



# Hidrólisis enzimática *in vitro* de tributirina por lipasa

Peng Yu. PhD

Jefe del servicio técnico Internacional, Centro de servicio técnico - E-mail: [pengyu@vtrbio.com](mailto:pengyu@vtrbio.com)

## Resumen

La tributirina es un éster en el que se esterifican tres moléculas de ácido butírico con una molécula de glicerol. En teoría, la lipasa puede digerir la **tributirina**, liberando ácido butírico y glicerol sin disociar. Sin embargo, nunca se había determinado la eficiencia enzimática ni la cantidad de ácido butírico. En este experimento se evaluó la capacidad de la lipasa exógena de realizar hidrólisis enzimática sobre la tributirina; esta evaluación se realizó por medio de los cambios en el valor de pH y del nivel de ácido butírico. Se utilizaron lipasa Sigma (Sigma, 10 unidades/ml) y preparado de VTR a base de lipasa (VTR, 10 unidades/ml) para hidrolizar VTNest (tributirina, 99 %, Guangdong VTR Bio-tech Co., Ltd.). Los resultados muestran que la lipasa VTR liberó ácido rápidamente, justo a los 15 minutos del inicio de la enzimólisis; fue significativa la reducción del pH al compararla con los grupos Control y Sigma. El grupo Sigma no mostró una reducción del pH hasta pasados 30 minutos de la hidrólisis. El ácido butírico liberado por la lipasa VTR pudo ser detectado con una simple tira reactiva de pH a partir del minuto 30 y a lo largo de todo el experimento, que duró 360 minutos. En el grupo Sigma no fue posible la detección de ácido butírico hasta el minuto 120 del experimento. La concentración de ácido butírico liberado por VTNest fue de 11,57  $\mu\text{mol/ml}$  con el uso de la lipasa Sigma durante 360 minutos y de 48,69  $\mu\text{mol/ml}$  con el uso de la lipasa VTR. Las tasas comparadas de liberación fueron de 0,639 % y 2,69 % para la lipasa Sigma y la VTR, respectivamente. La fórmula para predecir la liberación de ácido butírico de VTNest por el valor del pH es la siguiente:  $y = 410,28x^{-3,94}$  ( $R^2 = 0,8476$ ). Nuestros resultados sugieren que la tributirina puede hidrolizarse por lipasa y liberar ácido butírico; el nivel de ácido butírico liberado puede identificarse con una simple tira reactiva de pH y se puede predecir a partir del valor del pH.

## Introducción

VTNest es un producto nuevo desarrollado por Guangdong VTR Bio-Tech Co., Ltd. El ingrediente principal de VTNest es la tributirina, una molécula de glicerol esterificada con tres moléculas de ácido butírico. Los glicéridos de ácido butírico no juegan por sí mismos ningún papel beneficioso en la alimentación animal. Cuando el glicérido es digerido por la lipasa en el tracto gastrointestinal del animal, al ácido butírico liberado puede actuar como aditivo promotor de la salud. Sin embargo, la eficiencia enzimática y los niveles de ácido butírico no habían sido analizados hasta el momento. El presente estudio se realizó para evaluar la actividad lipolítica sobre el glicérido, y también para encontrar una manera de predecir fácilmente la liberación de ácido butírico.

## Materiales y Métodos

### Diseño

Se analizó *in vitro* el efecto de la hidrólisis enzimática de la lipasa sobre VTNest. Se añadió VTNest líquido (99 % de tributirina) a una solución tampón fosfato (PBS) con un pH de 7,2-7,4 y fue incubado sin lipasa (grupo Control), con lipasa Sigma (grupo Sigma) y con el preparado de lipasa VTR (VTR). Se determinaron los valores de pH y las concentraciones de ácido butírico a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos de la adición de la solución enzimática. Se calculó la tasa de liberación de ácido butírico y se diseñó la fórmula para predecir la liberación de ácido butírico de VTNest a partir del valor del pH.

### Materiales

VTNest, líquido que contiene un 99 % de tributirato de glicerol (tributirina).

### Grupos



Control: 10 ml tributirina + 44 ml PBS

Sigma: 10 ml tributirina + 40 ml PBS + 4 ml solución de lipasa Sigma (actividad enzimática = 10 unid/ml)

VTR: 10 ml tributirina + 40 ml PBS + 4 ml solución de lipasa VTR (actividad enzimática = 10 unid/ml)

### **Repeticiones**

3 repeticiones/tratamiento.

### **Mediciones**

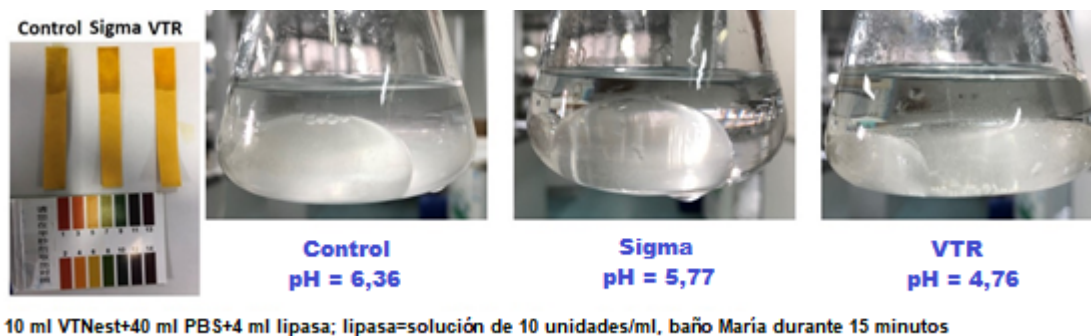
1. Medición del valor del pH a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos de la adición de la solución enzimática. Se detectaron los cambios de pH con tiras reactivas.

2. Medición del nivel de ácido butírico en la solución a los 0, 15, 30, 60, 90, 120, 240 y 360 minutos de la adición de la solución enzimática, por cromatografía de gases, de acuerdo con los métodos descritos por Peng et al. (2017).

### **Resultados**

El pH inicial del PBS era de 7,3. Tras la adición de 10 ml de VTNest, el pH descendió a 6,3-6,5. No hubo diferencias significativas entre los grupos de pH (Figura 6 y Tabla 1).

Tras 15 minutos de hidrólisis por lipasa, aparecieron muchas burbujas en la interfase VTNest-enzima del grupo VTR (Figura 1). Esto muestra que VTNest es rápidamente hidrolizado por la lipasa VTR. El valor de pH descendió significativamente de 6,26 a 4,88 en los 15 primeros minutos del grupo VTR. Este valor es significativamente más bajo ( $P < 0,05$ ) que los de los grupos control y Sigma (Figura 6). Una tira reactiva de pH de rango normal no puede detectar estas diferencias entre grupos.



**Figura 1. Control y VTNest hidrolizado con lipasa, y cambios en las tiras reactivas de pH a los 15 minutos**

Tras 30 minutos de hidrólisis, el pH de la solución del grupo Sigma (4,96) era significativamente más bajo ( $P < 0,05$ ) que el del grupo control (4,36 - Figura 6). El ácido liberado entre grupos puede separarse con tiras reactivas sensibles de pH (Figura 2, rango del papel reactivo de pH: 3,8-5,4).

El progreso del experimento y los cambios de pH entre 60 y 360 minutos se muestran en las figuras 3 a 5. De acuerdo con las fotografías tomadas durante el experimento, la apariencia de pequeñas gotas oleosas del tributirato de glicerol cambió con el aumento del tiempo de hidrólisis. Cuando se añadió lipasa VTR a la tributirina, las gotas se tornaron espuma formada de pequeñas burbujas. De acuerdo con la curva tiempo de reacción-valor del pH, la adición de lipasa a la tributirina hizo decrecer el pH de la solución (Figura 6,  $P < 0,05$ ) en comparación con el grupo control. El valor del pH en el grupo VTR fue



significativamente más bajo (Figura 6,  $P < 0,05$ ) que el del grupo Sigma a los 60, 90, 120, 240 y 360 minutos.

Los resultados sugieren que la lipasa hidroliza VTNest, liberando ácido butírico. Al mismo tiempo, nuestros resultados muestran que la capacidad de la lipasa VTR de hidrolizar VTNest era superior a la de la lipasa Sigma. La razón podría ser que la lipasa VTR está específicamente diseñada para permanecer activa en el tracto gastrointestinal animal como aditivo alimentario.

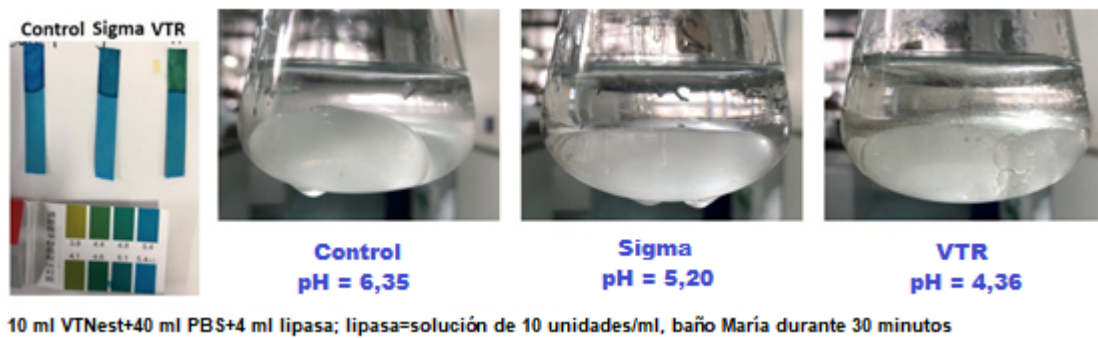


Figura 2. Control y VTNest hidrolizado con lipasa, y cambios en las tiras reactivas de pH a los 30 minutos



Figura 3. Control y VTNest hidrolizado con lipasa, y cambios en las tiras reactivas de pH a los 60 minutos

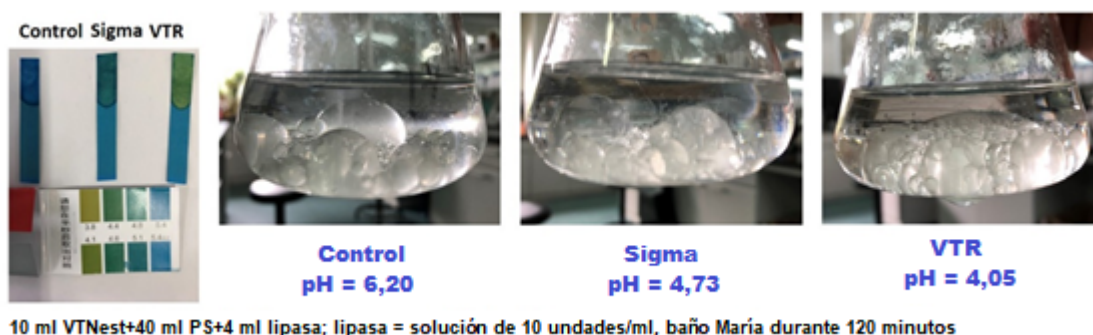
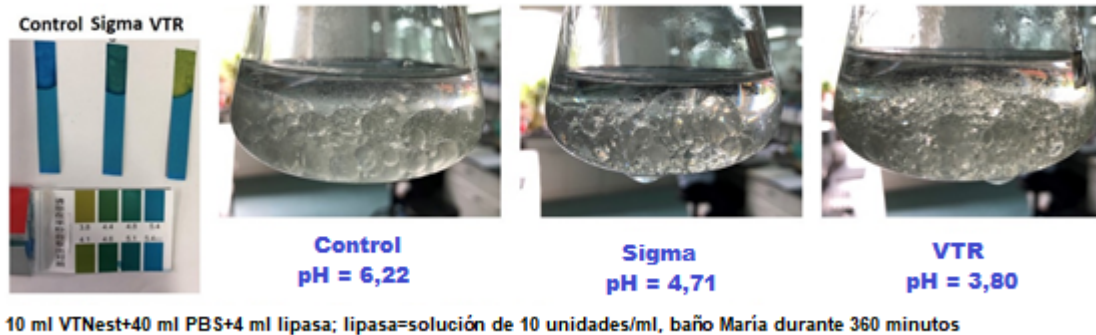
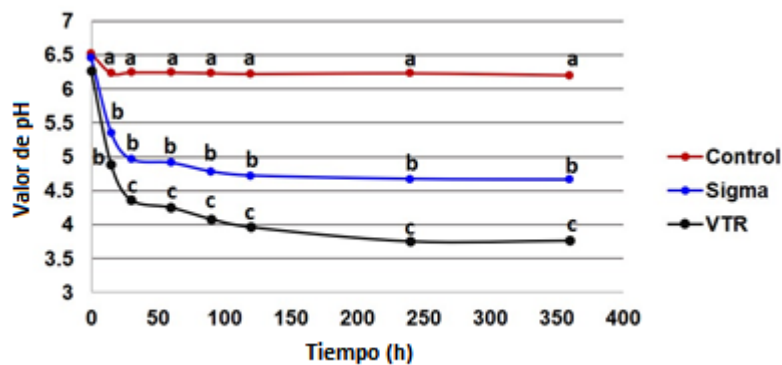


Figura 4. Control y VTNest hidrolizado con lipasa, y cambios en las tiras reactivas de pH a los 120 minutos



**Figura 5. Control y VTNest hidrolizado con lipasa, y cambios en las tiras reactivas de pH a los 360 minutos**



**Figura 6. Cambios dinámicos del pH de VTNest hidrolizado con lipasa**

Nota: los datos se mostraron como media  $\pm$  SEM, <sup>a, b</sup>Las medias que tienen en el mismo punto del tiempo diferentes exponentes son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Se analizó el sobrenadante con cromatografía de gases para determinar el tipo de ácido liberado y su concentración. El resultado de la concentración de ácido butírico se muestra en la Tabla 1. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles iniciales de ácido butírico de los tres grupos. Tras 15 minutos de hidrólisis, el nivel de ácido butírico en el grupo VTR era significativamente más alto que el del grupo Control; entre los 30 y los 360 minutos, el nivel de ácido butírico del grupo VTR fue significativamente más alto que el de los grupos Control y Sigma. Los resultados muestran que la lipasa VTR posee una capacidad de hidrólisis que cuadruplica la de la lipasa de Sigma.

**Tabla 1. Concentración de ácido butírico de VTNest hidrolizado con lipasa ( $\mu\text{mol/ml}$ )**

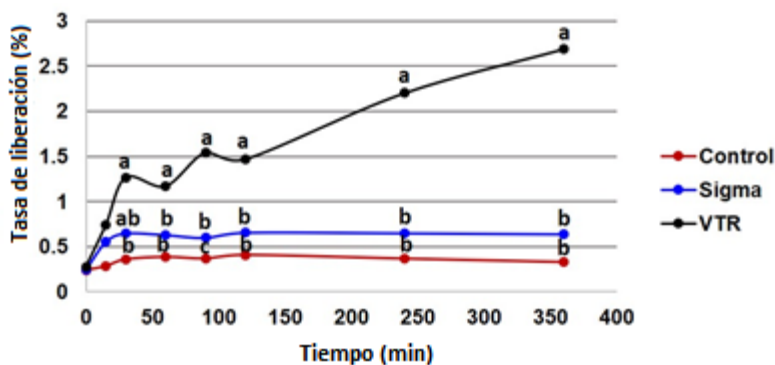
	Tiempo (min)							
	0	15	30	60	90	120	240	360
Control	4,36 $\pm$ 0,61	5,17 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	6,50 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	6,99 $\pm$ 1,55 <sup>b</sup>	7,13 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>	7,38 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	6,65 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	5,96 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>
Sigma	4,45 $\pm$ 0,33	9,99 $\pm$ 2,32 <sup>ab</sup>	11,72 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	11,40 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	10,82 $\pm$ 1,14 <sup>b</sup>	11,88 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	11,77 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	11,57 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>
VTR	5,05 $\pm$ 0,37	13,44 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>	22,96 $\pm$ 2,42 <sup>a</sup>	21,19 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	25,92 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	26,59 $\pm$ 2,65 <sup>a</sup>	39,86 $\pm$ 4,66 <sup>a</sup>	48,69 $\pm$ 4,79 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup>Las medias que se encuentra en la misma línea y tienen exponentes diferentes, son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

La curva de la tasa de liberación también muestra que la tasa de liberación en el grupo de la lipasa Sigma crece de forma abrupta entre los minutos 0 y 30, pero se nivela tras el minuto 60 y hasta el final del

**Figura 7. Cambios dinámicos en la tasa de liberación de ácido butírico de VTNest hidrolizado con lipasa**

Nota: los datos se muestran como media  $\pm$  SEM, <sup>a, b</sup>Medias que en el mismo punto del tiempo tienen diferentes exponentes, son diferentes ( $P < 0,05$ ).



experimento (Figura 7). Esto puede ser debido a que la lipasa Sigma es similar a la lipasa endógena y tiene una gran actividad enzimática en entornos neutros y alcalinos. Cuando el ácido butírico se acumula en la solución, el pH más bajo inhibe la actividad de la lipasa Sigma. Por otro lado, el grupo VTR obtuvo una tasa más alta de liberación que los grupos Control y Sigma, entre los minutos 60 y 360. Incluso cuando el pH medio alcanzó 3,76, la lipasa VTR

tenía actividad suficiente para hidrolizar VTNest.

Sin embargo, la eficacia de liberación del ácido butírico es aún baja debido a las limitaciones que presenta el hecho de realizar el experimento *in vitro*. La tasa de liberación de VTNest se determinará más adelante por medio de ensayos *in vivo*. La fórmula para predecir la liberación de ácido butírico de VTNest por lipasa es la siguiente:  $y=410,28x^{-3,94}$  ( $R^2=0,8476$ ), donde  $y$  es la tasa de liberación de ácido butírico (%) y  $x$  es el pH de la solución (Figura 8).

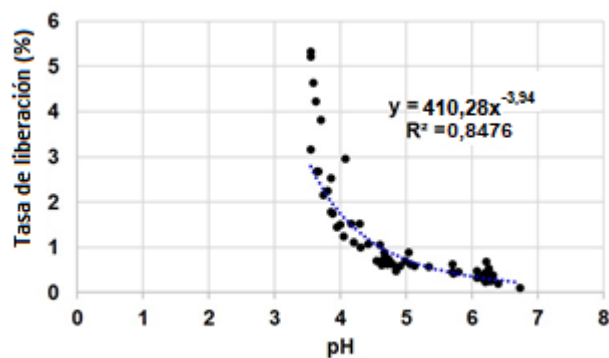


Figura 8. Fórmula para predecir la liberación del ácido butírico por VTNest hidrolizado por lipasa

## Resumen

Nuestros resultados sugieren que VTNest puede ser rápidamente hidrolizado por lipasa y el ácido butírico liberado puede ser identificado por medio de papel reactivo de pH después de 30 minutos. *In vitro*, la liberación de ácido butírico puede predecirse por medio de la fórmula:  $y=410,28x^{-3,94}$  ( $R^2=0,8476$ ), en la que  $y$  es la tasa de liberación de ácido butírico (%) y  $x$  es el pH de la solución.