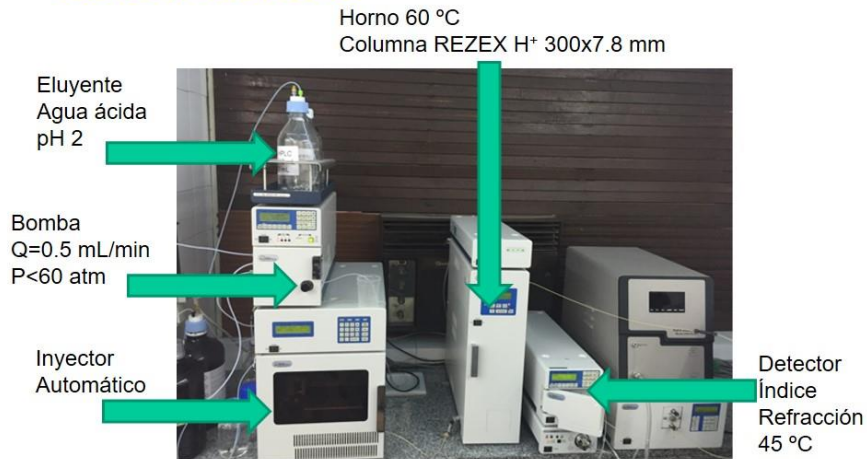
Procedimiento

8. Se van tomando muestras del matraz (0,5 mL cada) y se añaden a los microtubos preparados. Una muestra por cada vial. Se mezclan bien con la pipeta y se cambia la punta de pipeta de muestra a muestra.
9. Las muestras se diluyen con agua Milli-Q: 0,2 mL de la muestra y 0,8 mL de agua en viales de HPLC. Esto según se vayan tomando muestras.
10. Tiempos de muestreo: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos
11. Las muestras son analizadas en HPLC y se aplican calibrados para conocer la concentración de cada carbohidrato en el medio de reacción (celobiosas y glucosa), corrigiéndose la concentración de cada carbohidrato con la de ácido cítrico (que actúa como un patrón interno).



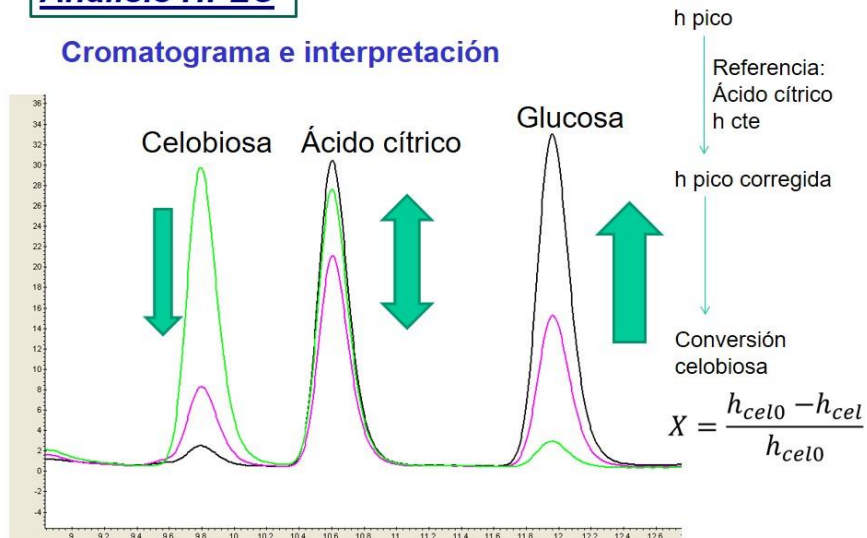
Análisis HPLC

Equipo y condiciones



Análisis HPLC

Cromatograma e interpretación



Aproximación gráfica al mejor modelo cinético (elegir el modelo cinético)

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Datos típicos

Temperatura del experimento: 45 °C

Concentración inicial de celobiosa en g/L: 10

Altura del pico de celobiosa en HPLC

Altura del pico de ácido cítrico (patrón interno)

Altura corregida del pico de celobiosa

Altura fijada del pico de ácido cítrico (el mismo valor para todas las muestras)

	Valor original	t (min)	Valores originales			Valores corregidos				
			h celobiosa (mV)	h celobiosa (mV)	h cítrico (mV)	h glucosa (mV)	t (min)	h celobiosa (mV)	h cítrico (mV)	h glucosa (mV)
T (°C)	45									
Ccel0 (g/L)	10	26	0	24.7	22	0	0	24.7	22.0	0.0
CE0 (mg/L)	42		5	19	24	9	5	17.4	22.0	8.3
			10	16	28	15	10	12.6	22.0	11.8
Ccel0 (mol/L)	0.0292		15	11	24	15	15	10.1	22.0	13.8
			20	12	31	24	20	8.5	22.0	17.0
			30	10	38	33	30	5.8	22.0	19.1
			40	4	25	23	40	3.5	22.0	20.2
			50	3	24	24	50	2.8	22.0	22.0
			60	2	25	26	60	1.8	22.0	22.9

t (min)	X celobiosa
0	0.00
5	0.29
10	0.49
15	0.59
20	0.66
30	0.77
40	0.86
50	0.89
60	0.93

Conversión de celobiosa estimada a partir de las alturas corregidas según:

$$X = \frac{h_{cel\ t=0} - h_{cel\ t=t}}{h_{cel\ t=0}}$$

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Primera figura: conversión de lactosa frente al tiempo (min) para todos los experimentos

MÉTODO INTEGRAL GRÁFICO

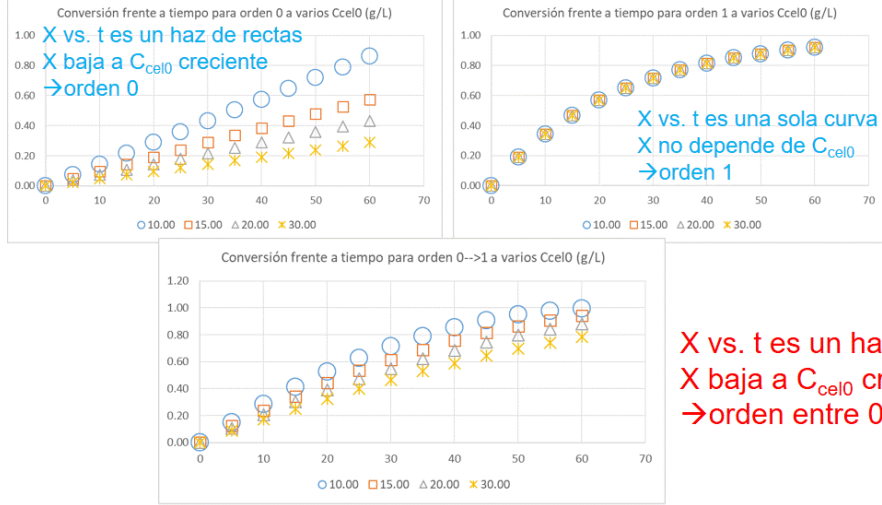
Evolución de la conversión con el tiempo a varias concentraciones de celobiosa a tiempo cero (en g/L)

X vs. t es un haz de curvas, X baja a C_{cel0} creciente → ¿orden entre 1 y 0?

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Primera figura: conversión de lactosa frente al tiempo (min) para todos los experimentos

MÉTODO INTEGRAL GRÁFICO



X vs. t es un haz de curvas
 X baja a C_{cel0} creciente
 →orden entre 0 y 1

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Estimación de los datos diferenciales por derivación usando incrementos intermedios

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO

T (°C)	45	t (min)	X celobiosa	ΔX/Δt por intervalo	C celobiosa (mM)	C celobiosa media intervalo	Velocidad media intervalo
Ccel0 (g/L)	10	0	0.00	0.058974359	29.24	24.93	1.72
CE0 (mg/L)	42	5	0.29	0.039232697	20.62	17.75	1.15
		10	0.49	0.02014652	14.88	13.41	0.59
Ccel0 (mol/L)	0.0292	15	0.59	0.012689913	11.94	11.01	0.37
		20	0.66	0.01103909	10.08	8.47	0.32
		30	0.77	0.009188153	6.85	5.51	0.27
		40	0.86	0.003117409	4.17	3.71	0.09
		50	0.89	0.004008097	3.26	2.67	0.12
		60	0.93		2.08		

Derivación numérica de datos integrales por intervalos
 (Ejercicio 1, primera parte)

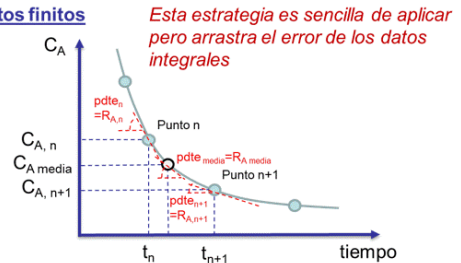
Método simple de incrementos finitos

N datos integrales
 →(N-1) incrementos
 →(N-1) datos diferenciales

$$R_A = v_A \cdot r = \frac{dC_A}{dt} \approx \frac{\Delta C_A}{\Delta t}$$

$$\bar{R}_{A,n \rightarrow n+1} = \frac{C_{A(n+1)} - C_{A(n)}}{t_{A(n+1)} - t_{A(n)}}$$

$$\bar{C}_{A,n \rightarrow n+1} = \left(\frac{C_{A(n)} + C_{A(n+1)}}{2} \right)_{n \rightarrow n+1}$$



PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Estimación de los datos diferenciales por derivación usando incrementos intermedios

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO

Datos diferenciales estimados para Ccel0=10 g/L=29,24 mM

C celobiosa media intervalo	Velocidad media intervalo
24.93	1.72
17.75	1.15
13.41	0.59
11.01	0.37
8.47	0.32
5.51	0.27
3.71	0.09
2.67	0.12

Este ejercicio de derivación se hace para 4 experimentos con Ccel0 entre 10 y 30 g/L

Tenemos

Ccel0 y r0 para todos los exptos
 Ccel y r para todos los exptos

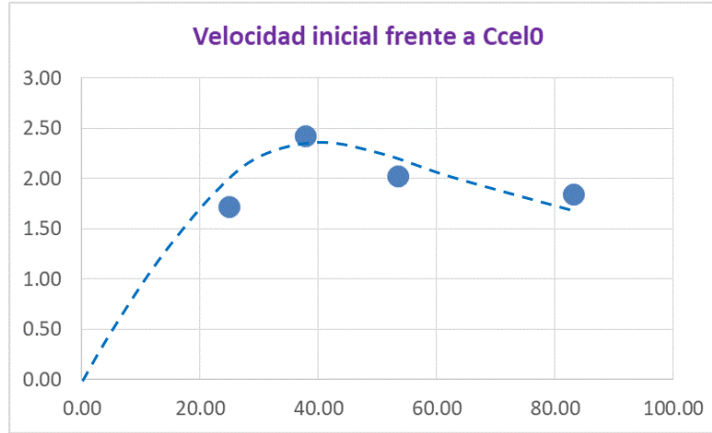


Gráficas diferenciales

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Segunda figura: velocidades iniciales (mM/min) frente a C_{cel0} (mM) todos los experimentos

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO

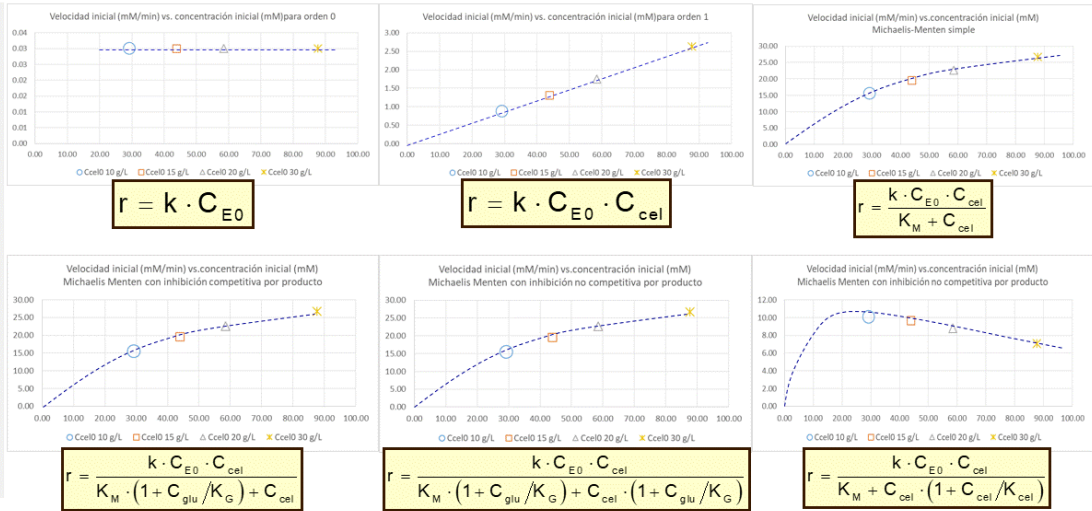


¿Qué sugiere esta figura? ¿inhibición por sustrato?

PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Segunda figura: velocidades iniciales (mM/min) frente a C_{cel0} (mM) varios modelos cinéticos

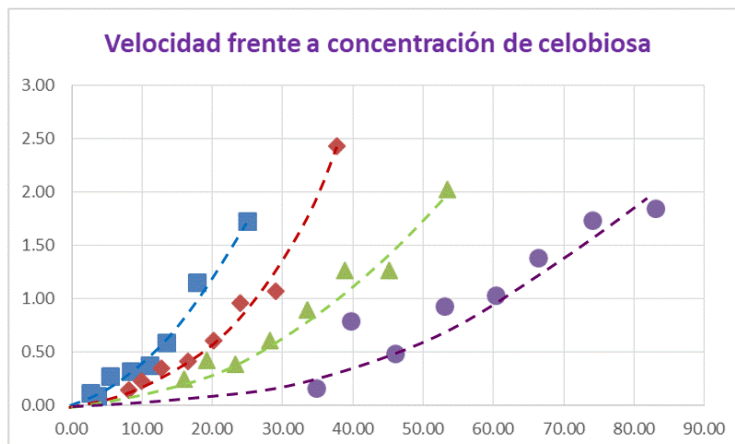
MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO



PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Tercera figura: velocidades (mM/min) frente a C_{cel} (mM) todos los experimentos

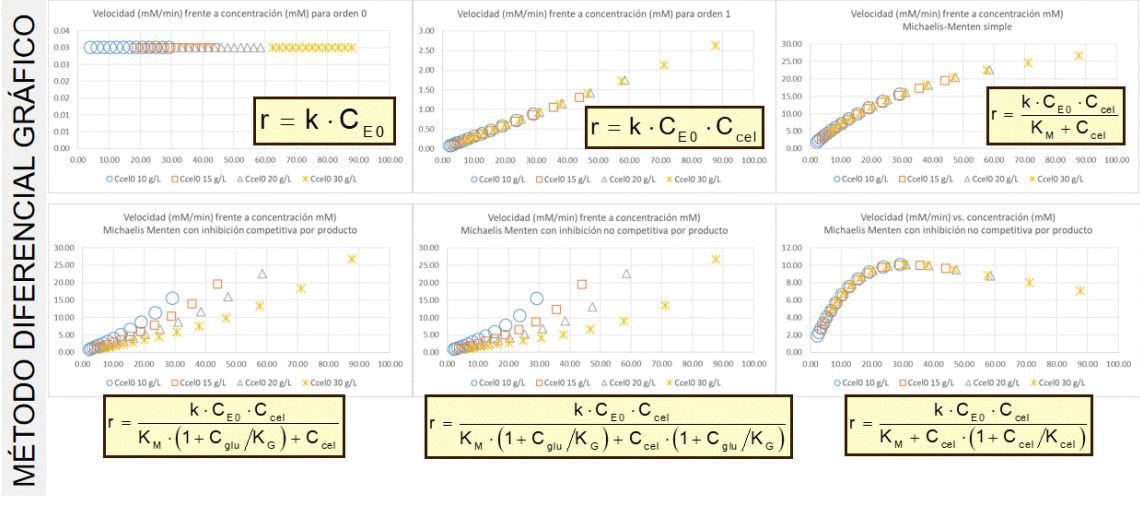
MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO



¿Qué sugiere esta figura? ¿inhibición por sustrato y por producto?

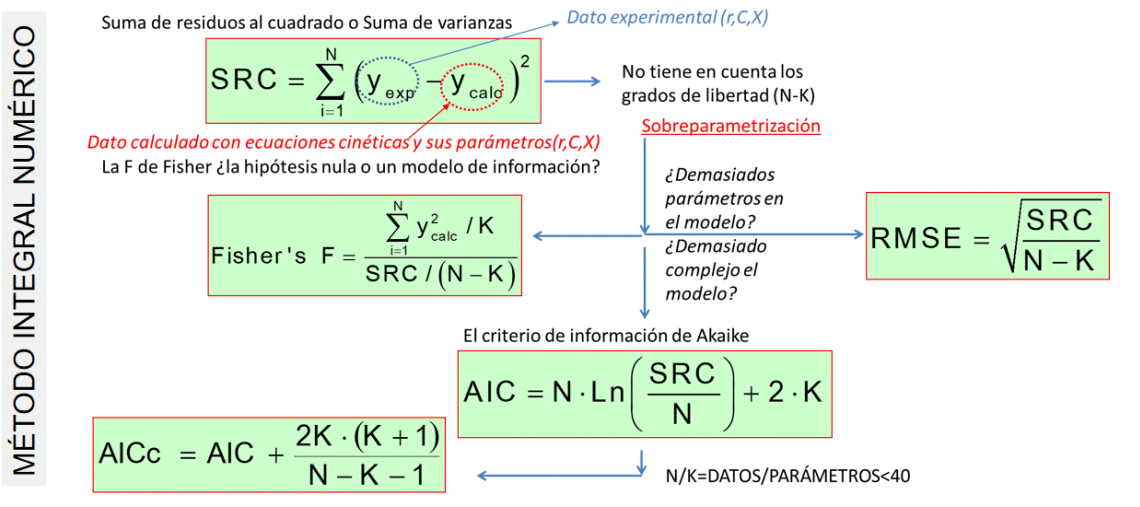
PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Tercera figura: velocidades (mM/min) frente a C_{cel} (mM) varios modelos cinéticos



PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

Los parámetros de bondad de ajuste, una vez conocemos los resultados de B-Madonna



PRÁCTICA: HIDRÓLISIS DE CELOBIOSA

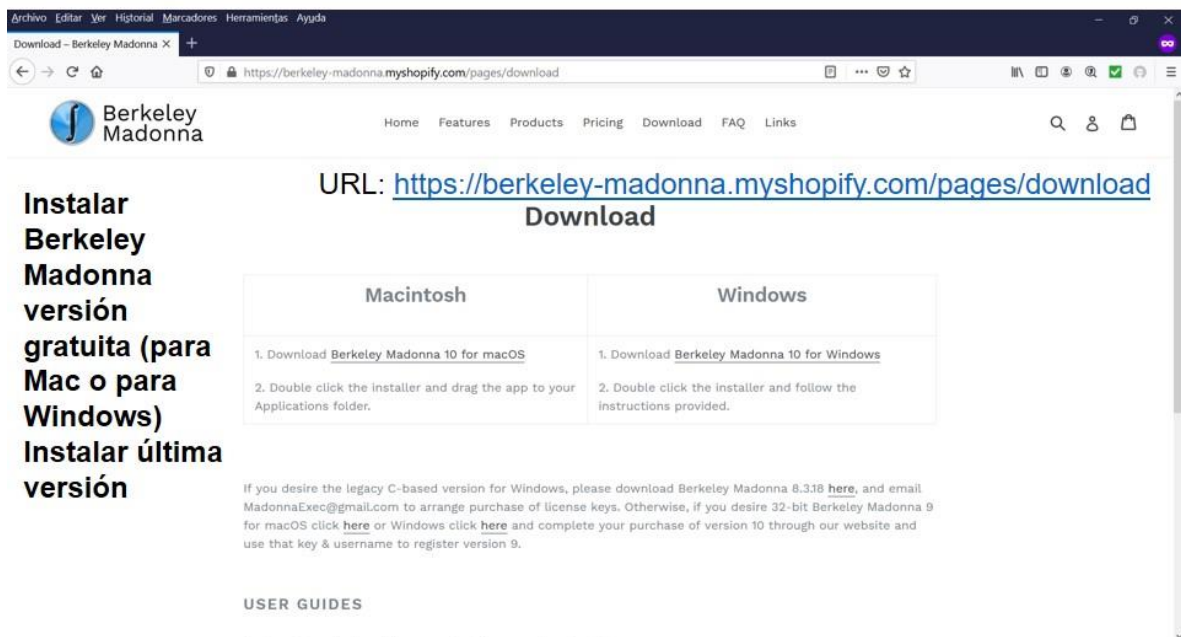
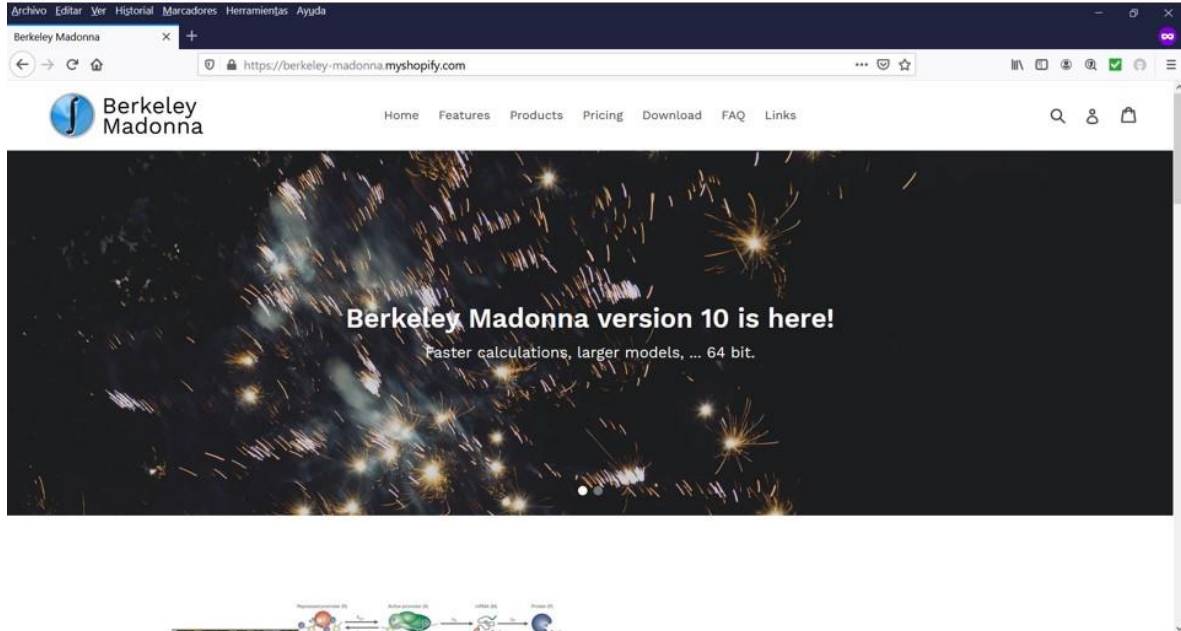
Informe de prácticas

Corto: unas 12 páginas. Individual.

- 1) Introducción: 1-2 páginas
- 2) Métodos de cálculo, parámetros estadísticos: 1-2 páginas
- 3) Resultados:
 - Análisis gráfico (cualitativo):
 - Método diferencial: gráficas de r vs. C_S y de r_0 vs. C_{S0}
 - Método integral: gráfica de X vs. tiempo a varias C_{S0}
 - Análisis numérico (cuantitativo):
 - Método integral: selección de modelo y constantes óptimas del modelo.
- 4) Discusión y conclusiones sobre los resultados
- 5) Bibliografía

Análisis numérico con Berkeley Madonna

La explicación es meticulosa, paso a paso, y la presentación consta de 55 diapositivas. Aquí se presentan, a modo de ejemplo, las ocho primeras y las dos últimas.



Código del programa de integración numérica en Madonna

```
{Parámetros del método de integración}
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME=60 ;Deja de calcular a las 100 unidades de tiempo
DT = 0.02 ;Integra cada 0.02 unidades de tiempo
Dtout=5 ; muestra datos cada 5 min

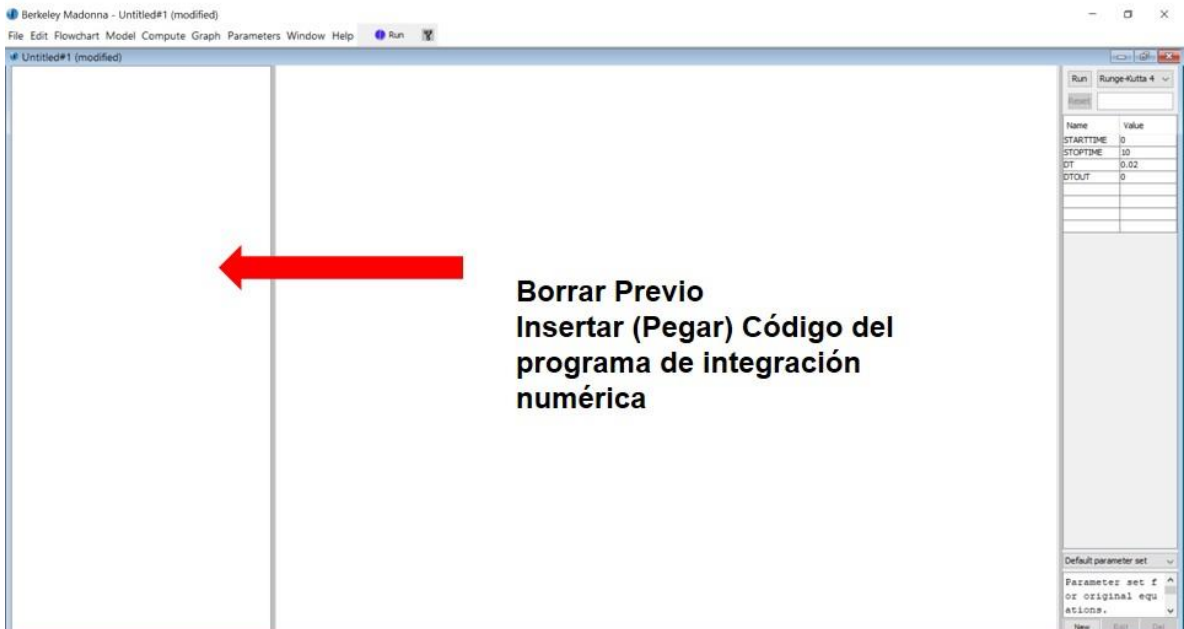
{Balances a sustratos y productos}
{Reacción: celobiosa----> 2 glucosa}

d/dt(C)=-r ; mM/min
d/dt(G)=r*2
Init (C)=Czero ; condición inicial en mM
Init (G)=0 ; condición inicial en mM
limit C >=0

{Modelos cinéticos}
{unisustrato irreversible}
;r=k*E*C
{unisustrato irreversible MM}
;r=k*E*C/(Km+C)
{unisustrato irreversible MM con inhibición por producto}
r=k*E*C/(C+Km*(1+G/KG))

k=20 ; (unidades depende del modelo usado *min-1)
Km= 20 ;mM
KG=50 ;mM
Ki=50 ;mM

{Condiciones de cada experimento}
E= 0.042 ;mg/mL
T= 30 ;°C
Czero=100 ; mM
```



Berkeley Madonna - Untitled#1 (modified)

File Edit Flowchart Model Compute Graph Parameters Window Help Run

Untitled#1 (modified)

```

{Parámetros del método de integración}
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME=60 .Deja de calcular a las 100
unidades de tiempo
DT = 0.02 .Integra cada 0.02 unidades de tiempo
Dtout=5 ; muestra datos cada 5 min

{Balances a sustratos y productos}
{Reacción: celobios-----> 2 glucosa}
d/dt(C)=-r ; mM/min
d/dt(G)=r*2
Init (C)=Czero ; condición inicial en mM
Init (G)=0 ; condición inicial en mM
limit C >=0

{Modelos cinéticos}
{unisustrato irreversible}
r=k*E*C
{unisustrato irreversible MM}
r=k*E*C/(Km+C)
{unisustrato irreversible MM con inhibición por
producto}
r=k*E*C/(C+Km*(1+G/KG))

k=20 ; (unidades depende del modelo usado
*min-1)
Km= 20 .mM
KG=50 .mM
Ki=50 .mM

{Condiciones de cada experimento}
E= 0.042 .mg/mL
T= 30 .°C
  
```

Run Runge-Kutta 4

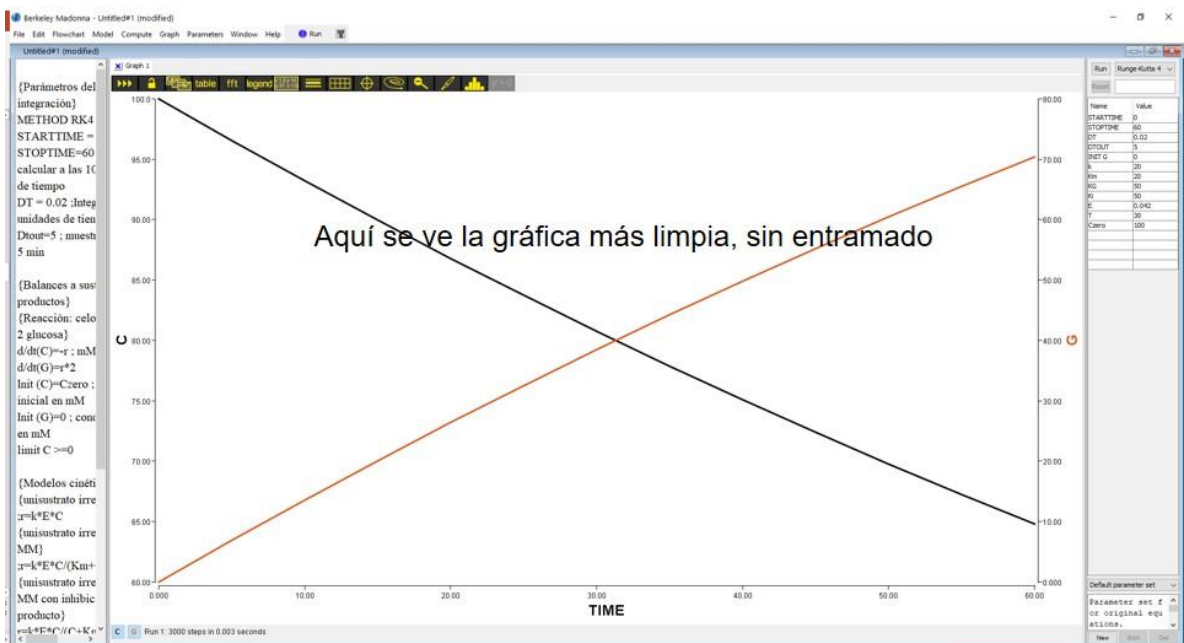
Name	Value
STARTTIME	0
STOPTIME	60
DT	0.02
Dtout	5
INIT C	0
INIT G	0
limit C	>=0

Default parameter set

Parameter set 1
or original equ
ations

New Run Quit

Compilar y Run

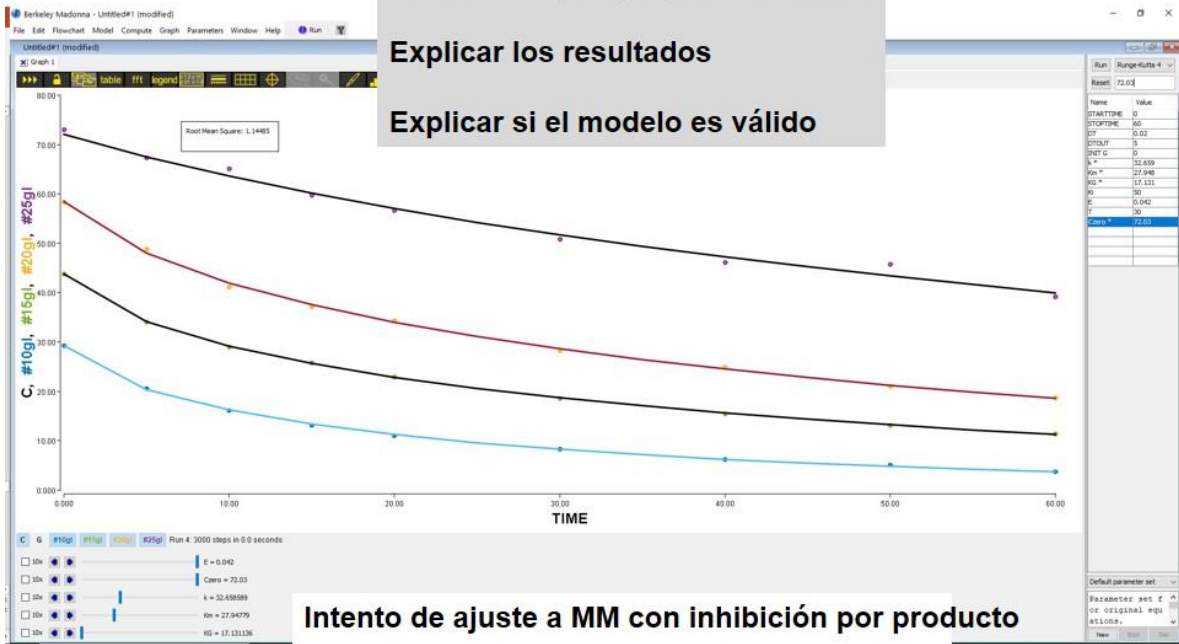


Ajuste de Modelo:

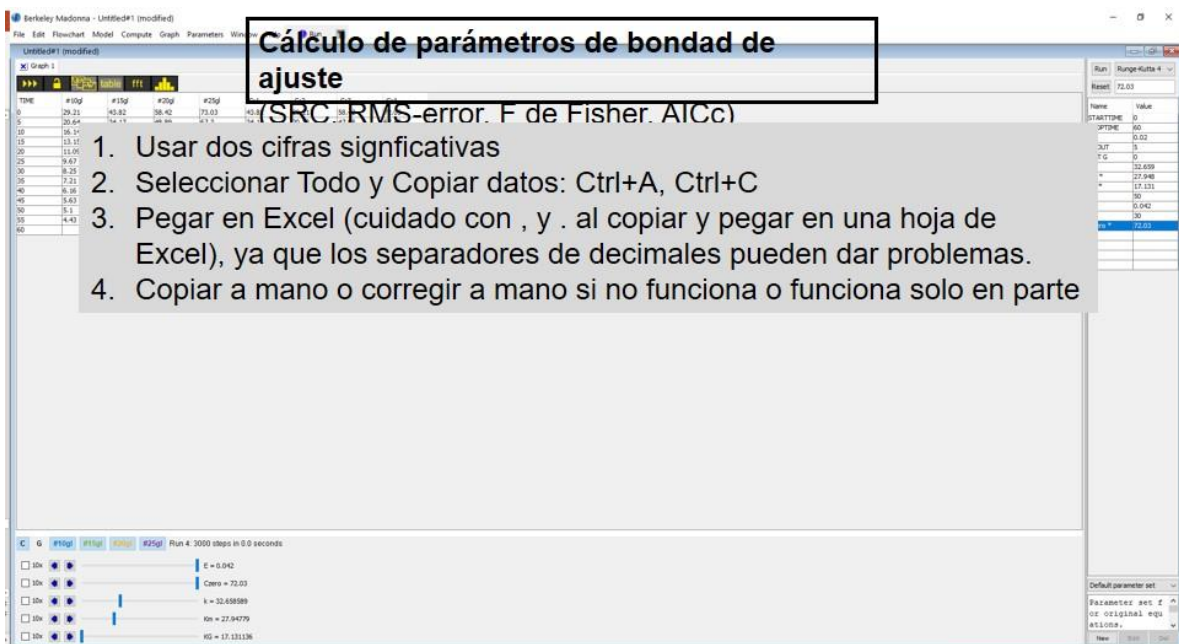
Anotar las k , KL y K_{gal} calculadas

Explicar los resultados

Explicar si el modelo es válido



Calculando k , KL y K_{Gal}



De todo este material se dispone de vídeos adecuados para el apoyo a la docencia online y presencial. En el Campus Virtual de las asignaturas se puede poner a disposición de los estudiantes datos de laboratorio, códigos de programa, guías de usuario como la Guía de Berkeley Madonna 10.4:

chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfindmkaj/https://www.berkeleymadonna.com/downloads/BM_Users_Guide_10.4.pdf

Este programa es libre, al menos para llevar a cabo los cálculos de regresión no lineal típicos en estas prácticas, y disponible en:

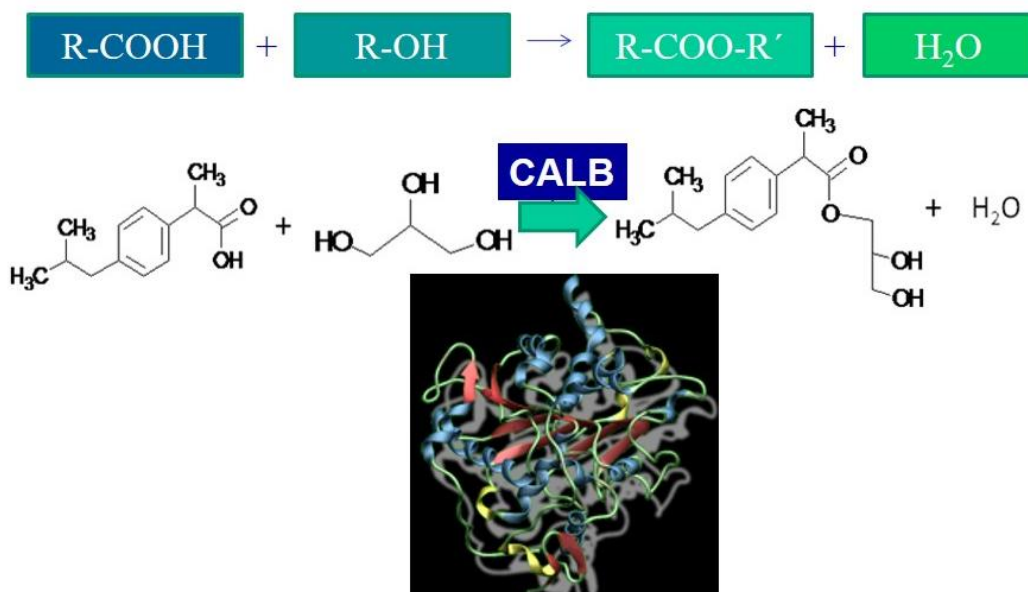
<https://www.berkeleymadonna.com/jmadonna/jmadrelease.html>

Se dispone de un programa similar para Aspen Custom Modeler v12.1 aplicable en los tres casos de estudio desarrollados en este Proyecto de Innovación Educativa. En la actualidad, y dentro de un PIE asociado a este, se ha desarrollado un programa similar en Excel. El objetivo es seleccionar el modelo cinético más adecuado para representar la realidad experimental y determinar los valores óptimos de los parámetros cinéticos.

2) Síntesis de un profármaco y surfactante basado en glicerina e ibuprofeno mediante la acción de la lipasa B de *Candida antarctica*

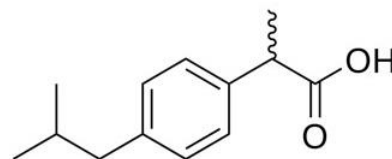
Guion de la práctica

SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS: MONOGLICÉRIDO DE IBUPROFENO



SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS

Monoglicéridos de ibuprofeno



Ibuprofeno

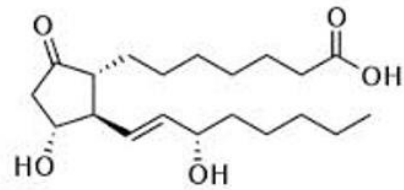
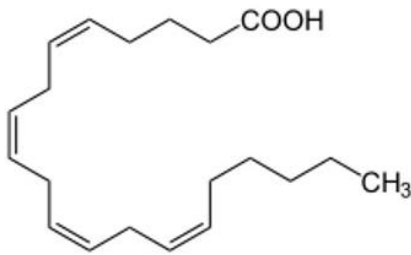
- Un antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Clase: ácidos arilpropiónicos.
- Inhibidor de las enzimas COX1 y COX2 (ciclooxigenasas). Inhibe la síntesis de prostaglandinas por estas enzimas.
- Absorción intestinal rápida, metabolizado en el hígado.
- El isómero S- es el activo; el isomero R- es inactivo pero se transforma en el S- (es un profármaco).
- No teratogénico, no carcinogénico y no mutagénico.
- Dosificación: 800-1200 mg/día. Máximo 2400 mg/día.
- **Efecto principal debido a la inhibición de COX2: antiinflamatorio, antipirético y analgésico. Posible neuroprotector.**
- **Efectos secundarios: náuseas, vómitos, hemorragia digestiva, ulceración, posible deterioro función renal, formación de edemas...producto de la inhibición de la COX1.**

SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS

Monoglicéridos de ibuprofeno

Acción principal: inhibición COX1 y COX2 (EC.1.14.99.1)

Enzimas ciclooxigenasas o prostaglandin-sintasas. Oxidan el ácido araquidónico a prostaglandinas (transmisores intercelulares).



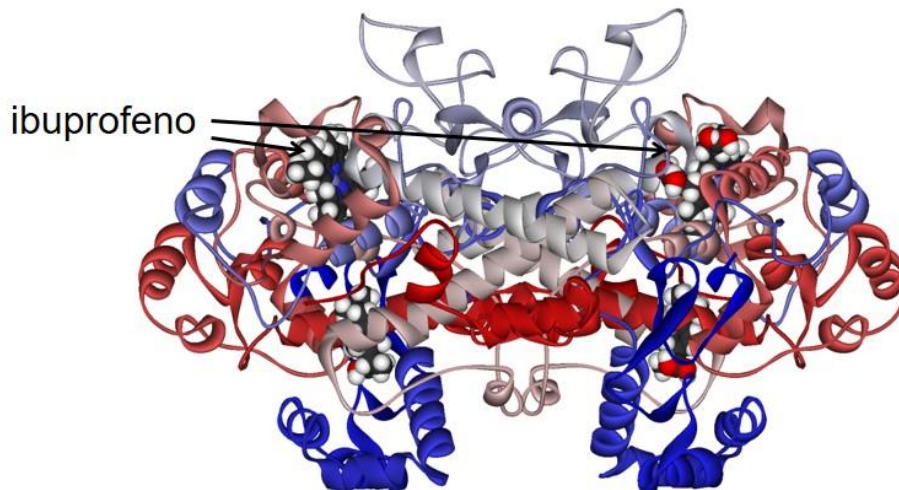
COX 1: regulación de la proliferación celular
(protección gástrica, asociación plaquetas...)

COX 2: procesos de inflamación y señalización celular

SÍNTESIS DE PROFÁRMACOS

Monoglicéridos de ibuprofeno

Ciclooxigenasas: COX1 y COX2 (EC.1.14.99.1)



PRIMERA PRÁCTICA: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOGLICÉRIDOS DE IBUPROFENO

Reactivos

Ibuprofeno en forma ácida

Agua Milli-Q

Glicerina grado UPS (99,98%)

Lipasa CALB libre Novozymes (Lipozyme CALB-L)

Metanol para parar la reacción y preparar muestras de HPLC

Aparatos y materiales

Microtubos eppendorf de 1,5 mL

Viales de muestra para HPLC 1,5 mL

Pipetas automáticas de volumen variable (1000 μ L, 5 mL)

Puntas de pipeta

Agitador magnético (imán)

Reactor: matraz redondo de 50 mL

Placa de agitación magnética con control PID de temperatura.

HPLC Jasco con columna C18 Mediterránea (Tecknokroma)

PRIMERA PRÁCTICA: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOGLICÉRIDOS DE IBUPROFENO



Placa de agitación magnética con control PID de temperatura IKA RTD

Agitación: 400 r.p.m

Tiempo de reacción: 90 minutos

PRIMERA PRÁCTICA: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOGLICÉRIDOS DE IBUPROFENO

Procedimiento

1. Se pesan 12,5 g de glicerina ($v = 10$ mL) en el matraz redondo de 50 mL y se añaden 1,25 mL de agua Milli Q (10 % w/w respecto a la glicerina).
2. Se pone en dicho matraz un imán y se coloca sobre la placa de calefacción, introduciendo la sonda de platino y ajustando la temperatura a 80 °C.
3. Se ajusta poco a poco la agitación a 400 r.p.m.
4. Se pesa la cantidad de ibuprofeno adecuado para que la concentración sea de 10 a 80 g/L (con respecto al volumen de glicerina).
5. Se añade a la glicerina del vaso ya termostatzada y se deja fundir (5 minutos).
6. Se preparan, entretanto, 8 microtubos eppendorf con 0,75 mililitros de metanol en cada uno de ellos.
7. Se toma una muestra del matraz (0,25 mL) y se añade al primer microtubo eppendorf, mezclando bien con el metanol. MUESTRA A TIEMPO CERO.
8. Una vez termostatzada la solución en el vaso, se añaden a este 1 o 2 mL de Lipozyme CALB L ($C_E = 1,5$ o 3 g/L), según se indique. TIEMPO CERO.

PRIMERA PRÁCTICA: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOGLICÉRIDOS DE IBUPROFENO

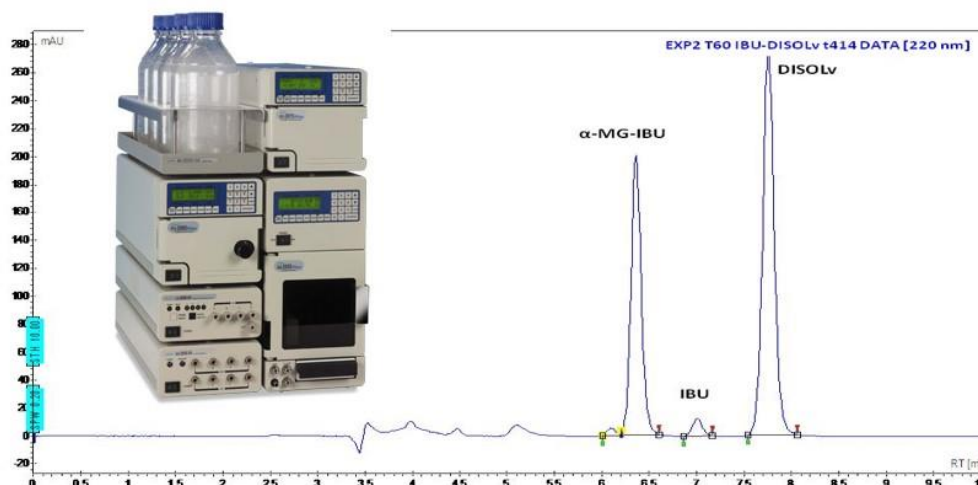
Procedimiento

8. Se van tomando muestras del matraz (0,25 mL cada) y se añaden, cada una, a microtubos que contengan solo el metanol, mezclando.
9. Tiempos de muestreo: 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 90 minutos.
10. Al finalizar de tomar muestras, se añaden 0,9 mL de metanol en viales de HPLC y se añade 0,1 mL de cada muestra en cada vial, mezclando.
11. Las muestras son analizadas en HPLC y se aplican calibrados basados en altura de pico y suma de alturas para conocer la conversión en cada muestra.
12. Los datos de conversión y tiempo se usan para determinar el modelo cinético y los valores de las constantes cinéticas mediante el método integral, utilizando ASPEN CUSTOM MODELER.

PRIMERA PRÁCTICA: SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONOGLICÉRIDOS DE IBUPROFENO

Análisis RP-HPLC

Columna: Mediterránea C18 250x4,6 mm
Eluyente: Metanol 86% agua pH 2.2 14% v/v
Caudal: 0,8 mL/min
Detector: DAD a $\lambda=210$ nm.



Programa Aspen Custom Modeler v12.1 (código fuente del programa principal)

Model BPBR2022

//Variables

kdir as realvariable;
krev as realvariable;
Cenz as realvariable;
Cib0 as realvariable;
X as realvariable;

KIb as realvariable;
KMG as realvariable;
KIbinh as realvariable;

//Modelo 1: Orden cero para la reacción directa y uno para la reacción inversa

//\$X=kdir*Cenz/Cib0-krev*Cenz*X;

//Modelo 2: Orden uno puro reversible

//\$X=kdir*Cenz*(1-X)-krev*Cenz*X;

//Modelo 3: Michaelis-Menten reversible: Hiperbólico con términos para ibuprofeno y monoglicérido en el denominador

//\$X=(kdir*Cenz*(1-X)-krev*Cenz*X)/(1+KIb*Cib0*(1-X)+KMG*Cib0*X);

//Modelo extra: Michaelis-Menten reversible con inhibición por ibuprofeno

//\$X=(kdir*Cenz*(1-X)-krev*Cenz*X)/(1+KIb*Cib0*(1-X)+KMG*Cib0*X+KIbinh*Cib0^2*(1-X)^2);

End

Programa Berkeley Madonna v10.4 (código fuente del programa principal)

{Parámetros del método de integración}

METHOD RK4

STARTTIME = 0

STOPTIME=60 ;Deja de calcular a las 100 unidades de tiempo

DT = 0.02 ;Integra cada 0.02 unidades de tiempo

Dtout=1 ; muestra datos cada 1 min

{Balances a sustratos y productos}

{Reacción: Glicerina + Ibuprofeno-----> Monoglicerido de ibuprofeno}

$d/dt(Ib)=-r$

$d/dt(Glib)=r$

Init (Ib)=Ibzero

Ibzero=50 ; condición inicial en mM

Init (Glib)=0 ; condición inicial en mM

limit Ib >=0

{Modelos cinéticos}

{Modelo 1: Orden cero para la reacción directa y uno para la reacción inversa}

$r=k_{dir}*E-K_{rev}*E*Glib$

{Modelo 2: Orden uno puro reversible}

$r=k_{dir}*E*Ib-K_{rev}*E*Glib$

{Modelo 3: Michaelis-Menten reversible: Hiperbólico con términos para ibuprofeno y monoglicérido en el denominador}

$r= (K_{dir}*E*Ib-K_{rev}*E*Glib)/(1+K_{ib}*Ib+K_{Glib}*Glib)$

{Modelo extra: Michaelis-Menten reversible con inhibición por ibuprofenor}

$r= (K_{dir}*E*Ib-K_{rev}*E*Glib)/(1+K_{ib}*Ib+K_{Glib}*Glib+K_{ilb}*Ib^2)$

$k_{dir}=20$; (unidades depende del modelo usado *min-1)

$k_{rev}=20$; (unidades depende del modelo usado *min-1)

$K_{ib}= 20$;mM

$K_{Glib}=50$;mM

$K_{ilb}=50$;mM

$E= 0.042$; concentración de enzima

{Expresión del rendimiento}

$x=(Ibzero-Ib)/Ibzero$

Informe de un estudiante (muestra anónima)

Índice

I.	Introducción	3
II.	Parte experimental	4
II.1	Materiales e instalación experimental	4
II.2	Procedimiento experimental	4
II.3	Métodos de calculo	5
II.4	Análisis RP-HPLC	6
III.	Resultados y discusión.....	7
III.1	Análisis gráfico (cualitativo)	7
III.2	Análisis numérico (cuantitativo).....	9
IV.	Conclusión	13
V.	Apéndices.....	14
	Apéndice I: Programa utilizado en ASPEN CUSTOM MODELER.....	14
VI.	Bibliografía.....	15

Índice de tablas

Tabla 1:	Constantes cinéticas del primer modelo numérico.....	9
Tabla 2:	Constantes cinéticas del segundo modelo numérico.....	10
Tabla 3:	Constantes cinéticas del tercer modelo numérico.....	11
Tabla 4:	Comparación de los ajustes de los 3 modelos numéricos	12

Índice de ilustraciones

Ilustración 1:	Fotografía de la instalación experimental	4
Ilustración 2:	Método simple de incrementos finitos	5
Ilustración 3:	Análisis HPLC	6
Ilustración 4:	Velocidades iniciales frente a varias concentraciones iniciales de sustrato.....	7
Ilustración 5:	Velocidades frente a $C_{ib,0}$, a varias concentraciones iniciales de sustrato	7
Ilustración 6:	Conversión frente a tiempo, a varias concentraciones iniciales de sustrato	8
Ilustración 7:	Datos de conversión frente a tiempo del primer modelo numérico.....	9
Ilustración 8:	Datos de conversión frente a tiempo del segundo modelo numérico	10
Ilustración 9:	Datos de conversión frente a tiempo del tercer modelo numérico.....	11

I. Introducción

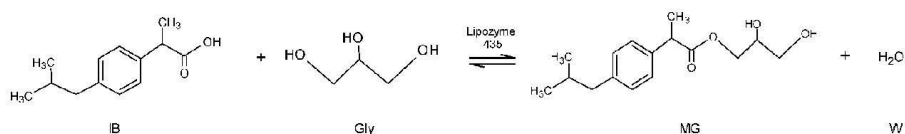
En los últimos años, se han desarrollado profármacos para bloquear el grupo de ácido carboxílico de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como una forma de reducir o evitar los efectos secundarios gastrointestinales. El ibuprofeno (ácido 2-(4-isobutilpenil) propiónico) pertenece a la familia de los profenos y es un AINE ampliamente utilizado. Su absorción intestinal es rápida y su dosificación es 800-1200 mg/día. Su isómero S- es el activo; el isómero R- es inactivo, pero se transforma en el S- (es un profármaco). Es no teratogénico, no carcinogénico y no mutagénico.

Los profenos son medicamentos eficaces para reducir el dolor, la inflamación y la fiebre. Son inhibidores de las ciclooxigenasas (COX), que inhiben la producción de prostaglandinas (transmisores intercelulares). Se han identificado dos isoformas de COX codificadas por dos genes diferentes. Ambas isoformas tienen funciones diferentes. COX-1 es una enzima de limpieza que se necesita para los requisitos básicos como la regulación de la proliferación celular (protección gástrica, asociación plaquetas...) y se produce constitutivamente en el cuerpo; mientras COX-2 es una enzima inducible, que se sintetiza generalmente en respuesta a la secreción de otros mensajeros químicos tales como toxinas, citoquinas, o mitógenos y que participa en procesos de inflamación y señalización celular.

Además del potencial terapéutico del ibuprofeno frente a situaciones patológicas asociadas con cambios inflamatorios y dolor, también se ha evaluado su eficacia en cáncer, neurodegeneración e incluso como complemento para hacer más efectiva la terapia con células madre. Muchas publicaciones han demostrado que este medicamento puede ejercer un potente efecto neuroprotector sobre diferentes modelos celulares de varias enfermedades neuronales. En estos modelos, se ha demostrado que el ibuprofeno suprime la pérdida neuronal vinculada a enfermedades neurodegenerativas.

El ibuprofeno también puede producir un alto número de cambios fisiológicos en el cuerpo, que conducen a anomalías en el corazón, el intestino y el riñón. La principal explicación detrás de estos efectos tóxicos es la inhibición no selectiva de las ciclooxigenasas. El efecto negativo más conocido cuando el ibuprofeno y sus derivados se administran por un tiempo prolongado son los problemas gastrointestinales, que se producen debido a la supresión de la síntesis de COX-1.

En esta práctica se estudia la síntesis de profármacos como el monoglicérido de ibuprofeno, catalizada por la lipasa. Se caracteriza por la reacción siguiente:



El objetivo es estudiar más ampliamente la cinética de la reacción para seleccionar un modelo cinético óptimo y sus parámetros asociados.

II. Parte experimental

II.1 Materiales e instalación experimental

El material necesario para esta síntesis es el siguiente: microtubos eppendorf de 1,5 mL, viales de muestra para HPLC 1,5 mL, pipetas automáticas de volumen variable (1000µL, 5 mL), puntas de pipeta, agitador magnético (imán), reactor: matraz redondo de 50 mL y placa de agitación magnética con control PID de temperatura IKA RTD. Todo este material permite establecer la instalación experimental adecuada (*Ilustración 1*) y realizar las manipulaciones necesarias para obtener los datos experimentales.



Ilustración 1: Fotografía de la instalación experimental

II.2 Procedimiento experimental

Nuestro grupo tenía como condiciones experimentales $C_{\text{ibuprofeno}} = 70 \text{ g/L}$ y $T = 80^\circ\text{C}$. Para llevar a cabo la síntesis, el primer paso es pesar 12,5 g de glicerina ($V = 10 \text{ mL}$) en el matraz redondo de 50 mL y añadir 1,25 mL de agua Milli Q (10 % w/w respecto a la glicerina). Después, hay que poner en dicho matraz un imán y colocarlo sobre la placa de calefacción, introduciendo la sonda de platino y ajustando la temperatura a 80°C . A continuación, se ajusta poco a poco la agitación a 400 r.p.m. Luego, se debe pesar la cantidad de ibuprofeno adecuado para que la concentración sea de 70 g/L (con respecto al volumen de glicerina), es decir 0,7 g de ibuprofeno. Luego, se añade a la glicerina del vaso ya termostalizada y se deja fundir durante aproximadamente 5 minutos. Entretanto, se preparan 8 microtubos eppendorf con 0,75 mL de metanol en cada uno de ellos y se toma una muestra a tiempo cero de 0,25 mL del matraz y se añade al primer microtubo eppendorf, mezclando bien con el metanol.

Una vez termostata la solución en el vaso, se añaden a este 1 mL de Lipozyme CALBL (C_{enz}=1,5 g/L). Este paso representa el tiempo cero. Durante el tiempo de reacción de 90 minutos, se van tomando muestras del matraz a intervalos de tiempo regulares de 0,25 mL cada, y se añaden a microtubos que contengan solo el metanol, mezclando. Al finalizar de tomar muestras, se añaden 0,9 mL de metanol en viales de HPLC y se añade 0,1 mL de cada muestra en cada vial, mezclando.

Para obtener nuestros resultados las muestras eran analizadas en HPLC, cuyo procedimiento se detalla en la parte II.4. Los datos de conversión y tiempo se usan para determinar el modelo cinético y los valores de las constantes cinéticas mediante el método integral, utilizando ASPEN CUSTOM MODELER.

II.3 Métodos de calculo

Los cálculos se pueden hacer mediante dos métodos diferentes: el método gráfico (con el método diferencial o integral) o numérico.

- Método diferencial gráfico

El método diferencial gráfico está basado en la derivación numérica de los datos integrales mediante el método de incrementos finitos descrito en la Ilustración 2.

$$\begin{aligned}
 & N \text{ datos integrales} \\
 & \rightarrow (N-1) \text{ incrementos} \\
 & \rightarrow (N-1) \text{ datos diferenciales} \\
 R_A &= v_A \cdot r = \frac{dC_A}{dt} \approx \frac{\Delta C_A}{\Delta t} \\
 \bar{R}_{A(n \rightarrow n+1)} &= \frac{C_{A(n+1)} - C_{A(n)}}{t_{A(n+1)} - t_{A(n)}} \\
 \bar{C}_{A(n \rightarrow n+1)} &= \left(\frac{C_{A(n)} + C_{A(n+1)}}{2} \right)_{n \rightarrow n+1}
 \end{aligned}$$

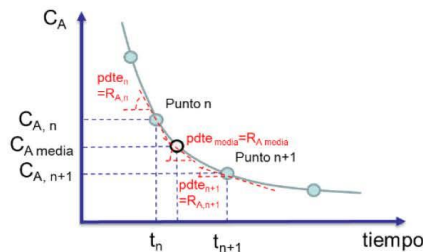


Ilustración 2: Método simple de incrementos finitos

Este método permite obtener datos diferenciales y analizar la evolución de las velocidades (incluso las velocidades iniciales) frente a la concentración de sustrato para todos los experimentos.

- Método integral gráfico

El método gráfico con datos integrales consiste simplemente en analizar las evoluciones de los datos directamente obtenidos, trazando los datos de conversión de sustrato vs tiempo a varias concentraciones iniciales de sustrato.

- Método integral numérico

Para el método numérico se estudiaron tres modelos cinéticos diferentes por la funcionalidad "Estimation" de ASPEN CUSTOM MODELER, y mediante el método integral es decir utilizando los datos

de conversión vs tiempo para diferentes concentraciones iniciales de sustrato. El programa utilizado en ASPEN figura en el *Apéndice I*. Los modelos probados están a continuación.

Modelo de orden cero (reacción directa)- orden uno (reacción inversa)

$$r = k_{dir} - k_{rev}C_{MG}$$

Modelo de orden uno (reacción directa)- orden uno (reacción inversa)

$$r = k_{dir}C_{gly} - k_{rev}C_{MG}$$

Modelo Michaelis-Menten (reacción directa)- Michaelis-Menten (reacción inversa)

$$r = \frac{k_{dir}C_{gly} - k_{rev}C_{MG}}{1 + K_{gly}C_{gly} + K_{MG}C_{MG}}$$

II.4 Análisis RP-HPLC

La cromatografía de HPLC es una técnica de análisis cualitativo y cuantitativo que permite la identificación, separación y dosificación de compuestos químicos en una mezcla líquida, incluso en trazas. La muestra para analizar, que contenga una o más especies, será arrastrada por una corriente de fase móvil en contacto con una fase estacionaria. Cada especie migra a una velocidad que depende de sus características y de las de las dos fases presentes. El cromatograma que contiene picos y los datos asociados del detector ayudan a calcular la concentración de cada compuesto. Esta técnica es muy utilizada en varios campos de la ciencia: en particular en la industria farmacéutica y veterinaria, en el ámbito medioambiental, en la biología y para el análisis de micotoxinas.

El análisis HPLC se llevaba a cabo en una columna Mediterránea C18 250x4,6 mm (Technokroma) con un eluyente Metanol 86% - agua pH 2.2 14% v/v y un caudal de 0,8 mL/min. El detector utilizado era el DAD a $\lambda = 210$ nm. Por fin, se aplicaban calibrados basados en altura de pico y suma de alturas para conocer la conversión en cada muestra. Se puede ver un cromatograma y la máquina utilizada en la *Ilustración 3*.

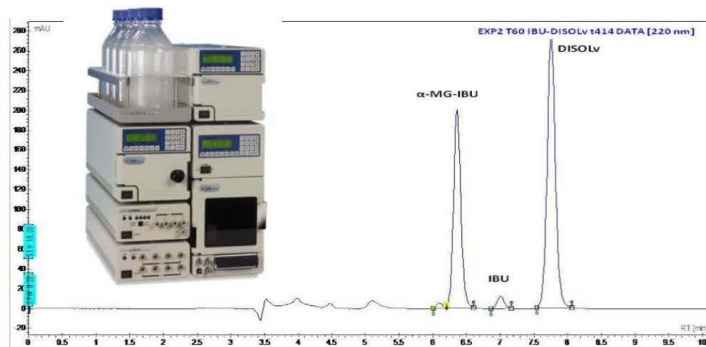


Ilustración 3: Análisis HPLC

III. Resultados y discusión

III.1 Análisis gráfico (cualitativo)

- *Método diferencial*

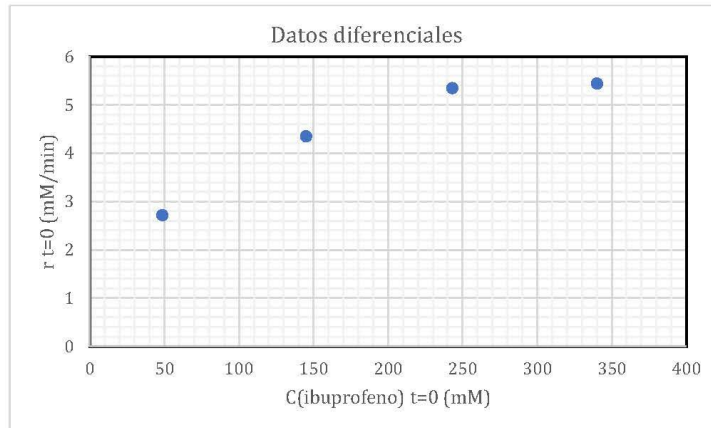


Ilustración 4: Velocidades iniciales frente a varias concentraciones iniciales de sustrato

La *Ilustración 4* representa las velocidades iniciales para diferentes concentraciones iniciales de ibuprofeno. Sugiere que la cinética inicial sigue un modelo de Michaelis-Menten ya que se ve una hipérbola que llega al cero, lo que es característico de este modelo.

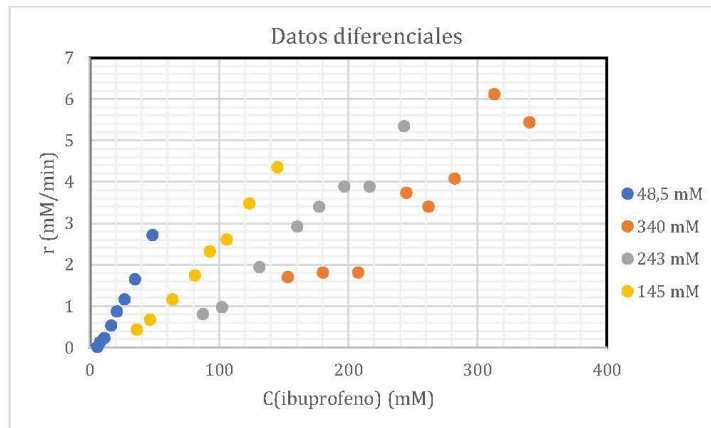


Ilustración 5: Velocidades frente a $C_{ib_{i_0}}$ a varias concentraciones iniciales de sustrato

En la *Ilustración 5* están representadas las velocidades de reacción frente a concentraciones de ibuprofeno, y para varias concentraciones iniciales de ibuprofeno. Se ve un haz de curva donde más aumenta la concentración inicial, más lenta es la reacción. Entonces la velocidad de reacción depende de la concentración inicial de sustrato. Cualitativamente, se puede concluir que el modelo cinético es un modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto.

- **Método integral**

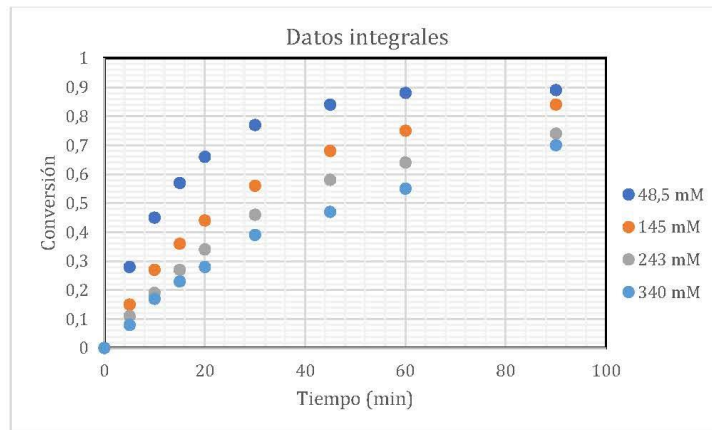


Ilustración 6: Conversión frente a tiempo, a varias concentraciones iniciales de sustrato

Como se puede ver en la *Ilustración 6*, los datos integrales de conversión frente al tiempo se organizan en un haz de curvas y cuanto más la concentración inicial de ibuprofeno disminuye, más aumenta la conversión. De esto podemos decir que la reacción sigue una cinética de orden entre 0 y 1, porque este tipo de evolución cuadra con la expresión de una cinética de orden 0 ($C_{A0} \frac{dX}{dt} = k$) pero son curvas (como en un orden 1) y no rectas (como en un orden 0).

III.2 Análisis numérico (cuantitativo)

- *Primer modelo: Modelo de orden cero (reacción directa)- orden uno (reacción inversa)*

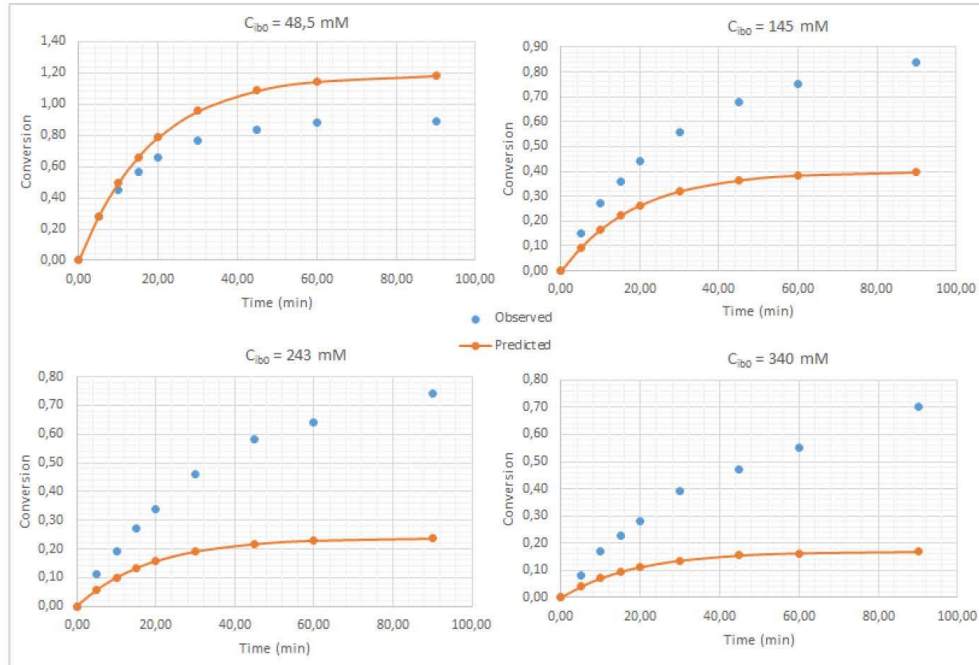


Ilustración 7: Datos de conversión frente a tiempo del primer modelo numérico

El modelo de orden cero-orden uno sigue la velocidad siguiente:

$$r = k_{dir} - k_{rev}C_{MG}$$

Se puede ver con la *Ilustración 7* que este modelo subestima los valores de conversión llegando a una conversión final más rápidamente que los experimentos, y esto para todas las concentraciones iniciales de ibuprofeno excepto para la más pequeña que está sobreestimada. En cualquier caso, hay una disparidad considerable entre la curva de los datos experimentales y la curva de los datos obtenidos con el modelo. Los valores de las constantes cinéticas obtenidas con este modelo están en la *Tabla 1*.

	Valor	Error
$k_{dir} \text{ (mM/min)}$	2,09	0,654
$k_{rev} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0361	0,0150

Tabla 1: Constantes cinéticas del primer modelo numérico

- Segundo modelo: Modelo de orden uno (reacción directa)-orden uno (reacción inversa)

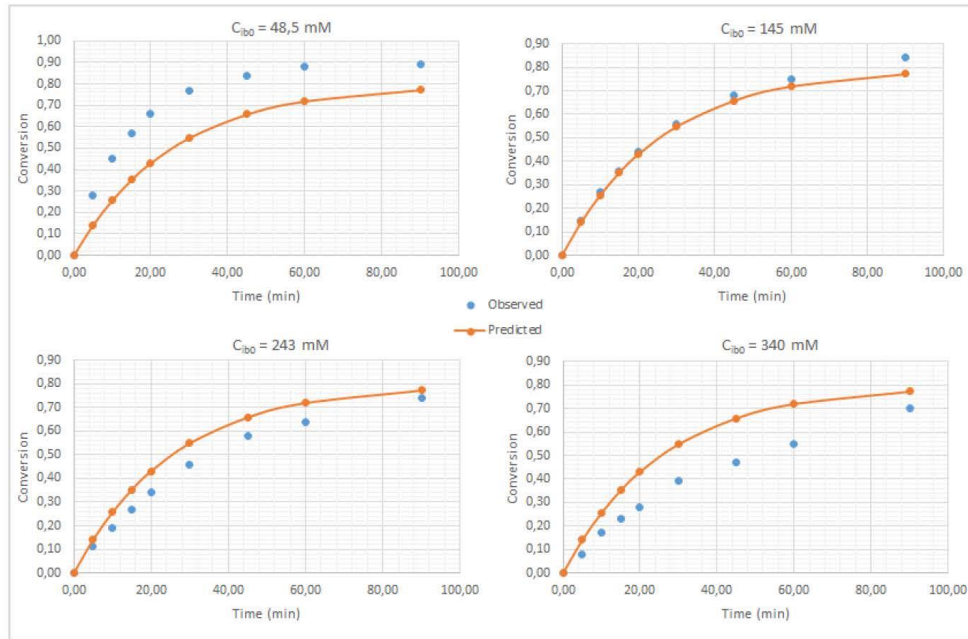


Ilustración 8: Datos de conversión frente a tiempo del segundo modelo numérico

El modelo de orden uno-orden uno tiene esta expresión de velocidad:

$$r = k_{dir}C_{ib} - k_{rev}C_{MG}$$

La Ilustración 8 muestra que este modelo sigue las tendencias inversas del modelo de orden cero-orden uno, también con la diferencia de que la disparidad entre los valores es un poco menor. Es decir que este modelo tiende a sobreestimar los valores de conversión, con la excepción otra vez de la concentración inicial de sustrato más baja. Los valores de la concentración inicial $C_{ib0} = 145$ mM se ajustan bien, pero obviamente se ve que el modelo no se ajusta bien para otras concentraciones y que no sería válido para un gran intervalo de concentraciones iniciales de ibuprofeno. Los valores de las constantes cinéticas de este segundo modelo están en la Tabla 2.

	Valor	Error
k_{dir} (min^{-1})	0,0207	0,0025
k_{rev} (min^{-1})	0,00529	0,00243

Tabla 2: Constantes cinéticas del segundo modelo numérico

- **Tercero modelo: Modelo de Michaelis-Menten (reacción directa)- Michaelis-Menten (reacción inversa)**

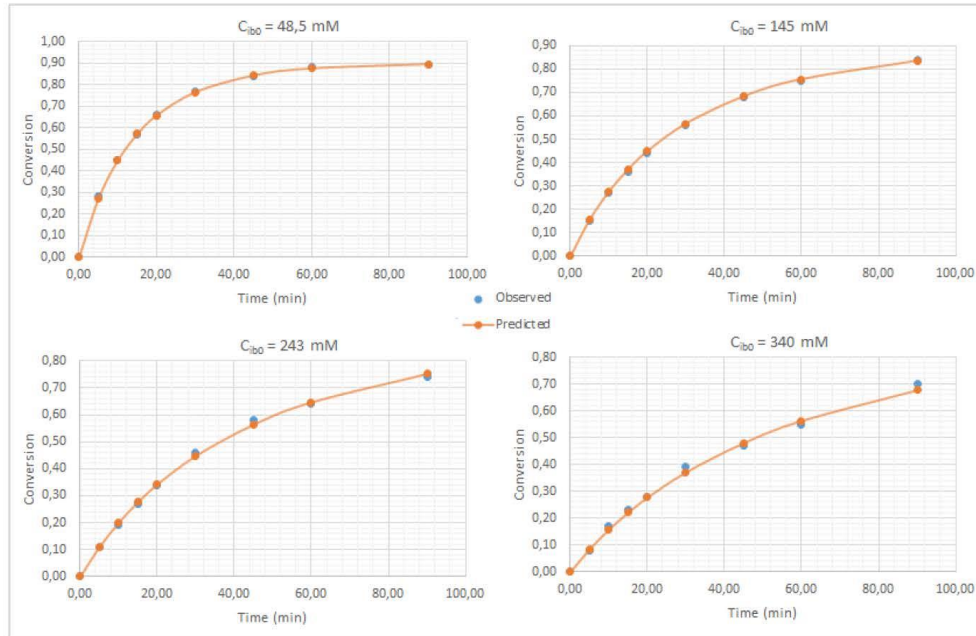


Ilustración 9: Datos de conversión frente a tiempo del tercero modelo numérico

El modelo de Michaelis Menten-Michaelis Menten (MM-MM) se expresa con la velocidad siguiente:

$$r = \frac{k_{dir}C_{ib} - k_{rev}C_{MG}}{1 + K_{ib}C_{ib} + K_{MG}C_{MG}}$$

En la *Ilustración 9* se ve que este modelo se ajusta muy bien a los datos experimentales para todas las concentraciones iniciales. El modelo sigue exactamente las tendencias de los datos experimentales. Esto se debe, por supuesto, a que tiene dos parámetros más que los otros modelos lo que permite una mayor precisión de ajuste. Por otro lado, tiene sentido que se ajusta mejor el modelo MM-MM porque hemos visto con los previos análisis cualitativos que el modelo cinético de la reacción es más bien un modelo de Michaelis-Menten que un modelo de orden 0 o 1. Los valores de las constantes cinéticas de este último modelo están en la *Tabla 3*.

	Valor	Error
$k_{dir} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0836	0,0035
$k_{rev} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	0,0094	0,0009
$K_{MG} \text{ (mM}^{-1}\text{)}$	0,0322	0,0023
$K_{ib} \text{ (mM}^{-1}\text{)}$	0,0170	0,0011

Tabla 3: Constantes cinéticas del tercero modelo numérico

- **Comparación de ajustes: selección de modelo y de constantes óptimas**

En la *Tabla 4* están resumidos los criterios que permiten comparar los ajustes de los modelos numéricos, y así elegir el modelo y los parámetros óptimos.

Modelo	orden 0-1	orden 1-1	MM-MM
SRC	0,2460	0,1143	0,0086
F	56,696	324,57	28062

Tabla 4: Comparación de los ajustes de los 3 modelos numéricos

Cuanto mayor es el parámetro de Fischer (F), mejor es el ajuste y cuanto menor es la Suma de Residuos al Cuadrado (SRC), mejor es el ajuste. Entonces comparando las SRC, se aprecia que el modelo de orden 0-1 lleva a los peores parámetros y el modelo MM-MM a los mejores. Es igual al comparar los parámetros de Fischer; el más grande es el del modelo MM-MM, entonces es el mejor ajuste.

Por lo tanto, el análisis numérico nos permite afirmar que el modelo cinético óptimo para la reacción es el modelo Michaelis Menten-Michaelis Menten, y las constantes cinéticas óptimas son las de este modelo.

IV. Conclusión

En esta práctica se estudió la síntesis enzimática de monoglicérido de ibuprofeno a partir de ibuprofeno, que se puede describir por la reacción siguiente: $R\text{-COOH} + R\text{-OH} \Rightarrow R\text{-COO-R}' + \text{H}_2\text{O}$. La práctica y los diferentes análisis resultantes (cualitativas y cuantitativas) permitieron elegir el modelo cinético óptimo de la reacción, así como sus constantes cinéticas óptimas. El modelo de Michaelis-Menten sale como el más adecuado, siguiendo la expresión de velocidad siguiente:

$$r = \frac{0,0836 \cdot C_{ib} - 0,0094 \cdot C_{MG}}{1 + 0,0170 \cdot C_{ib} + 0,0322 \cdot C_{MG}}$$

Conocer bien la cinética de una reacción como esta es imprescindible en su desarrollo y para llegar a los mejores resultados posibles en términos de eficiencia de producción. Como se menciona en la introducción, el ibuprofeno y los monoglicéridos de ibuprofeno son compuestos ampliamente usados y bastante importante a gran escala, lo que necesita un estudio claro y específico.

V. Apéndices

Apéndice I: Programa utilizado en ASPEN CUSTOM MODELER

Model BPBR2022

//Variables

kdir as realvariable; // constante cinética de la reacción directa. realvariable = numero con decimales

krev as realvariable;

Cenz as realvariable;

Cib0 as realvariable; // concentración inicial de sustrato

X as realvariable;

KIb as realvariable;

KMG as realvariable;

KIbinh as realvariable; // constante de inhibición (tipo Td)

//Modelo 1: Orden cero para la reacción directa y uno para la reacción inversa

$\$X = k_{dir} * C_{enz} / C_{ib0} - k_{rev} * C_{enz} * X$; // \$ = d/dt. multiplicando por X y no (1-X) porque es la reacción inversa y el reactivo es el producto de la directa (1-X se refiere al ibu)

//Modelo 2: Orden uno puro reversible

$\$X = k_{dir} * C_{enz} * (1-X) - k_{rev} * C_{enz} * X$; // reacción directa - reacción inversa

//Modelo 3: Michaelis-Menten reversible: Hiperbólico con términos para ibuprofeno y monoglicérido en el denominador

$\$X = (k_{dir} * C_{enz} * (1-X) - k_{rev} * C_{enz} * X) / (1 + K_{Ib} * C_{ib0} * (1-X) + K_{MG} * C_{ib0} * X)$;

End

VI. Bibliografía

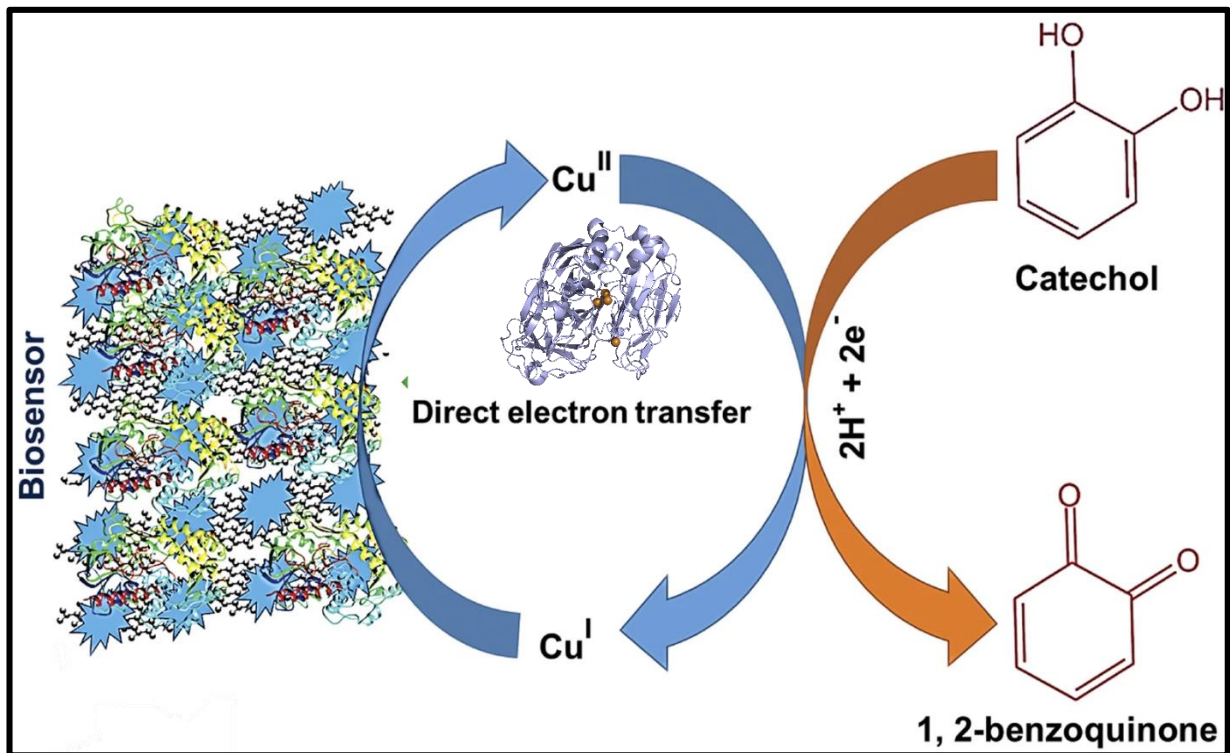
- Marianela Ravelo, M. Esther Gallardo, Miguel Ladero, Felix Garcia-Ochoa (2022). Synthesis of Ibuprofen Monoglyceride Using Novozym®435: Biocatalyst Activation and Stabilization in Multiphasic. *Catalysts*, 12, 1531. doi: 10.3390/catal12121531
- Marianela Ravelo, Jesus Esteban, Miguel Ladero, Felix Garcia-Ochoa (2016). Enzymatic synthesis of ibuprofen monoglycerides catalyzed by free *Candida antarctica* lipase B in a toluene–glycerol biphasic medium. *RSC Adv.*, 6, 69658-69669. doi: 10.1039/c6ra15480h

3) Oxidación biocatalítica de catecol con una lacasa de *Myceliophthora thermophila* expresada en *Aspergillus oryzae*

Guion de la práctica

Práctica 2 Cinética enzimática

Empleo de lacasas para la oxidación del catecol



Oxidación de catecol empleando lacasas para detectar catecol ⁶

1) Introducción

Las reacciones oxidativas son una de las transformaciones más importantes de la industria química, sobre todo en el campo farmacéutico y en química fina. Su importancia está aumentando en el procesamiento, valorización y mejora de materia lignocelulósica en el campo de las biorrefinerías. Esto, permite sustituir los métodos clásicos que generan compuestos oxidantes tóxicos, baja selectividad y reacciones secundarias, pero actualmente son más rentables.

Estas enzimas son dependientes de oxígeno ya que lo emplean como sustrato estando su actividad limitada por la baja solubilidad del oxígeno y por las limitaciones en su transporte. Por lo tanto, para estudiar el proceso se requerirá un estudio cinético del consumo de oxígeno y del transporte del oxígeno en el reactor. ¹

Dentro de las enzimas oxidativas, en esta práctica se estudiarán las lacasas. Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que pertenecen a la familia de las polifenol oxidasas que emplean cobre para la transferencia de electrones y emplean oxígeno como aceptor de electrones generando agua. Son capaces de oxidar una amplia variedad de sustratos como compuestos fenólicos, aminas aromáticas y lignina (Polímero formado por compuestos fenólicos), entre otros. Presentan la ventaja de que presentan una alta estabilidad, amplia especificidad de sustrato y capacidad de trabajar en condiciones suaves reduciendo costes de operación.

Su mecanismo de acción viene dado por su estructura, en la cual hay 4 átomos de cobre que van a ser fundamentales en la oxidación de los diferentes sustratos. El primer sitio de oxidación del sustrato es el cobre T1 coordinado con una cisteína y dos histidinas y después existe un sitio secundario formado por tres átomos de cobre (uno T2 y dos T3) coordinados también con dos histidinas. Una vez oxidado el sustrato en el sitio primario los electrones se transfieren del cobre T1 a los átomos de cobre T2/T3, donde se va a producir la reducción del oxígeno a agua. La capacidad de oxidación de las lacasas va a depender de el potencial redox del cobre T1 (En torno a 420-790 mV).

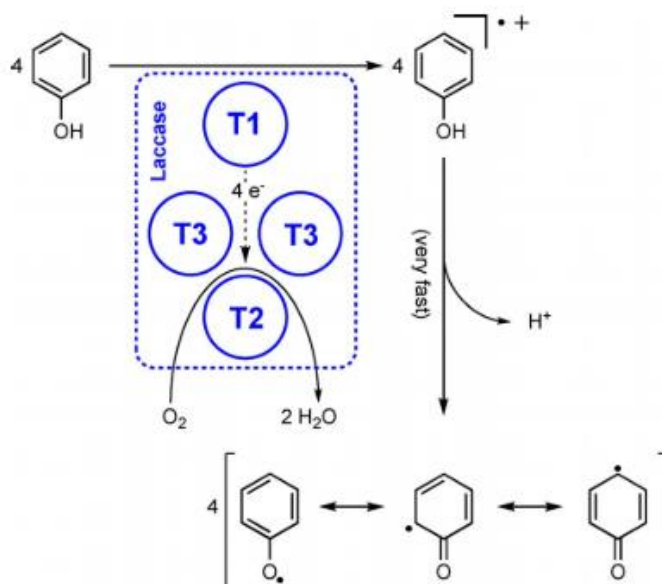


Figura 1: Mecanismo de acción de las lacasas sobre compuestos fenólicos. ²

Son enzimas que van a ser producidas y utilizadas por una gran variedad de organismos como hongos, bacterias, plantas e insectos, siendo las lacasas fúngicas las más empleadas industrialmente. ³

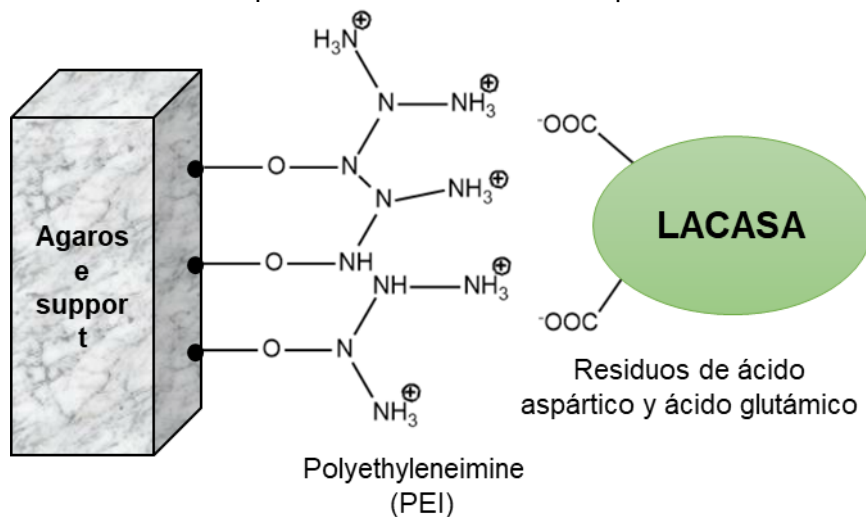
Presentan una gran diversidad de aplicaciones entre las que destacan:

- Tratamiento de aguas residuales y biorremediación: Los compuestos fenólicos son un grupo importante de contaminantes del medio ambiente debido a su elevada toxicidad y persistencia. Estas enzimas son capaces de oxidar estos compuestos generando compuestos menos tóxicos, por lo que las lacasas están ganando interés en este campo.
- Blanqueamiento en la industria papelera: En la producción de papel un paso fundamental es el blanqueamiento de la pulpa para la eliminación de la lignina

para mejorar la calidad del papel. En este caso el tratamiento con lacasas permite la oxidación de lignina produciendo su degradación, permitiendo un blanqueamiento de papel en condiciones más suaves que el proceso químico.

- Producción de bebidas: En la industria de zumos un paso muy importante es la clarificación y estabilización de los zumos ya que en el proceso de obtención de zumos existen una gran variedad de compuestos fenólicos que pueden alterar sus propiedades organolépticas. Por lo tanto, la oxidación de estos compuestos permite un control de la presencia de estos compuestos. ⁴

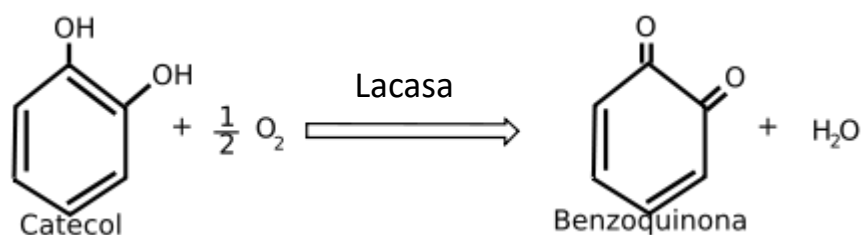
Debido a su elevado interés, pero sus elevados costes se están investigando la inmovilización sobre diferentes soportes para permitir su reutilización y aumentar su productividad. Así como, la inmovilización va a permitir un incremento de la estabilidad en condiciones más adversas. Sin embargo, presenta inconvenientes ya que se puede alterar las propiedades de la enzima reduciendo su actividad por cambios conformacionales y problemas estéricos en el sitio activo, así como problemas funcionales y de transferencia de materia cambiando sus propiedades cinéticas. En este caso, se va a emplear un soporte de agarosa que es un polímero de galactosas modificada con polietilenoimina. En este caso la superficie de la agarosa estará cubierta de grupos amino cargados positivamente a los que se adsorberá la enzima por intercambio iónico. ⁵



2) Objetivo

El objetivo de esta práctica va a ser el estudio de la cinética de consumo de oxígeno de enzimas oxidativas. Este objetivo principal se divide tres subobjetivos:

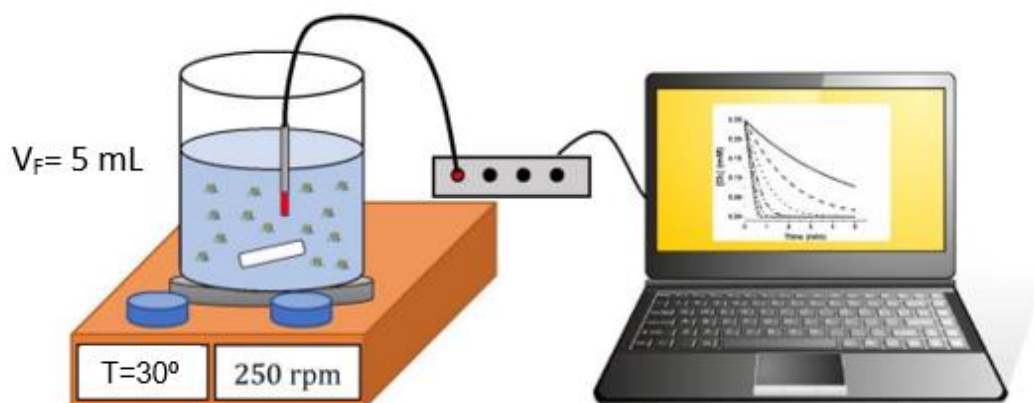
- Determinación de la actividad de enzimas oxidativas mediante la cuantificación de la velocidad inicial de consumo de oxígeno disuelto.
- Inmovilización de enzimas oxidativas y determinación de actividad mediante la cuantificación de la velocidad inicial de consumo de oxígeno disuelto.
- Determinación del modelo cinético de la oxidación de catecol catalizado por lacasa (polifenol oxidasas).



3) Procedimiento

Para llevar a cabo esta práctica se va a emplear Catecol como sustrato, una lacasa comercial Novozym 51003® (Novozymes, Dinamarca). La reacción se llevará a cabo en tampón fosfato pH 7,0 50 mM en viales de vidrio de 10 mL midiendo la evolución del oxígeno con el tiempo empleando un sensor de oxígeno de fibra óptica y un sensor de oxígeno (Pyroscience GmbH, Alemania).

Como soporte de inmovilización se empleará Agarosa 4-BCL (ABT, EEUU) modificada con polietilenoimina (Sigma-Aldrich, EEUU).



A) Estudio oxidación catecol por lacasas

El primer paso de esta práctica será medir la actividad enzimática de la lacasa para estudiar la actividad que se añade en cada ensayo.

1º Añadir 4,9 mL de Catecol 1 mM e incubar a 30 °C 5 min para que el medio alcance la temperatura deseada.

2º Se añaden 100 µL de la preparación enzimática que tiene una concentración de 0,3 g/L y se empieza a registrar la evolución el oxígeno.

3º Tras 5-10 min de reacción se para el experimento y se calcula la velocidad inicial de la reacción calculando la pendiente de la recta de consumo de oxígeno. A partir de la pendiente se estima la actividad de la enzima en U/mL.

B) Estudio cinético de la oxidación del catecol

Una vez conocida la actividad de la enzima se va a realizar el estudio cinético de oxidación de catecol mediante un procedimiento análogo a la medida de actividad.

1º Se añaden 4,9 mL de Catecol a diferentes concentraciones (1 mM o 5 mM) dependiendo del experimento y se deja que alcance la temperatura requerida (30 °C).

2º Se adicionan 100 µL de la preparación enzimática proporcionada a diferentes concentraciones (0,6-1,2 g/L) y se empieza a medir el consumo de oxígeno durante 15-30 min hasta que se estabilice la concentración de oxígeno. Estos datos serán empleados en la sesión de cálculos.

C) Estudio actividad de la enzima inmovilizada en Agarosa-PEI

Tras estudiar la cinética de la lacasa sobre el catecol y conocer su actividad se va a estudiar la actividad de la enzima inmovilizada proporcionada.

1º Al igual que en los casos anteriores se van a incubar 4,9 mL de catecol 1 mM hasta alcanzar los 30 °C.

2º Se agita la suspensión de enzima inmovilizada para que sea una solución homogénea. Se añaden 100 µL de la suspensión al medio de reacción y se empieza a registrar la concentración de oxígeno disuelto.

3º Se mide el consumo de oxígeno durante 5-15 min hasta que deje de disminuir la concentración de oxígeno.

4) Bibliografía

1. Lorente-Arevalo, A., Ladero, M. & Bolivar, J. M. Framework of the kinetic analysis of

O₂-dependent oxidative biocatalysts for reaction intensification. *React. Chem. Eng.* **6**, 2058–2074 (2021).

- Slagman, S., Zuilhof, H. & Franssen, M. C. R. Laccase-Mediated Grafting on Biopolymers and Synthetic Polymers: A Critical Review. *ChemBioChem* **19**, 288–311 (2018).
- Agustin, M. B. *et al.* Laccase as a Tool in Building Advanced Lignin-Based Materials. *ChemSusChem* **14**, 4615–4635 (2021).
- Brugnari, T. *et al.* Laccases as green and versatile biocatalysts : from lab to enzyme market — an overview. *Bioresour. Bioprocess.* **1**, 1–29 (2021).
- Virgen-Ortíz, J. J. *et al.* Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. *J. Mater. Chem. B* **5**, 7461–7490 (2017).
- Palanisamy, S. *et al.* A novel Laccase biosensor based on laccase immobilized graphene-cellulose microfiber composite modified screen-printed carbon electrode for sensitive determination of catechol. *Sci. Rep.* **7**, 1–12 (2017).

Aproximación gráfica al mejor modelo cinético (elegir el modelo cinético)

PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Trabajar con Origin 2023 (o Excel) para obtener los datos diferenciales

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO

Long Name	A(X1)	B(X2)	C(Y2)	D(Y2)
Units	time (s)	[O ₂] (µM)	Derivative Y1	r
Comments			1st derivative of "[O ₂]" (µM) ^s	micromolar/s
F(x)=				--col(c)
1	0.625	82.717	-1.6024	1.6024
2	1.626	81.113	-1.5942	1.5942
3	2.626	79.627	-1.57194	1.57194
4	3.628	77.966	-1.51321	1.51321
5	4.629	76.496	-1.54246	1.54246
6	5.63	74.878	-1.49351	1.49351
7	6.631	73.506	-1.46553	1.46553
8	7.632	71.944	-1.49944	1.49944
9	8.631	70.507	-1.38672	1.38672
10	9.631	69.172	-1.344	1.344
11	10.631	67.819	-1.36263	1.36263
12	11.633	66.444	-1.32749	1.32749
13	12.634	65.16	-1.21994	1.21994
14	13.633	64.004	-1.19323	1.19323
15	14.636	62.771	-1.21526	1.21526
16	15.635	61.571	-1.1361	1.1361
17	16.635	60.5	-1.12541	1.12541
18	17.636	59.319	-1.13195	1.13195
19	18.635	58.236	-1.09004	1.09004

Abrir Origin 2023 y añadir los primeros datos

- 1) Columna 1: tiempo (s)
- 2) Columna 2: concentración de oxígeno

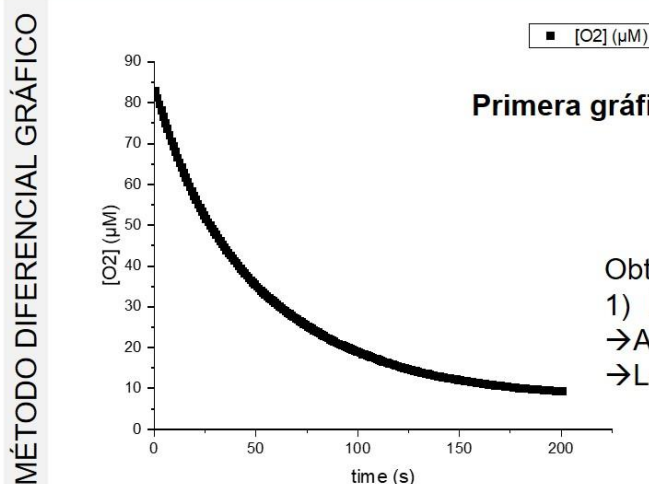


Hacer la primera gráfica

- 1) Seleccionar la columna 2 (click izdco en B(Y))
- 2) Ir al menú de arriba → Plot → Basic 2D → Scatter

PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Trabajar con Origin 2023 (o Excel) para obtener los datos diferenciales



Primera gráfica: concentración frente a tiempo



Obtener los datos de dC_{O_2}/dt o R_{O_2}

- 1) Ir al menú de arriba
→ Analysis → Mathematics → Differentiate
→ Last used

PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Trabajar con Origin 2023 (o Excel) para obtener los datos diferenciales

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO

Long Name	Units	Comments	A(X1)	B(X2)	C(Y2)	D(Y2)
time (s)	[O2] (μM)	Derivative Y1			r	
		1st derivative of [O2] (μM)*				
F(x)=						-col(c)
1	0.625	82.717			-1.6024	1.6024
2	1.626	81.113			-1.5942	1.5942
3	2.626	79.527			-1.57194	1.57194
4	3.628	77.966			-1.51321	1.51321
5	4.629	76.496			-1.54246	1.54246
6	5.63	74.878			-1.49351	1.49351
7	6.631	73.506			-1.46553	1.46553
8	7.632	71.944			-1.49944	1.49944
9	8.631	70.507			-1.38672	1.38672
10	9.631	69.172			-1.344	1.344
11	10.631	67.819			-1.36263	1.36263
12	11.633	66.444			-1.32749	1.32749
13	12.634	65.16			-1.21994	1.21994
14	13.633	64.004			-1.19323	1.19323
15	14.636	62.771			-1.21526	1.21526
16	15.635	61.571			-1.1361	1.1361
17	16.635	60.5			-1.12541	1.12541
18	17.636	59.319			-1.13195	1.13195
19	18.635	58.236			-1.09004	1.09004

Se obtiene la columna C: Derivative Y1 ($R_{O_2} < 0$)

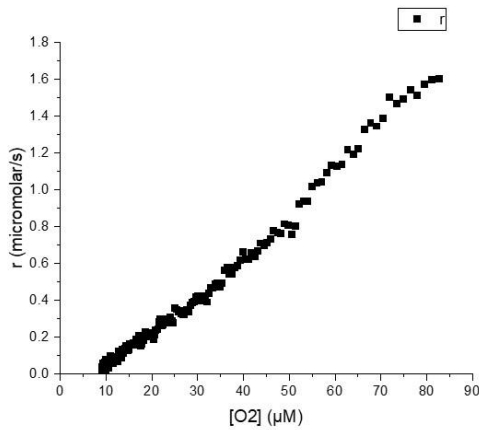
Vamos a modificar el signo de R_{O_2} para obtener la velocidad de la reacción (r) (coef. estequiométrico $O_2 = -1$)

- 1) Añadir una columna: column → add new columns
- 2) Seleccionar columna D (la nueva)
- 3) Meter una ecuación: column → set column values → col(D) = -col(C) → salen los datos de r en la col D

PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Trabajar con Origin 2023 (o Excel) para obtener los datos diferenciales

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO



Segunda gráfica: r vs C_{O_2}

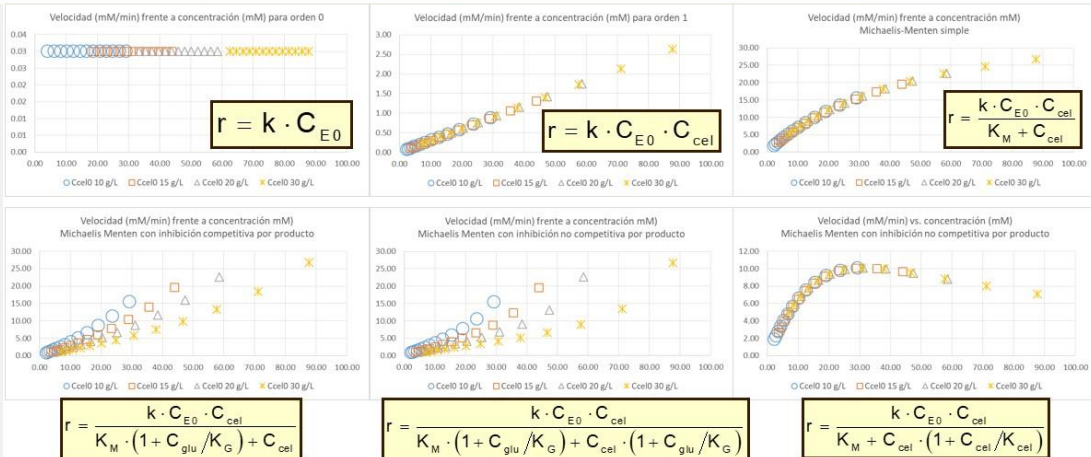
- 1) Seleccionar columna B (C_{O_2})
- 2) Cambiar de Y a X
Column → Set as → X
- 3) Ahora es la columna de nuestra variable X: la concentración
- 4) Seleccionar columna D (r)
- 5) Representar columna D como Y frente a columna B como X (r vs. C_{O_2})

¿Qué te sugiere su forma?

PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Figura: velocidades (mM/min) frente a C_{O_2} (mM) varios modelos cinéticos

MÉTODO DIFERENCIAL GRÁFICO



PRÁCTICA 2 FDBR 2022-23: CINÉTICA ENZIMÁTICA

Informe de prácticas

Corto: unas 12 páginas. Individual.

- 1) Introducción: 1-2 páginas
- 2) Métodos de cálculo, parámetros estadísticos: 1-2 páginas
- 3) Resultados:
 - Análisis gráfico (cualitativo): Origin o Excel
 - Método diferencial: gráficas de r vs. C_S
 - Análisis numérico (cuantitativo): Berkeley-Madonna
 - Método integral: selección de modelo y constantes del modelo.
- 4) Discusión y conclusiones sobre los resultados
- 5) Bibliografía

Entregar hasta el viernes 19 de mayo de 2023 en Tarea en CV, en formato Adobe Acrobat (pdf).

Formato del nombre de archivo: *Apellidos_nombre_práctica2FDBR.pdf*

Programa Berkeley Madonna v10.4 (código fuente del programa principal)

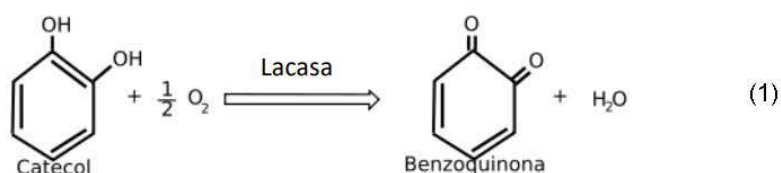
```
{Parámetros del método de integración}
METHOD RK4
STARTTIME = 0
STOPTIME=10 ;Deja de calcular a los 10 min
DT = 0.001 ;Integra cada 0.02 unidades de tiempo
Dtout=0.016 ; muestra datos cada segundo
{Balances a sustratos y productos}
{Reacción: 2 Catecol + O2 ----> 2 Quinona + 2 H2O}
d/dt(C)=-2*r ; mM/min
d/dt(O2)=-r ; mM/min
Init (C)=Czero ; condición inicial en mM
Init (O2)= O2zero ; condición inicial en mM
limit C >=0
limit O2 >=0
{Modelos cinéticos}
{orden cero}
;r=k*E ; mM/min
{unisustrato irreversible: orden 1}
;r=k*E*O2 ; mM/min
{unisustrato irreversible MM}
r=k*E*O2/(Km+O2) ; mM/min
k=2 ; (unidades depende del modelo usado)
Km= 0.1 ;mM
{Condiciones de cada experimento}
E= 0.04492 ;mg/mL
Czero= 1 ; mM
O2zero= 0.220 ; mM
```

Informe de un estudiante (muestra anónima)

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores ampliamente utilizados en la industria química porque promueven reacciones con alta regio- y estereoselectividad en condiciones muy suaves. La biocatálisis (síntesis de compuestos utilizando enzimas) se puede estudiar en disolución o con enzimas inmovilizadas en un soporte sólido, y representa una alternativa a los métodos de síntesis clásicos que generan compuestos más tóxicos [1].

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas oxidativas dependientes de oxígeno de la familia de las polifenol oxidasas. Estas pueden oxidar una gran variedad de sustratos, como compuestos fenólicos, aminas aromáticas o lignina, y contienen cuatro átomos de cobre para la transferencia de electrones. Así, sus principales aplicaciones son el tratamiento de aguas residuales, la degradación de compuestos recalcitrantes tóxicos (polímeros fenólicos) o el blanqueamiento del papel [2]. Las lacasas más empleadas en la industria son de origen fúngico. Al ser el oxígeno uno de los sustratos de la reacción, normalmente la actividad de estas enzimas está limitada por la baja solubilidad ($P_{O_2} = k_H \cdot C_{O_2}^*$) y por las condiciones de transporte [3]. La reacción estudiada en esta práctica es la oxidación de catecol en 1,2-benzoquinona, catalizada por lacasa:



Para ello, se mide la desaparición de oxígeno mediante un sensor de fibra óptica. Otras alternativas serían medir el catecol mediante HPLC o la 1,2-benzoquinona con espectroscopía de absorción, pues en disolución presenta un color marrón. Así:

$$-\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = 0 - OUR = q_{O_2} \cdot C_E \quad (2)$$

donde OTR (*oxygen transfer rate*) es la velocidad de transferencia de oxígeno y OUR (*oxygen uptake rate*) su velocidad de consumo. Al no trabajar en las condiciones de agitación adecuadas y no generarse un vórtice, la transferencia de oxígeno es próxima a cero y se puede despreciar.

OBJETIVO

El objetivo de esta práctica es el estudio cinético del consumo de oxígeno en la reacción de oxidación del catecol catalizada por lacasa, así como la determinación de la actividad enzimática en la misma reacción cuando la enzima se encuentra libre o inmovilizada en agarosa modificada con polietilenimina (PEI).

MATERIALES y MÉTODOS

Para esta práctica se emplearon viales de vidrio de 10 mL, catecol a 1mM o 5 mM en tampón fosfato pH 7,00 50 mM y una lacasa comercial Novozym 51003® a diferentes concentraciones y libre o inmovilizada en agarosa-PEI.

A) Estudio de actividad de enzima libre

Para ello, se añadieron 4,9 mL de catecol 1 mM en un vial dentro de un baño a 30 °C con agitación magnética. Tras alcanzar la temperatura deseada, se añadieron 100 µL de lacasa de concentración 0,3 g/L y se introdujo el sensor de oxígeno de fibra óptica para registrar su evolución. En el programa del ordenador se observaba directamente la variación de la concentración con el tiempo, obteniendo la pendiente del tramo lineal.

B) Estudio cinético

Con un procedimiento análogo al anterior, se añadieron 4,9 mL de catecol 5 mM en un vial y se dejaron en él hasta alcanzar los 30 °C. En los ensayos de otros compañeros se empleó catecol a 1 mM. Seguidamente, se añadieron 100 µL de lacasa diluida 1:5 (0,04492 g/L) y se empezó a medir la concentración de oxígeno. Otros experimentos emplearon una dilución de enzima 1:10 (0,02246 g/L).

Con los datos integrales de tiempo y concentración de cada uno de los cuatro experimentos con las dos concentraciones de sustrato y las dos de enzima, se representaron en el programa Origin y se calculó la derivada de cada uno, correspondiendo a la velocidad de la reacción (r) [4]. Además, con datos diferenciales de concentración y velocidad se realizó el análisis gráfico de los experimentos.

Igualmente, los datos integrales se exportaron al programa Berkeley-Madonna para comprobar qué modelo cinético se ajustaba mejor a los datos experimentales y obtener los parámetros cinéticos. Para ello, se comprobaron los siguientes modelos:

$$\text{Orden 0: } r = k \cdot C_{E_0}$$

$$\text{Unisustrato irreversible orden 1: } r = k \cdot C_{E_0} \cdot C_{O_2}$$

$$\text{Unisustrato irreversible Michaelis-Menten: } r = \frac{k \cdot C_{E_0} \cdot C_{O_2}}{K_M + C_{O_2}}$$

$$\text{Michaelis-Menten con inhibición competitiva: } r = \frac{k \cdot C_{E_0} \cdot C_{O_2}}{K_M \left(1 + \frac{C_{O_2}^0 - C_{O_2}}{K_G} \right) + C_{O_2}}$$

Además, el propio programa también mostraba la representación de los datos diferenciales (velocidad frente a concentración) y la raíz del error cuadrático medio (RMSE): $RMSE = \sqrt{SRC/(N - K)}$, siendo ($N - K$) los grados de libertad.

C) Estudio de actividad de enzima inmovilizada

Al igual que en el estudio de actividad de la enzima libre, se añadieron 4,9 mL de catecol 1 mM y cuando alcanzó los 30 °C se añadieron 100 µL de la suspensión de enzima inmovilizada ya preparada. Previamente, se empleó un vortex para homogeneizar la suspensión de enzima inmovilizada. Al contener residuos de ácido aspártico y ácido glutámico, la inmovilización de la enzima es por adsorción iónica con la polietilenimina, siendo esta interacción reversible en función del pH del medio. Tras introducir el sensor de oxígeno de fibra óptica, en el programa del ordenador se observaba directamente la variación de la concentración con el tiempo.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

A) Estudio de actividad de enzima libre

Tras parar el experimento, se anotó una pendiente y, por tanto, una velocidad inicial de la reacción de $110 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Además, teniendo en cuenta que una unidad de actividad (U) equivale a un $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, la actividad de la enzima libre es $0,11 \text{ U/mL}$.

B) Estudio cinético

El análisis gráfico de los datos integrales experimentales reflejan que la variación de la concentración de oxígeno con el tiempo no es lineal, por lo que se podría descartar un modelo cinético de orden 0 en el que la ecuación integrada sería: $C_{O_2} - C_{O_2}^0 = -k \cdot t$.

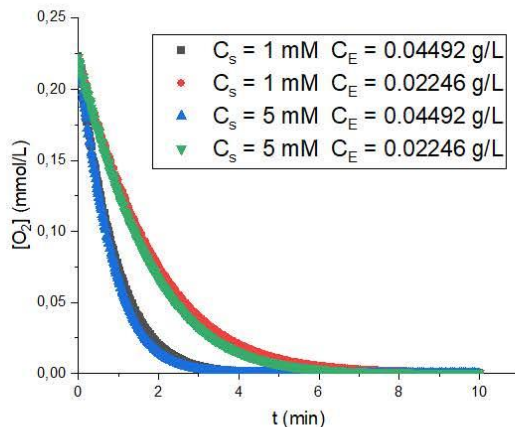


Figura 1: Variación de la concentración de oxígeno en función del tiempo para cada uno de los experimentos.

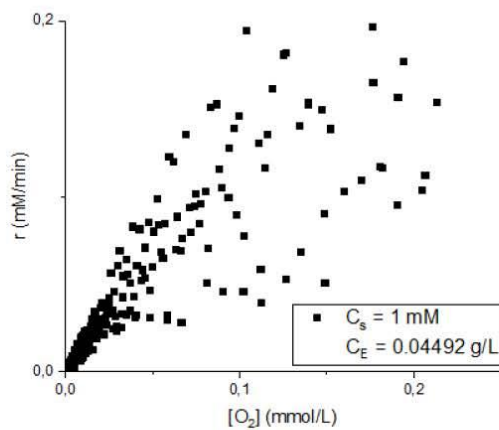


Figura 2: Datos diferenciales del primer experimento.

Además, en la figura 1 se observa que a mayor concentración de sustrato (C_S), la velocidad de consumo de oxígeno (pendiente) también es mayor.

Igualmente, se aprecia que la concentración de enzima (C_E) influye en la velocidad de reacción, por lo que debería aparecer en el modelo cinético y se podría descartar el de orden 1, pues en ese caso, para una misma concentración de sustrato se deberían obtener exactamente los mismos datos.

Así, cabe esperar que el modelo cinético válido sea una expresión de Michaelis-Menten, la cual se puede deducir del análisis gráfico de los datos diferenciales experimentales (Figura 2). En ella, se observa mucha dispersión conforme aumenta la concentración de oxígeno, sin embargo; esta dispersión es más llamativa hacia la región de mayores concentraciones, lo que parece indicar una tendencia hiperbólica de los datos. Aunque en la Figura 2 no se han reflejado todos los puntos de los cuatro experimentos, el comportamiento fue idéntico en todos ellos.

Seguidamente, el análisis numérico o cuantitativo con el programa de Berkeley-Madonna confirmó que no se trataba de un modelo cinético ni de orden 0 ni de orden 1, pues en ninguno de los casos la gráfica de velocidad frente a concentración se ajustaba a lo observado experimentalmente (Figura 2). Así, para un orden 0 la velocidad se debería haber mantenido constante con la concentración de oxígeno, mientras que para un orden 1 la velocidad debería aumentar linealmente con la concentración. En este punto, se podría llegar a interpretar que la figura 2 se asemeja a este comportamiento lineal, sin embargo, para que fuese correcto se debería haber observado dispersión a ambos lados de donde estaría la recta. Por este motivo, las gráficas anteriores no han sido incluidas en este informe, pero los parámetros cinéticos sí se encuentran en la tabla 1. De esta manera, el ajuste a un modelo cinético de Michaelis-Menten sí fue adecuado. Cabe destacar que antes de realizar los ajustes, se fijaron los rangos aproximados de los parámetros de cada modelo cinético ensayado.

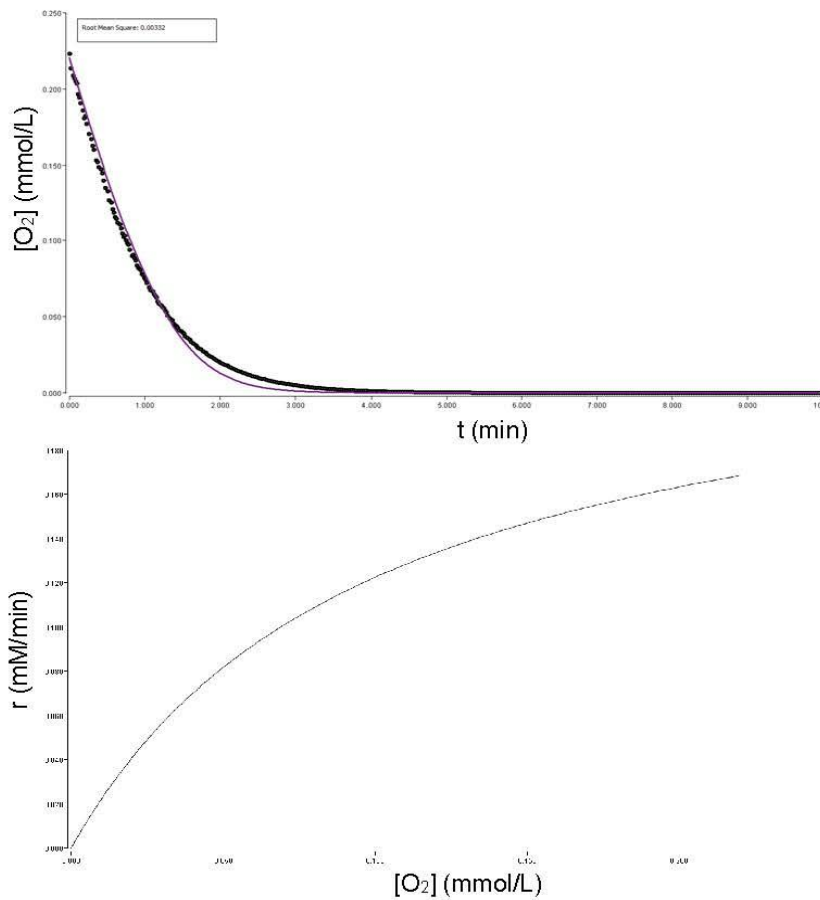


Figura 3: Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de los datos integrales (arriba) y diferenciales (abajo) del primer experimento ($C_S = 1$ mM. $C_E = 0,04492$ g/L).

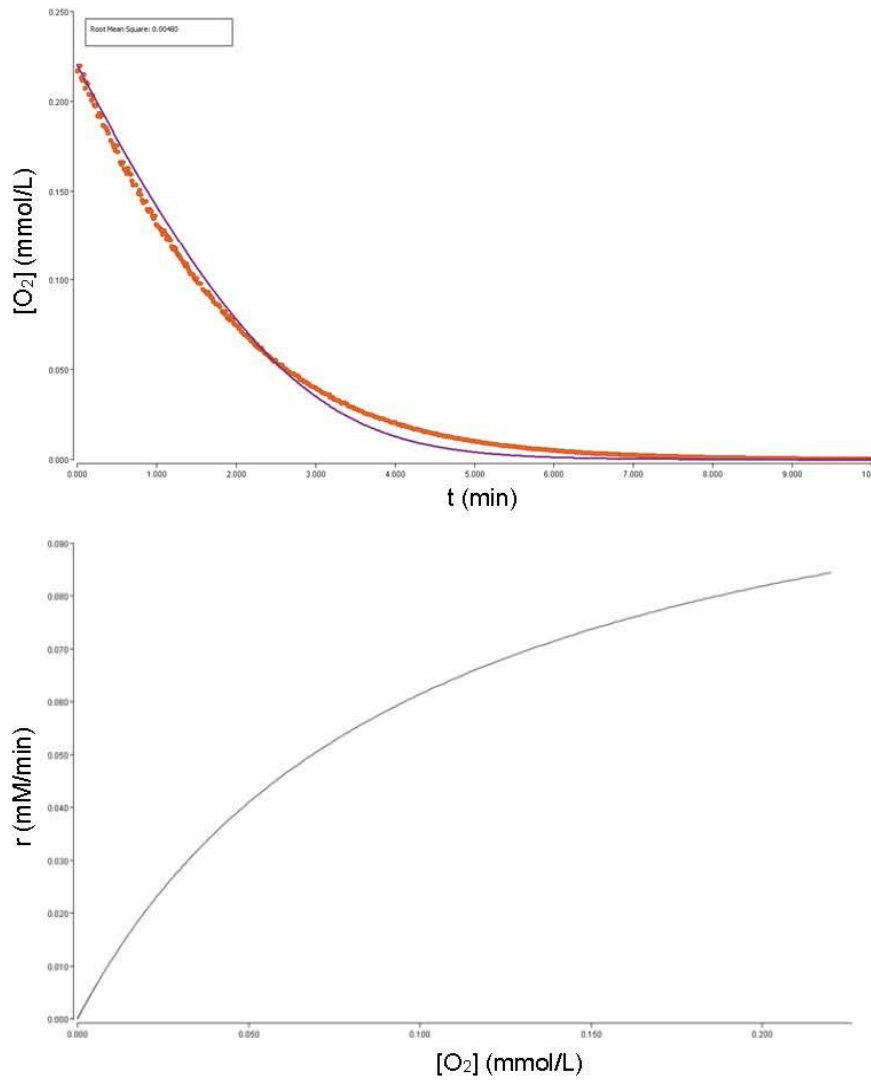


Figura 4: Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de los datos integrales (arriba) y diferenciales (abajo) del segundo experimento ($C_S = 1$ mM. $C_E = 0,02246$ g/L).

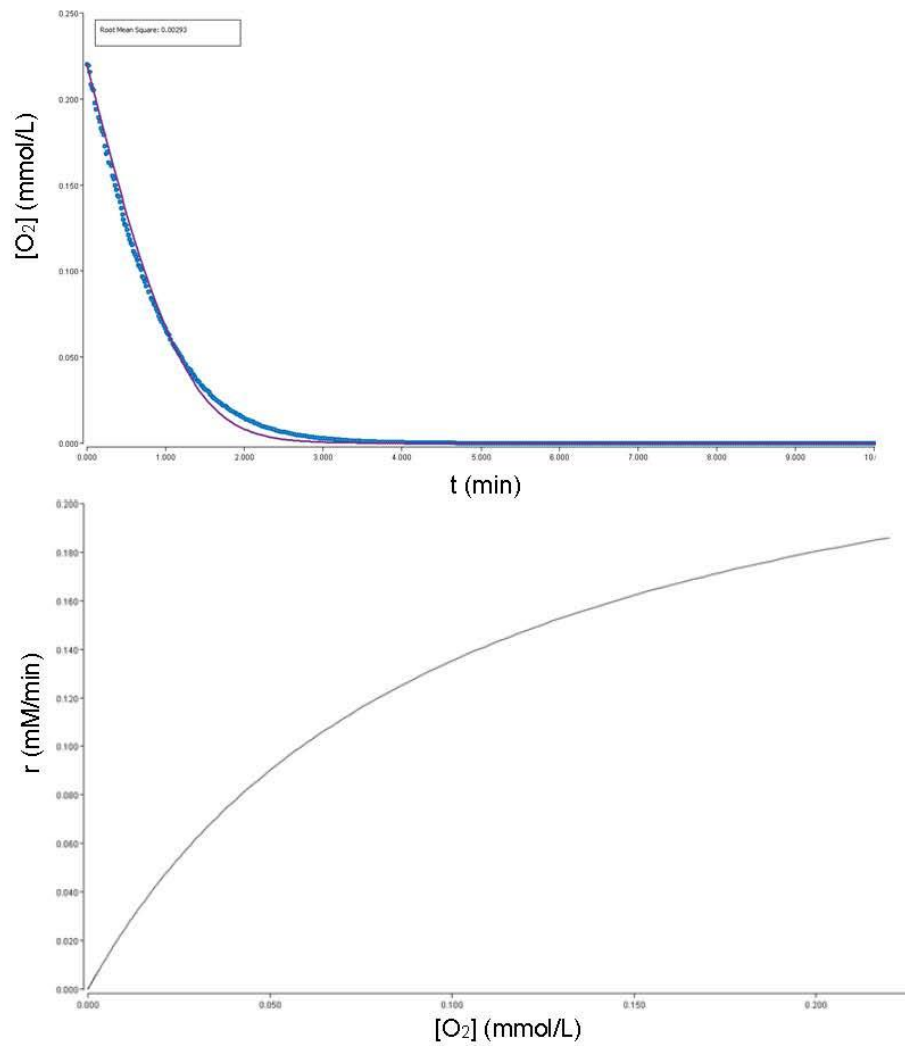


Figura 5: Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de los datos integrales (arriba) y diferenciales (abajo) del tercer experimento ($C_S = 5$ mM. $C_E = 0,04492$ g/L).

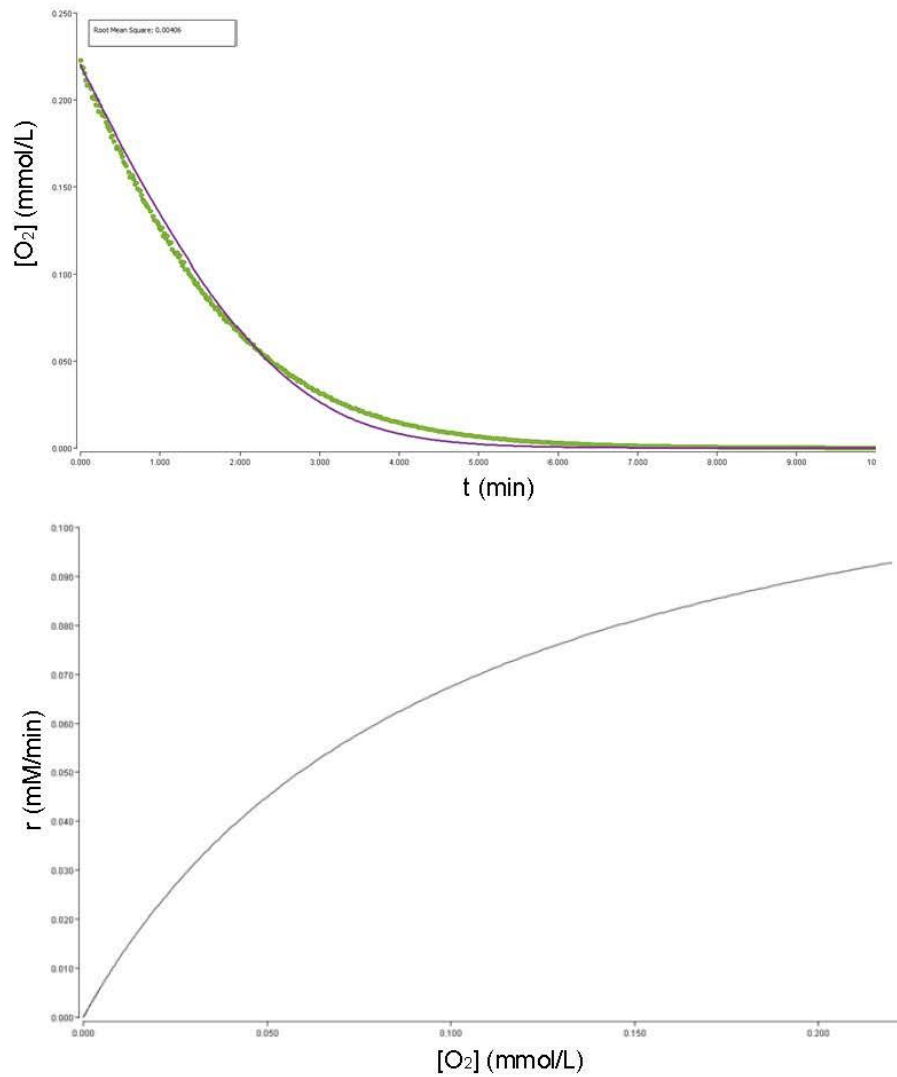


Figura 6: Ajuste al modelo de Michaelis-Menten de los datos integrales (arriba) y diferenciales (abajo) del cuarto experimento ($C_S = 5$ mM, $C_E = 0,02246$ g/L).

Tabla 1: Parámetros cinéticos de los distintos modelos cinéticos planteados.

		k (min⁻¹)	K_M (mM)	RMSE
Orden 0	C_S = 1 mM. C_E = 0,04492 g/L	3,00	0,1	0,0090
		k (mM⁻¹·min⁻¹)	K_M (mM)	RMSE
Orden 1	C_S = 1 mM. C_E = 0,04492 g/L	24,66	0,1	0,0023
		k (min⁻¹)	K_M (mM)	RMSE
Michaelis-Menten	C_S = 1 mM. C_E = 0,04492 g/L	5,46	0,1	0,0033
	C_S = 1 mM. C_E = 0,02246 g/L	5,47	0,1	0,0048
	C_S = 5 mM. C_E = 0,04492 g/L	6,02	0,1	0,0029
	C_S = 5 mM. C_E = 0,02246 g/L	6,01	0,1	0,0041

De nuevo, el valor más alto del RMSE para el modelo de orden 0 confirma que este no se ajusta a los datos experimentales. Igualmente, el modelo de orden 1 también se descarta por el valor tan elevado que se obtendría de la constante cinética (k). Así, se confirma que el modelo cinético de la reacción de oxidación de catecol catalizada por lacasa se corresponde con el modelo de Michaelis-Menten, en el cual el orden de reacción con respecto al oxígeno es un valor entre 0 y 1. De esta manera, la constante K_M de 0,1 mM refleja la afinidad de la enzima por el sustrato. A su vez, se observa que la constante cinética (k) varía con la concentración de sustrato. Puesto que el modelo cinético debería explicar todos y cada uno de los experimentos realizados y estos deberían tener las mismos parámetros constantes, se presupone que algo está variando.

Por consiguiente, se planteó un modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. Para ello, tras confirmar el modelo de Michaelis-Menten, se mantuvieron los valores los parámetros obtenidos anteriormente y se añadió el parámetro de la constante de inhibición (K_p).

Tabla 2: Parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten con inhibición.

	k (min⁻¹)	K_M (mM)	K_p (mM)	RMSE (datos integrales)	RMSE (datos diferenciales)
C_S = 1 mM. C_E = 0,04492 g/L	5,46	0,1	1,22	0,0071	0,0030
C_S = 1 mM. C_E = 0,02246 g/L	5,47	0,1	1,18	0,0043	0,0030
C_S = 5 mM. C_E = 0,04492 g/L	6,02	0,1	1,35	0,0026	0,0030
C_S = 5 mM. C_E = 0,02246 g/L	6,01	0,1	1,35	0,0036	0,0030

En general, parece que el modelo que mejor se ajustaría es el de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. No obstante, para aumentar la precisión del cálculo sería conveniente incluir más parámetros en el modelo cinético, como por ejemplo la concentración de catecol, que no se está teniendo en cuenta.

C) Estudio de actividad de enzima inmovilizada

Tras este último experimento, se obtuvo una velocidad inicial de consumo de oxígeno disuelto de $54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, lo que corresponde a una actividad de 0,054 U/mL. De esta manera, comparando con el valor de 0,11 U/mL de la enzima libre se corrobora que la inmovilización de la enzima implica pérdida de la actividad, aunque aumenta su estabilidad.

CONCLUSIONES

Con la determinación de la actividad enzimática se concluye que antes de inmovilizar una enzima hay que tener en cuenta cuál es la prioridad y buscar un equilibrio entre su actividad y su estabilidad. De esta manera, el empleo de enzimas inmovilizadas tiene como principal ventaja su reutilización industrial [5]. Así, en el ejemplo de la reacción de oxidación del catecol catalizada por lacasa, la inmovilización de la enzima en agarosa-PEI es una interacción electrostática y, por tanto, un proceso reversible en función del pH. En definitiva, con este estudio se obtuvo un descenso de la actividad de la lacasa de 0,056 U/mL. De manera que la inmovilización de la enzima reduce su actividad a la mitad.

Igualmente, resulta interesante señalar la importancia de haber realizado todas las medidas a la misma temperatura, ya que la solubilidad del oxígeno depende directamente de esta magnitud. Por ello, sin un control de la temperatura, los resultados de cada uno de los experimentos no se podrían comparar y no se obtendría ninguna conclusión.

Finalmente, el estudio cinético muestra que un modelo cinético de Michaelis-Menten es el que mejor se ajusta a los datos experimentales. No obstante, con la intención de refinar los resultados también se propuso la posibilidad de que este modelo de Michaelis-Menten presentase algún tipo de inhibición por producto, o más concretamente, de inhibición competitiva. Por lo tanto, se concluye que este es el modelo cinético de la oxidación de catecol catalizada por lacasa, ya que el valor de RMSE asociado al modelo de Michaelis-Menten con inhibición es menor que el del modelo sin considerar la inhibición para tres de los cuatro experimentos.

En conclusión, gracias a esta práctica se ha podido estudiar la cinética de la oxidación de catecol por enzimas lacasas, lo cual es útil para calcular la velocidad de la reacción, determinar los parámetros cinéticos y conocer la afinidad de la enzima por el oxígeno.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Laurent, N., Haddoub, R., & Flitsch, S. L. (2008). Enzyme catalysis on solid surfaces. *Trends in biotechnology*, 26, 328–337.

[2] Brugnari, T., Braga, D. M., dos Santos, C. S. A., Torres, B. H. C., Modkovski, T. A., Haminiuk, C. W. I., & Maciel, G. M. (2021). Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market-an overview. *Bioresources and Bioprocessing*, 8, 131.

[3] Lorente-Arevalo, A., Ladero, M. & Bolivar, J. M. (2021). Framework of the kinetic analysis of O₂-dependent oxidative biocatalysts for reaction intensification. *React. Chem. Eng.* 6, 2058–2074.

[4] OriginPro, Version 2020. *OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA.

[5] Caparco, A. A., Dautel, D. R., & Champion, J. A. (2022). Protein Mediated Enzyme Immobilization. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 18(19), e2106425.