



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

Estudio de la Producción de Lípidos Estructurados en
Reactores Enzimáticos Batch y de Lecho Empacado

Camila Andrea Palla

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN INGENIERÍA QUÍMICA

Estudio de la Producción de Lípidos Estructurados en
Reactores Enzimáticos Batch y de Lecho Empacado

Camila Andrea Palla

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2012

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ingeniería Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Ingeniería Química durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2007 y el 1 de marzo de 2012, bajo la dirección de la Dra. María Elena Carrín.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la
calificación de ().

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer desde lo más profundo de mi corazón y sinceramente:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme dado la posibilidad de realizar este Doctorado, al otorgarme una beca durante 5 años.

A la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) y a la Universidad Nacional del Sur por haberme brindado un hermoso lugar para trabajar, y por capacitarme.

A mi Directora María Elena por haberme ayudado siempre en todo lo que necesité y más, por estar siempre dispuesta a recibirme con su mejor sonrisa y sus ganas de trabajar, por el empeño que puso cada vez que nos encontramos frente a alguna adversidad y, sobre todo, por su cálido cuidado y amistad.

A mis compañeros del grupo de Alimentos, por su compañía y ayuda necesaria. A Pedro Forbito por toda la asistencia con los cromatógrafos, a Clarisa Cicchelli y a Liliana Ceci, por su disponibilidad.

Al grupo de Polímeros y Catálisis por permitirme utilizar sus equipos y brindarme su ayuda, gracias a Ruth Zacur, Cristina Frova, Graciela Goizueta, Daniel Ercoli, Gustavo Massimiliani y Matías Mendez.

A Ariel Targa y Alberto Sanger por su ayuda con el lecho empacado.

A profesionales de otros institutos, por su ayuda desinteresada: Graciela Más, Enrique Agulló, Gabriel Radivoy y Gustavo Monti.

A todos los que conforman PLAPIQUI por su amable sonrisa al cruzarnos por los pasillos y el interés de muchos.

A mis *amigos de la vida* por haberse interesado siempre y haberme dado palabras de aliento. A mi amiga Ivana por todos estos años de vivencias compartidas y por estar siempre a mi lado. A mi amiga Consuelo, un regalo que me dio PLAPIQUI, gracias por haberme ayudado siempre (hasta último momento) y por la hermosa compañía en todos estos años. A mis compañeras/os de oficina y de piso, por todos los lindos momentos compartidos, gracias Pipi por tu alegría, gracias Ticiania, Irene y Andrés.

A mis Padres, por haberme cuidado amorosamente y apoyado en todos estos años, y por haberme permitido ser quien soy. A mis hermanas, Liz y Mica por ser mi compañía siempre, por su preocupación y su enorme cariño. A mi prima Silvina, por todos los lindos años que vivimos juntas. Gracias Familia, aunque no los tenga tan cerca como quisiera, siempre estamos JUNTOS.

A mi esposo y amigo, Nicolás, por haberme acompañado constantemente, por su enorme ayuda, por sus palabras de aliento y por darme cada día su inmenso amor.

Finalmente, a mi Dios Jehová por darle propósito a mi vida, por guiarme cada día y por hacerme verdaderamente feliz.

RESUMEN

La industria alimentaria necesita disponer de tecnologías y procesos industriales acordes a las exigencias actuales en cuanto a calidad nutricional y cuidado del medio ambiente, y a su vez que le resulten económicamente convenientes. Las grasas sólidas y semisólidas se han producido a partir de aceites vegetales desde hace décadas utilizando distintas tecnologías, siendo uno de los objetivos actuales de su producción evitar introducir o generar compuestos perjudiciales para la salud del consumidor. La acidólisis enzimática, proceso que consiste en utilizar lipasas como biocatalizadores para incorporar ácidos grasos específicos en la estructura de los triglicéridos, se vislumbra como una alternativa válida para cumplir dicho objetivo.

En la presente tesis se estudia la producción de biocatalizadores sólidos y su accionar en la reacción de acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados libres, llevándola a cabo tanto en reactor batch como en uno de lecho empacado.

En el Capítulo 1 se hace una introducción general al tema de estudio junto con la revisión bibliográfica general. Los materiales utilizados y los métodos generales de análisis empleados se describen en el Capítulo 2. Los métodos específicos se describen en el lugar donde se plantea su utilización.

En el Capítulo 3 se analizan las características más relevantes para esta tesis del preparado comercial de lipasas de *Rhizomucor miehei*, así como la capacidad de las mismas para catalizar la reacción de interés en su estado libre.

Los Capítulos 4 y 5 se centran en la producción de los biocatalizadores sólidos. En el Capítulo 4 se analizan los métodos de inmovilización de las lipasas por adsorción. En el Capítulo 5 se describe la preparación y modificación de microesferas de quitosano a fin de ser empleadas como soportes, junto a la caracterización de las mismas mediante diversas técnicas.

Obtenido el biocatalizador que se consideró de mejor desempeño en la reacción de interés, en el Capítulo 6 se realizó el análisis de las condiciones de reacción propiamente dichas, seleccionando los niveles óptimos de las variables, y en el Capítulo 7 se indagó acerca del comportamiento cinético de este sistema en reactores batch.

La construcción y modos de funcionamiento del reactor de lecho empacado se describen en el Capítulo 8, donde también se desarrolla el modelado y simulación de este sistema, incluyendo la resistencia a la transferencia de materia.

Por último, en el Capítulo 9 se presentan las conclusiones generales a las cuales se abordó con el estudio desarrollado en la presente tesis.

ABSTRACT

The food industry requires new technologies and processes in line with the current requirements in terms of nutritional quality and environmental care, being at the same time economically profitable. For decades, different technologies have been used to produce solid and semisolid fats. One of the main goals of current processes is to avoid the introduction or generation of compounds which are harmful to human health. Enzymatic acidolysis, which consists in the incorporation of specific fatty acids in the glycerol backbone of triglycerides, appears as a valid alternative to fulfill this objective.

In the present thesis the production of solid biocatalysts and their performance in the acidolysis reaction between sunflower oil and free saturated fatty acids, in batch and packed bed reactor configuration, is studied.

In Chapter 1 a general introduction to the subject and the bibliographic revision are presented. The different materials employed, as well as the general analytical methods used throughout the development of this thesis, are described in Chapter 2. The specific methods are detailed in the corresponding sections where their applications are presented.

The most relevant characteristics of commercial preparations of *Rhizomucor miehei* lipases, as well as their capability to act in free form on the reaction in study, are analyzed in Chapter 3.

Chapters 4 and 5 are focused on the solid biocatalysts production. In Chapter 4 different lipase immobilization methods based on adsorption principle are analyzed. In Chapter 5 the preparation and modification of chitosan microspheres intended to be used as supports, together with their characterization, are described.

Once the most appropriate biocatalyst was obtained, the reaction conditions analysis, along with the selection of their optimum values, was developed in Chapter 6. In Chapter 7 the kinetic behaviour of batch reaction systems was studied.

The construction and operating mode of the packed bed reactor are described in Chapter 8. In addition, the modeling and simulation of the system, including mass transfer resistance considerations, are also developed.

Finally, the main conclusions that can be drawn from the studies developed in the present thesis are presented in Chapter 9.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Problemática: consumo mundial de lípidos y la salud	1
1.2. Alimentos funcionales: Lípidos estructurados	2
1.3. Ácidos grasos	2
1.3.1. Ácidos grasos de cadena corta	3
1.3.2. Ácidos grasos de cadena media	3
1.3.3. Ácidos grasos de cadena larga	4
1.4. Producción de lípidos estructurados.....	5
1.4.1. Síntesis química	5
1.4.2. Síntesis enzimática	5
1.5. Acidólisis enzimática.....	6
1.6. Objetivos.....	8
1.7. Referencias	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Introducción	12
2.2. Materiales.....	13
2.2.1. Aceite de girasol	13
2.2.1.1. Composición de ácidos grasos en glicéridos	13
2.2.1.2. Composición en triglicéridos y subproductos	13
2.2.1.3. Composición de los ácidos grasos en posición sn-2 de los triglicéridos	16
2.2.2. Mezcla de ácidos grasos saturados palmítico y esteárico	17
2.2.3. Trioleína.....	17
2.2.4. Quitosano	18
2.2.5. Reactivos y solventes	18
2.3. Métodos	19
2.3.1. Formación de las partículas de quitosano	19
2.3.2. Técnica para modificación química de las partículas: aminación reductiva.....	20
2.3.3. Técnica de inmovilización de lipasas de <i>Rhizomucor miehei</i>	21

2.3.4.	Determinación del contenido de proteína.....	22
2.3.4.1.	Método espectrofotométrico UV/Visible a 280 nm (UV/Vis 280)	22
2.3.4.1.1.	Método UV/Vis 280 (I)	23
2.3.4.1.2.	Método UV/Vis 280 (II)	23
2.3.4.1.3.	Método UV/Vis 280 (III)	23
2.3.4.2.	Método de Proti II.....	24
2.3.5.	Acidólisis de aceite de girasol y ácidos grasos palmítico y esteárico.....	24
2.3.6.	Técnica para deacidificación de muestras	25
2.3.7.	Determinación de la composición de ácidos grasos en glicéridos por CGL.....	26
2.3.7.1.	Derivatización de la muestra: metilación en frío	26
2.3.7.2.	Condiciones cromatográficas	27
2.3.8.	Determinación conjunta de FFA, MAG, DAG y TAG por CGL	27
2.3.8.1.	Derivatización de la muestra	28
2.3.8.2.	Condiciones cromatográficas	28
2.3.9.	Determinación de los ácidos grasos en posición sn-2 de los triglicéridos	29
2.3.10.	Análisis estadístico	34
2.4.	Referencias	34
3.	PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: LIPASAS DE R. MIEHEI LIBRES	35
3.1.	Introducción	35
3.2.	Características de las lipasas de Rhizomucor miehei	37
3.2.1.	Características del preparado comercial de lipasas	40
3.2.2.	Determinación del contenido de proteína del preparado comercial	42
3.2.2.1.	Método gravimétrico.....	43
3.2.2.2.	Método Proti 2.....	43
3.3.	Estudio de actividad: Hidrólisis	43
3.3.1.	Hidrólisis de trioleína.....	44
3.4.	Estudio de actividad: Acidólisis	45
3.4.1.	Acidólisis de trioleína	46
3.4.2.	Acidólisis de aceite de girasol.....	46
3.4.2.1.	Modelado de la cinética de reacción de las lipasas libres.....	47
3.5.	Resultados y Discusiones.....	48
3.5.1.	Contenido de proteína del preparado comercial.....	48

3.5.2. Hidrólisis de trioleína.....	49
3.5.3. Acidólisis de trioleína	51
3.5.4. Acidólisis de aceite de girasol.....	53
3.5.4.1. Efecto del tiempo y la temperatura de reacción.....	53
3.5.4.2. Perfil de ácidos grasos en los productos de reacción.....	57
3.5.4.3. Efecto de la cantidad de lipasa en el medio de reacción	58
3.5.4.4. Modelado de la cinética de reacción de las lipasas libres.....	59
3.6. Conclusiones.....	63
3.7. Referencias	64
4. PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: INMOVILIZACIÓN	69
4.1. Introducción	69
4.2. Métodos de inmovilización	71
4.2.1. Selección del método de inmovilización	72
4.2.1.1. Adsorción	75
4.3. Protocolo de inmovilización: búsqueda de las condiciones óptimas.....	78
4.3.1. Consideraciones generales.....	78
4.3.2. Primer protocolo de inmovilización ensayado.....	80
4.3.2.1. Primer protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la concentración de lipasa y la temperatura de inmovilización.....	81
4.3.3. Segundo protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la adición inicial de etanol/final de acetona	81
4.3.4. Métodos para la determinación de proteína en los biocatalizadores preparados.....	82
4.3.5. Desorción de las lipasas.....	85
4.4. Resultados y discusiones	86
4.4.1. Primer protocolo de inmovilización ensayado.....	86
4.4.1.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados	86
4.4.1.2. Actividad de los biocatalizadores preparados.....	90
4.4.1.3. Primer protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la concentración de lipasa y de la temperatura de inmovilización.....	91
4.4.1.3.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados.....	92
4.4.1.3.2. Actividad de los biocatalizadores preparados	92
4.4.2. Segundo protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la adición inicial de etanol/final de acetona	94
4.4.2.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados	94

4.4.2.2. Actividad de los biocatalizadores preparados.....	99
4.4.3. Importancia de la adecuada determinación del contenido de proteína en los medios de inmovilización/soportes	102
4.4.4. Desorción de las lipasas.....	103
4.5. Conclusiones.....	106
4.6. Referencias	108
5. PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: SOPORTE	112
5.1. Introducción	112
5.2. Quitosano	114
5.3. Caracterización del Quitosano	116
5.3.1. Peso molecular viscosimétrico medio.....	116
5.3.2. Viscosidad Brookfield	117
5.4. Preparación de microesferas de quitosano	117
5.4.1. Tamaño de partícula.....	117
5.4.2. Porosidad de las partículas.....	117
5.4.3. Resistencia mecánica de las partículas	118
5.5. Modificación química de microesferas de quitosano: aminación reductiva	119
5.6. Estudio preliminar: ensayo con microesferas de quitosano, quitosano modificadas y Octadecyl-Sepabeads	125
5.7. Estudio: microesferas de quitosano con diferente grado de hidrofobicidad	128
5.7.1. Caracterización de las microesferas de quitosano/quitosano modificadas	129
5.7.1.1. Análisis de tamaño de partícula	129
5.7.1.2. Determinación de área BET y tamaño de poro	130
5.7.1.3. Análisis del ángulo de contacto aire-agua.....	130
5.7.1.4. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	131
5.7.1.5. Difracción de rayos-X (XRD).....	131
5.7.1.6. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	132
5.7.1.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	132
5.7.1.8. Test de solubilidad	132
5.7.1.9. Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de sólidos	133
5.7. 2. Inmovilización de lipasas y contenido de proteína	134
5.7. 3. Estabilidad en el reuso	134
5.8. Resultados y discusiones	135

5.8. 1. Caracterización del quitosano	135
5.8.1.1. Peso molecular viscosimétrico medio	135
5.8.1.2. Viscosidad de Brookfield	135
5.8. 2. Caracterización de las microesferas de quitosano.....	136
5.8.2.1. Análisis de tamaño de partícula	136
5.8.2.2. Determinación de área BET y tamaño de poro	138
5.8.2.3. Análisis del ángulo de contacto aire-agua.....	138
5.8.2.4. Calorimetría de barrido diferencial	139
5.8.2.5. Difracción de rayos-X.....	142
5.8.2.6. Microscopia Electrónica de Barrido.....	143
5.8.2.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	146
5.8.2.8. Test de Solubilidad.....	148
5.8.2.9. NRM de sólidos para cuantificación del grado de sustitución	149
5.8.2.10. Contenido de proteína de los biocatalizadores preparados.....	152
5.8.2.11. Ensayos de actividad enzimática.....	154
5.8.2.12. Estabilidad en el reuso	157
5.9. Conclusiones.....	159
5.10. Referencias.....	160
6. ACIDÓLISIS: SELECCIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS	167
6.1. Introducción	167
6.2. Métodos empleados.....	169
6.2.1. Diseño experimental	169
6.2.2. Preparación del Biocatalizador.....	173
6.2.3. Reacciones de Acidólisis	173
6.2.4. Análisis de productos de reacción.....	174
6.2.4.1. Determinación de ácidos grasos en glicéridos	174
6.2.4.2. Determinación del perfil de triglicéridos (TAG).....	174
6.2.4.3. Cuantificación de subproductos (BP)	174
6.2.5. Optimización Multirespuesta y verificación de los modelos de ajuste.....	175
6.3. Resultados y discusiones	176
6.3.1. Diseño experimental: Análisis de los productos de acidólisis	176
6.3.1.1. Composición de ácidos grasos en glicéridos	176
6.3.1.2. Perfil de triacilgliceroles (TAG)	176

6.3.1.3. Análisis de subproductos.....	177
6.3.2. Modelos de ajuste.....	181
6.3.2.1. Composición de ácidos saturados palmítico y esteárico.....	181
6.3.2.2. Triglicéridos monoinsaturados como TAG deseados.....	184
6.3.2.3. Subproductos: mono y diglicéridos.....	186
6.3.2.4. Triglicéridos trisaturados: indicador de la acil migración.....	189
6.3.3. Optimización Multirespuesta y verificación de los modelos.....	191
6.4. Conclusiones.....	193
6.5. Referencias.....	195
7. CINÉTICA DE LIPASAS INMOVILIZADAS.....	197
7.1. Introducción.....	197
7.2. Trabajo experimental.....	198
7.3. Modelado matemático de la cinética de acidólisis.....	199
7.3.1. Antecedentes y consideraciones generales.....	199
7.3.2. Mecanismo Ping-Pong Bi Bi.....	201
7.3.3. Modelos cinéticos.....	203
7.3.3.1. Modelo cinético I.....	203
7.3.3.2. Modelo cinético I modificado.....	204
7.3.3.3. Modelo cinético II.....	204
7.3.3.4. Modelo cinético III.....	206
7.4. Resultados y discusiones.....	208
7.4.1. Composición de los productos de reacción de acidólisis: efecto del tiempo y la temperatura de reacción.....	208
7.4.1.1. Composición en ácidos palmítico y esteárico.....	208
7.4.1.2. Contenido de subproductos.....	209
7.4.1.3. Distribución de triglicéridos.....	211
7.4.2. Modelado matemático de la cinética de reacción.....	219
7.4.2.1. Modelo cinético I.....	219
7.4.2.2. Modelo cinético II.....	221
7.4.2.3. Modelo cinético III.....	222
7.5. Conclusiones.....	224
7.6. Nomenclatura.....	225
7.7. Referencias.....	226

8. ACIDÓLISIS EN LECHO EMPACADO	230
8.1. Introducción	230
8.2. Consideraciones generales y antecedentes	231
8.3. Diseño y construcción del reactor de lecho empacado	234
8.3.1. Componentes del reactor de lecho empacado	236
8.4. Operación del reactor de lecho empacado	243
8.4.1. PBR en recirculación	243
8.4.2. PBR en continuo	244
8.4.3. Determinación de la fracción vacía (ϵ)	244
8.5. Modelado y simulación del sistema reacción-reactor	245
8.5.1. Balance de materia	246
8.5.2. Velocidad de reacción	246
8.5.2.1. Modelo Cinético II expresado en S	247
8.5.2.2. Modelo Cinético III simplificado	249
8.5.3. Resistencia a la transferencia de materia	250
8.6. Resultados y discusiones	251
8.6.1. PBR en recirculación	251
8.6.2. PBR en continuo	252
8.6.3. Modelado y simulación del sistema reacción-reactor	258
8.7. Conclusiones	264
8.8. Nomenclatura	265
8.9. Referencias	266
9. CONCLUSIONES	269

INTRODUCCIÓN GENERAL

1

1.1. Problemática: consumo mundial de lípidos y la salud

Una gran cantidad de grasas y aceites son usados para nutrición humana directamente o después de una apropiada modificación empleando tecnologías convencionales de gran escala, como la hidrogenación. Los productos obtenidos no siempre son los ideales, por lo que un consumo desbalanceado de grasas y un consumo excesivo de lípidos "malos" como los saturados y los *trans* pueden provocar entre otras, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Gunstone, 2003). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que en 2004 alrededor de 17,1 millones de personas murieron a causa de enfermedades cardiovasculares, siendo la principal causa las dietas malsanas (OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>). Estas enfermedades pueden ser reducidas o evitadas cambiando la fuente, cantidad y estructura de las grasas y aceites de la dieta.

1.2. Alimentos funcionales: Lípidos estructurados

A nivel tecnológico, esto puede lograrse usando lípidos estructurados que cumplan los requerimientos para una nutrición favorable. Los lípidos estructurados (SL) son triglicéridos (TAG) en los que los ácidos grasos (FA) se reacomodan en el esqueleto del glicerol, generando así productos con propiedades fisicoquímicas y/o nutricionales mejoradas. *Es una molécula "hecha a medida", formulada para una función nutricional o tecnológica específica.* Algunas aplicaciones de reciente interés son: producción de margarinas o shortenings con bajo contenido de ácidos grasos *trans*, manejo de la funcionalidad en shortenings, incorporación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), producción de sustitutos de manteca de cacao y lípidos con bajas calorías (Osborn y Akoh, 2002; Li et al., 2010).

Las tecnologías empleadas para obtener lípidos estructurados con el fin de mejorar la calidad nutricional de las grasas utilizan el conocimiento que se tiene actualmente sobre la bioquímica y la fisiología de los lípidos en el cuerpo humano, particularmente sobre la digestión y la absorción de los ácidos grasos. Si bien algunas aún no son tecnologías absolutamente consolidadas, son los procesos referidos a materias grasas que muestran mejores perspectivas en el futuro desde el punto de vista tecnológico, nutricional y posiblemente comercial (Valenzuela y Sanhueza, 2008).

1.3. Ácidos grasos

Una amplia variedad de ácidos grasos son usados para producir lípidos estructurados en base a sus propiedades y funcionalidad. Los tipos de ácidos grasos que componen las moléculas de triglicéridos y su posición en la misma determinan las propiedades físicas y nutricionales, el destino metabólico y los beneficios para la salud de una grasa modificada (Osborn y Akoh, 2002). En consecuencia, a continuación se realiza una breve descripción de los mismos.

Cabe mencionar que los ácidos grasos pueden ser *insaturados o saturados*, dependiendo de la existencia o no de dobles enlaces en las cadenas carbonadas. Los ácidos

grasos insaturados pueden encontrarse en configuración *cis* o *trans*, según la ubicación de los hidrógenos de los carbonos adyacentes al doble enlace. En el primer caso, éstos se encuentran del mismo lado de la cadena carbonada, mientras que en los ácidos grasos *trans* están ubicados a cada lado de la misma. En los aceites y grasas naturales de origen vegetal los ácidos grasos insaturados se encuentran siempre en configuración *cis*.

1.3.1. Ácidos grasos de cadena corta

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) son aquellos que poseen de 2 a 6 átomos de carbono en su cadena y son generalmente conocidos como volátiles. La fuente tradicional de los mismos es la manteca y la leche bovina. Debido a su solubilidad en agua, tamaño molecular y longitud de cadena, son absorbidos en el estómago más rápidamente que los demás ácidos grasos. Adicionalmente, los triglicéridos conteniendo estos ácidos grasos pueden ser completamente hidrolizados por la acción de la lipasa pancreática, y ser absorbidos en el lumen del estómago y en el intestino. Su bajo calor de combustión los convierte en lípidos de bajas calorías.

1.3.2. Ácidos grasos de cadena media

Los ácidos grasos de cadena media (MCFAs) son aquellos que poseen de 6 a 12 átomos de carbono en su cadena y la fuente principal de los mismos es el aceite de coco y el de la semilla de palma. Estos son preferentemente transportados a través de la vena porta al hígado, debido a su menor tamaño y mejor solubilidad en comparación a los ácidos grasos de cadena larga. Los MCFAs son metabolizados en el organismo tan rápidamente como la glucosa, siendo baja la tendencia a formar depósitos debido a que no son fácilmente reesterificados para formar triglicéridos. Aunque estos pueden ser usados en el control de la obesidad, también pueden aumentar el nivel de colesterol en sangre. De ahí que estos sean usados en lípidos estructurados; por su inherente movilidad, solubilidad y facilidad para metabolizarse. Generalmente se combinan con ácidos grasos poliinsaturados, beneficiosos para la salud, formando los conocidos MLM.

1.3.3. Ácidos grasos de cadena larga

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFAs) son aquellos que poseen de 14 a 24 átomos de carbono en su cadena, siendo común hallarlos en algunas grasas animales y en aceites de pescado y vegetales. Éstos son absorbidos y metabolizados más lentamente que los restantes ácidos grasos, pudiendo gran parte de ellos ser eliminados del organismo por este motivo. Los LCFAs no pueden ser absorbidos ni transportados por la sangre debido a su mayor carácter hidrofóbico en comparación con los MCFAs y SCFAs, por lo que ingresan a las células intestinales en forma de micelas.

Existe una variedad de ácidos grasos de cadena larga, generalmente con numerosas insaturaciones en su cadena carbonada, de importancia para la salud humana. Los ácidos grasos Omega-6 no pueden ser sintetizados por el organismo y por ende son considerados ácidos grasos esenciales (EFAs). El ácido linoleico (18:2n-6) se encuentra en la mayoría de los aceites vegetales y semillas, y es un ácido graso esencial que puede además ser desaturado y aumentado en su cadena aún más para dar lugar al ácido araquidónico (20:4n-6). Este último es un precursor de la formación de eicosanoides, compuestos que actúan beneficiosamente sobre el sistema nervioso central y el inmune. Otro tipo de EFA son los Omega-3, tal como el ácido linolénico (18:3 n-3), que puede ser encontrado en la soja y en las semillas de lino. Así también, el ácido eicosapentanoico (20:5n-3, EPA) y el ácido docosahexanoico (22:6n-3, DHA), que se encuentran en el aceite de pescado, son poliinsaturados de interés en la producción de lípidos estructurados. Los ácidos grasos n-3 son esenciales para el crecimiento y el desarrollo durante toda la vida humana y deben ser incluidos en la dieta. Dietas ricas en n-3 PUFAs incrementan las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyen las de baja densidad (LDL). Por otra parte, los ácidos grasos Omega-9 encontrados en muchos aceites vegetales, tal como el ácido oleico (18:1n-9), si bien no son ácidos grasos esenciales cumplen un rol moderado en reducir el colesterol en el cuerpo. El ácido linoleico conjugado (CLA), el cual ha demostrado propiedades anticancerígenas en animales, también puede ser empleado en el diseño de lípidos estructurados.

Generalmente se cree que los ácidos grasos de cadena larga incrementan los niveles de colesterol. Sin embargo, el ácido esteárico (18:0) es neutro debido a que su punto de fusión es mayor que la temperatura del cuerpo humano, siendo desaturado hacia ácido oleico *in vivo*. Adicionalmente, los triglicéridos con altas cantidades de ácidos grasos saturados de cadena corta son débilmente absorbidos en humanos.

Controlar la posición del ácido graso en el triglicérido también resulta importante en la producción de lípidos estructurados, ya que permite definir el destino que tendrán los mismos en el organismo.

1.4. Producción de lípidos estructurados

Las estrategias para modificación de lípidos que dan lugar a grasas y aceites funcionales incluyen la síntesis química o enzimática. Esta última se lleva a cabo mediante lipasas, las cuales catalizan reacciones de interesterificación (intercambio de ácidos grasos entre dos moléculas de triglicéridos) o acidólisis (incorporación de ácidos grasos libres a un triglicérido).

1.4.1. Síntesis química

La interesterificación química es económica y fácil de escalar. Sin embargo, ofrece baja especificidad o control sobre la distribución de la posición de los ácidos grasos en el producto final (Willis y Marangoni, 1999). Este proceso usualmente implica la hidrólisis de una mezcla de triglicéridos y su reesterificación aleatoria. La reacción requiere de altas temperaturas y ausencia de agua. Además de los lípidos estructurados se obtiene un número de subproductos difíciles de remover (Akoh, 1998).

1.4.2. Síntesis enzimática

Las reacciones catalizadas por lipasas ofrecen algunas ventajas sobre las asistidas químicamente ya que producen aceites o grasas con una estructura definida, requieren condiciones experimentales menos severas, consumen menos energía y reducen el daño

térmico, entre otras (Gunstone, 2003). Si bien la función natural de las lipasas es la de llevar a cabo la hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos libres, la síntesis de lípidos estructurados mediante ellas es posible modificando las condiciones de reacción. En presencia de solventes orgánicos o en sistemas anhidros, las lipasas pueden presentar un comportamiento diferente, catalizando además reacciones de esterificación (Berry y Paterson, 1990).

La acción de las lipasas, en términos de eficiencia y estabilidad, se puede mejorar con técnicas de inmovilización. Para esto, la enzima se fija a un soporte (cerámica, vidrio poroso, material sintético, celulosa, entre otros) que le otorga una mayor estabilidad a la proteína frente a las condiciones de operación (velocidad de reacción, temperatura, acidez, fuerza iónica, entre otras) (Valenzuela y Sanhueza, 2008). Los procesos de inmovilización han impulsado el creciente uso de enzimas en la tecnología de las materias grasas. Las lipasas que se utilizan para la obtención de lípidos estructurados se obtienen, en general, de bacterias u hongos especialmente seleccionados (por selección genética o por modificación genética) para obtener altos rendimientos de actividad catalítica; y, en muchos casos, alta resistencia a la temperatura y a los solventes que se utilizan en los procesos.

1.5. Acidólisis enzimática

La acidólisis enzimática ha sido una estrategia ampliamente estudiada en las últimas décadas a fin de obtener lípidos estructurados (Shimada et al., 1996; Lee y Akoh, 1996; Garcia et al. 2001, Kim et al., 2006; Hita et al., 2009). Esta reacción esta compuesta por dos pasos, el primero incluye la hidrólisis de la unión éster a fin de liberar un ácido graso nativo y formar un glicérido que tiene al menos un grupo hidroxilo (si es que sólo tuvo lugar una única ruptura). El paso siguiente comprende la formación de una nueva unión éster entre el grupo hidroxilo del glicérido y un nuevo ácido graso libre del medio (Rodrigues-Fernandez Lafuente, 2010). La Fig. 1.1. muestra estos pasos de reacción para la reacción catalizada por lipasas *sn*-1,3 regioespecíficas, es decir aquellas que tienen la habilidad para actuar sobre las posiciones 1 y 3 del triglicérido. Entre ellas se encuentran las lipasas de *Rhizomucor miehei* (RML), incluidas en el esquema.

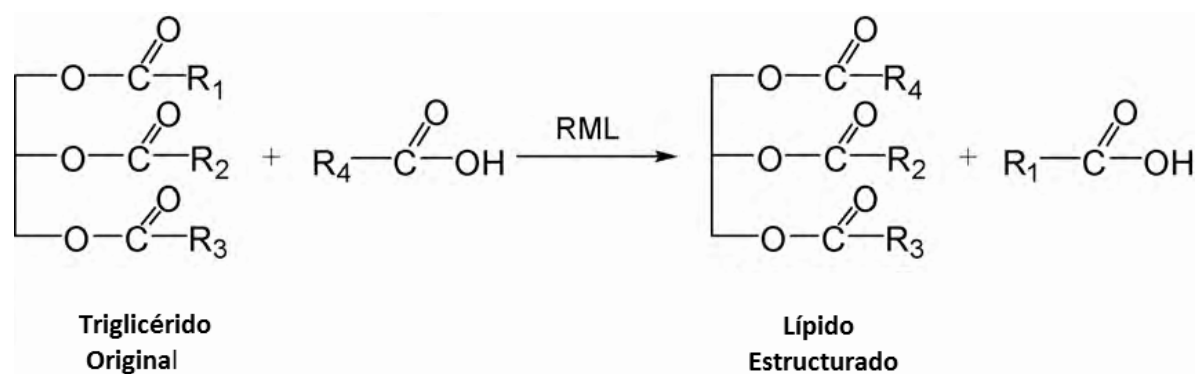


Figura 1.1. Esquema general de la acidólisis catalizada por lipasas de *Rhizomucor miehei* para producir lípidos estructurados.

Más específicamente, la acidólisis, mediante la incorporación de ácidos grasos saturados en los triglicéridos originales, puede ser empleada como un método alternativo a la hidrogenación parcial de aceites permitiendo así obtener grasas sólidas o semisólidas sin la indeseada formación de ácidos grasos *trans* (Carrín y Crapiste, 2008; Pacheco et al., 2010). Más aún, mediante el empleo de lipasas *sn*-1,3 específicas es posible incorporar ácidos grasos saturados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del triglicérido, manteniendo en la posición central del glicerol el ácido graso original. La aplicación de este tipo de lipasas en la acidólisis de aceites vegetales y ácidos grasos saturados ha tenido como objetivo obtener grasas semisólidas con propiedades benéficas para la salud humana ya que preservan los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados (tales como los esenciales) ubicados en la posición *sn*-2 (Jensen et al., 1995; Osborn y Akoh, 2002; Li et al., 2010).

Adicionalmente, ciertas reacciones indeseables pueden tener lugar debido a la presencia de diglicéridos producidos en el paso de hidrólisis. La transferencia de grupos acilo de cadena larga desde la posición *sn*-2 a las posiciones externas en los diglicéridos se denomina *acil migración* y provoca la disminución en el rendimiento y en la pureza de los lípidos estructurados (Xu et al., 1998; Yang et al., 2005).

1.6. Objetivos

Al momento de iniciar esta tesis, la obtención de lípidos estructurados mediante acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) catalizada por lipasas comerciales de *Rhizomucor miehei* en su forma inmovilizada (Lipozyme RM IM, NovoNordisk) había sido estudiada en el grupo de investigación de Ingeniería de Alimentos de PLAPIQUI alcanzando resultados satisfactorios (Carrín y Crapiste, 2008).

Sin embargo, para que este proceso pudiera ser llevado a escala industrial mediante operaciones continuas o semicontinuas, resultaba necesario el desarrollo de un biocatalizador más adecuado. Esto se debe a que el elevado costo y la fácil atrición de las lipasas inmovilizadas disponibles comercialmente restringen su utilización en procesos de gran escala. Es por ello que en este marco se planteó como objetivo de esta tesis la producción de lípidos estructurados empleando un catalizador biológico de alta actividad, de menor costo y de difícil atrición, para ser empleado en reactores batch y de lecho empacado.

Los objetivos específicos planteados para esta tesis fueron:

1. Preparar un biocatalizador adecuado para llevar a cabo la reacción de acidólisis enzimática entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados, a fin de obtener lípidos estructurados conteniendo una mayor cantidad de ácidos grasos saturados en los glicéridos.

Las tareas asociadas a alcanzar este objetivo son:

- Seleccionar una lipasa de alta actividad en la reacción de interés.
- Preparar un soporte adecuado para inmovilizar la lipasa elegida y un proceso de inmovilización que no altere las propiedades catalíticas de la misma.

2. Evaluar el desempeño del biocatalizador preparado en la reacción de acidólisis y optimizar las condiciones de reacción a fin de lograr las más altas modificaciones sobre el aceite de girasol, considerando el efecto de la temperatura de reacción, relación entre sustratos, cantidad de biocatalizador y presencia de solvente en el medio.

3. Diseñar y poner en funcionamiento un reactor de lecho empacado a escala laboratorio a fin de comparar su desempeño respecto a los reactores discontinuos.

4. Modelar y simular el proceso de reacción/reactor, teniendo en cuenta las distintas variables operativas, los fenómenos de transporte involucrados y la eficiencia del proceso, para obtener los parámetros cinéticos característicos del sistema.

1.7. Referencias

Akoh C.C., *Structured lipids, Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology.* Akoh C.C. y Min D.B., Marcel Dekker, New York (1998).

Berry D. R., Paterson A., *Enzymes in the Food Industry en Enzyme Chemistry - Impact and Applications*, 2nd Ed., Chapman and Hall, London (1990).

Bornscheuer U.T., Adamczak M., Soumanou M., *Lipase-catalysed synthesis of modified lipids, Lipids for functional foods and nutraceuticals*, Gunstone, F.D., The Oily Press, Estados Unidos (2003).

Carrín M.E., Crapiste G.H., *Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture*, *Journal of Food Engineering* 84 (2008) 243–249.

García H.S., Arcos J.A., Keough K.J., Charles G., Hill Jr. C.H., *Immobilized lipase-mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and packed bed reactor studies*, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) 623–632.

Hita E., Robles A., Camacho B., Gonzalez P.A., Esteban L., Jimenez M.J., Munio M.M., Molina E., *Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor*, *Biochemical Engineering Journal* 46 (2009) 257–264.

Jensen M.M., Christensen M.S., Høy C.-E. *Intestinal absorption of octanoic, decanoic, and linoleic acids: effect of triglyceride structure*, *Annals of Nutrition and Metabolism* 38 (1995) 104-116.

Kim I-H., Hill C.G. Jr, Lipase-Catalyzed Acidolysis of Menhaden Oil with Pinolenic Acid, *Journal of the American Oil Chemistry Society* 83 (2006) 109-115.

Lee K.-T., Akoh C.C., Immobilization of lipases on clay, celite 545, diethylaminoethyl-, and carboxymethyl-sephadex and their interesterification activity, *Biotechnology Techniques* 12 (1998) 381–384.

Li D., Adhikari P., Shin J.A., Lee J.H., Kim Y.J., Zhu X.M., Hu J.N., Jin J., Akoh C.C., Lee K.T., Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats, *LWT- Food Science and Technology* 43 (2010) 458–464.

OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html> (último acceso 12 de marzo, 2012)

Osborn H.T., Akoh C.C., Structured lipids—novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1 (2002) 93–103.

Pacheco C., Crapiste G.H, Carrin M.E., Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: kinetic behavior, *Journal of Food Engineering* 98 (2010) 492–497.

Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010) 1–22.

Shimada Y., Suenaga M., Sugihara A., Nakai S., Tominaga Y., Continuous production of structured lipid containing γ -linolenic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of the American Oil Chemists Society* 76 (1999) 189-193.

Valenzuela A., Sanhueza J., Estructuración de Lípidos y Sustitutos de Grasas, ¿Lípidos Del Futuro?, *Revista Chilena de Nutrición* 35 (2008) 394-405.

Willis W.M., Marangoni G.A., Assessment of lipase- and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids, *Journal of the American Oil Chemist's Society* 76 (4) (1999) 443–450.

Xu X., Skands A., Høy C., Mu H., Balchen S., Adler-Nissen J., Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design, *Journal of the American Oil Chemist's Society* 75 (1998) 1179–1186.

Yang T., Fruekilde M.B., Xu X., Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming, *Food Chemistry* 92 (2005) 101–107

MATERIALES Y MÉTODOS

2

2.1. Introducción

La factibilidad de reproducir una dada metodología experimental, se basa en el hecho de contar con buenos registros de las tareas desarrolladas. Por esa razón, este capítulo describe en detalle las principales técnicas empleadas en las labores experimentales durante el transcurso de la tesis. Así también se incorpora una descripción de los materiales necesarios para poder llevarlas a cabo.

Cabe mencionar que el mismo fue pensado como un apoyo para la interpretación de las diferentes técnicas que se mencionan a lo largo de esta tesis, por ello aquí se encontrara una variedad de métodos que podrían no estar relacionados. Por otro lado, también se aclara que las técnicas empleadas específicamente en un dado capítulo fueron descriptas directamente en dicho capítulo y no son mencionadas aquí.

2.2. Materiales

2.2.1. *Aceite de girasol*

El aceite de girasol refinado empleado en las reacciones de acidólisis fue adquirido en un mercado local y fue usado tal como se recibió. El mismo fue producido para consumo humano por la empresa Molinos Río de la Plata S.A. (Buenos Aires, Argentina). El Índice de Peróxidos (IP) determinado por el método IUPAC 2.0501 y AOCS CD 8-53, fue de 1.94 ± 0.02 mEq. O₂/kg muestra, para el aceite que se empleó durante todas las reacciones efectuadas, salvo cuando se realizó la acidólisis con lipasas en su estado libre, en el que otro lote de aceite fue usado conteniendo un IP de 103.32 ± 0.03 mEq. O₂/kg.

2.2.1.1. *Composición de ácidos grasos en glicéridos*

La composición de los ácidos grasos, determinados como metil ésteres de ácidos grasos (FAME) por cromatografía gas-líquido (técnica descrita en Sección 2.3.7), son los mostrados en la Tabla 2.1. Como se esperaba, el aceite de girasol resultó predominante en ácidos grasos insaturados. Los compuestos presentes y los valores asociados resultaron similares a los reportados por Reske et al. (1997) y Serrano-Vega et al. (2005) teniendo en cuenta la variabilidad asociada a un producto de origen vegetal.

2.2.1.2. *Composición de triglicéridos y subproductos*

La Tabla 2.2 muestra las especies de triglicéridos presentes en el aceite de girasol (técnica descrita en Sección 2.3.8). Cabe mencionar que en la técnica empleada para realizar esta identificación no se discriminaron isómeros de posición para una dada especie de triglicérido, por lo cual y a modo de ejemplo, POSt, PStO, OPSt, OStP, StOP y StPO se encuentran todos englobados en la misma especie identificada, y en este caso denominada POSt. La identificación realizada y los valores de cada una de ellas resultaron similares a lo reportado en trabajos previos (Reske et al., 1997; Serrano-Vega et al., 2005). Puede observarse que el aceite de girasol posee un elevado nivel de triglicéridos triinsaturados (UUU) e intermedio de diinsaturados (UUS), mientras que la composición de triglicéridos trisaturados (SSS) es muy baja (0.11%). Las especies mayoritarias que conformaron el grupo

UUU fueron OLL, LLL y OOL, en concordancia con los resultados obtenidos a través del análisis de FAME. Por otro lado, los UUS mayoritarios fueron PLL y POL.

Por otro lado, en la Tabla 2.3 se presenta la composición de subproductos.

Tabla 2.1.

Composición en ácidos grasos del aceite de girasol.

Ácido Graso		Concentración % m/m
	C14:0	0.08 ± 0.00
Palmítico	C16:0	6.32 ± 0.04
	C16:1	0.08 ± 0.00
	C17:0	0.05 ± 0.00
	C17:1 c	0.04 ± 0.00
Esteárico	C18:0	3.23 ± 0.02
Oleico	C18:1 n9t	0.24 ± 0.03
	C18:1 n9c	30.75 ± 0.18
Linoleico	C18:2n 6t	0.09 ± 0.01
	C18:2n 6c	56.51 ± 0.27
	C20:0	0.22 ± 0.02
	C18:3n 6	0.04 ± 0.00
	C18:3n 3	0.19 ± 0.00
	C20:1n9 c11	0.16 ± 0.01
	C20:1n9 c11	0.13 ± 0.02
	C22:0	0.58 ± 0.02
	C24:0	0.22 ± 0.11
	C22:6n3	0.05 ± 0.01
	N.I ^a	1.02 ± 0.03

^aNI: no identificados

Tabla 2.2.

Perfil de triglicéridos (TAG) del aceite de girasol.

TAG ^a	Tipo de TAG ^b	Composición (m/m %)
PPP	SSS	ND ^c
PPSt	SSS	ND
POP	SUS	0.30 ± 0.00
PLP	SUS	0.98 ± 0.02
StStP	SSS	0.07 ± 0.01
POST	SUS	0.29 ± 0.01
POO	UUS	2.80 ± 0.03
PLSt	SUS	0.85 ± 0.00
POL	UUS	6.54 ± 0.07
PLL	UUS	8.30 ± 0.13
StStSt	SSS	0.04 ± 0.01
StStO	SUS	0.13 ± 0.03
OOST	UUS	1.26 ± 0.01
StStL	SUS	ND
OOO	UUU	8.12 ± 0.00
StOL	UUS	2.59 ± 0.43
OOL	UUU	15.23 ± 0.30
StLL	UUS	3.06 ± 0.14
OLL	UUU	27.36 ± 0.06
LLL	UUU	21.81 ± 0.51
NI ^d		0.27
Σ SSS		0.11
Σ SUS		2.55
Σ UUS		24.55
Σ UUU		72.52

^a P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico.

^b S: ácido saturado, U: ácido insaturado. ^c ND: no detectado. ^d NI: no identificado

Tabla 2.3.

Composición en subproductos del aceite de girasol.

Subproducto	Concentración % m/m
Ácidos grasos libres	0.16 ± 0.06
Monoglicéridos	0.11 ± 0.08
Diglicéridos	1.03 ± 0.13

2.2.1.3. Composición de los ácidos grasos en posición *sn-2* de los triglicéridos

La composición de los ácidos grasos en la posición *sn-2* de los triglicéridos del aceite de girasol, determinados como FAME (técnica descrita en Sección 2.3.9), son los mostrados en la Tabla 2.4. Como era de esperarse, los ácidos linoleico (C18:2 n6c) y oleico (C18:1 n9c) resultaron ser los mayoritarios, en concordancia con lo reportado por Carrín y Crapiste (2008). Más aún, la distribución de estos ácidos grasos entre las posiciones *sn-1,3* y *sn-2* de los glicéridos fue similar para el ácido oleico (33% del total se encuentra en *sn-2*), y levemente superior para el ácido linoleico (38% del total se encuentra en *sn-2*).

Tabla 2.4.Composición en ácidos grasos en la posición *sn-2* de los glicéridos del aceite de girasol.

Ácido Graso	Concentración % m/m
C16:0	2.12 ± 0.16
C18:0	0.98 ± 0.00
C18:1 n9c	30.21 ± 0.03
C18:2 n6c	64.63 ± 0.04
N.I ^a	2.06 ± 0.23

^aNI: no identificados

2.2.2. Mezcla de ácidos grasos saturados palmítico y esteárico

La mezcla de ácidos grasos saturados palmítico y esteárico (StPFA) empleada en las reacciones de acidólisis, de grado de pureza 49-54% y 40-51% respectivamente (Fluka), fue proporcionada por Sigma Aldrich (Alemania).

2.2.3. Trioleína

La Trioleína (C18:1, cis-9) empleada en las reacciones de hidrólisis fue de 65% de pureza (Sigma). Su Índice de Peróxidos fue de 10.38 ± 0.02 mEq. O₂/kg. La composición en ácidos grasos mayoritarios de los glicéridos de la trioleína, determinada como FAME por cromatografía gaseosa es mostrada en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5.

Composición en ácidos grasos de la trioleína.

Ácido Graso	Concentración % m/m
C14:0	2.90 ± 0.10
C14:1	0.84 ± 0.02
C15:0	0.27 ± 0.02
C16:0	4.65 ± 0.05
C16:1	5.45 ± 0.06
C17:0	0.28 ± 0.03
C17:1c	1.11 ± 0.12
C18:0	0.80 ± 0.08
C18:1n 9c	66.40 ± 0.01
C18:2n 6c	8.01 ± 0.00
C20:0	0.58 ± 0.06
N.I. ^a	8.68 ± 0.06

^aNI: no identificados

2.2.4. Quitosano

El quitosano empleado en la preparación de microesferas para soporte de inmovilización de las lipasas fue gentilmente donado por el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas en Quitina de la Universidad Nacional del Sur; obtenido de la quitina que constituye las caparazones de camarones (fuente *Artemesia longinaris*), su forma física fue en escamas. El grado de desacetilación del material fue de 80.2%, determinado mediante resonancia magnética nuclear (^1H NMR). La humedad del mismo fue de $9.3 \pm 0.01\%$ determinada según la Norma de acuerdo al Método Oficial Ca 2c-55 (AOCS, 2009).

2.2.5. Reactivos y solventes

Dodecil aldehído de 92% de pureza y cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) (> 95% de pureza, Fluka) y las sales empleadas para la preparación de soluciones buffers, fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (> 99% de pureza), fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (> 99% de pureza) y acetato de sodio, CH_3COONa (> 99% de pureza), fueron proporcionados por Sigma Aldrich.

Todos los estándares utilizados para las determinaciones cromatográficas (1,2,3-trioctadecanol-glicerol, 1,2,3-trihexadecanol-glicerol, 1,2,3-trioctadecadienol-glicerol, 1,2,3-trioctadecanol-glicerol, 1,2,3-trihexadecanol-glicerol, 1,2,3-tridecanol-glicerol, 1,2-distearol-3-palmitol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-2-oleol-glicerol, 1,3-dioleol-2-palmitol-glicerol, 1,2-dilinolel-3-palmitol-rac-glicerol, 1,2-dioleol-3-stearol-rac-glicerol, 1-palmitol-2-oleol-3-linoleol-rac-glicerol, 1,2-distearol-3-oleol-rac-glicerol, 1,3-dipalmitol-rac-glicerol, 1-monopalmitol-rac-glicerol, ácido oleico, tetradecano) fueron de pureza mayor al 98% y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EEUU). La piridina utilizada fue de J.T. Baker (Philipsburg, EEUU). El N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza). El n-hexano, tanto de grado cromatográfico como analítico, así como el metanol, etanol y ácido acético empleados, fueron de la marca Dorwil. Los hidróxidos de potasio y sodio fueron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina), mientras que el sulfato de sodio de Anedra (España).

2.3. Métodos

2.3.1. Formación de las partículas de quitosano

Reactivos necesarios: hidróxido de sodio, metanol, ácido acético.

Procedimiento experimental:

- 1- Preparar una solución de hidróxido de sodio (NaOH) de concentración 1 N.
- 2- Con la anterior, preparar una solución de NaOH y metanol en relación 3:1 v/v.
- 3- Pesar el quitosano y disolverlo en una solución acuosa de ácido acético al 2 %. La relación masa de quitosano/volumen de ácido debe ser mayor o igual a 3 para obtener partículas con buena resistencia mecánica. Agitar hasta observar formación de gel. La disolución puede favorecerse empleando calor.
- 4- Tomar con la jeringa el gel de quitosano y agregarlo por goteo a la solución anterior (Fig. 2.1). La aguja hipodérmica empleada fue de 1.5 mm de diámetro.
- 5- Filtrar para retener las partículas formadas, y lavar con abundante agua para remover los residuos del medio neutralizante.
- 6- Si las partículas van a ser modificadas, eliminar el agua y someterlas a la reacción de aminación reductiva. Si este no es el caso, y se desea usarlas como tal, secar en estufa a 40 °C, hasta peso constante.

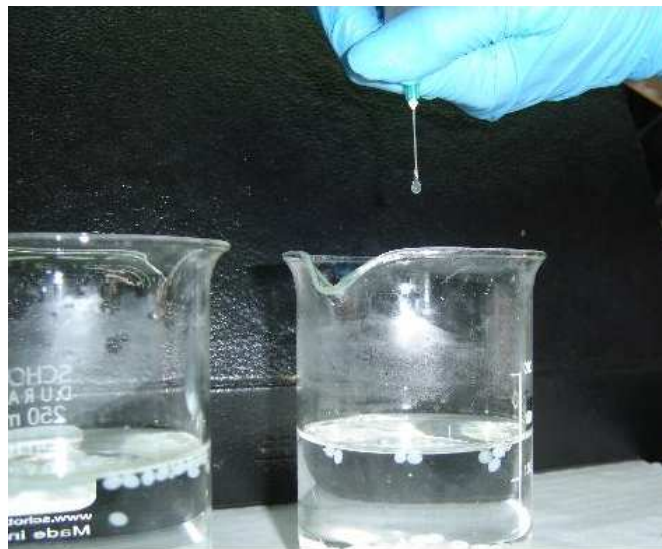


Figura 2.1. Formación de microsferas de quitosano por precipitación.

2.3.2. Técnica para modificación química de las partículas: aminación reductiva

Reactivos necesarios: etanol, docedil aldehído, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3).

Procedimiento experimental:

- 1- Introducir las microesferas de gel de quitosano obtenidas según la técnica descrita en la Sección 2.3.1 en un recipiente adecuado.
- 2- Agregar etanol en relación 10 ml/g de quitosano en escamas seco inicial.
- 3- Disolver en etanol (28 ml/g de aldehído) la cantidad de aldehído determinada por la relación molar NH_2 / aldehído deseada, para favorecer la disolución emplear calentamiento leve. Luego, añadir al medio con las microesferas y agitar vigorosamente durante 1.5 h (salvo otro tiempo especificado) (Fig. 2.2).
- 4- Agregar NaCNBH_3 en exceso (3 moles NaCNBH_3 /monomol de polvo de quitosano seco inicial) y agitar durante 1 h.
- 5- Eliminar la mezcla de reacción y retener las microesferas alquiladas. Lavarlas con etanol para eliminar los residuos de reactivos. Seguir el proceso de lavado mediante medición de la absorbancia de la solución de lavado frente a etanol, en espectrofotómetro UV/Vis a 270 nm. Continuarlo hasta obtener absorbancia nula.
- 6- Enjuagar con agua destilada y secar en estufa a 40 °C, hasta peso constante.

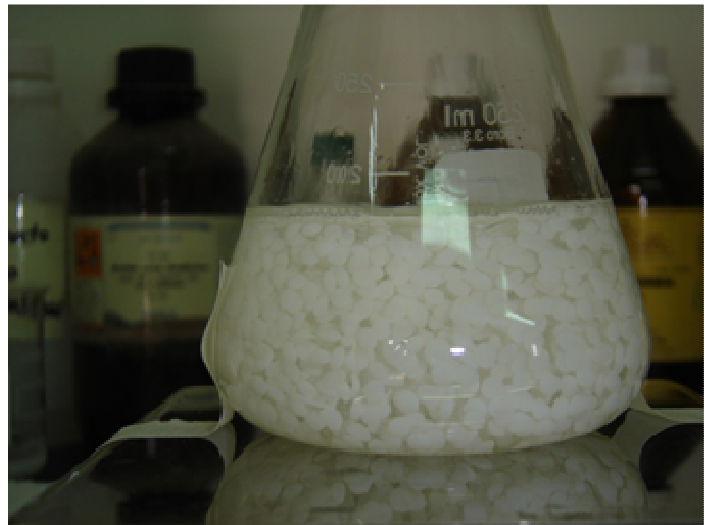
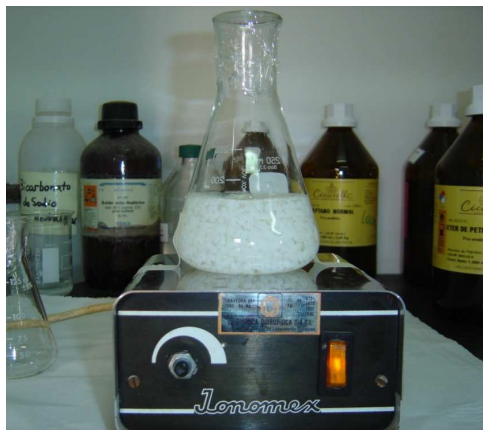


Figura 2.2. Alquilación de microesferas de quitosano.

2.3.3. Técnica de inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei*

Reactivos necesarios: fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Procedimiento experimental:

- 1- Diluir el volumen correspondiente a 15 g de preparado comercial de lipasa en 20 ml de solución buffer (fosfato de sodio, 20 mM, pH 6 a 4°C) y mantener bajo agitación durante 5 min.
- 2- Añadir 1.5 g del soporte (obtenido según Sección 2.3.1 o 2.3.2) previamente lavado con la solución buffer a la solución enzimática y agitar a temperatura ambiente durante 24 h (Fig. 2.3).
- 3- Cuantificar la cantidad de proteína adsorbida en los soportes; para ello tomar muestra de la solución sobrenadante al principio y al final del proceso.
- 4- Separar los sólidos por filtración.
- 5- Enjuagar con buffer fosfato a 0 °C y secar en estufa de vacío a 35 °C hasta peso constante.

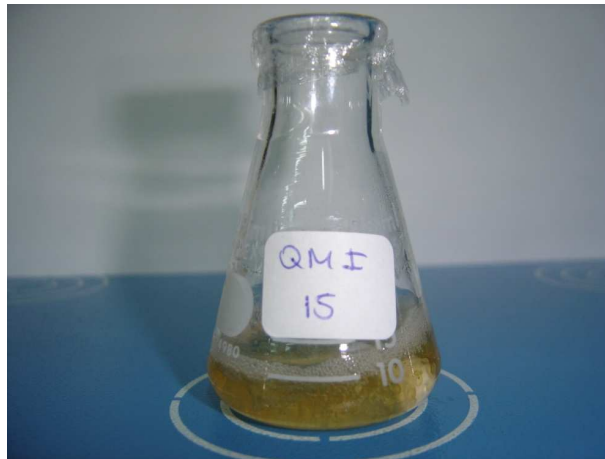


Figura 2.3. Inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* por adsorción en microesferas de quitosano modificadas.

2.3.4. Determinación del contenido de proteína

La cantidad de proteína presente en los preparados de lipasa comercial utilizados y principalmente la cantidad adsorbida sobre los soportes tras la inmovilización, fueron aspectos muy importante durante el transcurso de esta tesis. Por esta razón, se trató de disponer de un método adecuado y preciso para esta determinación. A continuación se detallan dos métodos empleados y las variaciones que surgieron de uno de ellos.

2.3.4.1. Método espectrofotométrico UV/Visible a 280 nm (UV/Vis 280)

El método con el que se contó inicialmente para cuantificar la proteína adsorbida en los soportes fue el método espectrofotométrico UV/Visible. El mismo consistió en registrar las absorbancias a 280 nm (longitud de onda a la que absorben la luz los aminoácidos aromáticos de las proteínas) de las soluciones de inmovilización antes y después del proceso en cuestión y relacionar estos valores a fin de determinar esta medida. En todos los casos se requirió formar diluciones del sobrenadante en buffer para poder realizar la lectura en un rango adecuado de absorbancias, por ejemplo empleando 0.02 ml de sobrenadante + 3 ml de buffer fosfato.

Un aspecto a destacar de este método es que si no se conoce la cantidad de proteína en el preparado, lo único que se puede reportar es, por diferencia en absorbancias, cuanto

“material” del medio quedo retenido sobre los soportes. Si se dispone de un valor, éste puede ser usado para calcular cuanta proteína se tiene en un dado volumen de solución y así generar curvas de calibración que relacionen cantidades con absorbancias. En consecuencia, en base a la *información que se disponía al momento* sobre la cantidad de proteína presente en el preparado comercial de lipasa, es que diversos criterios de cuantificación fueron empleados.

2.3.4.1.1. Método UV/Vis 280 (I)

No disponiendo de información alguna respecto al contenido de proteína en el preparado comercial de lipasa, ya que el proveedor no la especificó, se cuantificó, mediante las diferencias en la absorbancia inicial y final de los sobrenadantes, la cantidad de preparado retenida en los soportes. Para que este contenido sea tomado como contenido de proteína se requiere asumir que lo único que se adsorbió sobre el soporte es proteína.

2.3.4.1.2. Método UV/Vis 280 (II)

Disponiendo de un valor de contenido de proteína de 0.44 g/g de preparado comercial de lipasa, obtenido mediante el método gravimétrico (detallado en la Sección 3.2.2.1.), fueron determinadas tanto la concentración de proteína en los medios de inmovilización al inicio del proceso como las de las disoluciones preparadas para llevar a cabo la medición en el espectrofotómetro. Tras verificar linealidad en las curvas de absorbancia-cantidad de proteína, registrando la absorbancia asociada a la solución de inmovilización final se conoció su contenido de proteína.

2.3.4.1.3. Método UV/Vis 280 (III)

Este criterio para cuantificación se empleó tras disponer del valor de proteína en el preparado comercial (CLP) determinado mediante el método de Proti II. Los cálculos realizados con los métodos anteriores se rehicieron tomando como base un valor de 55.28 ± 1.34 mg/g de CLP.

2.3.4.2. Método de Proti II

Reactivos necesarios: kit comercial Proti II (Wiener lab., Argentina) formado por solución EDTA/Cu y suero de albúmina (47 g proteína/L) como estándar de calibración.

Procedimiento experimental:

Realización de la curva de calibrado:

- 1- Introducir en tubos de ensayo diferentes volúmenes conocidos de suero (ej. 25, 50, 75 y 100 μ L), realizando cada concentración por triplicado. Agregar en cada tubo 3.5 ml de la solución EDTA/Cu y agitar.
- 2- Preparar un blanco de reacción siguiendo el mismo procedimiento que en el punto anterior, pero empleando agua destilada en vez del suero patrón.
- 3- Mantener los tubos calefaccionados a 37 °C durante 15 min. Una vez alcanzado este tiempo permitir que alcancen temperatura ambiente y realizar la medición antes de las 12 h.
- 4- Medir la absorbancia de las soluciones frente al blanco, en el espectrofotómetro UV/Vis a 540 nm.
- 5- Calcular los gramos de proteína contenidos en cada solución y graficarlo frente al valor de absorbancia obtenido. Determinar por regresión la ecuación que relaciona ambas variables.

Mediciones:

- 1- Introducir 50 μ L de la muestra incógnita en un tubo y agregar 3.5 ml de la solución EDTA/Cu. Agitar.
- 2- Seguir pasos 2 al 4 de la enumeración anterior.
- 3- Empleando la curva de calibrado determinar a qué cantidad de proteína corresponde el valor obtenido de absorbancia.

2.3.5. Acidólisis de aceite de girasol y ácidos grasos palmítico y esteárico

Reactivos necesarios: mezcla de ácidos grasos palmítico y esteárico (StPFA), aceite de girasol (SO), hexano normal de grado analítico, sulfato de sodio, preparado comercial de lipasa o biocatalizador preparado.

Procedimiento experimental:

- 1- Introducir en un tubo de reacción 0.755 g de la mezcla de ácidos grasos palmítico y esteárico.
- 2- Agregar aproximadamente 0.4 g de aceite de girasol refinado, para obtener una relación molar 6:1 StPFA/SO.
- 3- Agregar 3.5 ml de hexano normal. Introducir la barra agitadora y cerrar herméticamente.
- 4- Introducir el tubo en el baño calefactor a temperatura deseada, mantener durante 10 min para que ocurra la disolución y la homogeneización.
- 5- Introducir una cantidad determinada del preparado comercial de lipasa o del biocatalizador preparado, según corresponda.
- 6- Mantener bajo agitación el tiempo definido para la reacción (Fig. 2.4). Retirar al finalizar por filtración.
- 7- Cuando es empleada la enzima en su estado libre, antes de filtrar, añadir 2 ml de acetona al medio para su desactivación y agregar al papel de filtro una cucharadita de sulfato de sodio.



Figura 2.4. Sistema de reacción batch con biocatalizador.

2.3.6. Técnica para Deacidificación de Muestras

Los productos de reacción fueron purificados mediante deacidificación alcalina de forma de remover los ácidos grasos libres, mediante la técnica descrita por Carrín y Crapiste (2008).

Reactivos necesarios: hexano normal de grado analítico, etanol, hidróxido de potasio (KOH) y cloruro de sodio (NaCl).

Procedimiento experimental:

- 1- Evaporar el hexano contenido en el producto de reacción.
- 2- Tomar 200 mg del producto homogeneizado e introducirlo en tubo de ensayo.
- 3- Agregar 6 ml de hexano normal. Limpiar las paredes del tubo con el mismo.
- 4- Agregar 3.2 ml de solución de KOH 0.5 N preparada con etanol al 20 % v/v. Agitar vigorosamente con vórtex.
- 5- Dejar en reposo por 30 min para permitir la separación de fases. Agregar gotitas de etanol si es necesario, para ayudar a la separación.
- 6- Tomar la fase superior de hexano con pipeta Pasteur.
- 7- Lavar la fase inferior, alcohólica, con 2 ml de hexano; agitar, dejar decantar y recuperar nuevamente la fase superior.
- 8- Agregar a toda la fase hexano obtenida (pasos 6 y 7) 1.2 ml de solución de KOH 0.5 N preparada con etanol al 20 % v/v y agitar.
- 9- Agregar 2.4 ml de solución de NaCl saturada; agitar 30 seg; dejar en reposo por 30 min para permitir la separación de fases.
- 10- Recolectar en un recipiente la fase superior. Evaporar el hexano bajo campana extractora mediante corriente de nitrógeno, hasta peso constante de la muestra. Obtener el peso del producto deacidificado.

2.3.7. Determinación de la composición de ácidos grasos en glicéridos por CGL

2.3.7.1. Derivatización de la muestra: metilación en frío

Los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) fueron preparados a partir de las muestras deacidificadas (Sección 2.3.6) (excepto cuando se procesaron las muestras obtenidas de la reacción de la lipasa pancreática, donde los sustratos iniciales para la metilación fueron directamente 2-monoglicéridos), a través de transesterificación en frío con KOH metanólico de acuerdo al Método Oficial Ce 2-66 (AOCS, 2009).

Reactivos necesarios: Hexano cromatográfico, hidróxido de potasio (KOH) y metanol.

Procedimiento experimental:

- 1- Preparar en un tubo de centrifuga una solución de producto deacidificado en hexano cromatográfico de concentración 25 mg/ml.
- 2- Añadir 200 µl de solución de KOH en metanol al 20% (m/v); agitar.
- 3- Centrifugar por 5 min; recolectar la fase superior conteniendo los FAME.

2.3.7.2. Condiciones cromatográficas

Los FAME se analizaron por cromatografía gas-líquido (GLC) en un cromatógrafo gaseoso Agilent serie 4890D (Hewlett-Packard) equipado con una columna capilar (SP-2380, 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm espesor de film; Supelco Inc.). Hidrógeno se utilizó como gas transportador con una velocidad de 17 cm/min. Se inyectó en modo split con una relación 1:100. La temperatura del horno se programó a 170 °C por 15 min, incrementándose hasta 210 °C a una velocidad de 4°C/min, y se mantuvo a dicha temperatura por 10 min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 220 °C. FAME se identificaron por comparación de los tiempos de retención con estándares auténticos. La adquisición de datos y la integración de los picos fue realizada empleando el software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, 1998). Los resultados se reportaron como % (m/m) de ácidos grasos en los glicéridos.

2.3.8. Determinación conjunta de FFA, MAG, DAG y TAG por GLC

Las muestras sin deacidificar se analizaron por GLC, de acuerdo al método presentado en detalle por Pacheco (2012). El mismo permite cuantificar en simultáneo los productos de la reacción de acidólisis, triglicéridos (TAG), y subproductos: diglicéridos (DAG), monoglicéridos (MAG), ácidos grasos libres (FFA) y glicerol (G) de la reacción. Cabe mencionar que si bien los ácidos grasos libres fueron cuantificados, no se consideran como subproducto de la reacción de acidólisis debido a que la mayoría forma parte del reactivo en exceso de la reacción.

2.3.8.1. Derivatización de la muestra

Reactivos necesarios: Piridina, N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), soluciones de estándares (tricaprina, tetradecano y tripalmitoleína).

Procedimiento experimental:

- 1- Preparar en un tubo de microcentrífuga una solución de producto sin deacidificar en piridina, de concentración 20 mg/ml.
- 2- Tomar 15 μ l de la solución anterior e introducirla en un nuevo tubo de microcentrífuga. Añadir al mismo el volumen requerido de cada una de las soluciones de estándares, aproximadamente 5 μ l, según la concentración de las mismas.
- 3- Agregar 28 μ l de silanizante u otra cantidad necesaria para derivatizar los compuestos presentes.

2.3.8.2. Condiciones Cromatográficas

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo gaseoso Agilent serie 4890D (Hewlett-Packard) equipado con una columna capilar metálica (MXT-65TG, 30 m x 0.25 mm x 0.10 μ m; Restek, Bellefonte, USA.). El inyector fue usado en modo split (1:70) y mantenido a 360 °C. La temperatura del detector fue constante e igual a 380 °C. La programación del horno fue 40°C durante 4 min, luego se incrementó hasta 350 °C a una velocidad de 15°C/min, y posteriormente hasta 355 °C a 0.2°C/min. Hidrógeno fue empleado como gas carrier a una velocidad de 33.6 cm/s. El método del estándar interno se utilizó para cuantificar cada grupo de subproductos (FFA, MAG y DAG) empleando las curvas de calibración pertinentes. Tetradecano y tricaprina fueron los estándar internos usados para FFA y, MAG y DAG, respectivamente. Los factores de respuesta de los triglicéridos disponibles fueron correlacionados con su tiempo de residencia relativo para poder realizar la cuantificación de aquellos de los que no se disponía de estándares. La adquisición de datos y la integración de los picos se realizó mediante el software HP 3398A GC ChemStation (Hewlett-Packard, 1998). El análisis fue llevado a cabo identificando cada TAG en base a su tiempo de retención. El contenido de cada especie se reportó como % g/100 g de TAG total.

2.3.9. Determinación de los ácidos grasos en posición sn-2 de los triglicéridos

La determinación de la composición ácida de la posición sn-2 de los glicéridos del aceite de girasol se realizó utilizando la reacción de la lipasa pancreática, siguiendo la norma AOCS Ch 3-91 (AOCS, 2009) con modificaciones (respecto a la cantidad de muestra analizada).

Reactivos necesarios: buffer tris hidroximetil aminometano, colato de sodio, cloruro de calcio (CaCl), ácido clorhídrico (HCl), dimetil éter.

Procedimiento experimental:

- 1- Preparar en un tubo una solución conteniendo 40 mg de muestra deacidificada y 0.2 ml de hexano normal.
- 2- Agregar: 0.5 ml de solución de colato de sodio de concentración 1g/l, 0.2 ml de CaCl de concentración 220g/l, 2ml de buffer tris 1M ajustado a pH 8.0 con HCl.
- 3- Incorporar 20 mg de lipasa pancreática.
- 4- Colocar en un baño calefaccionado con agitación magnética a 52 °C durante 3 min.
- 5- Remover el tubo del baño y agitar vigorosamente durante 2 min.
- 6- Anadir 1 ml de HCl y 1 ml de dimetil éter. Agitar durante 30 s.
- 7- Centrifugar y coleccionar la capa superior.
- 8- Separar los monoglicéridos (MAG) por cromatografía de capa fina, coleccionándose la fracción de 2-MAG para ser y analizada mediante cromatografía gas-líquido (CGL) como se describió en la Sección 2.3.7.

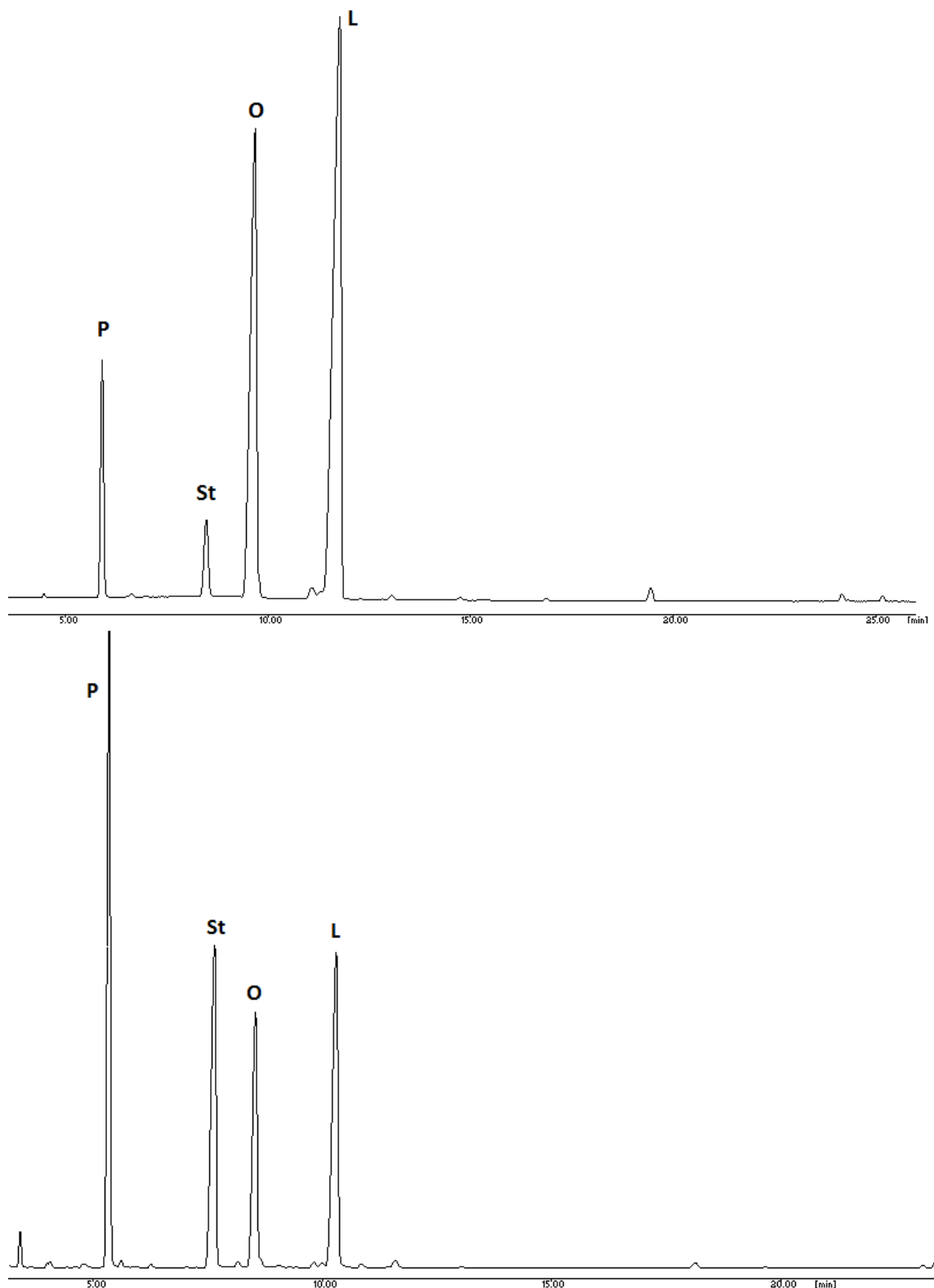


Figura 2.5. Cromatograma de ácidos grasos en glicéridos de: aceite de girasol (**arriba**) y un producto de reacción acidólisis (obtenido a 60°C tras 70.5, detalles en la Sección 7.2) (**abajo**). Condiciones cromatográficas especificadas en la Sección 2.3.7.

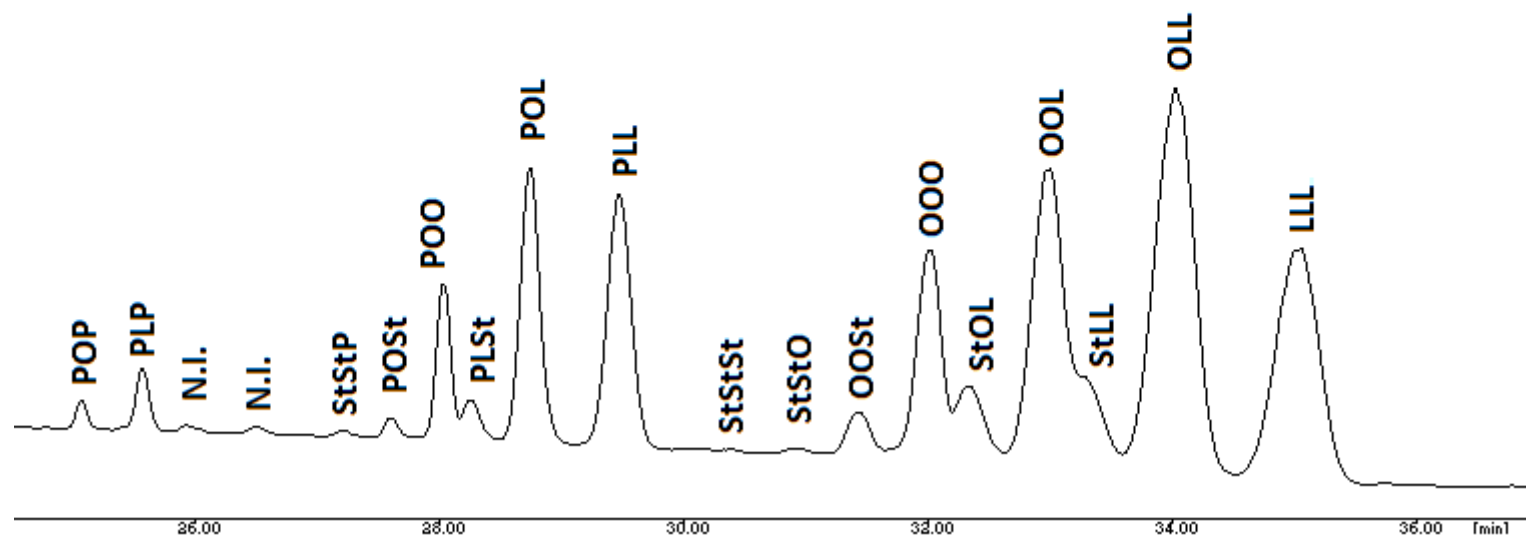


Figura 2.6. Cromatograma parcial de la zona de especies de triglicéridos para el aceite de girasol. Condiciones cromatográficas especificadas en la Sección 2.3.8.

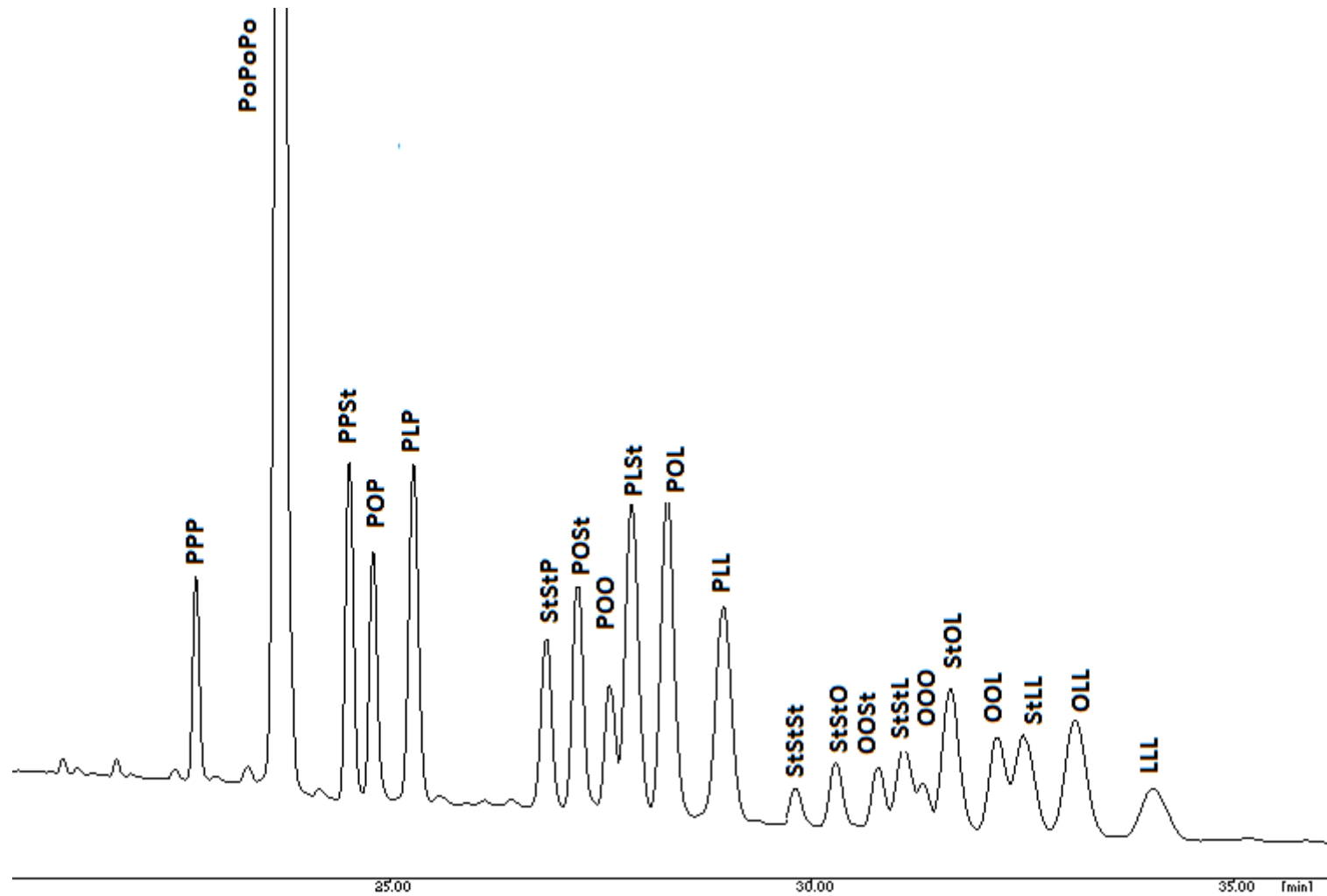


Figura 2.7. Cromatograma parcial de la zona de especies de triglicéridos para un producto de reacción de acidólisis (obtenido a 60°C tras 70.5 h de reacción, detalles en la Sección 7.2). Estándar interno: tripalmitoleina (PoPoPo). Condiciones cromatográficas especificadas en la Sección 2.3.8.

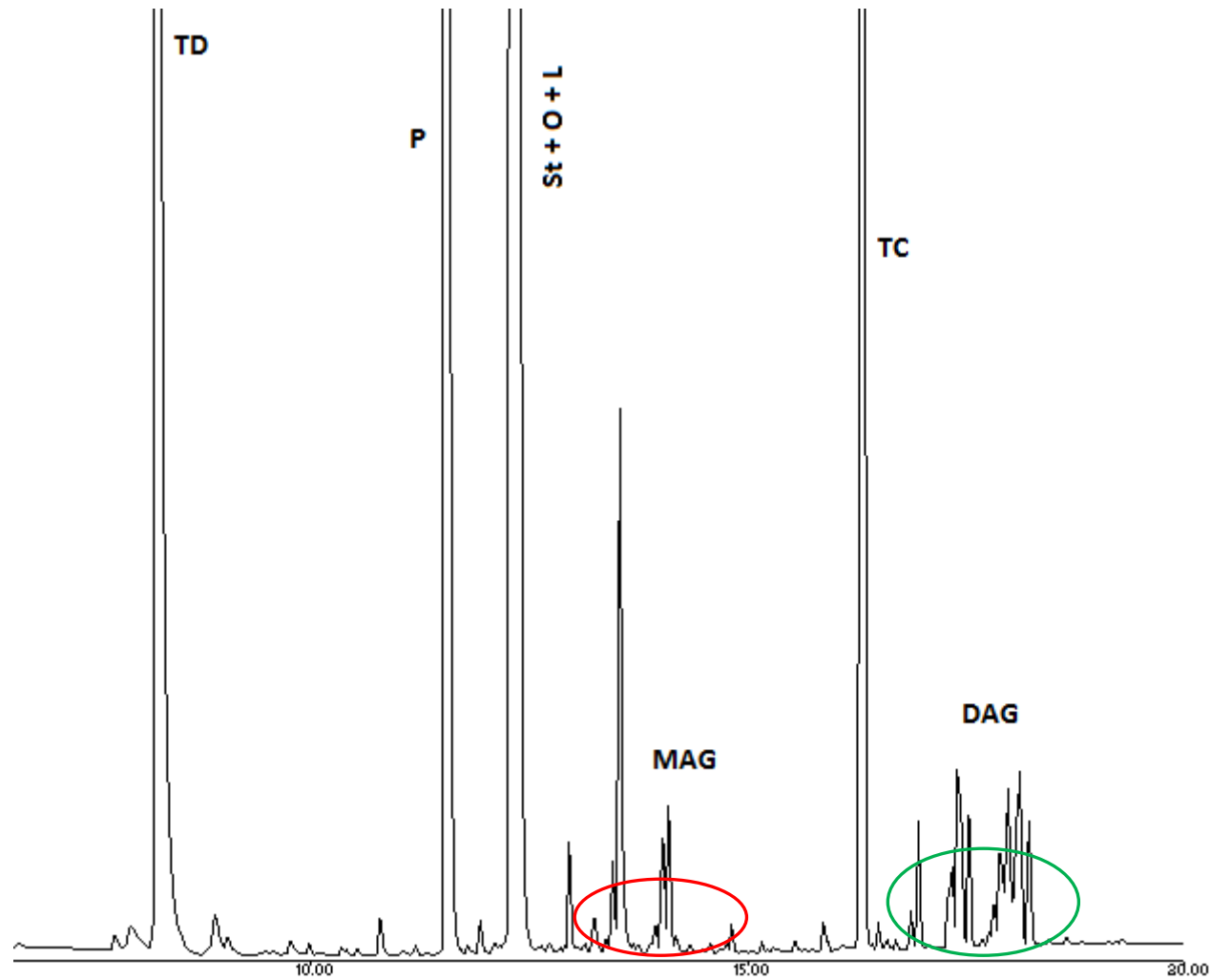


Figura 2.8. Cromatograma parcial de la zona de: ácidos grasos libres (P (palmítico), St (esteárico), O (oleico) y L (linoleico)), monoglicéridos como grupo (MAG) y diglicéridos como grupo (DAG), para un producto de reacción de acidólisis (obtenido a 60°C tras 70.5, detalles en Sección 7.2). Condiciones cromatográficas especificadas en la Sección 2.3.8. Estándares internos: tetradecano (TD) y tricaprina (TC).

2.3.10. Análisis estadístico

La totalidad de las determinaciones llevadas a cabo en la presente tesis se realizaron como mínimo por duplicado, salvo cuando se empleó un diseño de experimentos y cuando se realizaron las experiencias en el reactor de lecho empacado. En los casos en que los coeficientes de variación superaron el 10%, una tercera muestra independiente fue realizada con el objetivo de descartar el valor que presentara error experimental no aleatorio. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas mediante test *t*, empleando un nivel de confianza del 95%. Valores del estadístico $P > F$ menores que 0.05 indicaron diferencias significativas y valores mayores a 0.1, indicaron lo contrario.

Adicionalmente y cuando se lo requirió se emplearon test de comparación de medias como el de Tukey y Bonferroni.

Referencias

AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 6th ed., AOCS Press, Champaign, IL, (2009).

Carrín M.E., Crapiste G.H., Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture, *Journal of Food Engineering* 84 (2008) 243-249.

Pacheco C., Cinética de la interesterificación enzimática de aceites vegetales, Tesis Doctoral, (2012).

Reske J., Siebrecht J., Hazebroek J., Triacylglycerol composition and structure in genetically modified sunflower and soybean oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (1997) 989 – 998.

Serrano-Vega M., Martínez-Force E., Garcés R., Lipid characterization of seed oils from high-palmitic, low-palmitoleic, and very high-stearic acid sunflower lines, *Lipids* 40 (2005) 369 – 374.

PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: LIPASAS DE *R. MIEHEI* LIBRES

3.1. Introducción

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas E.C. 3.1.1.3) constituyen uno de los grupos de enzimas más ampliamente utilizadas en la industria biotecnológica. Esto se debe a que las mismas reconocen una gran variedad de sustratos, manteniendo su regioselectividad y estereoselectividad, y pueden catalizar muchas reacciones diferentes: hidrólisis o síntesis de enlaces ésteres, alcoholólisis, aminólisis, peroxidaciones, interesterificaciones y epoxidaciones, entre otras. Esta diversidad que las caracteriza hace que resulten muy útiles en numerosas aplicaciones, tales como la obtención de productos farmacéuticos y medicamentos, en la producción de biodiesel o en la modificación de alimentos (Rodríguez y Fernández-Lafuente, 2010).

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilglicerolos liberando ácidos grasos y glicerol (IUPAC-IUB, 1979). Sin embargo en presencia de solventes orgánicos o en sistemas anhidros, las lipasas pueden presentar un comportamiento totalmente diferente,

catalizando reacciones de esterificación y transesterificación (Berry y Paterson, 1990). Dependiendo de su origen, las lipasas pueden tener un peso molecular variable entre 20,000 y 200,000 Da, siendo activas en amplios rangos de pH (4.0 a 9.0) y temperatura (ambiente hasta 70 °C) (Borgstron y Brockman, 1984). Con relación a su regioselectividad en sustratos acilglicéricos, pueden ser clasificadas en lipasas: *sn*-1,3 regioespecíficas, no regioespecíficas y ácido graso específicas (Macrae y Hammond, 1987; Castro y Anderson, 1995). Este tipo de características es usado para distinguir la variedad de lipasas existentes, y para seleccionar la más adecuada para una aplicación específica.

Las lipasas se pueden encontrar en una gran cantidad de tejidos y fluidos de animales y vegetales, o bien pueden ser producidas por procesos fermentativos utilizando diversas especies de microorganismos (hongos y bacterias). Actualmente, desde el punto de vista económico e industrial, los microorganismos han sido los preferidos como fuentes de lipasas (Mukherjee, 1994; Castro y Anderson, 1995).

Dado que uno de los principales objetivos de esta tesis fue la preparación de un biocatalizador por inmovilización de las lipasas de *Rhizomucor miehei* en un soporte adecuado, resultó fundamental conocer las características de esta enzima. Por otra parte, si bien esta tesis fue planteada en un marco ingenieril, no pueden dejarse de lado los aspectos biológicos propios del sistema en estudio para poder entender y explicar los procesos involucrados. De este modo, se presenta una breve descripción referida a las lipasas y posteriormente, un análisis de la actividad de las mismas en las reacciones de hidrólisis y acidólisis. Principalmente, la atención fue puesta en esta última reacción por ser la seleccionada para la producción de lípidos estructurados a partir de una mezcla de triglicéridos heterogéneos, aceite de girasol.

En consecuencia, el trabajo experimental detallado en este capítulo tuvo como *objetivo* corroborar que las lipasas de *Rhizomucor miehei* en su estado libre sean lo suficientemente aptas y activas en la reacción de interés, de forma que su empleo y su posterior inmovilización fuese claramente justificado.

3.2. Características de las lipasas de *Rhizomucor miehei*

Las lipasas de *Rhizomucor miehei* también han sido empleadas como catalizador de numerosas reacciones (Monsalve et al., 2012). Aunque en la taxonomía fúngica haya sido reemplazada la denominación *Mucor* por la forma *Rhizomucor*, varios productores de estas lipasas han mantenido su antiguo nombre por simplicidad, y por ende es común hallar ambos en la literatura. En esta tesis, la convención de nombre empleada en cada trabajo es mantenida teniendo presente que se está refiriendo al mismo microorganismo.

Haciendo un poco de historia, esta enzima extracelular fue descrita por primera vez en 1973. Años más tarde, se reportó un primer uso de la misma para transformación de alimentos, donde se demostró que era capaz de tener actividad en productos grasos naturales, tales como aceites vegetales, sebo de vaca, manteca de cerdo y aceite, y una serie de sustratos sintéticos que incluyen ésteres de sorbitol de ácidos grasos (Rodriguez y Fernandez-Lafuente, 2010).

La enzima nativa se ha encontrado presente en los organismos en dos formas distintas, diferenciadas sólo por desglicosilación parcial (la lipasa *B* formada por desglicosilación parcial de la lipasa *A*). La enzima se expresó oportunamente en un organismo de *Aspergillus oryzae* genéticamente modificado (Huge-Jensen et al., 1989). Esta forma de obtención es actualmente la empleada por Novozymes, uno de los principales productores mundiales de enzimas, quien la presenta disponible comercialmente en forma libre (Palatase 2000L) y en una forma inmovilizada (Lipozyme RM IM). El soporte de la enzima inmovilizada es Duolite ES 562, una débil resina intercambiadora de aniones sobre la base de copolímeros de fenol-formaldehído. Dada las ventajas que presenta la lipasa en su forma inmovilizada respecto de la libre (las mismas se detallan en el Capítulo 4), los trabajos de investigación existentes en el tema emplean, en una amplia mayoría, la forma inmovilizada (Lee y Akoh, 1996; Yankah y Akoh, 2000; Xu et al., 2000; Garcia et al., 2001; Camacho et al., 2007).

La estructura atómica de las lipasas de *Rhizomucor miehei* fue de las primeras en darse a conocer mediante análisis de rayos X (Fig. 3.1). La estructura reveló una tríada

catalítica constituida por serina, histidina y ácido aspártico, con un residuo nucleofílico, serina, ocluido bajo un fragmento helicoidal superficial denominado tapa o lid (Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010). Esta tapa es un fragmento peptídico anfifílico que cubre el sitio activo haciéndolo inaccesible al sustrato o al solvente. La enzima nativa se describe como una sola cadena polipeptídica de 269 aminoácidos mientras que la obtenida mediante modificación genética por *Aspergillus oryzae* cuenta con 273 residuos (Huge-Jensen et al., 1989). El conocimiento de su composición permite explicar su mecanismo de acción y la forma en que se relaciona con el medio.

El mecanismo de acción de las lipasas está asociado a la serina activa. La hidrólisis del sustrato comienza con un ataque nucleofílico por parte del oxígeno de la serina sobre el átomo de carbono carbonílico del enlace éster. Esto origina la formación de un intermediario tetraédrico, estabilizado por el hidrógeno vinculado a los átomos de nitrógeno de los residuos de la cadena principal, que pertenecen al denominado "agujero oxianón". De esta forma, se libera por ejemplo un alcohol, dejando atrás un complejo acil lipasa, el cual es finalmente hidrolizado valiéndose del agua del medio, con la consecuente liberación del ácido graso y regeneración de la enzima (Brzozowski et al., 1991; Fernandez Torres, 2006; Peters et al. 1996).

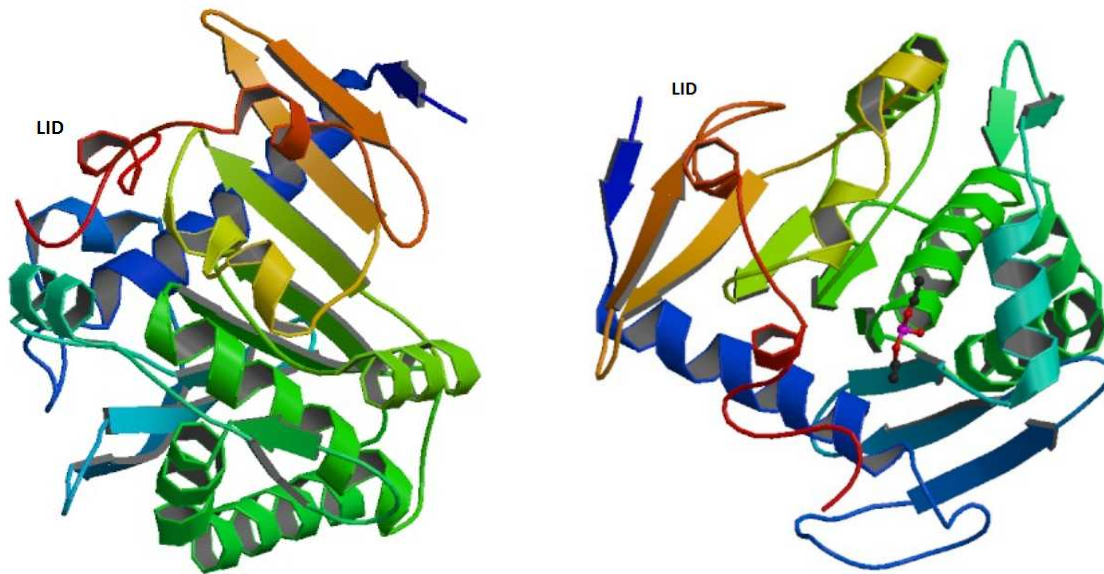


Figura 3.1. Estructuras tridimensionales de la lipasa de *Rhizomucor miehei*, conformación abierta (derecha) y cerrada (izquierda). Representaciones obtenidas en el Protein Data Bank (PDB: 3TGL y PDB: 4TGL, respectivamente).

Para que la lipasa actúe resulta necesario desplazar el lid, dejando al descubierto el sitio activo. Se ha demostrado que en presencia de interfases hidrofóbicas, por ejemplo originadas cuando la solubilidad de un sustrato se excede y da lugar a una interfase lípido-agua, se da un cambio de conformación en la lipasa que incluye el corrimiento del lid confiriéndole funcionalidad. Este complejo mecanismo denominado *activación interfacial* ha sido motivo de numerosos estudios en base a simulaciones dinámicas moleculares y ha sido empleado como herramienta para aumentar la actividad e incluso desarrollar nuevos métodos de inmovilización (Brzozowski et al., 1991; Fernandez -Lafuente et al., 1998).

Una característica natural de la mayoría de las lipasas, incluida la de *Rhizomucor miehei*, es la tendencia a formar agregados bimoleculares cuando se encuentran en solución, debido a las interacciones que se originan entre las superficies hidrofóbicas que rodean los centros activos (Palomo et al., 2004). En consecuencia, la formación de estos agregados disminuiría la actividad efectiva de la lipasa al reducir el área de contacto del centro activo con el sustrato.

3.2.1. Características del preparado comercial de lipasas

El preparado comercial de lipasas utilizado en el trabajo experimental de esta tesis, es un extracto líquido denominado por el proveedor (Sigma Aldrich) Lipase from *Rhizomucor miehei* ≥ 20000 LU/g (Novozymes), también conocido como Palatase® 20000 L. Contiene una lipasa purificada *sn*-1,3 específica de *Rhizomucor miehei* producida por fermentación sumergida de un microorganismo, *Aspergillus oryzae* genéticamente modificado. Es una lipasa desarrollada para la producción de compuestos que otorgan aroma y sabor a los quesos o para modificación de los mismos. Su preferencia para hidrolizar ésteres de ácidos grasos pequeños resulta en la formación de un sabor óptimo. Palatase tiene una temperatura óptima de 40 °C y manifiesta alta actividad en el intervalo de pH 6 - 8.5, siendo el más adecuado 7.5 (Šinkūnienė et al., 2011).



Figura 3.2. Preparado comercial de lipasas de *Rhizomucor miehei*.

Los preparados de lipasa comercial son a menudo mezclas complejas de proteínas, grasas, hidratos de carbono, desechos celulares, ácidos nucleicos y sales remanentes de la fermentación del organismo huésped y del procesamiento de la corriente que contiene a la enzima. El hecho que no se lleve a cabo la purificación completa de la proteína de interés se

debe a que es un proceso costoso, que además puede resultar en pérdida de actividad y estabilidad de la misma (Bjurlin et al., 2001). En consecuencia, al incorporar la lipasa al medio de reacción introduciendo un volumen dado de preparado enzimático comercial, son agregados simultáneamente un número de impurezas que podrían llegar a tener un efecto positivo, neutro o negativo sobre la reacción catalizada. A pesar de esto, la composición de los preparados comerciales no es informada por los proveedores.

Quienes realizaron un estudio de la composición de diferentes preparados comerciales comúnmente empleados en catálisis enzimática fueron Bjurlin et al. (2001). Entre los 34 preparados diferentes analizados se encuentra Palatase 20000L, donde la composición hallada fue la que se muestra en la Tabla 3.1. En lo que al contenido de proteína se refiere, mediante el método de Kjeldahl se halló que el mismo era de solo el 0.6 % (m/m) del preparado, del cual una proporción fue lipasa de *Rhizomucor miehei*. La identificación de los diferentes tipos de proteínas presentes fue realizada mediante un análisis de los puntos isoeléctricos (pI). Esta técnica se basa en el hecho de que el pH al cual una proteína tiene carga neta nula (pH isoeléctrico) es característico de cada proteína. Para el preparado en cuestión se encontraron 5 bandas distintas, cada una correspondiente a un punto isoeléctrico, en la región ácida. Solo una de ellas mostró actividad lipolítica, la cual correspondió a la lipasa de *Rhizomucor miehei* con un pI de 3.7. Este hecho reviste considerable importancia ya que se esperaría que, siendo la única proteína activa, la catálisis efectuada con el uso de este preparado comercial sea *sn*-1,3 específica.

Adicionalmente, Novozymes declara dentro de las especificaciones para Palatase® 20000L la presencia de sorbitol como estabilizante y sorbato de potasio y benzoato de sodio como conservantes. Por otra parte, reporta una actividad lipolítica de 20000 LU/g.

Tabla 3.1.

Composición del preparado comercial de lipasa Palatase 20000L reportado por Bjurlin et al. (2001).

COMPONENTE	% (m/m)
Carbohidratos	48.4
Grasas	0.1
Proteínas	0.6
NaCl	0.1
Cenizas	0.2
Humedad	49.3

3.2.2. Determinación del contenido de proteína del preparado comercial

La determinación de la cantidad de lipasas de *Rhizomucor miehei* presentes en el preparado comercial es una tarea suficientemente compleja, debido a que se requiere la aislación de la proteína correspondiente del resto de las proteínas y de los demás componentes. Por ello, es más común, si es que se hace, que se informe el contenido de proteína total a fin de tener una idea de la cantidad de catalizador introducida en la reacción (Jurado et al., 2006).

Esta determinación cobra mayor importancia cuando se desea comparar la actividad de la lipasa libre respecto de su forma inmovilizada, ya que para que la comparación sea válida se requiere del empleo de las mismas relaciones proteína/sustratos en los medios de reacción. Por otro lado, es un parámetro adecuado cuando se emplean diferentes envases de la enzima comercial, teniendo presente que los productos de fermentación pueden variar de lote a lote.

Dada la necesidad de conocer el contenido de proteína de los preparados que se disponían para la realización de la tarea experimental de esta tesis, se emplearon dos

métodos para la cuantificación: uno, gravimétrico, basado en la precipitación de las proteínas y otro, de tipo colorimétrico, llevado a cabo con un kit comercial.

3.2.2.1. Método gravimétrico

Este método consiste en la precipitación de las proteínas contenidas en el preparado comercial mediante el empleo de un solvente orgánico, acetona, que lleva a la proteína de su forma soluble a una insoluble logrando su precipitación (García Román, 2005).

Experimental: una cierta cantidad de preparado comercial comprendida entre 150 y 300 mg fue introducida en un tubo de microcentrífuga (denominado comúnmente eppendorf), y luego se añadieron 2 ml de acetona. Tras agitar con vórtex, el sistema fue colocado en la centrífuga (500 rpm, 10 min) y el sobrenadante obtenido fue cuidadosamente retirado. El precipitado resultante fue llevado a estufa a 60 °C hasta peso constante. La cantidad de proteína se determinó cuantificando el material remanente.

3.2.2.2. Método Protí 2

Este método colorimétrico (Protí2, Wiener lab., Argentina) consiste en la determinación de la absorbancia en el espectrofotómetro UV/Vis a 540 nm de una solución, basado en la unión de los iones cobre de una solución alcalina (EDTA/Cu en NaOH) a la proteína. La absorbancia es proporcional a la concentración de proteína, por lo cual requiere de la realización de una curva de calibrado; en este caso se utilizó un suero patrón de albúmina de concentración conocida. Dado que este método fue seleccionado como el más adecuado para la cuantificación de proteínas entre varios ensayos durante el transcurso de esta tesis, la técnica paso a paso es descripta en el Capítulo 2.

3.3. Estudio de actividad: Hidrólisis

La función natural de las lipasas es la hidrólisis de enlaces éster; por ende, al actuar sobre los triglicéridos dan como productos ácidos grasos libres, diglicéridos, monoglicéridos y, si la reacción es completa, glicerol (Fig.3.3).

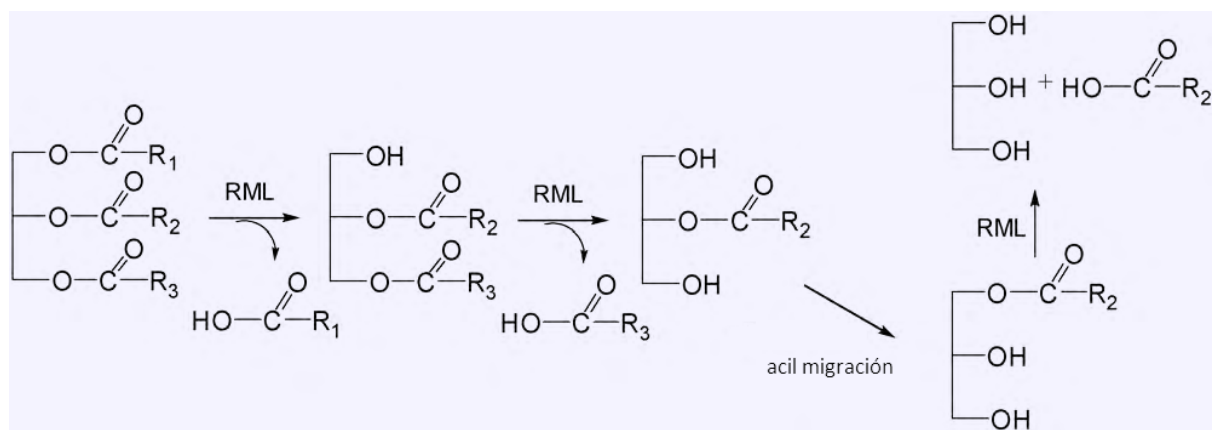


Figura 3.3. Esquema general de la hidrólisis completa de triglicéridos catalizada por lipasas de *Rhizomucor miehei* para producir ácidos grasos libres.

Adicionalmente, la hidrólisis consiste en la reacción primaria para dar lugar a la posterior esterificación. Ambos pasos resultan necesarios en varios procesos enzimáticos como la interesterificación, la acidólisis y la transesterificación. Teniendo presente estos aspectos, se decidió evaluar la capacidad hidrolítica de las lipasas de *Rhizomucor miehei* como una manera de caracterizar el preparado comercial que se utilizó; por un lado, para determinar si las lipasas se encontraban activas, ya que si las condiciones de transporte y almacenamiento no fueron las adecuadas podría haber ocurrido la desactivación de las enzimas. Cabe mencionar que en la ficha técnica del producto aparece la actividad promedio de la lipasa, 20000 LU/g, pero no se menciona en que condiciones fue determinada. En consecuencia, el sustrato y las condiciones para ensayar la hidrólisis fueron seleccionados en base a los empleados en trabajos anteriores.

3.3.1. Hidrólisis de Trioleína

En los antecedentes de reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas, por lo general se emplean triglicéridos como tributirina (Bjurlin et al., 2001; Noel y Combes, 2003; Jurado et al., 2006) o de cadena más larga como trioleína (Šinkūnienė et al., 2011), con máximo grado de pureza. Dado que en la reacción de interés de esta tesis, la acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados, se requiere que inicialmente se hidrolicen los ácidos grasos insaturados oleico y linoleico, se decidió al empleo de un sustrato que contenga uno de estos, de forma de representar más adecuadamente el sistema real. De este modo, la

actividad hidrolítica fue evaluada por el método de titulación en continuo, siguiendo el procedimiento descrito por Noel y Combes (2003), reemplazando tributirina por trioleína.

Experimental: La mezcla de reacción consistió en 0.1 g de trioleína (C18:1, cis-9) de 65% de pureza (Sigma), añadidos a una mezcla emulsionante formada por NaCl (17.9 g/L), KH_2PO_4 (0.41 g/L), glicerol (54% v/v) y goma arábica (6 g/L). Esta mezcla fue emulsionada en un homogeneizador Pro Scientif 200 a 9000 rpm durante 6 minutos y luego colocada en un baño de agua para mantener la temperatura constante a 30 °C. Posteriormente, una masa conocida del preparado enzimático fue incorporada al sistema anterior ya en agitación. Los ácidos grasos liberados en el tiempo fueron titulados por la adición de una solución de NaOH 55 mM, manteniendo así el pH en un valor constante igual a 7.

La actividad hidrolítica fue calculada a partir de la pendiente de la curva de titulación. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como los μmoles de ácidos grasos liberados por 1 g de preparado enzimático en 1 minuto de reacción, en las condiciones ensayadas.

3.4. Estudio de actividad: Acidólisis

Como se mencionó en el capítulo introductorio de esta tesis, las lipasas de *Rhizomucor miehei* han sido ampliamente usadas para producir lípidos estructurados mediante la reacción de acidólisis. Numerosos estudios han demostrado que resultan ser entre muchas lipasas, de las más adecuadas para llevar a cabo esta reacción, no solo porque logran altos niveles de incorporación de los ácidos grasos deseados, sino también por su alta especificidad para actuar en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del esqueleto del glicerol, preservando la posición *sn*-2 (Fomuso y Akoh, 1998; Kim y Hills, 2006; Hamam y Shahidi, 2007). A modo de ejemplo, Fomuso y Akoh (1997) llevaron a cabo la acidólisis de trioleína con ácidos grasos caproico y butírico, y de nueve lipasas ensayadas de producción comercial, las de *Rhizomucor miehei* en forma inmovilizada (IM60) fueron las más efectivas. De este modo, las tareas experimentales que se detallan a continuación tuvieron como objetivo analizar el desempeño de las lipasas en la obtención de lípidos estructurados mediante la acidólisis de un triglicérido de tipo analítico, trioleína, y una mezcla de

triglicéridos heterogéneos, aceite de girasol, con ácidos grasos saturados como sustrato ácido.

3.4.1. Acidólisis de Trioleína

La capacidad las lipasas de *Rhizomucor miehei* en su estado libre para catalizar la acidólisis entre trioleína, de grado de pureza 65%, y la mezcla de ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, de composición 49-54% y 40-51% m/m respectivamente, empleando hexano como solvente, fue evaluada mediante la determinación de la composición de los ácidos grasos en los glicéridos de los productos de reacción. Esto se realizó llevando a cabo las reacciones a 30, 40 y 50 °C, para tiempos de reacción de 2 y 4 h.

Experimental: 0.4 g de trioleína y la cantidad correspondiente a una relación molar 6:1 de la mezcla de ácidos palmítico y esteárico (StPFA) respecto a trioleína, fueron introducidos en un tubo roscado, al que se le añadió 3.5 ml de hexano. Luego de mantener la mezcla de reacción en un baño de agua a temperatura para homogenizar los sustratos, 80 µL de preparado comercial de lipasa (4.42 mg de proteína) fueron agregados para comenzar la acidólisis. La mezcla fue agitada y mantenida a la temperatura deseada durante el tiempo especificado. La reacción terminó cuando la lipasa fue inactivada con acetona y removida del medio por filtración a través de sulfato de sodio. Los productos de reacción fueron almacenados a -20 °C hasta su posterior análisis. La composición en ácidos grasos de los lípidos estructurados obtenidos en los productos, se determinó según las técnicas descriptas en el Capítulo 2, previa purificación de las muestras (Secciones 2.3.6 y 2.3.7).

3.4.2. Acidólisis de Aceite de girasol

La capacidad de las lipasas de *Rhizomucor miehei* en su estado libre para catalizar la reacción de interés de esta tesis - la acidólisis entre aceite de girasol refinado, compuesto por triglicéridos heterogéneos, y la mezcla de ácidos grasos palmítico y esteárico - empleando hexano como solvente, fue evaluada mediante la determinación de la composición de los ácidos grasos en los glicéridos de los productos de reacción. Para ello, se determinaron las cinéticas de reacción cuando las mismas fueron realizadas a temperaturas de 30, 40 y 50 °C.

Experimental: el protocolo experimental y la metodología de análisis fue similar a lo descrito en la sección previa (3.4.1), solo que en vez de trioleína se utilizó aceite de girasol (SO).

3.4.2. 1. Modelado de la cinética de reacción de las lipasas libres

Se llevó a cabo un breve análisis de la cinética de la acidólisis catalizada por las lipasas de *Rhizomucor miehei* en su forma libre. Esto se realizó, por un lado, con el fin de comprender el efecto que tienen la temperatura y el tiempo sobre la velocidad de reacción, y por el otro, para poder realizar las comparaciones pertinentes con la cinética asociada a la misma enzima en su estado inmovilizado. La variable analizada fue la incorporación de ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, respecto al total de ácidos grasos en los glicéridos, del producto de reacción. Esta variable, denominada F_M en su forma abreviada, se calculó en base a las composiciones molares del producto y del aceite original, según la siguiente ecuación:

$$F_M = (P + St)_{t=t} - (P + St)_{t=0} \quad (3.1)$$

donde $P+St$ refiere a la composición molar de ácidos grasos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en los glicéridos, y t es el tiempo de reacción.

El modelo más sencillo disponible en la literatura para representar en acidólisis la incorporación de los ácidos grasos reactantes con el tiempo de reacción, es el propuesto por Xu et al. (1998). Éste se desarrolló observando que la curva que describe el comportamiento de dicha incorporación versus el tiempo de reacción, tiene una forma similar a la representada por la ecuación de Michaelis- Menten. Al reemplazar en ésta la velocidad de reacción por la incorporación y la concentración de sustratos por el tiempo se tiene la expresión que aquí se denomina Modelo I, el cual consiste en representar F_M en el tiempo y hallar una constante K_I propia del sistema. Por otro lado, cuando el sistema reactivo presenta un periodo inicial de retraso, dicha expresión puede corregirse con un parámetro n y así obtener el denominado Modelo I modificado. Las ecuaciones que representan a ambos, respectivamente, son:

$$F_M = \frac{F_{Me} \cdot t}{K_I + t} \quad (3.2)$$

$$F_M = \frac{F_{Me} \cdot t^n}{K_I^n + t^n} \quad (3.3)$$

donde F_{Me} corresponde a la incorporación lograda en el equilibrio, t es el tiempo de reacción, y K_I y n son parámetros de ajuste.

3.5. Resultados y Discusiones

3.5.1. Contenido de proteína del preparado comercial

La cantidad de proteína en el preparado de lipasa comercial (CLP) determinado por el método gravimétrico condujo a un valor de 43.95 ± 0.88 % (m/m). Este valor fue obtenido analizando dos lotes diferentes (denominados RM08 y RM09) con 3 réplicas por muestra.

Por otro lado, los valores obtenidos empleando el método de Proti 2 fueron de 55.28 ± 1.34 mg/g de CLP para el lote RM09, y de 76.22 ± 3.35 mg/g de CLP para el lote RM10. Ambos valores corresponderían a un 5.5 % y a un 7.6 % (m/m). En este caso también se realizaron 3 réplicas por muestra. Cabe aclarar, que la determinación de proteína sobre los distintos lotes de CLP fue realizada según el método que se disponía al momento de realizar el análisis.

Como puede notarse al comparar ambos métodos, existe una muy amplia diferencia entre los valores hallados para el contenido de proteína. No obstante, si se toma como guía los valores reportados en otros trabajos para el mismo preparado enzimático comercial, es posible definir cual es más certero. Bjurlin et al. (2001) encontró mediante el método de Kjeldahl, 0.6 % (m/m) en el CLP de Palatase 20000L. Por su parte, Oliveira y Rosa (2006) reportaron para este mismo un contenido de proteína de 18.4 mg/ml (aproximadamente 0.15 % m/m). Ambos reportes muestran contenidos menores a los hallados por el método

de Proti 2, lo que estaría relacionado a la variabilidad propia del producto biológico. Aún así, en todos los casos la cantidad de proteína en los preparados fue baja.

3.5.2. Hidrólisis de Trioleína

La capacidad hidrolítica de las lipasas fue medida en función de la actividad inicial registrada a partir de la curva de titulación, donde cada μmol de NaOH adicionado neutralizó la misma cantidad de ácido oleico liberado por la enzima (Fig.3.4). Las concentraciones del preparado comercial de lipasa en el medio de reacción que se emplearon en cada una de estas determinaciones estuvieron comprendidas entre 0.25 - 1.06 g/L. Tal como se puede apreciar en la Fig. 3.5, las actividades se encontraron en el rango de 137.5 U/g a 86.6 U/g, respecto a los valores anteriores de concentración empleada. Esta determinación reveló que en el rango de concentraciones estudiadas, la actividad específica de la lipasa de *Rhizomucor miehei* disminuye al aumentar su concentración en el medio de reacción. Para corroborar que el factor limitante no fuera la disponibilidad de sustrato, en un ensayo adicional se aumentó en un factor de 4 la masa de trioleína y se encontró que la actividad no sufría variaciones. En consecuencia, este efecto de disminución de la actividad con el aumento de la cantidad de lipasa en el medio de reacción podría explicarse teniendo presente que la formación de agregados bimoleculares podría haber tenido lugar, haciendo que menos lipasa relativa estuviera disponible para actuar sobre la trioleína.

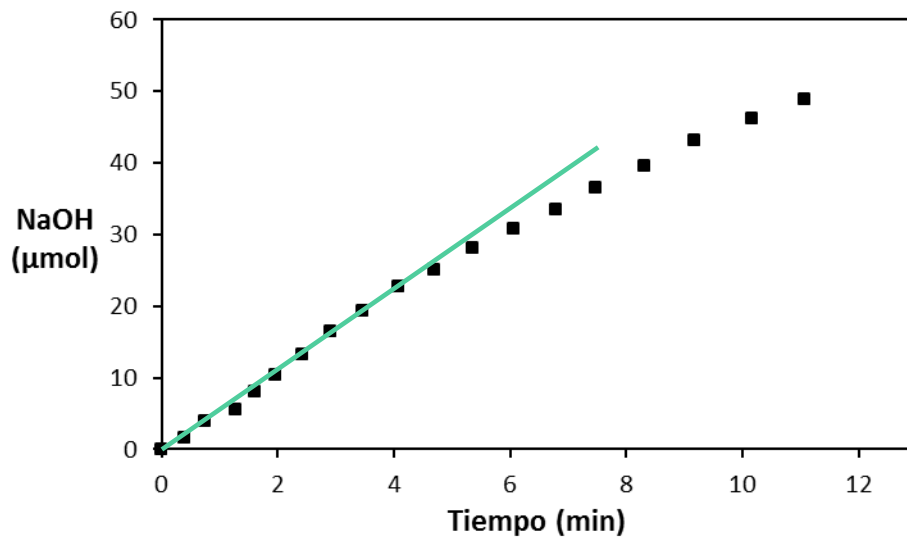


Figura 3.4. Determinación de la actividad hidrolítica mediante la curva de titulación.

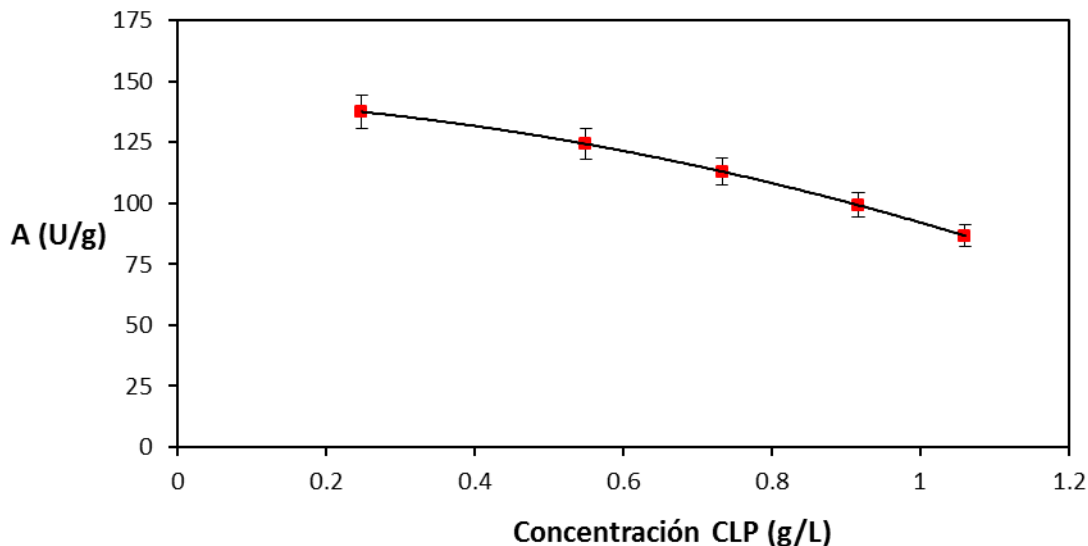


Figura 3.5. Hidrólisis de trioleína empleando diferentes concentraciones de preparado comercial de lipasas (CLP) de *Rhizomucor miehei* en el medio de reacción. Las condiciones de reacción son detalladas en la Sección 3.3.1.

Por otra parte, al comparar la actividad catalítica encontrada con la reportada por el proveedor, en condiciones desconocidas, (20000 LU/g) y en otros estudios (Noel y Combes, 2003; Jurado et al., 2006), ésta resultó significativamente menor. Noel y Combes (2003) reportan 116 U/mg. Dado que se emplearon las mismas condiciones usadas por dichos autores, salvo por el triglicérido y la fuente de lipasas (los autores emplearon tributirina

como sustrato y lipasas de *Rhizomucor miehei* en polvo (Fluka) previamente solubilizadas) las diferencias pueden atribuirse a cualquiera de estas dos fuentes. Por un lado, el empleo como sustrato de un triglicérido con ácidos grasos de cadena mucho más larga (18 C del ácido oleico respecto a los 4 C del ácido butírico) podría haber significado para la lipasa un compuesto más difícil al cual acceder desde el punto de vista estérico. Adicionalmente, podría haber sucedido que el preparado empleado en esta tesis contuviera menor cantidad de proteína activa.

Šinkūnienė et al. (2011) realizaron la hidrólisis de trioleína en un medio conteniendo hexano y buffer fosfato como solventes, empleando distintas clases de enzimas comerciales (Palatase® 20000L, Lecitase® Ultra (fosfolipasa A1), Lipopan™ F BG (lipasa de *Fusarium oxysporum*), Lipopan™ 50 B (lipasa de *Thermomyces lanuginosus*)). Si bien las condiciones empleadas para cuantificar la actividad fueron diferentes y por ende no se pudieron realizar comparaciones, en este estudio se reportó que la lipasa más adecuada para hidrolizar trioleína fue Palatase, lo que demostraría que el empleo de la misma aseguraría su capacidad para llevar a cabo el primer paso de reacción necesario en la acidólisis de aceite de girasol.

Dado que los objetivos que motivaron la realización de la hidrólisis de trioleína no pudieron cumplirse, ya sea por falta de información de parte de proveedores o por no contar con suficientes antecedentes de sistemas de reacción en los que se emplea *Rhizomucor miehei* libre en conjunto con trioleína, se decidió evaluar directamente la capacidad catalítica de las lipasas en la reacción de acidólisis.

3.5.3. Acidólisis de Trioleína

La composición mayoritaria en ácidos grasos de los glicéridos de la trioleína, determinada como metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía gaseosa fue de: 4.65% de palmítico, 0.80% de esteárico, 66.40% de oleico y 8.00% de linoleico. La composición en ácidos grasos de interés, palmítico y esteárico, de los lípidos estructurados obtenidos a partir de la trioleína se muestra en las Figs. 3.6.A y 3.6.B. Como puede observarse, el contenido de ambos ácidos grasos aumentó con el tiempo de reacción y alcanzó los valores

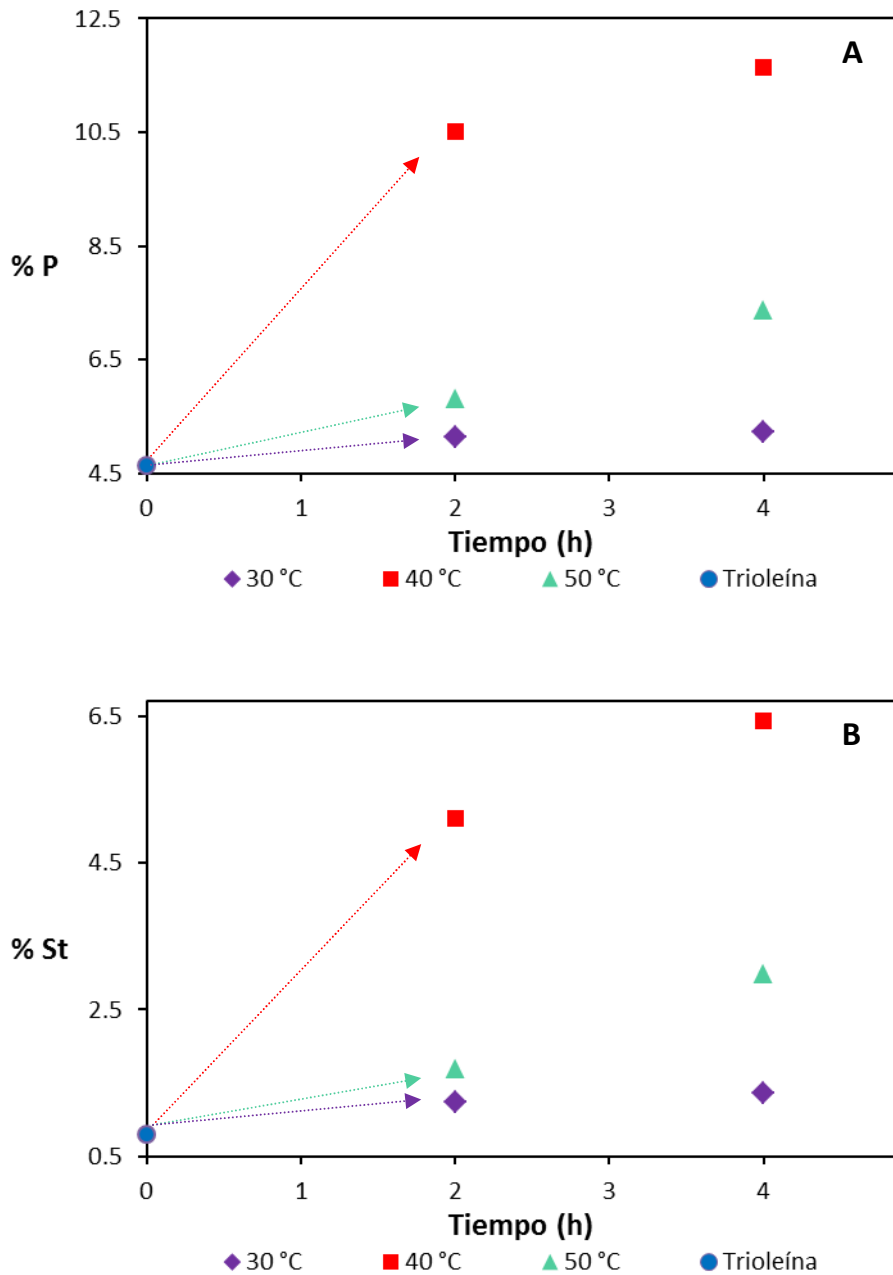


Figura 3.6. A) Composición de ácido palmítico en los glicéridos (% P, m/m) y B) Composición en ácido esteárico en los glicéridos (% St, m/m), de los productos de acidólisis de trioleína, en función del tiempo y la temperatura de reacción. Las condiciones de reacción son detalladas en la Sección 3.4.1.

más altos cuando la reacción se realizó a 40°C, lo que resulta acorde al valor reportado como temperatura óptima de la lipasa (Šinkūnienė et al., 2011). En estas condiciones y tras 4 horas de reacción, con la lipasa libre de *Rhizomucor miehei* se logró un lípido estructurado con 11.63% de ácido palmítico y 6.44% de ácido esteárico, lo que representa una incorporación respecto a la composición inicial de 150.37% y 704.26%, respectivamente. Esto demostró que las lipasas libres resultan aptas para la obtención de lípidos modificados a través de trioleína. Una conclusión similar fue reportada por Hamam y Shahidi (2007), quienes llevaron a cabo la acidólisis de trioleína empleando lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas (Lipozyme RM IM), logrando composiciones de hasta 31 % (m/m) de ácido esteárico luego de 24 h de reacción.

Respecto a la preferencia de la lipasa por incorporar un ácido graso saturado u otro, considerando la composición inicial y final, tras 4 horas de reacción, 6.98 % de ácido palmítico y 5.64 % de ácido esteárico fue el cambio hallado, lo que indicaría que prácticamente la lipasa en estas condiciones no establece diferencias entre ambos.

3.5.4. Acidólisis de Aceite de girasol

La composición en ácidos grasos de los glicéridos del aceite de girasol, como se especificó en el capítulo anterior fue de: 6.32 % de ácido palmítico, 3.23 % de ácido esteárico, 30.97 % de ácido oleico y 56.60 % de ácido linoleico, representando el punto de partida para la modificación llevada a cabo por las lipasas libres de *Rhizomucor miehei*, en las distintas condiciones ensayadas.

3.5.4.1. Efecto del tiempo y la temperatura de reacción

Como puede apreciarse en las Figs. 3.7.A y 3.7.B, la mayor incorporación de ácidos grasos saturados tuvo lugar cuando la reacción se llevó a cabo a 40 °C, tal como sucedió cuando se empleó trioleína. Las reacciones realizadas a 30 °C siguieron la tendencia de la anterior logrando menor incorporación final; a 50 °C pareció presentar una tendencia lineal entre la composición alcanzada de los ácidos grasos de interés, palmítico y esteárico, y el tiempo de reacción. Por otra parte, también puede notarse como para las primeras horas de reacción (hasta la hora 4) no hay prácticamente diferencias por realizar las reacciones a

diferentes temperaturas, y los niveles de incorporación son bajos. Después de ese tiempo sí se aprecia un efecto marcado dado por la temperatura de reacción. Tras 24 horas de reacción y a 40°C, las lipasas lograron un producto con una composición de 25.06% de ácido palmítico y 22.46% de ácido esteárico, lo que significó una incorporación respecto a la composición inicial del 297 y 598 %, respectivamente.

Al comparar la incorporación lograda a 40°C para tiempos cortos de reacción, hasta 4 h, cuando se usó aceite de girasol en lugar de trioleína se observa que la modificación fue mucho menor, dejando ver que la enzima actuó mas rápido cuando el sustrato fue trioleína. Para poder explicar este hecho, se analizó el índice de peróxidos en ambos sustratos, y se halló que los valores correspondientes a la trioleína y al aceite eran, 10.38 y 103.32 mEq. O₂/kg, respectivamente. Sin duda este mayor contenido de peróxidos, productos de la degradación por oxidación de los sustratos grasos y que resultan perjudiciales para la actividad de las lipasas, podría haber tenido un efecto inicial de inhibición (Costales y Fernández, 2009). Otra posible explicación podría ser que las lipasas hayan tenido mayor afinidad por hidrolizar la trioleína que los triglicéridos mayoritarios del aceite que contienen linoleína, lo que llevaría a una velocidad de reacción global en la acidólisis mucho mayor.

El efecto de la temperatura sobre la acidólisis de aceite de girasol catalizada por las lipasas libres se puede apreciar mejor cuando se representa la composición de ácidos palmítico y esteárico para los productos, tras 24 h de reacción (Fig. 3.8). Como ya se mencionó, la mayor incorporación se logró trabajando a la temperatura óptima de la enzima; así en orden decreciente de actividad se tiene 40>30>50>60 °C. La menor actividad encontrada a las mayores temperaturas ensayadas probablemente estuvo asociada a la parcial desactivación de las lipasas.

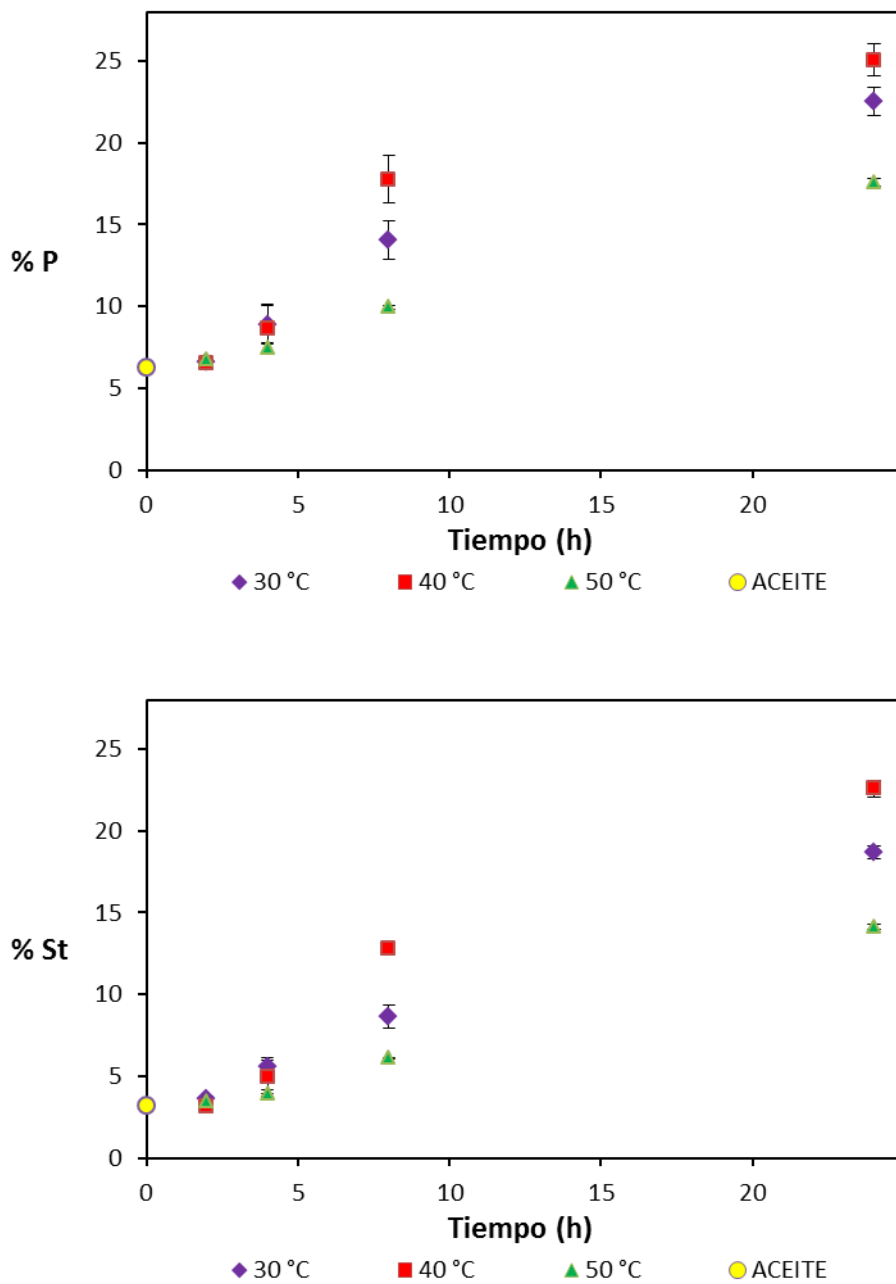


Figura 3.7. A) Composición de ácido palmítico en los glicéridos (% P, m/m) y B) Composición de ácido esteárico en los glicéridos (% St, m/m), de los productos de acidólisis de aceite de girasol, en función del tiempo y de la temperatura de reacción. Las condiciones de reacción son detalladas en la Sección 3.4.2.

En la mayoría de los antecedentes existentes, por no decir la totalidad, sobre estudios en reacciones de acidólisis llevadas a cabo por lipasas de *Rhizomucor miehei* en donde se evalúa el efecto de la temperatura de reacción, se ha empleado la lipasa en su forma inmovilizada (Yankah y Akoh, 2000). Por lo cual, no se puede realizar una comparación ni validación del perfil encontrado, ya que la inmovilización por lo general da lugar a derivados enzimáticos más estables térmicamente que la lipasa libre. Yang et al. (2010) mostraron el corrimiento de las curvas de temperatura cuando en vez de emplear la lipasa *Candida antarctica* libre en la hidrólisis de aceite de oliva, se usaban las formas inmovilizadas. Este estudio también dejó ver que la curva correspondiente a la enzima libre resultó muy similar a la reportada en la Fig. 3.8, aunque fuese otra clase de lipasa.

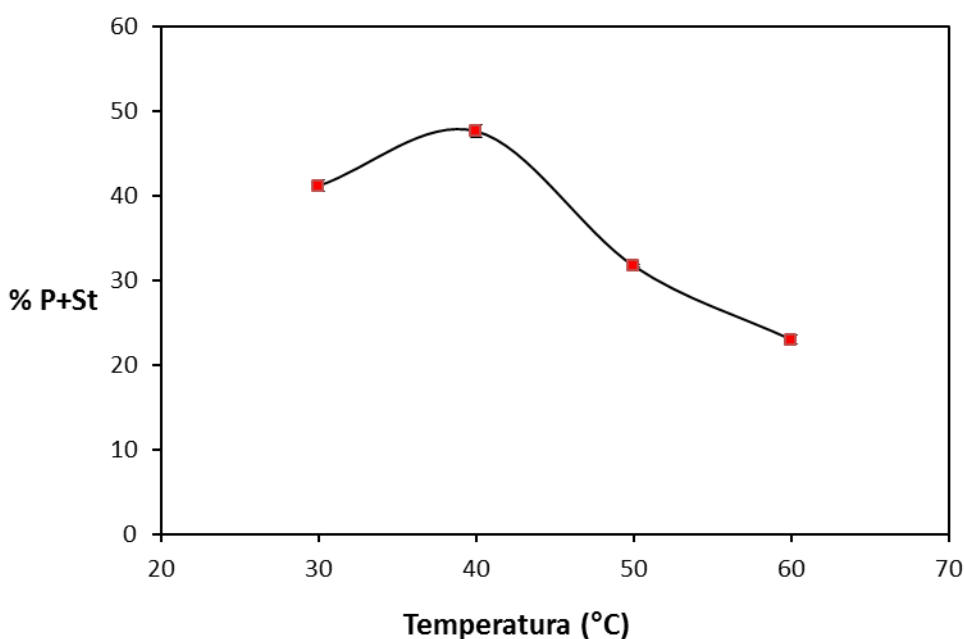


Figura 3.8. Composición de ácidos palmítico y esteárico (% P+St) en los productos de acidólisis de aceite de girasol en función de la temperatura de reacción. Las condiciones de reacción son las detalladas en la Sección 3.4.2, para un tiempo de 24h.

3.5.4.2. Perfil de ácidos grasos en los productos de reacción

Teniendo presente que hasta el momento solo se ha hecho referencia a los ácidos grasos palmítico y esteárico, por ser estos los que se desean incorporar a la estructura original del triglicérido, el perfil de evolución de los mismos junto con el de los ácidos oleico y linoleico, restantes ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite de girasol, se incluye en esta sección. De este modo, la Fig. 3.9 muestra la variación en la composición de estos 4 ácidos grasos en el tiempo, para la temperatura de reacción óptima, 40 °C. Como puede apreciarse, a tiempo cero se tiene la composición original del aceite de girasol donde los ácidos insaturados linoleico y oleico son los mayoritarios representando el 97.6% del total. A medida que la reacción transcurre estos son removidos de los glicéridos dando lugar a la posterior incorporación de los ácidos palmítico y esteárico, aumentando así la cantidad de estos ácidos en el producto. El cambio en ácido linoleico al finalizar la reacción fue de 56.60 a 33.24%, y en ácido oleico de 30.97 a 16.92 %, lo que implica una remoción del 41.27 y del 45.37%, respectivamente. El hecho de que el ácido oleico haya sido el más removido, a pesar de no ser el mayoritario, podría revelar una mayor afinidad de las lipasas por hidrolizar este compuesto o deberse a que este ácido graso se distribuye de forma prácticamente similar entre las tres posiciones del glicerol (32.29 % del contenido total de ácido oleico se encuentra en la posición *sn-2*), mientras que el ácido linoleico lo hace con una leve preferencia en la posición *sn-2* (38.28 % del contenido total de ácido linoleico se encuentra en la posición *sn-2*); por ende, la lipasa *sn-1,3* específica hidrolizaría, en proporción, más ácido oleico que linoleico. Sin embargo, la composición de estos ácidos grasos en las posiciones externas (*sn-1,3*) de los glicéridos presentes en el aceite también mostraron mayor proporción de ácido linoleico que oleico (34.93 % y 20.97 %, respectivamente), desestimando así la segunda hipótesis.

De esta manera se remarca que, cada vez que se haga mención a un incremento en la composición de los ácidos palmítico y esteárico, se estará indicando implícitamente que hay asociada una disminución correspondiente de los ácidos oleico y linoleico.

En lo que se refiere a la preferencia por incorporar un ácido graso saturado sobre otro, considerando las composiciones iniciales (aceite) y finales de cada uno, se halló un

cambio de 18.74 % para palmítico y un 19.23 % para esteárico. Teniendo presente los desvíos asociados a los puntos experimentales esta diferencia no fue significativa ($P > 0.05$); lo cual significaría que, en las *condiciones de reacción ensayadas*, la lipasa resultó no mostrar especificidad por incorporar un tipo específico de ácido graso saturado (entre los utilizados, palmítico de 16 C y esteárico de 18 C).

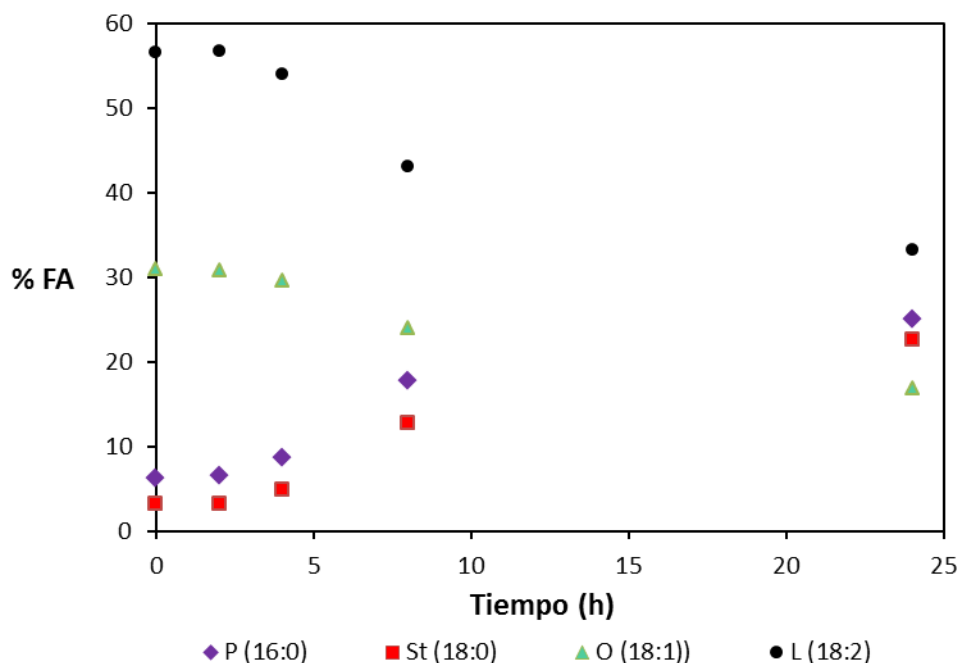


Figura 3.9. Composición de ácidos grasos (% FA) en los productos de acidólisis de aceite de girasol, en función del tiempo. Ácidos palmítico (P), esteárico (St), oleico (O) y linoleico (L).

3.5.4.3. Efecto de la cantidad de lipasa en el medio de reacción

El efecto de la cantidad de preparado enzimático en el medio de reacción empleado para la acidólisis de aceite de girasol y ácidos grasos saturados, pudo notarse cuando se realizaron ensayos independientes para comparar la actividad de la lipasa libre e inmovilizada. En esa oportunidad se emplearon dos cantidades distintas de preparado comercial de lipasa que contenían 4.42 y 38.08 mg de proteína, ambas determinadas por el método de Proti 2.

Los resultados de ambas reacciones se muestran en la Fig.3.10, donde se ve claramente que la mayor composición de ácidos palmítico y esteárico (46.38 %) se alcanzó con la menor cantidad de proteína en el medio. Este comportamiento se correspondió con los resultados obtenidos durante la hidrólisis de trioleína, y por ende puede explicarse también teniendo presente que una mayor cantidad de lipasas en el sistema generó una mayor cantidad de agregados bimoleculares inactivos.

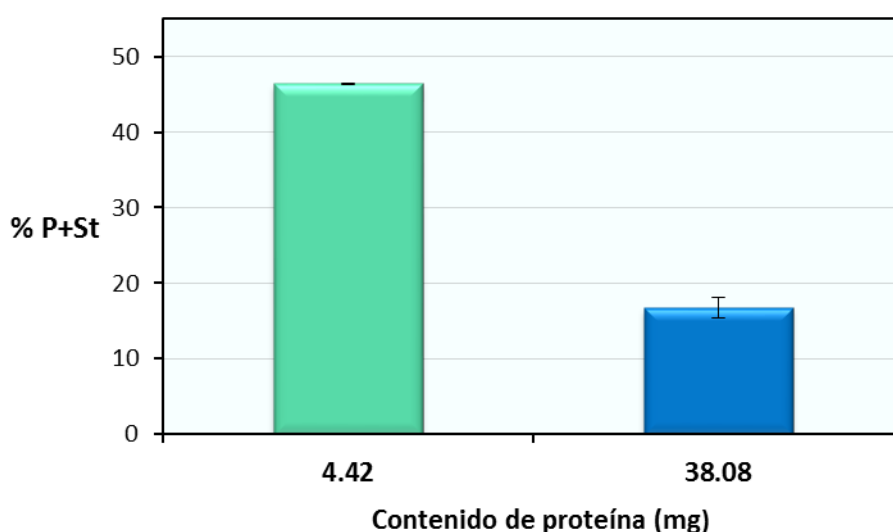


Figura 3.10. Efecto del contenido de proteína en el medio de reacción sobre la composición de ácidos grasos palmítico y esteárico en el lípido estructurado. Condiciones de reacción: 6 mol StPFA/mol SO, 3ml hexano/g sustrato, 33 mg de proteína/g sustrato, a 60°C y 24h.

3.5.4.4. Modelado de la cinética de reacción de las lipasas libres

Al representar los resultados de la acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados en términos de la variable F_M se puede visualizar claramente la cantidad total de ácidos grasos introducidos por la lipasa al triglicérido original (Fig. 3.11). De esta forma, tras 24 h de reacción a la temperatura óptima (40°C), puede apreciarse que casi el 40 % de los ácidos grasos presentes han sido incorporados por la enzima. Por otra parte, también se observa claramente para las tres temperaturas analizadas la baja incorporación lograda a tiempos cortos de reacción y las formas sigmoidales de las curvas obtenidas. Cuando se intentó modelar este comportamiento empleando la ecuación correspondiente al Modelo I (Ec. 3.2), las curvas generadas no lograron ajustar los puntos experimentales correctamente.

Por esa razón, se decidió el empleo de la Ec. 3.3, una forma modificada del Modelo I donde se incorpora una constante adicional, n . Cuando la misma fue aplicada se lograron describir los puntos experimentales con un excelente nivel de correlación, como puede observarse en la misma figura. Los valores correspondientes a los parámetros de este modelo, F_{Me} , K_i y n , y al coeficiente de correlación R^2 asociado al modelo se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2.

Parámetros del Modelo I Modificado (Ec. 3.3) para cada temperatura de reacción ensayada y el coeficiente de determinación correspondiente.

T (°C)	F_{Me} (% molar)	K_i (h)	n	R^2
30	38.97	10.926	1.982	0.9975
40	39.42	7.570	3.360	0.9997
50	32.72	15.945	1.973	0.9996

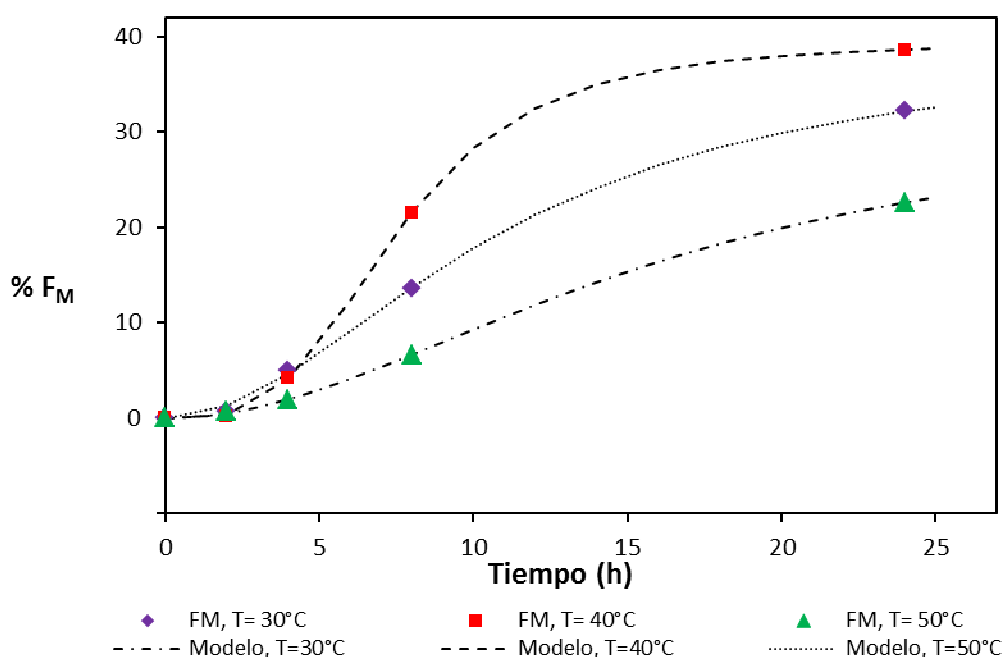


Figura 3.11 Perfil de incorporación de ácidos grasos saturados (% F_M) durante la reacción de acidólisis de aceite de girasol, en función del tiempo y la temperatura. Las condiciones de reacción son las detalladas en la Sección 3.4.2. Datos experimentales (puntos) y ajuste según Modelo I modificado (líneas).

La existencia de este periodo de muy baja incorporación a tiempos cortos de reacción ha sido también observado por Camacho Páez et al. (2002), quienes lo denominaron "periodo lag". Ellos emplearon lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas (Lipozyme IM) para la acidólisis entre aceite de hígado de bacalao y ácido caprílico en un reactor de lecho empacado y observaron que mientras menor era el contenido de agua del biocatalizador, mayor era la duración de la fase lag. Ellos sugirieron que ese tiempo es el que se requiere para la formación del equilibrio entre el agua del medio fluido, de saturación del solvente y la consumida por la formación de una poca cantidad de diglicéridos, y la capa de agua que rodea al sistema soporte-enzima. Teniendo en cuenta esto y considerando que las lipasas empleadas en los ensayos realizados se encontraban en su estado soluble, se podría pensar que durante el periodo lag la lipasa, también en este caso, interactuó con las moléculas de agua del medio previamente a mostrar actividad enzimática. De este modo, tuvo lugar la formación de una capa de hidratación que actuó como componente primario del microambiente de la enzima en el medio orgánico. Una vez que la lipasa se hidrató y tomó su conformación activa aumentó su poder catalítico acelerando la velocidad de reacción (Camacho Páez et al., 2003). La mayor fuente de agua incorporada al sistema provino del preparado comercial de lipasa, el cual contiene alrededor de 50% de agua, según lo informado por Bjurlin et al. (2001). Dado que las condiciones a las que fueron llevadas a cabo las reacciones fueron las mismas, solo se varió la temperatura y el tiempo, es de esperar que todos los sistemas hayan tenido el mismo contenido de agua. El parámetro asociado al tiempo que dura la fase lag es n ; un valor de $n=1$ implica que no hay fase lag, y a medida que aumenta n se incrementa la duración del periodo sin actividad. Asimismo, este parámetro influye también en la velocidad de reacción que sigue al periodo lag y en el punto final que describe la curva. Para 30 y 50 °C se pudo observar prácticamente el mismo valor de n , pero a 40 °C difirió. Esto probablemente se debió a que en las temperaturas extremas, si bien las incorporaciones de equilibrio predichas no fueron similares, las velocidades de reacción pseudo-iniciales exhibieron un comportamiento análogo, generando globalmente una compensación en el valor de n obtenido. Los puntos experimentales pueden ser ajustados con el Modelo 1 si se corrigen los tiempos descontando el periodo lag. En este caso el mejor ajuste se obtuvo, para todas las

temperaturas, al restar un valor de 3.4 h que coincidió con el n asociado a 40 °C. En este caso, se obtienen las curvas graficadas en la Fig.3.12, siendo los parámetros F_{Me} , K_I , y el R^2 correspondientes los que se muestran en la Tabla 3.3. Como puede verse los ajustes dados por este modelo también fueron satisfactorios.

Tabla 3.3.

Parámetros del Modelo I para cada temperatura de reacción ensayada y el coeficiente de determinación correspondiente.

T (°C)	F_{Me} (% molar)	K_I (h)	R^2
30	46.84	10.001	0.9881
40	50.27	6.194	0.9999
50	40.85	19.075	0.9915

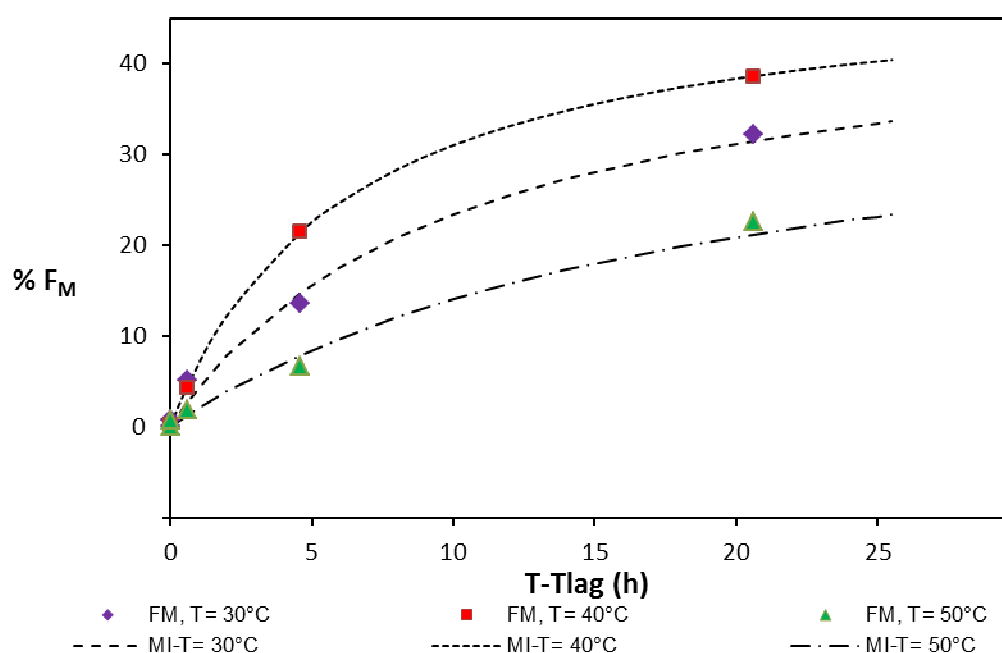


Figura 3.12 Perfil de incorporación de ácidos grasos saturados (% F_M) durante la reacción de acidólisis de aceite de girasol en función del tiempo, descontando el período lag, y la temperatura. Las condiciones de reacción son las detalladas en la Sección 3.4.2. Datos experimentales (puntos) y ajuste según Modelo I (líneas).

Al comparar los parámetros de ajuste del Modelo I Modificado con los del Modelo I, se ve que el primero predice menores niveles de incorporación para el equilibrio (F_{Me}) que el segundo. Por otro lado, los valores de K_I resultaron similares para cada temperatura, salvo

para $T=50^{\circ}\text{C}$. De esta forma queda manifiesto que los modelos representan satisfactoriamente el comportamiento real para los rangos de tiempo sobre los que se definieron; para poder predecir incorporaciones a mayores tiempos se requeriría de ensayos adicionales efectuados en la zona del equilibrio.

3.6. Conclusiones

Las lipasas de *Rhizomucor miehei* producidas en *Aspergillus oryzae* demostraron ser, en su estado libre, catalizadores altamente eficaces para la producción de lípidos estructurados, debido al alto grado de incorporación de ácidos grasos saturados, alcanzando un 40 % en la mejor condición. Una ventaja respecto a otros catalizadores es la baja temperatura óptima de la misma, ya que, trasladado este proceso a escala industrial se operaría a bajos costos energéticos.

En lo que respecta al comportamiento de la lipasa estudiada frente a dos sustratos distintos, trioleína y aceite de girasol en idénticas condiciones y para mismos tiempos, se encontró que la modificación fue mayor en el primer sustrato con una composición más alta en ácido oleico. Cabe mencionar que este comportamiento podría haberse visto afectado por el alto valor de peróxidos encontrado en el aceite.

Adicionalmente, pudo notarse como la formación de agregados bimoleculares en la lipasa es un fenómeno que se hace más notable a mayor contenido de lipasa en el medio de reacción, lo cual conlleva a reducciones en la actividad tanto en la reacción de hidrólisis como en la de acidólisis. Este comportamiento podría ser evitado empleando la lipasa en su forma inmovilizada.

Por otra parte, la preferencia por remover ácido oleico antes que linoleico por parte de *Rhizomucor miehei* podría explicarse en base a las interacciones que surgen a nivel microscópico, entre la lipasa, el medio y el sustrato, usando como herramienta el modelado molecular, este queda aquí planteado como un posible trabajo a futuro.

En lo que al modelado de la cinética de acidólisis se refiere, se lograron modelos que describieron con aceptable precisión el comportamiento para las temperaturas ensayadas, los cuales pueden ser empleados para comparación con las cinéticas de la enzima inmovilizada.

3.7. Referencias

Alcántara A.R., de Fuentes I.E, Sinisterra J.V., *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview, *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1998) 169-184.

Berry, D. R., Paterson A., *Enzymes in the Food Industry* en *Enzyme Chemistry - Impact and Applications*, 2nd Ed., 340-342. C.J. Suckling (Ed.) Chapman and Hall, London, (1990).

Bjurlin M.A., Bloomer S., Haas M. J., *Composition and Activity of Commercial Triacylglycerol Acylhydrolase Preparations*, *Journal of the American Oil Chemistry Society* 78 (2001) 153-160.

Borgstrom, B., Brockman, H.L., *Lipases*, Elsevier, Amsterdam (1984).

Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling , Høge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L., *A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex*, *Nature* 351 (1991) 491-494.

Camacho F., Roble A., Camacho B., González P. A., Esteban L., Molina E., *Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor*, *Chemical Engineering Science* 62 (2007) 3127-3141.

Camacho Páez B., Robles Medina A., Camacho Rubio F., González Moreno P., Molina Grima E., *Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-*

catalyzed reactions in organic solvents, *Enzyme and Microbial Technology* 33 (2003) 845-853.

Carrín M.E., Crapiste G. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture, *Journal of Food Engineering* 84 (2008) 243–249.

Castro, H.F. y Anderson, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipase, *Química Nova* 18 (1995) 544-554.

Costales, R. y A. Fernández. Hidrogenación e interesterificación. *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. J. M. BlockyD. Barrera-Arellano. San Pablo, Brasil, Editorial Blücher, Vol. 1, (2009).

Fomuso L., Akoh C., Enzymatic modification of triolein: Incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (1997) 3269-272.

Fomuso L., Akoh C., Structured lipids: Lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998) 405-410.

García Román M., Hidrolisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes, Tesis doctoral, (2005).

Hamam F., Shahidi F., Enzymatic Incorporation of Selected Long-Chain Fatty Acids into Triolein, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84 (2007) 533-541.

Huge-Jensen B., Andreasen F., Chdstensen T., Chdstensen M., Thim L. , Boel E., *Rhizomucor miehei* Triglyceride Lipase Is Processed and Secreted from Transformed *Aspergillus oryzae*, *LIPIDS* 24 (1989) 781-785.

Jurado E., Camacho F., Luzón G., Fernández-Serrano M., García-Román M., Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions, *Chemical Engineering Science* 61 (2006) 5010-5020.

Kim I-H., Hill C.G. Jr, Lipase-Catalyzed Acidolysis of Menhaden Oil with Pinolenic Acid, *Journal of the American Oil Chemistry Society* 83 (2006) 109-115.

IUPAC-IUB (1979). Commission on nomenclature, *Enzyme nomenclature* Academic Press, NY, 6-19.

Macrae, A. R., Hammond, R. C., Present and future application of lipases, *Biotechnology Letters* 9 (1987) 601-604.

Monsalve, L. N., Gillanders, F. and Baldessari, A., Promiscuous Behavior of *Rhizomucor miehei* Lipase in the Synthesis of *N*-Substituted β -Amino Esters, *European Journal of Organic Chemistry* 201 (2012) 1164 -1170.

Mukherjee, K. D., Plant lipases and their application in lipid biotransformations, *Progress in Lipid Reserch* 33 (1994) 165-174.

Noel M., Combes D., Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability, *Journal of Biotechnology* 102 (2003) 23-32.

Oliveira M. R., Enzymatic transesterification of sunflower oil in an aqueous-oil biphasic system, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83 (2006) 21-25.

Palomo J.M., Ortiz C., Fuentes M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions, *Journal of Chromatography A* 1038 (2004) 267-273.

Peters G. H., Olsen O. H., Svendsen A., Wade R. C., Theoretical Investigation of the Dynamics of the Active Site Lid in *Rhizomucor miehei* Lipase, *Biophysical Journal* 71 (1996) 119-129.

R. Fernandez-Lafuente, P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1998) 185-197.

Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010) 15-32.

Šinkūnienė D., Bendikienė D., Juodka D., Response surface methodology-based optimization of lipase-catalyzed triolein hydrolysis in hexane, *Romanian Biotechnological Letters* 16 (2011) 5891-5901.

Xu X., Mu H., Skands A., Høy C., & Adler-Nissen, J. ,Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification, *Journal of the American Oil Chemistry Society* 76 (1999) 175-181.

Yang J., Ma X., Zhang Z., Chen B., Li S., Wang G., Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption-cross-linking methods: A comparative study, *Biotechnology Advances* 28 (2010) 644-650.

**Certificado de análisis del preparado comercial de la lipasa *Rhizomucor miehei*,
proporcionado por el proveedor (Sigma aldrich)**

Certificate Of Analysis

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i> , ≥20,000 U/g
Product Number	L4277
Product Brand	SIGMA
CAS Number	9001-62-1
Storage Temp	2-8°C

TEST	LOT 117K0799 RESULTS
ENZYMATIC ACTIVITY *	22,300 LU/G
DENSITY *	1.19 G/ML
	* SUPPLIER RESULTS
QC RELEASE DATE	NOVEMBER 2007



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

ORDERING

[Custom Products](#)
[eCommerce Solutions](#)
[Order Center](#)
[Products](#)
[Terms & Conditions](#)

SERVICE & SUPPORT

[Customer Support](#)
[Technical Service](#)
[Web Help Desk](#)
[MSDS](#)
[C of A](#)

CORPORATE

[Corporate](#)
[Investor Relations](#)
[Business Development](#)
[Worldwide Offices](#)
[About Us](#)

Site Map

[Careers](#)
[Events](#)
[Programs](#)
[REACH Regulations](#)
[Contact Us](#)

Site Use Terms

[Change Country](#)
[Privacy](#)
[Literature Portal](#)
[Tool Box](#)



Copyrights © 2010 Sigma-Aldrich Co. All Rights Reserved.

Reproduction of any materials from the site is strictly forbidden without permission. Sigma-Aldrich brand products are sold exclusively through Sigma-Aldrich, Inc.

PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: INMOVILIZACIÓN

4.1. Introducción

Como quedó demostrado en el capítulo anterior, las lipasas libres de *Rhizomucor miehei* mostraron ser un catalizador altamente efectivo para la producción de lípidos estructurados mediante la acidólisis de aceite de girasol y ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico. No obstante, el alto costo económico de las lipasas se convierte en un factor restrictivo para que estos procesos puedan llevarse a cabo en mayor escala.

La posibilidad de reutilización de las enzimas es un aspecto atractivo para la biocatálisis y ha sido motivo de numerosos estudios. El proceso que permite separar físicamente a la enzima de la mezcla de reacción para que pueda ser empleada en repetidas oportunidades, es la *inmovilización*. Esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas, orgánulos, células, etc. por su unión a un soporte (Arroyo, 1998). La inmovilización provee además algunos beneficios para aplicaciones industriales, tales como estabilidad a cambios en el pH y la temperatura, fácil recuperación, reducción de problemas de inhibición debido al medio o a los productos, y especialmente hace posible la operación en modo

continuo (Vikbjerg et al., 2005; H-Kittikun et al., 2008; Hita et al., 2009). Por otra parte, los inconvenientes asociados al proceso de inmovilización de enzimas son: alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un número diferente de uniones al soporte, posible pérdida de actividad y por último, el biocatalizador resulta más caro que la enzima nativa.

Las propiedades de las preparaciones de enzimas inmovilizadas son determinadas por las características de la enzima y del material empleado como soporte (Fig. 4.1). La interacción específica entre ellos genera una enzima inmovilizada con distintas propiedades químicas, bioquímicas, mecánicas y cinéticas (Tisher y Wedekind, 1999).

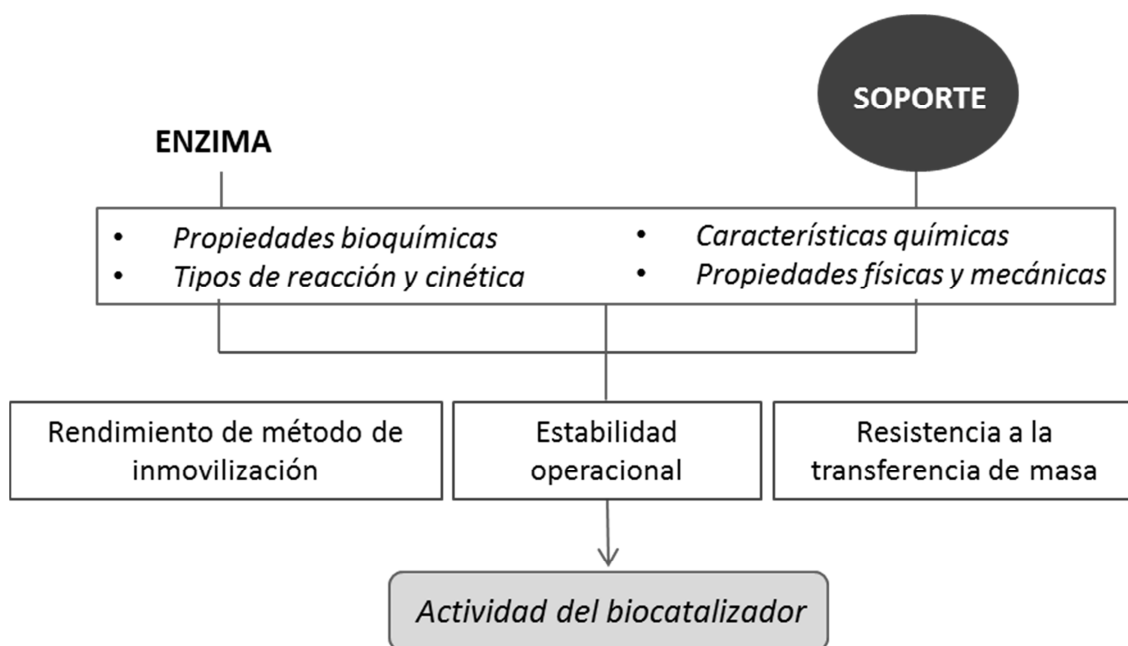


Figura 4.1. Aspectos involucrados en la obtención de biocatalizadores mediante inmovilización.

Varias lipasas inmovilizadas disponibles comercialmente han sido empleadas en la producción de lípidos estructurados, en numerosas reacciones (Lee y Akoh, 1996; García et al., 2001, Pacheco et al., 2010). Más específicamente, en lo que a la reacción de interés de esta tesis se refiere, Carrín y Crapiste (2008) han reportado altos niveles de incorporación de ácidos grasos saturados empleando Lipozyme RM IM. Sin embargo, el elevado costo y la

fácil atrición de las lipasas inmovilizadas disponibles comercialmente limitan su utilización en procesos de gran escala. Es por ello que uno de los objetivos de esta tesis fue la preparación de un biocatalizador con buena actividad catalítica en la reacción de acidólisis y que cumpla con dos características: bajo costo y alta resistencia mecánica.

Para poder cumplir con este objetivo propuesto, se llevó a cabo una minuciosa búsqueda de antecedentes que involucró métodos de inmovilización y soportes empleados en la obtención de derivados enzimáticos de las lipasas de *Rhizomucor miehei*. El trabajo experimental que tuvo lugar tras esta investigación y que adicionalmente fue surgiendo en base a los resultados obtenidos, se detalla en este capítulo y en el siguiente. Principalmente, este capítulo se centra en los diferentes métodos de inmovilización ensayados, por lo general para un soporte en común, en la búsqueda de un biocatalizador de alta actividad, mientras que el capítulo siguiente se enfoca en lo relacionado a la obtención de un soporte adecuado para inmovilización.

Por otra parte, como se podrá notar a lo largo de este capítulo, en la búsqueda de un biocatalizador de alta actividad catalítica, cada técnica de inmovilización propuesta y ensayada requirió adicionalmente que los derivados enzimáticos obtenidos fueran probados en la reacción de interés.

4.2. Métodos de inmovilización

Actualmente se encuentran disponibles numerosos métodos para realizar inmovilización de lipasas, incluyendo cada uno diferente grado de complejidad y eficiencia. Los métodos usados pueden ser divididos en dos categorías principales: i) métodos químicos, donde se forman uniones covalentes entre el soporte y la lipasa; y ii) métodos físicos, que comprenden fuerzas de interacción más débiles o contenciones físicas para la lipasa. Los métodos químicos incluyen la fijación de la lipasa a una matriz por fuerzas covalentes entre los grupos funcionales de la matriz y de la enzima, y la formación de enlaces entrecruzados (Crosslinking) intermoleculares, ya sea entre las

moléculas de la enzima misma o con grupos funcionales de la matriz. En este último caso se emplea por lo general glutaraldehído como agente ligante. Por otro lado los métodos físicos abarcan el atrapamiento (Entrapment) de la lipasa en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa (gel, polímero, fibra hueca porosa), la adsorción sobre un soporte, la unión a micelios o células bacterianas, y el intercambio iónico entre el soporte y la lipasa (Malcata et al., 1990).

4.2.1. Selección del método de inmovilización

Dada la diversidad de técnicas de inmovilización, la elección del método a emplear no es una tarea fácil. Algunos aspectos e interrogantes que se pueden tomar en consideración y que deben ser analizados al momento de la selección son:

El método a emplear...

- disminuye la actividad de la enzima?
- permite la regeneración del soporte?
- tiene un costo demasiado elevado?
- posee un sistema de preparación complejo?
- posee agentes químicos que podrían afectar a la enzima?
- posee agentes químicos que podrían inhabilitar su uso en la industria alimentaria?
- permite obtener las características finales deseadas en el biocatalizador?

Por otra parte, también se debe tener en cuenta cuales han sido las técnicas empleadas anteriormente en la inmovilización de lipasas específicamente y los resultados obtenidos. En la Tabla 4.1 puede apreciarse una recopilación de los métodos usados con diferentes tipos de lipasas; también se incluye en que reacción han sido empleados los derivados obtenidos y cual fue su nivel de actividad respecto a la enzima libre. Como puede notarse, en lo que a las lipasas de *Rhizomucor miehei* (antiguamente denominadas *Mucor miehei*) se refiere, han sido empleadas múltiples técnicas. No obstante, resaltan de

Tabla 5.1. Antecedentes en inmovilización de lipasas: método de unión, tipo de lipasa y soporte empleados, y actividad exhibida.

MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN	LIPASA	SOPORTE	REACCIÓN ^a	ACTIVIDAD ^b	REFERENCIA
Adsorción	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Acrílico	H	Baja	Malcata et al. (1990)
Adsorción	<i>Mucor miehei</i>	Polipropileno	E	No disponible	Malcata et al. (1990)
Intercambio iónico	<i>Mucor miehei</i>	Resina	I	No disponible	Malcata et al. (1990)
Adsorción	<i>Mucor miehei</i>	Polipropileno	E	No disponible	Malcata et al. (1990)
Adsorción	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Acrílico	H	No disponible	Malcata et al. (1990)
Adsorción	<i>Mucor miehei</i>	Celita	I	No disponible	Malcata et al. (1990)
Adsorción	<i>Rhizopus delemar</i>	Cerámico	A	Alta	Shimada et al. (1996)
Adsorción	<i>Candida antarctica B</i>	Polipropileno en polvo	E	Hiperactividad	Foresti (2005)
Adsorción	<i>Candida antarctica B</i>	Pellets de polipropileno comercial	E	Baja	Foresti (2005)
Adsorción	<i>Candida antarctica B</i>	vidrio-polipropileno	E	Baja	Foresti (2005)
Adsorción	<i>Candida antarctica B</i>	Quitosano en polvo	E	Alta	Foresti (2005)
Adsorción	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octyl- agarose	H	Hiperactividad (700%)	Fernández-Lafuente et al. (1998)
Adsorción	<i>Mucor miehei</i>	Octadecyl-Sepabeads	H	Hiperactividad (500%)	Palomo et al. (2002)
Covalente	<i>Mucor miehei</i>	Glyoxil-agarose	H	Media (70%)	Palomo et al. (2002)
Covalente	<i>Mucor miehei</i>	Agarose	H	Media (50%)	Palomo et al. (2002)
Adsorción	<i>Candida rugosa</i>	Oxido de niobio amorfo	H/ E	Baja	Castro et al. (2000)
Adsorción	<i>Candida rugosa</i>	Oxido de niobio cristalino	H/ E	Baja	Castro et al. (2000)
Covalente	<i>Candida rugosa</i>	Oxido de niobio cristalino	H/ E	Baja	Castro et al. (2000)
Adsorción	<i>Candida rugosa</i>	Fosfato de circonio amorfo	H/ E	Baja (34%)	Castro et al. (2000)
Adsorción	<i>Candida rugosa (AY)/ Pseudomonas</i>	Clay	I	Baja	Lee y Akoh (1998)
Adsorción	<i>Candida rugosa (AY)</i>	Celita 545	I	Mayor rendimiento	Lee y Akoh (1998)

Capítulo 4 - Preparación de biocatalizadores: Inmovilización

Adsorción	<i>Pseudomonas sp. (PS)</i>	CM- Sephadex	I	buen rendimiento	Lee y Akoh (1998)
Adsorción	<i>Pseudomonas sp. (AK)</i>	DEAE-Sephadex	I	Baja	Lee y Akoh (1998)
Adsorción	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octil agarosa	H	Hiperactividad (700%)	Bastida et al. (1998)
Adsorción	<i>Candida rugosa</i>	Epoxy silica	H	Media	Reis-Costa et al. (2003)
Adsorción	<i>Candida rugosa</i>	Epoxy silica	E	Baja	Reis-Costa et al. (2003)
Covalente	<i>Candida rugosa</i>	Amino silica	H	Alta	Reis-Costa et al. (2003)
Covalente	<i>Candida rugosa</i>	Amino silica	E	Alta	Reis-Costa et al. (2003)
Covalente	<i>Pancreática</i>	Amino silica	H	Baja	Reis-Costa et al. (2003)
Covalente	<i>Pancreática</i>	Amino silica	E	Baja	Reis-Costa et al. (2003)
Intercambio iónico	<i>Candida antarctica B</i>	Polyethylenimine- agarose	H	Enantioselectividad	Torres et al. (2006)
Covalente	<i>Candida antarctica B</i>	CNBr-agarosa	H	Enantioselectividad	Torres et al. (2006)
Covalente	<i>Candida rugosa</i>	Glyoxil-agarose	H	No disponible	Mateo et al. (2007)
Covalente	<i>Pseudomonas fluorescence</i>	Eupergit C	H	No disponible	Mateo et al. (2007)
Adsorción	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octyl-agarose	H	Hiperactividad (540%)	Nieto et al. (2005)
Adsorción	<i>Rhizomucor miehei</i>	Butyl-Sepabeads	H	Hiperactividad (171%)	Nieto et al. (2005)
Adsorción	<i>Rhizomucor miehei</i>	Octadecyl-Sepabeads	H	Hiperactividad (442%)	Nieto et al. (2005)
Intercambio iónico	<i>Rhizomucor miehei</i>	Amberlite	H	Baja (14.2%)	Nieto et al. (2005)
Covalente	<i>Rhizomucor miehei</i>	Eupergit C	H	Baja (2.85%)	Nieto et al. (2005)
Adsorción + Cross-linking	<i>Candida rugosa</i>	MANAE-agarose	H	Hiperactividad (500 %)	Fernández-Lorente et al. (2007)
Adsorción + Cross- linking	<i>Candida antarctica (A y B)</i>	MANAE-agarose	H	Hiperactividad (1000 %)	Fernández-Lorente et al. (2007)

^a A: Acidólisis; E: Esterificación; H: Hidrólisis; I: interesterificación. ^b Actividad del derivado enzimático respecto a la de la enzima libre.

manera sobresaliente los resultados obtenidos con la *adsorción* en soportes comerciales tales como Octyl-agarose y Octadecyl-Sepabeads. Por ejemplo, Nieto et al. (2005) reportaron una actividad 5 veces mayor de los biocatalizadores preparados con estos soportes, respecto a la de la lipasa libre. Por su parte, Bastida et al. (1998) informaron una actividad 20 veces mayor cuando lipasas de *Rhizomucor miehei* fueron inmovilizadas en Octyl-agarose y empleadas en la hidrólisis de p-nitrofenil propionato. Estos hallazgos motivaron un análisis más exhaustivo de la técnica mencionada.

4.2.1.1. Adsorción

La adsorción física es quizás el procedimiento más sencillo para realizar la inmovilización. La misma consiste en poner en contacto el soporte con una solución acuosa de enzimas y pasado cierto tiempo, una vez efectuada la adsorción, lavar el complejo formado de manera de eliminar la enzima no inmovilizada. Las interacciones que favorecen la adsorción son las fuerzas iónicas, de Van der Waals y puentes de hidrógeno.

Los principales factores que influyen en la adsorción de proteínas son (Arroyo, 1998):

1. *el pH del medio*: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
2. *la fuerza iónica del medio*: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
3. *el diámetro de poro del soporte*: dependiendo del tamaño, la enzima puede quedar retenida en su interior o no; si así fuera, esto podría ocasionar restricciones para el acceso del sustrato (Cao, 2006). Este hecho es de fundamental importancia cuando se plantea utilizar el biocatalizador en reacciones con sustratos de peso molecular elevado.

Como principales ventajas de este método se destacan:

- Preparación sencilla
- Bajo costo

- No se generan cambios de especificidad enzimática
- Los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido de agua.

Como inconvenientes de la adsorción se puede mencionar:

- Requerimientos de optimización de las variables que controlan la adsorción
- Los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico
- La unión al soporte es débil.

Si bien las características señaladas anteriormente son producto del análisis del comportamiento de las enzimas inmovilizadas por este método, en un modo general, en lo relacionado a las lipasas se han desarrollado estrategias para valerse de los beneficios de la adsorción sorteando los obstáculos que la misma presenta. Esto ha podido llevarse a cabo sobre la base de que las lipasas poseen una característica que no es común a todas las enzimas, dos conformaciones diferentes con distinta actividad. Una conformación cerrada, considerada inactiva, donde el sitio activo se encuentra aislado del medio de reacción por la existencia de una tapa o "lid" formada por una cadena polipeptídica; y una conformación abierta, donde el "lid" es descubierto permitiendo que el sitio activo quede completamente libre al acceso de sustratos (Mateo et al., 2007). Ambas formas de lipasas están en un equilibrio afectado por las condiciones experimentales. Tal es el caso que, en presencia de gotas hidrofóbicas de sustrato, las lipasas pueden adsorberse fuertemente sobre la interfase de las mismas, desplazando el equilibrio hacia su forma abierta, un fenómeno denominado *activación interfacial*. Este hecho a favorecido la adsorción preferencial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos, los cuales imitan la superficie hidrofóbica de los sustratos.

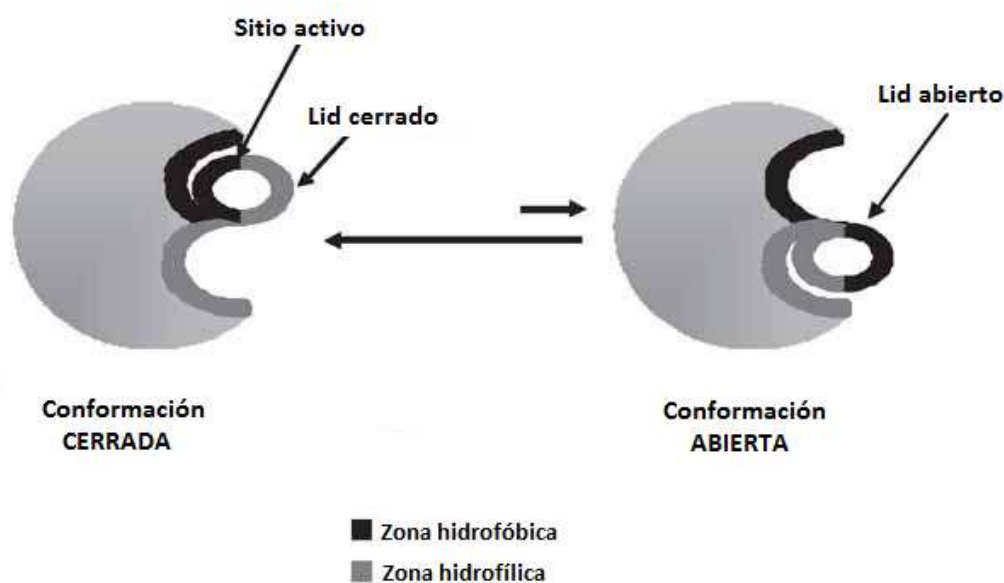


Figura 4.2. Conformación de las lipasas.

Se ha demostrado que las lipasas han sido capaces de adsorberse en soportes hidrofóbicos a muy bajas fuerzas iónicas, involucrando la superficie hidrofóbica que rodea a su sitio activo (Fig. 4.2). Esto ha permitido estabilizar la conformación abierta y obtener un derivado catalítico con más actividad que la lipasa nativa, condición denominada *hiperactivación* (Fernández-Lafuente et al., 1998; Palomo et al., 2002; Nieto et al., 2005; Wilson et al., 2006;). De este modo, varias lipasas han sido inmovilizadas, hiperactivadas y en algunos casos hasta purificadas por adsorción en una amplia variedad de soportes hidrofóbicos o soportes recubiertos con grupos hidrofóbicos (Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010a). Adicionalmente, mediante cambios en la naturaleza del soporte y su hidrofobicidad, ha sido posible controlar la fuerza de adsorción, la actividad y la selectividad de los sustratos (Fernández-Lorente et al., 2007; Fernández-Lorente et al., 2008). La adsorción de la lipasa sobre estos soportes frecuentemente es muy fuerte, lo que hace posible el uso de los biocatalizadores con sustratos hidrofóbicos de tamaño pequeño o mediano aún en presencia de concentraciones moderadas de solventes orgánicos. Sin embargo, cambiando las condiciones del medio puede lograrse la desorción

completa de la lipasa, permitiendo recuperar y reusar el soporte después de la inactivación de la misma. Se ha demostrado además, que este tipo de inmovilización permite producir biocatalizadores que son muy estables bajo diferentes condiciones, haciendo esta técnica especialmente adecuada para la inmovilización de lipasas (Palomo et al., 2002; Fernández-Lorente et al., 2008; Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010a).

4.3. Protocolo de inmovilización: búsqueda de las condiciones óptimas

4.3.1. Consideraciones generales

Habiéndose determinado la metodología de inmovilización ha emplear con las lipasas de *Rhizomucor miehei*, resulta necesario establecer el protocolo para realizar la adsorción. Para ello es necesario determinar las condiciones a las que se llevará a cabo; esto incluye:

- Temperatura de inmovilización
- Tipo de buffer y fuerza iónica del mismo
- Concentración enzima /soporte y enzima/ buffer en el medio de inmovilización
- Tiempo de inmovilización.

Dado que el sistema lipasa-soporte empleado en esta tesis fue novedoso y por ende no se correspondió a ningún otro sistema de inmovilización del cual se contara con antecedentes, para poder especificar valores apropiados para las variables detalladas anteriormente se tomaron como referencia las condiciones empleadas en la inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre soportes hidrofóbicos. Cabe mencionar que llamativamente, la información que se brinda en las publicaciones científicas no es completa y que por ende los protocolos que proponen no se pueden seguir al pie de la letra. Igualmente existen algunos aspectos generales que se mencionan en las mismas que sirven como guía. En lo que al tipo de buffer se refiere, el más empleado resultó ser el de fosfato de sodio a pH 7 a bajas fuerzas iónicas, entre 5 y 25

mM (Bastida et al., 1997; Palomo et al., 2002; Nieto et al., 2005). La relación volumen de preparado comercial de lipasa / masa de soporte y la cantidad asociada de buffer para el medio de inmovilización fue elegida sobre la base de que sistemas más bien diluidos dan origen a biocatalizadores con una carga de proteína menor a la carga máxima admitida por el soporte, lo que favorece a la adsorción superficial evitando problemas difusionales (Palomo et al., 2002; Cao, 2005). Respecto a la temperatura de inmovilización, las empleadas comúnmente son la temperatura de almacenamiento de la lipasa (entre 3 y 4°C) y la temperatura ambiente (Bastida et al., 1997; Nieto et al., 2005).

En base a las consideraciones anteriores y en la búsqueda de un protocolo que diera lugar a un catalizador activo, se ensayaron diferentes técnicas de inmovilización por adsorción variando las condiciones de realización. Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de proteína adsorbida sobre los soportes. Cabe mencionar, que las técnicas empleadas para esta determinación se fueron variando a medida que el conocimiento adquirido con el uso permitía distinguir las ventajas y desventajas asociadas. Un análisis detallado de las mismas se realiza en la Sección 4.3.5.

Por otra parte, teniendo presente que no toda la lipasa soportada en los catalizadores preparados puede estar activa, resultó esencial corroborar la actividad de los mismos en la reacción de interés, acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados, según la reacción base (condiciones especificadas en la Sección 2.3.5).

En lo que se refiere al soporte empleado en las inmovilizaciones, inicialmente se probaron 3 diferentes a fin de tener una idea del comportamiento de los mismos y de la eficiencia de la técnica. Estos fueron una resina comercial, Octadecyl-Sepabeads® (Resindion SRL, Italy) (ODSB), y soportes especialmente preparados para tal fin: microesferas de quitosano (Q) y microesferas de quitosano modificadas (QM). Estas últimas se obtuvieron a través de un procedimiento de neutralización y posterior aminación reductiva. Un análisis detallado de la preparación y caracterización de éste y demás soportes, se realiza en el Capítulo 5. Para los ensayos siguientes el soporte

empleado siempre fue el mismo, QM, más específicamente microesferas del tipo QM1-1 (ver nomenclatura en el Capítulo 5).

4.3.2. Primer protocolo de inmovilización ensayado

Tomando como punto de partida las pautas que se mencionaron anteriormente, se elaboró un protocolo de inmovilización que fue usado para la adsorción de las lipasas de *Rhizomucor miehei*, empleando ODSB, Q, QM como soporte.

Método de inmovilización: El volumen estipulado de preparado comercial de lipasa (3 ml) se disolvió en 60 ml de buffer fosfato de sodio (25 mM, pH 7) y se mantuvo bajo agitación durante 5 min. Posteriormente, 1 g de soporte previamente lavado con el mismo buffer se añadió al medio de inmovilización y se mantuvo bajo agitación durante 7 h (a menos que en lo siguiente se especifique otro tiempo) a la temperatura fijada (3 °C). Luego los sólidos se recuperaron por filtración y fueron lavados con agua destilada, midiendo tras cada enjuague la absorbancia del líquido residual en el espectrofotómetro UV/Visible a 280 nm. Este paso finalizó cuando la absorbancia se volvió nula, lo que indicó que ya no había proteína sobre el soporte que no estuviera correctamente adsorbida. Finalmente, los biocatalizadores fueron secados en estufa de vacío a 30 °C hasta peso constante y después almacenados a 4 °C hasta el momento de uso.

El proceso de inmovilización fue seguido a través de la medición de absorbancia de las soluciones sobrenadantes en el UV/Visible a 280 nm (ver Sección 2.3.4). Adicionalmente se preparó un blanco de inmovilización, una solución de preparado comercial de lipasa (CLP) en buffer fosfato de concentración 1:20 (v/v) igual a la empleada en los medios de inmovilización, con el objetivo de determinar si se daba algún tipo de variación en la absorbancia durante el transcurso del proceso, independiente del proceso de adsorción.

4.3.2.1. Primer protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la concentración de lipasa y la temperatura de inmovilización

Posteriormente, sobre el protocolo elaborado se analizó el efecto de dos variables: concentración de enzima en el medio y temperatura de inmovilización. Para ello, la metodología que se describió anteriormente se llevó a cabo empleando dos concentraciones diferentes de enzima en el sobrenadante: 1 y 3 ml de preparado comercial/ g soporte y se realizó a dos temperaturas diferentes, 25 °C y a temperatura de cámara frigorífica, 3°C. De la combinación de estas variables, se generaron 4 tipos de biocatalizadores diferentes; las denominaciones de los mismos se especifican en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.

Denominación de los biocatalizadores obtenidos en función de las variaciones impuestas (1° protocolo): temperatura y concentración de preparado comercial de lipasa en el medio de inmovilización.

TEMPERATURA	RELACIÓN LIPASA / SOPORTE	
	1 ml/g	3 ml/g
3 °C	QMF1	QMF3
25 °C	QMA1	QMA3

4.3.3. Segundo protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la adición inicial de etanol/ final de acetona

Otro protocolo de inmovilización fue ensayado, siguiendo el procedimiento descrito por Esteban et al. (2009) para adsorción de lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre un soporte comercial hidrofóbico de polipropileno (Accurel MP-1000), dadas las similitudes con el sistema lipasa-soporte de este trabajo. Este nuevo ensayo contempla el empleo de una solución buffer de menor pH y fuerza iónica, 6.0 y 20 mM, respectivamente, y una concentración de masa de preparado enzimático/masa de soporte aproximadamente 10 veces mayor a la empleada en el protocolo 1. En simultáneo se analizó el efecto que tienen dos variables ampliamente usadas en las técnicas para

inmovilización de lipasas: contacto inicial del soporte con etanol, y la adición o no de acetona fría al final del proceso (Gitlesen et al., 1997; Bosley y Peilow, 1997; Soumanou et al., 1998; Hita et al., 2007).

Método de inmovilización: el volumen correspondiente a 15 g de CLP, 12.6 ml, fue adicionado a 20 ml de buffer fosfato de sodio (20 mM, pH 6.0) y mantenidos con agitación durante 5 min. Luego, 1.5 g de microesferas de quitosano modificadas fueron puestas en contacto con 5 ml de etanol, ó solución buffer cuando no correspondía (para mantener una única concentración en los sistemas), y agregadas al medio de inmovilización. Tras 24 h de agitación del sistema, cuando correspondió, se añadieron 5 ml de acetona a aproximadamente -20° C. Los biocatalizadores fueron recuperados por filtración, lavados 3 veces con buffer fosfato a 4 °C y secados en estufa de vacío durante 48 h. Finalmente fueron almacenados a 4 °C hasta el momento de uso.

Tabla 4.3.

Denominación de los biocatalizadores obtenidos en función de las variaciones impuestas (2° protocolo): adición inicial de etanol/ final de acetona.

ETAPA FINAL	ETAPA INICIAL	
	Con etanol	Sin Buffer
Con acetona	QMEA	QMBA
Sin acetona	QME	QMB

4.3.4. Métodos para la determinación de proteína en los biocatalizadores preparados

Un aspecto de gran importancia en lo que a la preparación de biocatalizadores se refiere tiene que ver con la determinación de la cantidad de lipasa adsorbida sobre el soporte. Si bien lo esencial es que la enzima se inmovilice en una conformación activa, la cantidad de proteína retenida sobre los mismos es una medida que permite establecer cuan eficiente ha sido el protocolo de inmovilización.

Dada la complejidad de los sistemas biológicos, no se dispone de métodos sencillos para cuantificación de proteínas (como técnica rutinaria de control) que permitan obtener resultados *absolutamente precisos*; cada uno tiene sus ventajas y limitaciones. Los métodos más empleados a nivel bioquímico son el de Biuret, el de Lowry, el de Bradford, el BCA, y la espectroscopia UV/Vis a 280 nm. Otras técnicas empleadas son Kjeldahl, en menor grado, y la cuantificación indirecta a través de la actividad residual de los sobrenadantes. Una breve descripción de las mismas se realiza en esta sección, junto con las ventajas y desventajas asociadas. El análisis de estos aspectos es lo que determina que técnica será más apropiada para emplear con la muestra (Olson y Markwell, 2007).

- *Método de Biuret*: El método comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y cobre (II). Presenta interferencia con amoníaco, buffer y detergentes.
- *Método de Lowry*: combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) por la oxidación de tirosina, triptofano, cisteína y cistina de las cadenas polipeptídicas. Es más preciso que Biuret, pero tiene la desventaja que muchos compuestos presentes en buffers y en extractos celulares causan interferencia (carbohidratos, glicerol, EDTA, Tris, compuestos de potasio y de disulfuro, fenoles, ácido úrico, guanina, xantina, magnesio y calcio, entre otros).
- *Método de Bradford*: se basa en la unión directa del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (CBBG) a las proteínas que poseen arginina, triptofano, tirosina, histidina y residuos de fenilalanina. Es un método simple y sensible. La desventaja es que algunas proteínas precipitan con CBBG, como las hidrofóbicas, generando absorbancias erróneas.
- *Método de BCA*: reemplaza el reactivo de Folin-Ciocalteu del método de Lowry por ácido bicinconínico (BCA), para soluciones alcalinas de proteínas. Interfieren azúcares reductores y sulfato de amonio.
- *Espectroscopia UV/Vis a 280 nm*: se basa en la absorción a 280 nm de aminoácidos aromáticos de las proteínas (tirosina y triptofano). Tiene la ventaja que no es necesario utilizar reactivos y la muestra no se daña o destruye durante la determinación. Su precisión

aumenta cuando se comparan soluciones de la misma proteína. Es sensible al pH, a la fuerza iónica y a la turbidez del medio. Sufre interferencias por presencia de ácidos nucleicos.

- *Método de Kjeldahl*: se emplea para determinación de nitrógeno total, el cual se asocia al contenido de proteína. Es una técnica confiable, pero compleja. Incluye la digestión de la muestra y la posterior determinación del amoníaco presente.
- *Actividad residual de los sobrenadantes*: se mide la actividad de las lipasas remanentes en el sobrenadante en reacciones sencillas de hidrólisis, por lo general las mismas en las que se prueba al biocatalizador preparado, y se la compara con la correspondiente a la solución de inmovilización inicial. El contenido suele reportarse en unidades de actividad lipolítica / mg de soporte o como % de actividad residual (Fernández-Lafuente et al., 1998; Castro et al., 2000; Palomo et al., 2002).

En base a lo considerado, y como se mencionó en un apartado anterior, inicialmente se seleccionó al método UV/Visible a 280 nm para calcular el contenido de proteína de los derivados enzimáticos, mediante la medición de la absorbancia en esta longitud de onda de la solución de inmovilización en distintas etapas del proceso. Los resultados obtenidos fueron analizados en función de diferentes criterios, establecidos según la información que se tenía al momento sobre el contenido de proteína del preparado de lipasa comercial. Los métodos asociados a estos criterios se detallan en la Sección 2.3.4.

Posteriormente se empleó el kit Proti 2 (Wiener lab., Argentina), una forma comercial del método de Biuret para determinación de proteínas totales, en el que se emplea como suero patrón una solución de albúmina de concentración conocida (Sección 2.3.4.2).

En un ensayo independiente, se evaluó la utilidad de emplear alícuotas de la solución sobrenadante como catalizador en la reacción de interés para determinar por diferencia el porcentaje de actividad retenida en los biocatalizadores tras la inmovilización. Los resultados obtenidos se detallan en la Sección 4.4.3.

Por otra parte, el empleo de un método no colorimétrico como el método de Kjeldahl, tuvo que descartarse debido a que las microesferas de quitosano empleadas como soporte contienen nitrógeno en su composición, con lo cual la determinación del contenido de proteínas sobre los mismos se vería interferida por este hecho. Asimismo, la determinación sobre los sobrenadantes no fue realizada, debido a los tiempos involucrados en la técnica, ya que no permitiría seguir la inmovilización al momento.

En lo que se refiere a la eficiencia de inmovilización (E %), la misma se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$E \% = \frac{\text{proteína removida}}{\text{proteína inicial}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Donde proteína removida se refiere a la diferencia entre el contenido inicial y final de proteína en el sobrenadante de inmovilización.

4.3.5. Desorción de las lipasas

A pesar de que una característica deseable en la preparación de biocatalizadores es que la lipasa se adhiera fuertemente al soporte para evitar su desorción, y de este modo el mismo pueda ser empleado en múltiples reusos, resulta sin embargo conveniente que la enzima pueda removerse de la superficie del material tras su desactivación. Esto permitiría que el soporte recuperado pueda ser nuevamente empleado para la inmovilización de lipasa fresca, en sucesivas oportunidades, con lo cual se podrían disminuir costos por el reuso del soporte y por la disposición final de residuos sólidos.

Con el objetivo de analizar la reversibilidad de la inmovilización y la posibilidad de reuso del soporte, biocatalizadores del tipo QMB (Tabla 4.3) fueron empleados para realizar ensayos de desorción en base a la metodología propuesta por Palomo et al. (2002) para la remoción de lipasas de *Mucor miehei* adsorbidas sobre Octadecyl-Sepabeads.

Desorción: 200 mg de biocatalizador fueron introducidos en un tubo de ensayo al cual se añadió 5 ml de solución de concentración 0.2% (v/v) de Tritón X-100 (surfactante

no iónico) en buffer fosfato de sodio 5 mM (pH 7 a 4 °C). Luego, el tubo cerrado fue colocado en un baño de agua a 100 °C aproximadamente durante 5 min. Posteriormente, la solución fue retirada y el proceso de lavado se repitió 4 veces más. Tras los lavados con la solución, los sólidos fueron enjuagados 10 veces con agua destilada caliente para remover el detergente remanente. Al finalizar, los soportes fueron llevados a estufa de vacío a 40 °C hasta peso constante.

La determinación del número necesario de lavados con detergente, para garantizar la desorción, se realizó comparando el espectro de absorbancia de la solución de Tritón tras ser usada en el lavado con el de la solución fresca (inicial).

Para corroborar la completa desorción de las lipasas, los soportes tratados fueron analizados por ^{13}C -NMR de sólidos en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Resonancia Magnética en Sólidos (Córdoba, Argentina) con el objetivo de analizar si los picos obtenidos en los espectros correspondían únicamente al material original del soporte o quedaba enzima inactivada adsorbida sobre los soportes.

4.4. Resultados y discusiones

4.4.1. Primer protocolo de inmovilización ensayado

4.4.1.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados

Los resultados de la inmovilización de las lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre los soportes seleccionados, microesferas de quitosano (Q), microesferas de quitosano modificadas (QM) y Octadecyl- Sepabeads® (ODSB), se muestran en la Tabla 4.4. Como puede apreciarse, se registraron las absorbancias de la solución de inmovilización, también denominada sobrenadante, en el espectrofotómetro UV/Vis a una longitud de onda de 280 nm tanto al inicio como al final del proceso de adsorción. Conociendo la concentración inicial del preparado comercial de lipasa (CLP) en el medio de inmovilización y su absorbancia asociada, la absorbancia final del sobrenadante y la

cantidad másica de soporte utilizado, es posible estimar mediante diferentes métodos la fracción de lipasa que quedó adsorbida sobre los soportes.

La absorbancia inicial se midió en el blanco de inmovilización y ese valor se tomó como el inicial para todos los sobrenadantes. Mediciones de absorbancia a tiempos intermedios permitieron distinguir como se iba dando el proceso de adsorción; los valores registrados se muestran en la Tabla 4.5. Como puede observarse, todos los sobrenadantes exhibieron el menor valor de absorbancia a tiempos cortos, entre 2 y 4 h de inmovilización, y paulatinamente estos valores se fueron incrementando con el transcurso del tiempo; excepto para ODSB que aumentó y luego permaneció siempre en el mismo valor. Este comportamiento revela que inicialmente hubo más componentes del sistema que fueron retenidos en el soporte. Como se mencionó en el Capítulo 3, el preparado comercial de lipasa contiene una proporción elevada de carbohidratos y en menor cantidad lípidos, minerales y sales. Para evitar la influencia de algunos de estos componentes en las mediciones de absorbancia, las muestras de sobrenadante fueron filtradas, centrifugadas y diluidas antes de la lectura; con lo cual se esperaba que el efecto de los mismos haya sido mínimo. No obstante, es posible que inicialmente hayan quedado adsorbidas proteínas tanto de *Rhizomucor miehei* como otras presentes en el sistema, y que posteriormente debido a la continua agitación, algunas de ellas que no se encontraban tan fuertemente unidas hayan sido removidas de los soportes. También es posible que los iones de las sales del buffer y del CLP hayan sido adsorbidos por los numerosos grupos laterales de las lipasas adsorbidas sobre los soportes, dando lugar a una modificación en la composición del sobrenadante.

Respecto a ODSB, puede verse que después de la cuarta hora se alcanzó una concentración de equilibrio entre la cantidad de proteína adsorbida sobre el soporte y la que permaneció en el medio líquido. Estos tiempos cortos de adsorción son consistentes con los periodos de inmovilización reportados en otros trabajos de investigación. Nieto et al. (2005) realizó la adsorción de lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre ODSB durante 1.5 h; Palomo et al. (2006) llevó a cabo la misma inmovilización y el tiempo de la misma fue de 3 h. Cabe mencionar que en ninguno de los dos antecedentes se realiza un seguimiento de

la adsorción en el tiempo, ni una cuantificación del contenido de proteína en los soportes tras la adsorción; más bien los derivados enzimáticos son directamente probados en la reacción de interés. En un estudio similar, Palomo et al. (2002) realizó la inmovilización antes mencionada y siguió el proceso tomando muestras del sobrenadante y del sólido en forma periódica, las cuales empleó posteriormente como catalizador en la hidrólisis de p-nitrofenil propionato, hallando que para tiempos de inmovilización entre 0.5 h y 5 h la actividad residual de los biocatalizadores obtenidos era prácticamente la misma, lo que indicaría que la carga de proteína activa en ODSB, en dicho caso también habría alcanzado el equilibrio de adsorción.

En lo que al blanco se refiere, también se observó una pequeña disminución neta en la absorbancia y un comportamiento oscilatorio con el transcurso del tiempo. La variación entre las mediciones fue mayor a la variabilidad inherente al método; por ende esto manifestaría la existencia de algún tipo de fenómeno que esté ocurriendo en el medio enzimático. Es un hecho conocido que las lipasas de *Rhizomucor miehei* en solución tienden a formar agregados bimoleculares inclusive a bajas concentraciones o a adsorberse sobre compuestos hidrofóbicos presentes en el preparado comercial de lipasa. Los agregados bimoleculares poseen propiedades muy diferentes respecto a la forma monomérica de la lipasa (Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010^a). Teniendo en cuenta este comportamiento de las lipasas, es posible que haya tenido lugar la formación de agregados moleculares, ocasionando así un sistema heterogéneo a nivel microscópico que podría ser el causante de las diferencias registradas en la absorbancia de la luz. También, estas fluctuaciones podrían ser generadas por factores externos ambientales, no totalmente controlados durante el periodo experimental. Dado que estos cambios también podrían haber ocurrido en los medios en contacto con los soportes, pero quedar enmascarados por la adsorción, para el cálculo del contenido de proteína se restó al valor final de absorbancia, obtenido para cada sobrenadante de inmovilización, la diferencia hallada para el blanco entre el tiempo inicial y final (0.003).

En cuanto a la concentración de proteína en los soportes luego del proceso de adsorción, en la Tabla 4.4 puede notarse el empleo de 3 métodos de estimación distintos

que dan lugar a muy variados resultados. El método UV/Vis 280 (I) fue el empleado inicialmente. Mediante este se puede saber cuanto del material presente en el CLP queda retenido sobre el soporte. El mismo requiere que se asuma que todo lo que se adsorbe es proteína, lo cual puede no ser necesariamente cierto. Por ende, es conveniente expresar la estimación de la cantidad adsorbida en mg de CLP por g de soporte, en vez de mg de proteína por g de soporte. A efectos comparativos este método puede ser usado, lo que permite distinguir que el soporte que más material adsorbió del medio fue ODSB, seguido por Q; y que la menor cantidad fue retenida por QM.

Dado que en la información suministrada por el proveedor del CLP de *Rhizomucor miehei* no se hacía referencia al contenido de proteína en el mismo, como se analizó en el Capítulo 3, diferentes métodos fueron analizados y ensayados para poder determinar esta cantidad. De este modo, el método UV/Vis 280 (II) toma en cuenta el valor obtenido mediante el método gravimétrico (detallado en la Sección 3.2.2.1.), 0.44 g proteína/g de CLP para la concentración inicial en el medio de inmovilización y para la consecuente concentración de la dilución formada para la medición en el espectrofotómetro. Por otra parte, el método UV/Vis 280 (III) se basa en un contenido de proteína mucho menor en el CPL, 55.28 mg proteína/ml CLP, hallado tiempo después con la implementación del método de Proti 2 (Wiener lab., Argentina). Como puede apreciarse en la Tabla 4.4, los contenidos cuantificados a través de estos 3 métodos resultaron muy diferentes, siendo el valor más fiable el obtenido a través del método UV/Vis 280 (III). Esto permite demostrar la importancia de tener un procedimiento adecuado para la determinación de proteínas ya que errores de gran magnitud pueden ser introducidos por este medio. Adicionalmente, no sería lo mismo considerar para un sistema de reacción que la cantidad de catalizador incorporada al medio es de 31 mg o de 670 mg/g soporte, por solo citar un ejemplo.

En lo que se refiere a la eficiencia de inmovilización (E %) para los soportes ensayados, entre un 9.8 y un 25.9 % de la proteína inicial presente en el medio de reacción fue retenida por los sólidos.

4.4.1.2. Actividad de los biocatalizadores preparados

La actividad catalítica de los derivados enzimáticos obtenidos del primer protocolo de inmovilización se evaluó a través de la reacción de interés de esta tesis (acidólisis) y se cuantificó mediante la composición de ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico (% P+St), en el producto final (ver Sección 2.3.5 para más detalles). Los resultados logrados con los biocatalizadores preparados con cada uno de los soportes se muestran en la Fig. 4.3. Como puede notarse, el cambio en la composición realizado por las lipasas inmovilizadas fue muy pequeño. Tal es así, que los valores de % P+St para las réplicas de reacción analizados mediante el test de comparación de medias de Bonferroni, mostró que solo el producto de reacción obtenido en presencia de QM tuvo diferencias significativas respecto a la composición del aceite (SO) ($P < 0.05$). Empleando un test menos conservador como el de Tukey, los productos de reacción obtenidos en presencia de QM y de ODSB mostraron diferencias significativas respecto a SO ($P < 0.05$). Aun así, los niveles de ácidos grasos saturados resultaron mucho menores a los deseados como para dar origen a un producto con propiedades diferentes al original. Probablemente, la cantidad de lipasa incorporada al medio de reacción fue muy baja. Cabe mencionar que, como la información obtenida a través del método UV/Vis 280 (I) respecto a la cantidad de proteína no era de suma confianza, a efectos de realizar la comparación de actividad de los derivados obtenidos, se introdujeron *mismas cantidades míasicas de biocatalizador* en los medios de reacción (0.093 g). Ahora bien, siendo válido el valor de contenido de proteína en los biocatalizadores hallado a través de UV/Vis 280 (III), se tendrían 2.89, 1.54 y 3.97 mg de proteína presente en los medios de reacción para Q, QM y ODSB, respetivamente. Sin lugar a dudas, estos representan contenidos muy bajos como para lograr modificaciones considerables sobre los 400 mg de aceite empleados en cada reacción. Cabe aquí hacer la comparación con los resultados logrados con lipasa en solución (Capítulo 3), donde la acidólisis se ensayó con una relación proteína/aceite de 4.42 mg proteína/400 mg aceite. En dichas experiencias, la incorporación lograda tras 4 h de reacción a 40°C fue alrededor 18% de P+St.

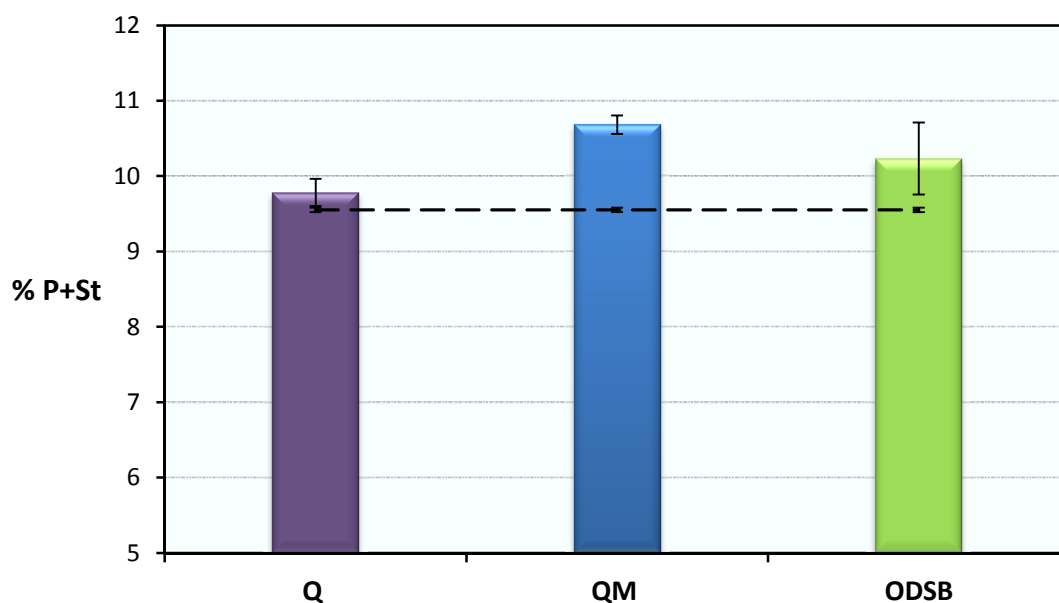


Figura 4.3. Actividad de los preparados enzimáticos obtenidos con el primer protocolo de inmovilización (microesferas de quitosano (Q), microesferas de quitosano modificadas (QM) y Octadecyl- Sepabeads® (ODSB)): Composición de ácidos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en glicéridos (% P+St) de los productos de acidólisis a 60 °C, 8 h de reacción, 0.093 g de biocatalizador y demás condiciones acorde a Sección 2.3.5. Para comparación se incluye, en línea punteada, la composición original del aceite de girasol (SO).

4.4.1.3. Primer protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la concentración de lipasa y de la temperatura de inmovilización

La disconformidad con los resultados obtenidos con el primer protocolo de inmovilización, motivó a la realización de un estudio donde se analizó el efecto de la concentración de preparado comercial de lipasa en el medio de inmovilización y la temperatura del proceso. Además de la temperatura ya ensayada se eligió la ambiente, debido a que era el otro valor más empleado en los protocolos de inmovilización reportados en la literatura científica. Respecto a la concentración de CLP en el medio, erróneamente se seleccionó un valor menor de 1 ml/ g de soporte. Esta decisión se tomó sobre la base que al momento se creía que era mucha la proteína contenida en los biocatalizadores preparados con el primer protocolo de inmovilización, debido al empleo del método UV/Vis 280 (I) para la cuantificación, sumado al hecho que el biocatalizador con menor cantidad de material adsorbido, QM, resultó ser el de mayor actividad entre los

ensayados. Esto llevó a pensar, equívocamente, que una cantidad excesiva de lipasa había sido inmovilizada en los soportes dando lugar a derivados de muy baja actividad (por cuestiones difusionales).

4.4.1.3.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados

Los resultados obtenidos para las 4 variantes del protocolo inicial se muestran en la Tabla 4.6. Como puede apreciarse, solo se pudo estimar el contenido de proteína en los biocatalizadores obtenidos mediante la inmovilización llevada a cabo a temperatura ambiente, ya que los correspondientes a la inmovilización en frío exhibieron absorbancias mayores a la inicial, para todos los tiempos muestreados (en la Tabla 4.6. solo se presentan los valores a tiempo inicial y final). Dado que este inconveniente no se presentó durante el primer ensayo realizado, resulta difícil atribuir lo sucedido a una posible causa (la inspección visual de los mismos indicaba mayor turbidez que la inicial); sin embargo fue consistente con lo manifestado en otros trabajos, donde se expresa la baja reproducibilidad del método espectrofotométrico a 280 nm (Foresti, 2005). En lo que respecta al contenido de proteína de los derivados enzimáticos obtenidos a temperatura ambiente, cuantificado a través del método UV/Vis 280 (III) desarrollado posteriormente, puede notarse que al partir de una menor concentración inicial de CLP se obtuvieron catalizadores con menor cantidad de proteína adsorbida. Por otro lado, el efecto de la temperatura sobre la adsorción de proteínas no pudo determinarse.

Con respecto a la eficiencia de la inmovilización, los valores obtenidos para QMA1 y QMA3 fueron 0.18 y 2.65 % respectivamente, bastante menores a los correspondientes al primer ensayo de inmovilización.

4.4.1.3.2. Actividad de los biocatalizadores preparados

La actividad de los biocatalizadores obtenidos con las variantes introducidas en el primer protocolo de inmovilización se muestra en la Fig.4.4. Nuevamente, el cambio en la composición de los glicéridos originales realizado por las lipasas inmovilizadas fue muy pequeño. Para las condiciones de acidólisis especificadas, usando un método estadístico de ANOVA doble para analizar los 4 tratamientos efectuados con un error menor al 5%, se

halló que el % P+St no difirió con las variaciones impuestas en la temperatura de inmovilización y en la concentración de CLP en el sobrenadante. Tampoco se detectaron efectos de interacción entre estos dos parámetros. Respecto al efecto de la temperatura de inmovilización, se infiere que la misma no altera la conformación espacial de la enzima ni su adsorción sobre el soporte. Por otro lado, la insignificancia lograda con la variación de la concentración de enzima estuvo relacionada con que las cantidades empleadas resultaron ser mucho menores que las convenientes, un aspecto que se dedujo con el progreso de esta tesis.

El análisis de comparación por pares de medias realizado con el test de Bonferroni mostró que los productos de reacción de QMA3 y QMF3 tuvieron diferencias significativas respecto a la composición del aceite ($P < 0.05$). Aun así las conversiones logradas no resultaron satisfactorias.

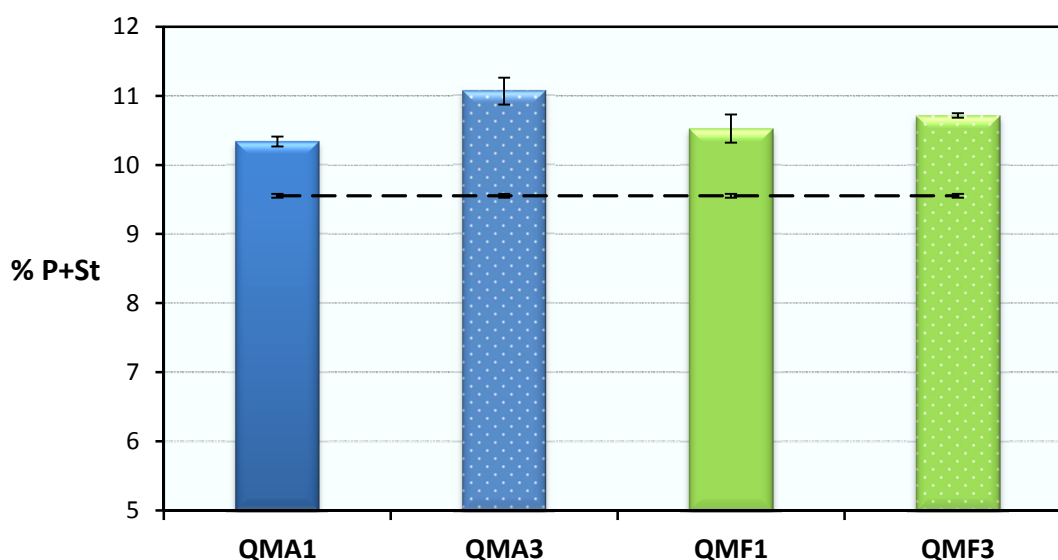


Fig. 4.4. Actividad de los preparados enzimáticos obtenidos mediante variaciones en el primer protocolo de inmovilización, medida a través de la Composición de ácidos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en glicéridos (% P+St) de los productos de acidólisis a 60 °C, 8 h de reacción, 0.093 g de biocatalizador y demás condiciones acorde a Sección 2.3.5. Soporte empleado: microesferas de quitosano modificadas (QM). Para relacionar tratamiento con biocatalizador ver tabla 4.2. Para comparación se incluye la composición original del aceite de girasol (SO). Para comparación se incluye, en línea punteada, la composición original del aceite de girasol (SO).

4.4.2. Segundo protocolo de inmovilización ensayado: análisis de la adición inicial de etanol/ final de acetona

Los resultados obtenidos con el primer protocolo de inmovilización y sus variantes no fueron los pretendidos, con lo cual tuvo lugar una nueva búsqueda de antecedentes de técnicas de inmovilización de *Rhizomucor miehei*, para obtención de biocatalizadores que debían ser empleados en reacciones más complejas que la hidrólisis, como la acidólisis. El procedimiento más acorde al sistema en estudio en esta tesis resultó ser el descrito por Esteban et al. (2009), quienes inmovilizaron lipasas del mismo CLP sobre un soporte hidrofóbico comercial (Accurel MP-1000) y las emplearon en la alcoholólisis de aceite de hígado de bacalao y aceite de atún. Adicionalmente, este protocolo involucraba el empleo de una cantidad mayor de CLP en el medio de inmovilización, lo cual se correspondía con lo deducido a partir de los resultados de los ensayos de adsorción anteriores (Sección 4.4.1.).

En este protocolo el contacto inicial de los soportes con etanol está asociado al empleo de soportes de polipropileno, y el agregado final de acetona se realiza para promover la precipitación de las proteínas de la solución de inmovilización sobre los sólidos.

4.4.2.1. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados

La Tabla 4.7 muestra los 4 tipos de biocatalizadores obtenidos debido a las diferencias introducidas en el segundo protocolo de inmovilización, junto a las absorbancias iniciales y finales de los sobrenadantes y el contenido de proteína asociado, cuantificado a través de los métodos UV/Vis a 280 nm (II) y UV/Vis a 280 nm (III) . En forma complementaria, se empleó el método de diferencia de peso (Δ Peso) para cuantificar el contenido de proteína sobre los soportes.

La adición final de acetona al medio de inmovilización dio lugar a biocatalizadores con mayor contenido de proteína, cumpliendo el objetivo en primera instancia. Si bien la absorbancia final de los medios a los que se agregó acetona fue mayor que la inicial, esto se debió a la presencia de este nuevo componente. Para poder suprimir su efecto, se

Tabla 4.4.

Inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* en diferentes soportes: métodos para la cuantificación de la lipasa adsorbida mediante la medición de absorbancia en UV/ Vis a 280 nm.

Biocatalizador	Mediciones		Proteína/Soporte (mg/g)			Eficiencia de Inmovilización (%)
	ABS 280 nm (t= 0 h)	ABS 280 nm (t= 7 h)	UV/Vis 280 (I)	UV/Vis 280 (II)	UV/Vis 280 (III)	
Q	0.491	0.396	669.589	208.059	31.107	18.73
QM	0.491	0.448	356.087	110.651	16.544	9.79
ODSB	0.491	0.361	918.972	285.544	42.692	25.85
Blanco	0.491	0.488	-	-	-	-

Tabla 4.5.

Seguimiento de la inmovilización. Valores de absorbancia en UV/ Vis a 280 nm.

Tiempo (h)	Q	QM	ODSB	Blanco
0	0.491	0.491	0.491	0.491
2	0.385	0.427	0.242	0.474
4	0.371	0.426	0.361	0.481
6	0.393	0.447	0.361	0.473
7	0.396	0.448	0.361	0.488

Tabla 4.6.

Inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* introduciendo variaciones sobre el primer protocolo ensayado: métodos para la cuantificación de la lipasa adsorbida mediante la medición de absorbancia en UV/ Vis a 280 nm.

Biocatalizador	Protocolo		Mediciones		Proteína/Soporte (mg/g)		Eficiencia de Inmovilización (%)
	Temperatura (° C)	Enzima (ml CLP/g Soporte)	ABS 280 nm (t= 0 h)	ABS 280 nm (t= 5 h)	UV/Vis 280 (II)	UV/Vis 280 (III)	
QMA1	25	1	0.223 ^a	0.199	0.683	0.101	0.18
QMA3	25	3	0.458 ^b	0.451	29.436	4.397	2.65
QMF1	3	1	0.199 ^a	0.230	-	-	-
QMF3	3	3	0.219 ^c	0.284	-	-	-

^a Valor de absorbancia correspondiente a la disolución: 0.5 ml de sobrenadante + 2.5 ml de buffer fosfato.

^b Valor de absorbancia correspondiente a la disolución: 0.4 ml de sobrenadante + 2.6 ml de buffer fosfato.

^c Valor de absorbancia correspondiente a la disolución: 0.2 ml de sobrenadante + 2.8 ml de buffer fosfato.

Tabla 4.7.

Inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* con el segundo protocolo: métodos empleados para la cuantificación de la lipasa adsorbida.

Biocatalizador	Protocolo		Mediciones		Proteína/Soporte (mg/g)				Eficiencia de Inmovilización (%)
	Etanol (ml)	Acetona (ml)	ABS 280 nm (t= 0 h)	ABS 280 nm (t= 24 h)	UV/Vis 280 (II)	UV/Vis 280 (III)	Δ Peso	Proti II	
QMB	0	0	0.217 ^a	0.197	285.841	42.762	150.418	-	9.22
QMBA	0	5	0.217 ^a	0.347	861.408	128.808	133.316	-	27.80
QME	5	0	0.206 ^b	0.200	89.334	13.369	127.268	-	2.92
QMEA	5	5	0.206 ^b	0.349	711.014	106.312	126.582	-	22.79
Blanco acetona			0.19						
QM1-1	0	0						57.96	11.78

^a Valor de absorbancia correspondiente a la disolución: 0.02 ml de sobrenadante + 3 ml de buffer fosfato.

^b Valor de absorbancia correspondiente a la disolución: 0.02 ml de sobrenadante conteniendo etanol + 3 ml de buffer fosfato.

preparó una solución de acetona en buffer de igual concentración a la alcanzada en los sobrenadantes, y tras realizar la dilución correspondiente se midió la absorbancia de la misma (Abs = 0.19). Descontando este valor, se realizaron los cálculos pertinentes a la cuantificación de proteína, lo que permitió llegar a la conclusión antes mencionada.

Respecto al efecto del etanol, contrarrestando QMB con QME y QMBA con QMEA, puede notarse que su agregado condujo a derivados enzimáticos con menor cantidad de proteína que sus pares correspondientes. Ambas conclusiones se alcanzaron analizando los resultados de los métodos UV/Vis 280 (II) y UV/Vis 280 (III), siendo este último el más confiable. Estas mismas deducciones no pudieron lograrse empleando el método de Δ Peso, ya que para éste el biocatalizador con mayor carga de proteína fue QMB, teniendo los restantes derivados cantidades similares. Cabe recordar que este método cuantifica todo material adicional al soporte tras la inmovilización, que podrían ser componentes adicionales del CLP como así también agua retenida que no haya sido posible eliminar durante el secado. Dadas las disparidades encontradas, resulta más factible extraer conclusiones de la actividad manifestada por los mismos en la reacción de interés. No obstante, en un ensayo de inmovilización independiente al analizado, microesferas de quitosano modificadas (QM1-1 en la Tabla 4.7) fueron usadas para adsorción de las lipasas de *Rhizomucor miehei* siguiendo el mismo protocolo empleado con QMB. En esta oportunidad, dado que ya se disponía del kit Proti II (Wiener lab., Argentina), la cuantificación de proteínas adsorbidas sobre este soporte resultó ser de 57.96 mg de proteína/ g de soporte, un valor muy similar al obtenido para QMB usando el método de UV/Vis 280 (III), 42.76 mg de proteína/ g de soporte. Este hecho permitiría concluir que el método de UV/Vis 280 (III) es el más confiable de los 3 empleados y que por ende, las conclusiones extraídas tras su aplicación serían las más adecuadas.

Por otra parte la eficiencia de inmovilización para los biocatalizadores preparados con esta técnica varió entre 2.92 y 27.80 %. Si bien estos valores fueron similares a los obtenidos con el primer protocolo, teniendo en consideración que las concentraciones iniciales de proteína no fueron las mismas, los resultados no son comparables.

4.4.2.2. Actividad de los biocatalizadores preparados

La composición en ácidos grasos saturados palmítico y esteárico (% P+St) de los productos de acidólisis, logrados con cada uno de los biocatalizadores tras 24 h de reacción, se muestran en la Fig. 4.5. Todos los lípidos estructurados obtenidos mostraron diferencias altamente significativas respecto al aceite de girasol ($P < 0.0001$). En lo que a los tratamientos se refiere, mediante un ANOVA doble se evidenció que el contacto del soporte con etanol produjo diferencias significativas en la actividad de los biocatalizadores ($P = 0.0012$) presentando un efecto negativo sobre la misma; sin embargo, el efecto de añadir acetona al final del protocolo y la interacción entre ambas variables, no resultaron significativos ($P = 0.1481$ y $P = 0.661$, respectivamente). Para la acidólisis en las condiciones ensayadas, los biocatalizadores más activos resultaron ser QMB y QMBA, quienes lograron una composición promedio de 23.5 y 22.4 % de ácidos palmítico y esteárico, respectivamente, en los glicéridos del producto de reacción, lo que se corresponde a una incorporación de 146.4 y 134.2 % en relación al aceite, respectivamente.

La adición de acetona no influyó en la actividad de los biocatalizadores pero, como pudo observarse en la sección 4.4.2.1, condujo a derivados con mayor contenido de proteína. Este resultado se podría interpretar teniendo presente que el CLP posee en su composición otras proteínas además de las de *Rhizomucor miehei*. De este modo, el agregado de acetona podría haber causado que se adhiran sobre la superficie del soporte otras proteínas que no poseen actividad catalítica en la reacción de interés. Este hecho implicaría que el proceso de adsorción que involucró a las proteínas activas se dio durante el tiempo que duró el protocolo, mientras que las inactivas fueron retenidas por un mecanismo diferente, debido al agregado final de acetona. Así también, puede inferirse que la existencia de estas proteínas adicionales no impidió el acceso de los sustratos al sitio activo de las lipasas. No obstante, esta posibilidad podría llegar a darse en el caso que se emplearan contenidos mayores de CLP en el medio de inmovilización. Otro aspecto relacionado que se podría derivar de estos resultados es que las microesferas de quitosano modificadas empleadas como soporte en la adsorción tradicional (sin agregar acetona) fueron capaces de retener en su superficie solo las proteínas de *Rhizomucor*

miehei, lo cual indicaría que dichas microesferas podrían ser empleadas en procesos de purificación de extractos crudos de lipasas. Aplicaciones de este tipo han sido dadas a soportes hidrofóbicos, tales como Octyl-agarose (Palomo et al., 2002; Nieto et al., 2005).

El contacto previo de los soportes con etanol y la permanencia de esta sustancia en el medio de inmovilización no condujeron en este caso a la obtención de biocatalizadores más activos. Esto remarca la particularidad de los sistemas “enzima - soporte -proceso de inmovilización”. Dado que el desempeño de un derivado enzimático es altamente dependiente del medio de inmovilización, no sorprende que la actividad catalítica también dependa de la existencia de una sustancia aditiva, la cual puede afectar la interacción de la enzima con el soporte y generar cambios en la conformación de la misma (Cao, 2006).

Por otra parte, si bien es cierto que se incorporó 1.5 veces más cantidad de biocatalizador al medio de reacción que en el primer ensayo y que el tiempo de reacción se prolongó hasta las 24 h, seguramente las condiciones asociadas al segundo protocolo de inmovilización (mayor concentración de CLP, menor pH y fuerza iónica), condujeron a que la lipasa tomara una conformación más activa.

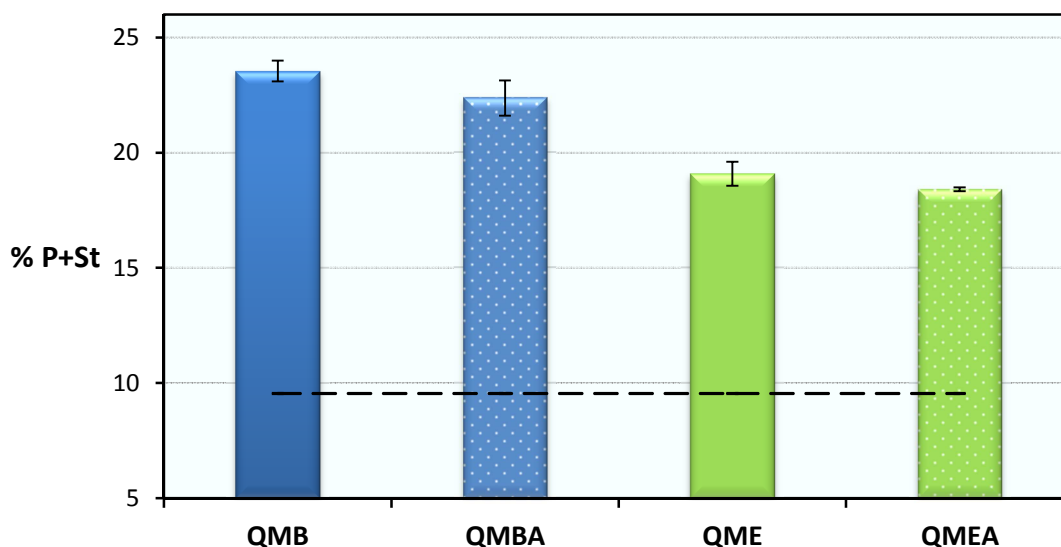


Figura 4.5. Actividad de los preparados enzimáticos obtenidos mediante el segundo protocolo de inmovilización, medida a través de la Composición de ácidos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en glicéridos (% P+St) de los productos de acidólisis a 60 °C, 24 h de reacción, 0.250 g de biocatalizador y demás condiciones acorde a Sección 2.3.5.. Soporte empleado: microesferas de quitosano modificadas (QM). Para relacionar tratamiento con biocatalizador ver tabla 4.3. Para comparación se incluye, en línea punteada, la composición original del aceite de girasol (SO).

Finalmente, en base a los resultados de las variantes impuestas sobre el segundo protocolo de inmovilización ensayado y de la actividad de los biocatalizadores obtenidos con ellas, se seleccionó como protocolo a seguir para las siguientes inmovilizaciones a efectuar aquel que dio lugar al derivado QMB, es decir, sin el agregado de etanol ni de acetona.

Resulta necesario mencionar que para medir cuan efectivo ha sido el proceso de inmovilización, es necesario comparar la actividad del biocatalizador obtenido con la de la lipasa en su estado libre, incorporando *misma cantidad de proteína* en uno u otro estado, al medio de reacción. Esta labor se desarrolló posteriormente tras la preparación del soporte óptimo, la cual se detalla en el Capítulo 5.

4.4.3. Importancia de la adecuada determinación del contenido de proteína en los medios de inmovilización/soportes

Habrán notado el lector, según lo manifestado en las secciones anteriores, lo primordial de disponer de una técnica precisa y reproducible para la cuantificación de proteínas en los medios de inmovilización y, en consecuencia en los soportes para adsorción. No solo esto resulta imperioso porque puede llevar a deducciones incorrectas de los resultados, sino porque también se podrían estar realizando comparaciones no válidas, por ejemplo si se decidiera incorporar en los medios de reacción mismas cantidades de proteína, en vez de biocatalizador (soporte+proteínas), para evaluar el desempeño de los mismos.

Como ya se mencionó, no se dispone de un método para cuantificación de proteínas que permita obtener resultados absolutamente precisos y que sea sencillo y rápido de realizar; cada uno tiene ventajas y limitaciones. Dado que el empleo del método espectrofotométrico UV/Vis a 280 nm mostró problemas de reproducibilidad, el kit comercial Proti 2 fue el empleado durante las inmovilizaciones realizadas a partir de aquí en el transcurso de esta tesis, ya que dio lugar a soluciones más estables que permitieron una cuantificación adecuada y resultados repetitivos.

El procedimiento más ampliamente reportado en los trabajos de inmovilización, que consiste en medir la actividad del sobrenadante en la reacción de interés en diversas instancias del protocolo, no fue compatible con la reacción de acidólisis ni con el modo de cuantificar la actividad a través de la composición en ácidos grasos palmítico y esteárico (% P+St) de los productos de reacción. Cuando se introdujo al sistema de reacción un volumen dado de solución de inmovilización inicial, donde la cantidad de CLP era conocida, el % P+St resultó mucho menor al obtenido cuando la reacción se realizó empleando esa misma cantidad pero directamente de CLP como catalizador. Esto se debió a que al incorporar la solución de inmovilización al medio de reacción se introduce una cantidad importante de agua que hace que el paso preponderante de reacción sea el de hidrólisis.

Algo que también demuestra lo complejo que resulta la determinación de la proteína contenida en los biocatalizadores preparados es el hecho de que en trabajos donde se inmovilizan lipasas para ser usadas en reacciones complejas como la acidólisis, los mismos son directamente empleados en la reacción de interés sin realizar ningún tipo de análisis para cuantificación de proteínas adsorbidas; aun cuando llevan a cabo estudios en los que se emplean distintas relaciones de CLP/ soporte durante la inmovilización para lograr biocatalizadores con diferentes características (Hita et al., 2009) .

4.4.4. Desorción de las lipasas

Los espectros de absorbancia correspondientes a las soluciones de lavado del biocatalizador se muestran en la Fig. 4.6. Como puede apreciarse, las soluciones de los primeros lavados muestran una zona de amplia absorción para las longitudes de onda comprendidas entre 235 y 265 nm, lo que correspondería a la lipasa y a algún otro componente antes presente en el biocatalizador. A partir del quinto lavado (se realizaron 9 lavados en total) todos los espectros obtenidos resultaron prácticamente iguales. Esto indicaría que 5 lavados con la solución de Tritón X-100 en buffer fosfato alcanzarían para desorber la lipasa del soporte, o al menos para llegar a la condición de máxima desorción ya que la evidencia de soluciones de lavado inalterables no significa directamente que toda la lipasa se haya desorbido. Cabe mencionar que si bien se esperaría que la mayor absorción de la lipasa en UV/Vis se diera para la longitud de onda de 280 nm, en consistencia con lo expuesto anteriormente para el seguimiento de la inmovilización, la existencia de un compuesto surfactante como el Tritón y la turbidez generada en el medio debido a la desnaturalización de las proteínas probablemente hayan ocasionado un corrimiento en este valor.

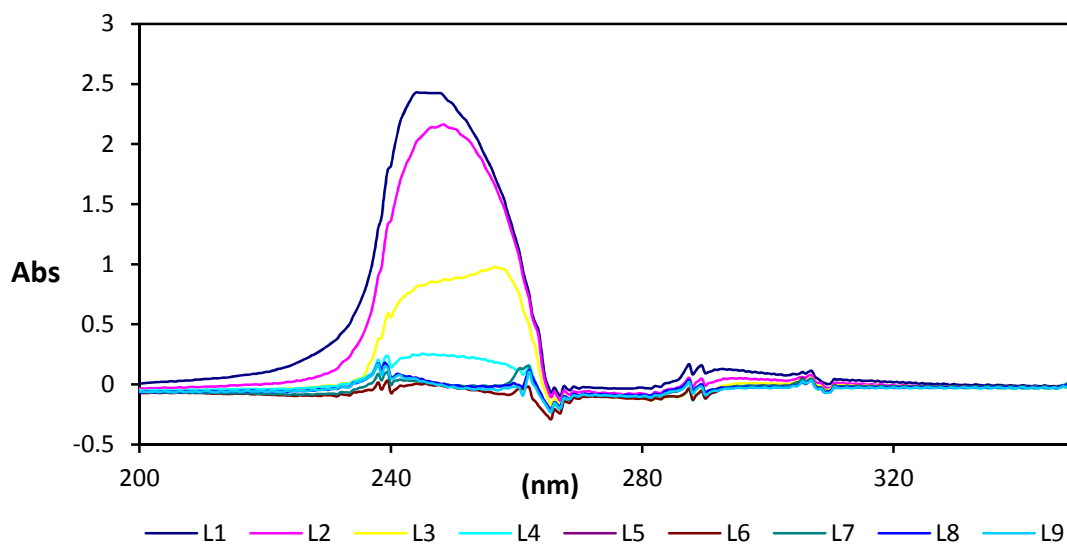


Fig. 4.6. Espectros de absorbanza de UV/Vis de las soluciones de Tritón X-100 luego de haber sido empleadas en el lavado del biocatalizador (Li= lavado número i).

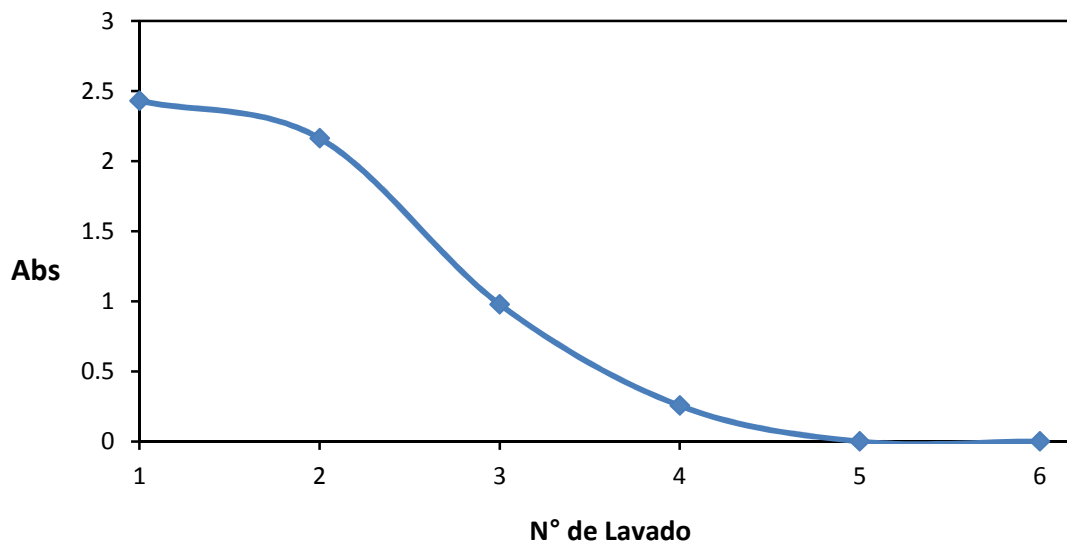


Fig. 4.7. Desorción de las lipasas: curva de disminución del valor máximo de absorbanza (250 nm aproximadamente) en función del número de lavado.

Adicionalmente, es posible construir la curva de desorción de las lipasas (Fig. 4.7), graficando la máxima absorbancia obtenida en cada lavado, a fin de obtener una idea más

clara de como se fue dando el proceso. Como se observa en dicha figura, el máximo desprendimiento del material adsorbido ocurre entre hasta el cuarto lavado.

En lo que se refiere a los espectros obtenidos por ^{13}C NMR, como lo indica la Fig. 4.8, las microesferas lavadas mostraron los mismos picos característicos de aquellas sobre las que no se habían inmovilizado lipasas. Así también, no se registró ningún pico adicional que correspondiera a la estructura química de la lipasa, lo que corroboró la completa desorción de las mismas. Vale mencionar que en el Capítulo 5 se realiza un análisis detallado de la información brindada por esta técnica.

De este modo queda demostrado que el segundo protocolo de inmovilización da origen a un biocatalizador en el cual el soporte puede ser regenerado para ser usado posiblemente en la adsorción de lipasas nuevas. Quedaría como un trabajo a futuro corroborar si se mantiene la capacidad de carga de los mismos, lo cual se esperaría teniendo en cuenta que la estructura química del material no pareciera haberse alterada por el proceso empleado para la desorción de las proteínas.

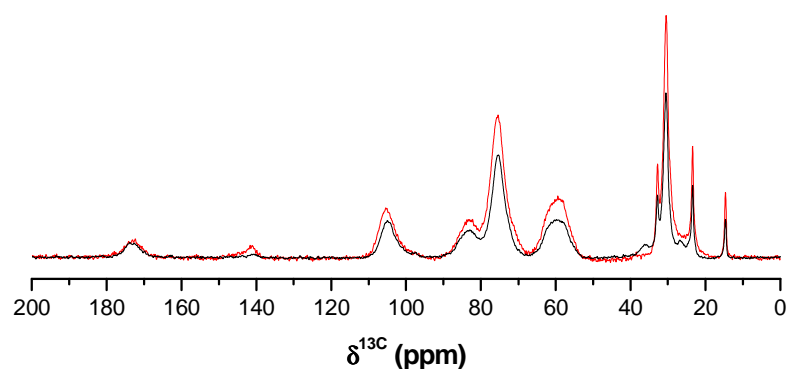


Figura 4.8. Espectros de ^{13}C NMR correspondientes al soporte original (QMB, en línea negra) y al soporte recuperado tras el tratamiento de desorción de la lipasa (QMB desorción, en línea roja).

4.5. Conclusiones

El desarrollo de un nuevo biocatalizador no es tarea fácil, pues conlleva lidiar con la complejidad propia de los sistemas biológicos. Un aspecto fundamental es la elección de la técnica a emplear para la unión de la enzima al soporte sólido. En este capítulo se expusieron las labores experimentales más relevantes que llevaron a la obtención de una técnica adecuada para la retención de las lipasas de *Rhizomucor miehei* empleando como soporte microesferas de quitosano modificadas. Esto se hizo mediante el ensayo de dos protocolos de inmovilización distintos y el análisis conjunto del efecto de algunas variables propias de la técnica: temperatura, concentración de preparado enzimático, y efecto de añadir etanol o acetona, según fuese el caso. En virtud de todos los resultados presentados en este capítulo, se seleccionó como método de inmovilización al segundo protocolo, sin enjuague previo del soporte con etanol ni finalización de la inmovilización con adición de acetona. También, se estimaron los contenidos de proteína presentes en los biocatalizadores obtenidos principalmente mediante técnicas colorimétricas.

Por último, se demostró que es factible recuperar los soportes realizando lavados de los biocatalizadores con Tritón X-100.

Sin embargo, para dar por concluida las tareas abocadas a la realización del biocatalizador, resulta necesario analizar en detalle otro aspecto igual de fundamental: el soporte. El capítulo siguiente se centrará en esta cuestión, más específicamente en qué grado de hidrofobicidad debe tener el mismo para dar lugar a una conformación de la lipasa que permita la hiperactividad. Es por esta razón, que la comparación de la actividad del derivado enzimático con respecto a la de la lipasa libre y el estudio de la estabilidad operacional, no se realizaron en conjunto con la elección del protocolo de inmovilización, sino que se llevaron a cabo al momento de disponer del biocatalizador debidamente preparado (lo cual se presenta en los próximos capítulos).

4.6. Referencias

Arroyo M., Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, *Ars Pharmaceutica* 39 (2) (1998) 23-39.

Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Huguet J., Guisán J.M., A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnology and Bioengineering* 58 (1998) 486-493.

Bosley J., Peilow A., Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (1997) 107-111.

Cao L., Covalent Enzyme Immobilization, in *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG (2006).

Carrín M.E., Crapiste G.H., Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture, *Journal Food Engineering* 84 (2008) 243-249.

Castro H.F., Silva M.L.C.P., Silva G.L.J.P, Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (2000) 849-858.

dos Reis-Costa L., Soares A.M., França S.C., Trevisan H.C., Roberts T.J., Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor, *Protein Peptide Letters* 6 (2003) 619-28.

Esteban L., Muñío M.d.M., Robles A., Hita E., Jiménez M.J., González P.A., Camacho B., Molina E., Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types, *Biochemical Engineering Journal* 44 (2009) 271-279.

Fernández-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernández-Lorente G., J.M. Guisán, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1998) 185-197.

Fernandez-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M., Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties, *Process Biochemistry* 43 (2008) 1061–1067.

Fernández-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernández-Lafuente R., Palomo J.M., Guisán J.M., Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties, *Process Biochemistry* 43 (2008) 1061–1067.

Fernández-Lorente G., J.M. Palomo, Z. Cabrera, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports, *Enzyme Microbial Technology* 41 (2007) 565–569.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Cabrera Z., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports, *Enzyme Microbial Technology* 41 (2007) 565–569.

Foresti L., Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación, Tesis doctoral, UNS, Argentina (2005).

Gitlesen T., Bauer M., Adlercreutz P., Adsorption of lipase on polypropylene powder, *Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1345 (1997) 188-196.

Hita E., Robles , B. Camacho A., Gonzalez P.A., Esteban L., Jimenez M.J., Munio M.M., Molina E., Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor, *Biochemical Engineering Journal* 46 (2009) 257-264.

Hita E., Robles A., Camacho B., Ramírez A., Esteban L., Jiménez M., Muñío M.M., González P.A., Molina E., Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in

docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases, *Process Biochemistry* 42 (2007) 415–422.

H-Kittikun A., Kaewthong W., Cheirsilp B., Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS, *Biochemical Engineering Journal* 40 (2008) 116-120.

Jiménez M.J., Esteban L., Robles A., E. Hita, González P.A., Muñío M.M., Molina E., Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis, *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 172-179.

Lee K.-T, Akoh C.C., Immobilization of Lipases on Clay, Celite 545, Diethylaminoethyl-, and Carboxymethyl-Sephadex and their Interesterification Activity, *Biotechnology Techniques* 12 (1998) 381-384.

Lee K.-T., Akoh C., Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (1996) 611-615.

Malcata F.X., Reyes H.R., Garcia H.S., Hill C.G. Jr., Amundson C.H., Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review, *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1990) 890-910.

Mateo C., Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microbial Technology* 40 (2007) 1451-1463.

Nieto I., Rocchietti S., Ubiali D., Speranza G., Morelli C.F., Fuentes I.E., Alcantara A.R., Terreni M., Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract - Enzymatic resolution of (R,S)-2-Tetralol, *Enzyme Microbial Technology* 37 (2005) 514-520.

Pacheco C., Crapiste G.H., Carrín M.E., Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: Kinetic behavior, *Journal of Food Engineering* 98 (2010) 492-497.

Palomo J.M, Fernández-Lorente G., Mateo C., Segura R.L., Ortiz C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology* 22 (2006) 143-152.

Palomo J.M., Muñoz G., Fernández-Lorente G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M., Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19 (2002) 279-286.

Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010 b) 15-32.

Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010 a) 1-22.

Soumanou M.M., Bornscheuer U.T., Schmid R.D., Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998) 703–710.

Tischer W., Wedekind F., Immobilized enzymes: methods and applications. *Topics in Current Chemistry* 200 (1999) 95–126.

Vikbjerg A.F., Peng L.F., Mu H.L., Xu X.B., Continuous production of structured phospholipids in a packed bed reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82 (2005) 237-242.

Wilson L., Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Illanes A., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports, *Enzyme Microbial Technology* 38 (2006) 975–980.

PREPARACIÓN DE BIOCATALIZADORES: SOPORTE

5.1. Introducción

Las propiedades de las enzimas inmovilizadas son gobernadas por las características tanto de la enzima como del material de soporte. La interacción entre los dos da lugar a un biocatalizador con propiedades físico-químicas y cinéticas específicas que pueden ser decisivas para su aplicación práctica. Por lo tanto, un soporte elegido en forma adecuada puede mejorar significativamente el rendimiento del derivado enzimático. Aunque es sabido que no hay un soporte universal para todas las enzimas y sus aplicaciones, cualquier material considerado para tal uso debe cumplir con algunas características deseables, especialmente si piensa emplearse en un lecho empacado. Estas incluyen: alta afinidad por las proteínas, disponibilidad de grupos funcionales reactivos para reacciones directas con las enzimas y para modificaciones químicas, estabilidad mecánica y rigidez, regenerabilidad y facilidad de preparación en diferentes configuraciones geométricas, permitiendo lograr la permeabilidad y superficie adecuadas para la biotransformación elegida. Adicionalmente,

para uso con alimentos, aplicaciones farmacéuticas, médicas y agrícolas, se requiere no toxicidad y biocompatibilidad de los materiales. (Krajewska, 2004).

De los materiales disponibles para inmovilizar enzimas, orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos, el quitosano resulta sumamente apropiado debido a que ofrece la mayoría de las características anteriores. Más aún, actualmente este biopolímero junto con la quitina, tienen un gran número de aplicaciones reales y potenciales debido a su versatilidad química, abundancia natural y compatibilidad con el medio ambiente.

Sin embargo, para que este material pueda ser empleado como soporte de las lipasas de *Rhizomucor miehei* resulta necesario modificar su forma física, de polvo o escamas, a una más adecuada para ser empleada principalmente en reactores continuos. Simultáneamente, como se mencionó anteriormente (Capítulo 4), estas enzimas poseen la capacidad de adsorberse en una conformación abierta, que promueve la hiperactividad, sobre soportes hidrofóbicos, con lo que se vuelve imperioso modificar la naturaleza hidrofílica del quitosano. Una forma de realizarlo es injertando cadenas alquílicas largas mediante una reacción de aminación reductiva. De este modo, la tarea inicial desarrollada en este capítulo estuvo dirigida a la preparación de microsferas de quitosano modificadas con la finalidad de conferirles un carácter más hidrofóbico. Simultáneamente, se llevó a cabo un estudio de la influencia de las condiciones de reacción en la obtención de partículas con diferente grado de modificación y como esto condicionó la adsorción y la actividad de las lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas.

Por otra parte, dado que no existen antecedentes de aminación reductiva efectuada sobre microsferas, el desarrollo de estos soportes novedosos necesitó de la corroboración de la modificación impuesta. Para ello, se emplearon diferentes técnicas de caracterización física y química de materiales.

De este modo, el trabajo experimental que se detalla en este capítulo tuvo como finalidad la obtención de un biocatalizador mecánicamente resistente y de alta actividad catalítica en reacciones de acidólisis, *enfocándose en la preparación del soporte*. Cabe mencionar que las reacciones en las que se probaron los derivados enzimáticos fueron

desarrolladas en modo batch, por ser más simples de llevar a cabo, pero las características deseadas para el biocatalizador siempre se establecieron teniendo en cuenta su uso a futuro en sistemas continuos.

5.2. Quitosano

El quitosano en sí es un polímero de β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina), derivado de la desacetilación parcial de la quitina. La quitina por su parte, es un polímero natural de cadena lineal formado por poli β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina) que representa una de las fuentes renovables orgánicas más abundantes del planeta. Es el principal constituyente de los caparzones de los crustáceos, los exoesqueletos de los insectos y las paredes celulares de hongos en los que proporciona fuerza y estabilidad.

El quitosano se obtiene por N-desacetilación, pudiendo variar con el proceso el grado de modificación; es por consiguiente un copolímero de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Fig. 5.1), y para caracterizarlo se emplea el grado de desacetilación (DD). Es un material insoluble en agua, pero la presencia de grupos amino hacen que sea soluble en soluciones ácidas de pH menor a 6.5 aproximadamente. Comercialmente, ambos polímeros se obtienen relativamente a bajo costo a partir, principalmente, de los residuos del procesamiento industrial de los mariscos. Básicamente, la quitina se obtiene por tratamiento con NaOH y luego con HCl, para remover los demás componentes del exoesqueleto. Para producir el quitosano, la quitina se somete a N-desacetilación mediante un tratamiento a alta temperatura con una solución de NaOH, seguido por procedimientos de purificación (Ramos et al. 2003), lo que permite obtener un material con distintas propiedades químicas y biológicas.

Por otro lado, es posible obtener compuestos derivados del quitosano, gracias a que posee en su estructura molecular grupos reactivos amino e hidroxilo susceptibles de modificaciones químicas. Varias clases de modificaciones han sido estudiadas con el objetivo de mejorar sus propiedades: la alquilación, la acilación, la carboxialquilación y la cuaternización entre otras (Krajewska, 2004). Adicionalmente, al disolverse en solución

acuosa acidificada los grupos amino adquieren carga positiva, lo que le otorga como propiedad singular la capacidad de formar geles en presencia de compuestos polianiónicos.

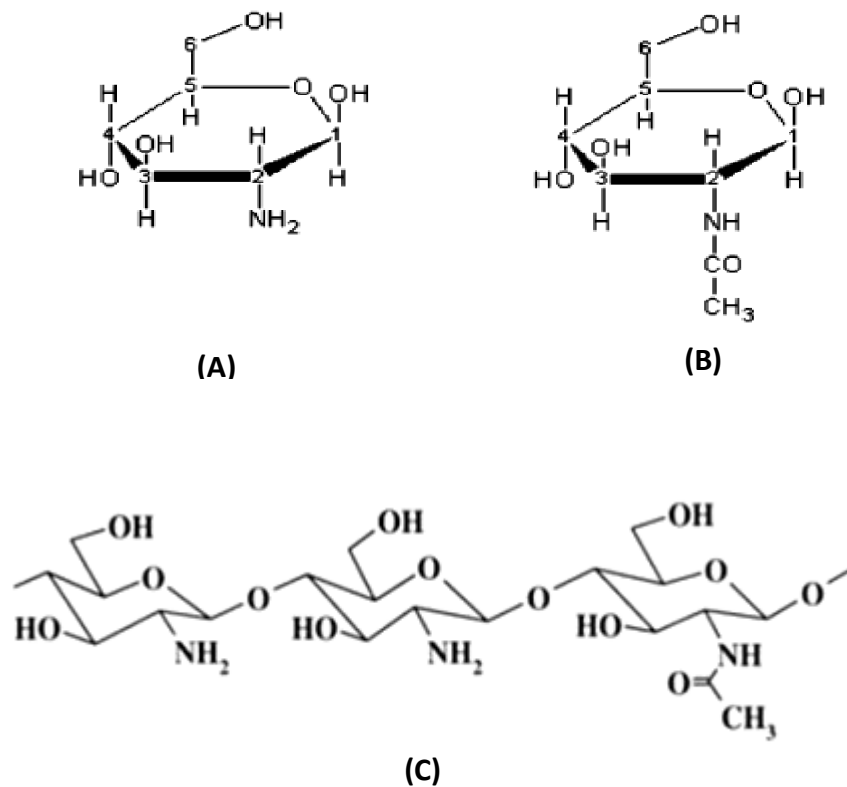


Figura 5.1. Estructura Química de (A) monómero del quitosano y (B) monómero de la quitina. (C) Estructura del quitosano parcialmente desacetilado.

El quitosano ha sido empleado para inmovilización de enzimas en forma de polvo, de escamas o en diferentes conformaciones a partir de la preparación de geles. Estos geles han dado lugar a films, lechos, membranas, partículas, fibras, y fibras huecas entre otras (Krajewska, 2004; Tangpasuthadol et al., 2003; Biró et al., 2008, Foresti y Ferreira, 2007, Pillai et al. 2009). Los métodos empleados para la preparación de los mismos se pueden dividir en cuatro grupos: evaporación del disolvente, neutralización, reticulación y gelificación de ionotrópicos (Krajewska, 2004).

De estos métodos, el más empleado para producir partículas esféricas de diferentes tamaños es la *neutralización*. En este, un gel obtenido a partir de una solución ácida de quitosano es puesto en contacto con una solución alcalina y el incremento en el pH conduce a la precipitación del material. Las partículas, o lechos de partículas, son obtenidos al añadir el gel de quitosano gota a gota a una solución de NaOH frecuentemente preparada con mezclas de agua - etanol/metanol donde el alcohol, al ser un compuesto no solvente para el quitosano, facilita la solidificación de las partículas.

5.3. Caracterización del Quitosano

Como ya se mencionó, el quitosano es un polímero cuyas características dependen del proceso empleado para obtenerlo; por lo cual su caracterización inicial es fundamental para poder relacionar el desempeño del material utilizado en esta tesis con los resultados reportados por otros autores.

5.3.1. Peso molecular viscosimétrico medio

Dado que el quitosano es un polímero compuesto por cadenas de distinta longitud, su caracterización incluyó la determinación del peso molecular viscosimétrico medio (M). Este se calculó mediante la ecuación de Mark-Houwink (Ec. 5.1), la cual relaciona la viscosidad intrínseca (η) con M, a través de dos parámetros, K y α (Ortona et al., 2008).

$$\eta = KM^\alpha \quad (5.1)$$

Las mediciones de viscosidad se llevaron a cabo empleando un viscosímetro capilar Ubbelohde K292-1 (Cannon Instrument Co.), el cual se sumergió en un baño de agua para mantener la temperatura constante en 25 °C. Las soluciones de quitosano empleadas en la determinación se prepararon usando solución buffer 0.25 M ácido acético/0.25 M acetato de sodio como solvente y las concentraciones de las mismas fueron menores que 1 % (m/v). Las mediciones consistieron en registrar repetidas veces los tiempos asociados a las soluciones y al solvente siguiendo las especificaciones fijadas por la norma ASTM D 2857-95 (2001). Los parámetros de la ecuación de Mark-Houwink fueron obtenidos de Kasai et al. (2000) para las condiciones empleadas, siendo $K = 1.57 \times 10^{-2}$ y $\alpha = 0.79$ para expresar η en

cm³/g y M en Da. Estos parámetros solo son válidos para pesos moleculares promedios comprendidos entre 35 y 2220 kDa.

5.3.2. Viscosidad Brookfield

La viscosidad de una solución ácida de quitosano de una dada concentración, por lo general de 1% (m/v) en 1% de ácido acético, determinada en el viscosímetro Brookfield, es una medida muy usada para caracterizar al polímero, principalmente a nivel comercial. Por ello, se realizaron mediciones de velocidades de deformación para dados esfuerzos de corte sobre una solución con la concentración antes mencionada, empleando un viscosímetro BROOKFIELD DV-II+ (Brookfield Engineering Laboratories Inc, USA) acoplado a UL ADAPTER, correspondiente a una geometría de cilindros concéntricos.

5.4. Preparación de microesferas de quitosano

5.4.1. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula del soporte empleado en la posterior inmovilización de lipasas por lo general es determinado por el tipo de reactor a utilizar. En el caso de los reactores de lecho empacado, los soportes suelen ser mayores al resto para reducir la caída de presión (Bódalo et al., 1986). Por ello, teniendo presente que una meta a futuro era emplear el biocatalizador preparado en este tipo de reactores, se seleccionó una aguja hipodérmica de diámetro tal que permitiera tener partículas de aproximadamente 1 mm de diámetro, para la preparación de microesferas mediante el método de neutralización.

5.4.2. Porosidad de las partículas

Otra característica a tener en cuenta en la preparación o elección de un soporte es la porosidad del mismo. Materiales que contengan poros de mayor tamaño que las enzimas pueden ser propicios para que las mismas queden inmovilizadas en su interior, lo que se traduce en una disminución de la actividad neta debido a que los sustratos deben ingresar por los poros para poder reaccionar. Por el contrario, materiales con poros pequeños favorecen a la adsorción de las enzimas sobre la superficie, evitando dichas restricciones difusionales. Materiales como Accurel EP 100, con diámetro de poro de 0.14 μm y áreas

superficiales elevadas ($85 \text{ m}^2/\text{g}$) han demostrado poseer buena relación actividad/capacidad de carga de lipasa (Al-Duri et al., 1995). Si bien el quitosano en escamas posee baja área superficial BET para adsorción de lipasas, esta propiedad puede mejorarse si se emplea el material pero en forma de microesferas. Guibal et al. (1998) reportaron que mientras quitosano en forma de escamas de 2 mm de diámetro mostró un área BET de $1\text{-}2 \text{ m}^2/\text{g}$, quitosano en forma de microesferas de gel de 2.5 mm de diámetro exhibió un área BET de $250\text{-}800 \text{ m}^2/\text{g}$. Con mayores áreas superficiales y diámetros de poro pequeños se aseguraría una superficie adecuada para la adsorción de las lipasas.

5.4.3. Resistencia mecánica de las partículas

Otro requerimiento para el soporte tiene que ver con la dureza de los mismos. Es deseable que los soportes no sufran rotura ni pérdida del material durante su uso, ya sea debido a la agitación propia de los sistemas discontinuos o por las altas presiones que se pudieran generar en los reactores de lecho empacado. Para dar lugar a microesferas de quitosano que sean resistentes mecánicamente, es necesario controlar la concentración del gel empleado para la formación de partículas. Carrara y Rubiolo (1994) demostraron que soluciones de quitosano en ácido acético mayores a 3 % (m/v) dan lugar a partículas con mayor resistencia y forma regular.

Experimental: Para la formación de las microesferas de quitosano se preparó un gel disolviendo quitosano en polvo en una solución acuosa de ácido acético al 2%, hasta alcanzar una concentración de 3% (m/v). Luego, empleando agujas hipodérmicas de 1.5 mm de diámetro, el gel fue arrojado gota a gota a una solución 3:1 (v/v) de hidróxido de sodio (1N) y metanol. Este medio neutralizante permitió que las partículas permanezcan como tal. Las microesferas obtenidas fueron filtradas y posteriormente lavadas con agua destilada. Esta técnica se detalla en la Sección 2.3.1.

5.5. Modificación química de microesferas de quitosano: aminación reductiva

En las últimas décadas se han llevado a cabo numerosos estudios de modificación química de quitosano, con el fin de generar derivados con diferentes propiedades físico-químicas. Estos han encontrado aplicaciones tecnológicas variadas principalmente en el área farmacéutica, biológica y a menor nivel cosmética. Las más comunes tienen que ver con la liberación progresiva de fármacos, vectores para transfección de genes, la obtención de polímeros biológicamente activos, soportes para inmovilización de enzimas, y cromatografía hidrofóbica, entre otras (Desbrières et al., 1996; Rinaudo et al., 2005; Rinaudo, 2006; Xue et al., 2006).

Entre las técnicas desarrolladas, la reacción de aminación reductiva empleando aldehídos ha sido muy útil para obtener derivados hidrofóbicos de quitosano. Esta permite que cadenas alquílicas de diferente longitud sean injertadas en la estructura molecular, más específicamente unidas al átomo de nitrógeno del grupo NH_2 perteneciente al C2 del anillo (Fig. 5.3). El método, ampliamente discutido en la literatura, fue desarrollado inicialmente por Yalpani et al. (1983), y modificado posteriormente por Desbrières et al. (1996). El procedimiento implica la formación de una solución de quitosano con ácido acético, a la cual se le agrega el aldehído de interés disuelto en metanol o etanol, lo que lleva a un equilibrio entre la formación del ion iminio y los reactivos. El inmediato agregado de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) logra la reducción del ion permitiendo desplazar el equilibrio. El empleo de NaCNBH_3 como agente reductor se debe a que es más reactivo, selectivo y estable en medio ácido que otros compuestos empleados con aldehídos y cetonas. Luego de concluida la reacción y de secar el material se obtiene un sólido blanco y escamoso (Fig. 5.2.B), que se caracteriza por el grado de sustitución o alquilación de los monómeros de quitosano.

Para lograr diferentes derivados alquílicos, se han usado aldehídos con diferente cantidad de carbonos en la cadena; por ejemplo, Rinaudo et al. (2005) emplearon aldehídos de 3, 6, 8, 10 y 12 átomos de carbono para preparar derivados con el mismo grado de

sustitución (5 %), excepto en el caso de C12 donde obtuvieron menor sustitución (2%), y luego estudiar su comportamiento reológico y solubilidad. Vale destacar que el *grado de sustitución* es la característica que identifica a los derivados, e indica que porcentaje del total de las monomoléculas han modificado su grupo amina. Adicionalmente, dado que son dos los átomos de hidrógeno factibles de reemplazar por estas cadenas carbonadas, las unidades pueden estar mono o disustituidas.

Por otra parte, como alternativa a la aminación reductiva en forma directa, se ha propuesto la realización de la reacción en dos etapas con el fin de reducir la formación de compuestos disustituidos. Abdel-Magid et al. (1996) fueron quienes sugirieron esta reacción que involucra primero la formación de las iminas y posteriormente la rápida reducción. Adicionalmente, mostraron que el empleo de metanol como solvente permite una formación de iminas más rápida que con otros solventes.

Teniendo presente lo anterior, la necesidad de obtener un soporte hidrofóbico a partir de quitosano puede ser resuelta llevando a cabo la reacción de aminación reductiva sobre el material. Sin embargo, otras cuestiones deben definirse si se busca que este material sea posteriormente empleado como soporte de inmovilización de lipasas. Algunas de ellas son:

- Que tipo de aldehído se empleará?
- Cuál es el grado de sustitución o modificación óptimo?
- Dado que la técnica permite obtener un sólido escamoso, cuál es la forma de proceder para obtener microesferas?
- Cómo evitar que residuos de cianuro provenientes del agente reductor queden remanentes en el soporte? Este compuesto podría afectar a la enzima durante su inmovilización y lo que es peor aún, podría ser trasladado hasta el producto de reacción.

Respecto a la primera cuestión, se debe tener en cuenta que la longitud y la cantidad de cadenas injertadas es lo que determina la hidrofobicidad final del material. Una mayor presencia de átomos de carbono, ya sea por el aumento en el largo de las cadenas o por

mayor cantidad de ellas, da lugar a compuestos más hidrofóbicos. Por otra parte, las lipasas han demostrado una mejor adsorción en materiales extremadamente hidrofóbicos, tales como Octadecyl-Sepabeads. Asimismo otros soportes comerciales conteniendo cadenas alquílicas de distinta longitud, también han sido empleados en la inmovilización de lipasas, entre ellos figuran Butyl-Sepabeads, Octyl-agarose, Butyl-agarose, Butyl-toyopearl y Hexyl-toyopearl (Nieto et al. 2005; Fernandez-Lorente et al., 2008; Branco et al. 2010). Los trabajos de investigación que analizan la capacidad de estos soportes para dar lugar a derivados enzimáticos, por lo general comparan varios de ellos en simultáneo. Un factor común que se puede hallar es que a medida que la longitud de la cadena aumenta para un mismo tipo de soporte, pareciera que mayor es la actividad del biocatalizador obtenido a partir de él. A modo de ejemplo, Branco et al. (2010) inmovilizaron lipasas de *Pyrococcus furiosus* en Butyl-Sepabeads y en Octadecyl-Sepabeads, consiguiendo un 140 y 237 % de hiperactivación, respectivamente. Fernandez-Lorente et al. (2008) inmovilizaron lipasas de *Bacillus thermocatenuatus* en Butyl-toyopearl y Hexyl-toyoperl obteniendo una hiperactivación de 150 y 200 %, respectivamente. En base a esto, de los aldehídos disponibles comercialmente se seleccionó a aquel de cadena carbonada más larga para ser empleado en la aminación: dodecil aldehído (C12).

Para analizar la posibilidad de formar microesferas a partir de un gel obtenido con quitosano previamente alquilado, se procedió a realizar la reacción de aminación reductiva (Fig. 5.3) empleando una solución con quitosano en escamas. Esto se hizo siguiendo la técnica empleada por Desbrieres et al. (1995). Para ello, se disolvieron 0.5 g de quitosano en 15 ml de ácido acético al 1% (m/v) y se agitó a temperatura ambiente hasta ver formación de gel. Luego se agregaron 5 ml de etanol y se continuó agitando por 25 minutos. Pasado ese tiempo, la cantidad apropiada de dodecilaldehído correspondiente a una relación molar 1:1 NH_2 /aldehído, disueltos en 20 ml de etanol por calentamiento de la solución, fueron añadidos agitando en forma continua y vigorosa. Posteriormente se agregó el reductor, correspondiente a un exceso de 3 mol NaCNBH_3 /monomol quitosano inicial y se mantuvo la agitación hasta que la suspensión obtenida se enfrió a temperatura ambiente. Los sólidos

obtenidos fueron secados en estufa de vacío a 30 °C durante 24 h. Se obtuvo así un sólido blanco escamoso (Fig. 5.2.B).

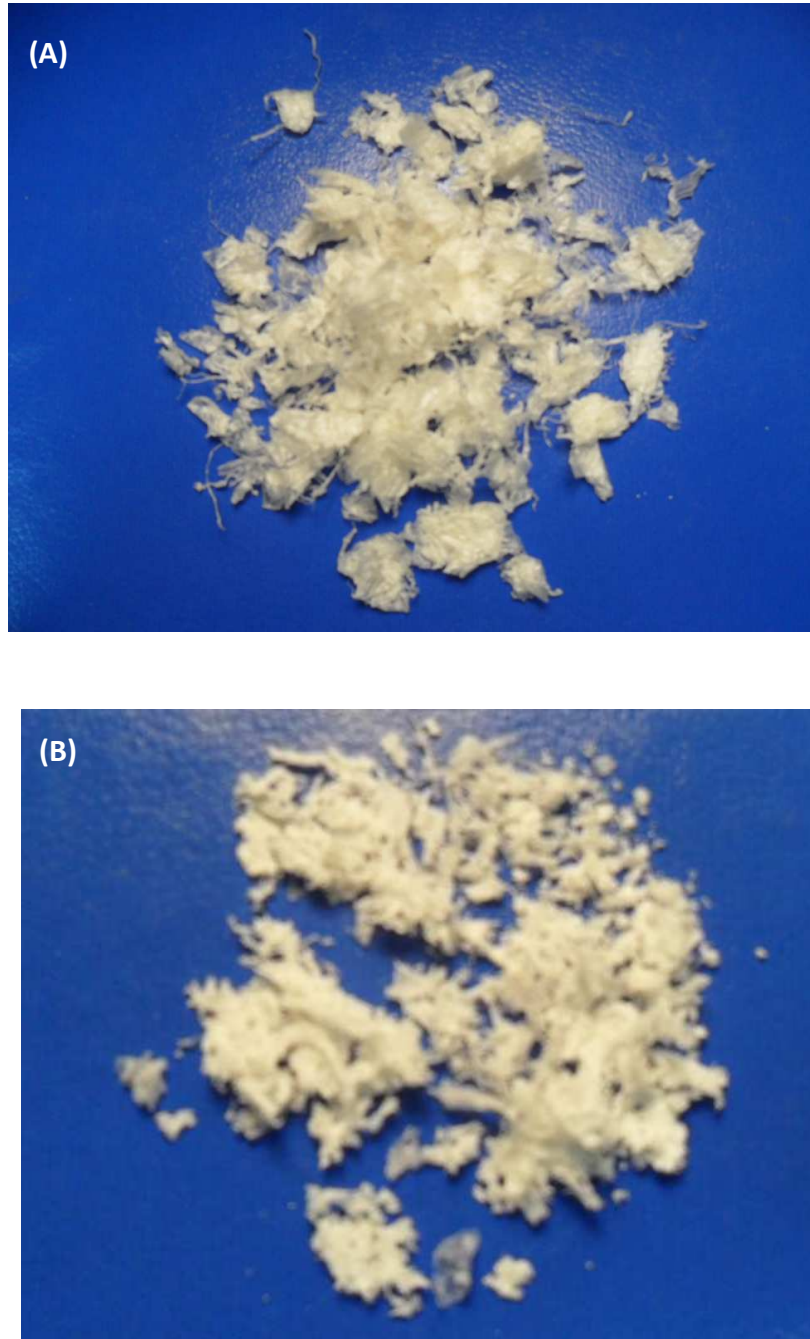


Figura 5.2. (A) Quitosano en escamas y (B) Alquil quitosano obtenido por aminación reductiva.

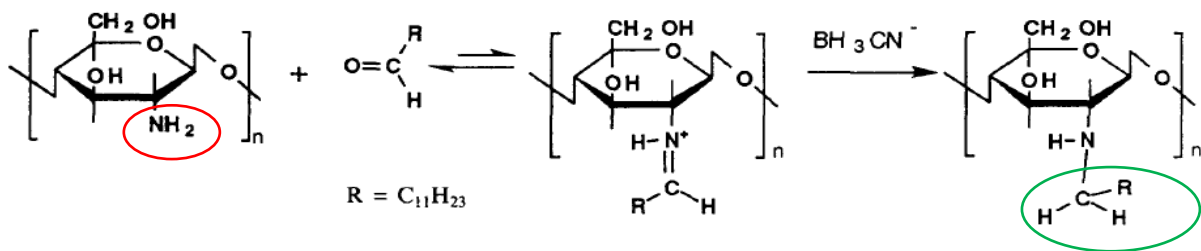


Figura 5.3. Esquema de reacción de la aminación reductiva empleando dodecil aldehído ($C_{12}H_{24}O$). En color, se señala el grupo reactivo (rojo) y la estructura carbonada injertada tras la reacción (verde).

Con el fin de obtener un gel que pudiera ser empleado para la formación de microesferas mediante el método de neutralización empleando agujas hipodérmicas, 0.3 g del quitosano modificado alquílicamente fueron puestos en contacto con 30 ml de solución de ácido acético al 2 % (v/v) y sometidos a continua agitación. Lo que se observó fue que el material no se disolvió y tampoco tuvo lugar la formación de gel. Este resultado si bien no fue el deseado, concuerda con lo reportado por Desbrières et al. (1996), quienes manifiestan que los derivados obtenidos con relaciones 1:1 NH_2 /aldehído o mayores (para aldehídos de 3 átomos de carbono o más), resultan insolubles en ácido acético 0.2 M. En un ensayo similar al anterior, se agregó una solución de ácido acético al 50 % (v/v) a 0.2 g de alquil quitosano, de forma de tener una concentración 3 % m/v, y se agitó durante 24 h. En esta oportunidad, en la que se empleó una concentración mucho mayor de ácido, tampoco se logró la disolución del material. Esto se debe a que la solubilidad es una función de la longitud de las cadenas alquílicas empleadas y del grado de sustitución, dependiendo del balance entre las repulsiones electrostáticas de las cargas catiónicas (relacionadas al pH) y las interacciones hidrofóbicas. Esto indicaría que el material fue modificado en gran medida, por lo que las aminas que son ionizadas no fueron suficientes comparadas con la contribución hidrofóbica (Desbrières et al., 1996). Cabe mencionar que el trabajo antes citado logra solubilizar derivados de cadenas alquílicas de 12 C, pero obtenidos con una relación NH_2 /aldehído mucho más baja, 1/0.05.

En base a los resultados anteriores, donde quedó demostrado que materiales altamente hidrofóbicos no son compatibles con la formación de gel empleando el solvente preferencial del quitosano, se necesitó diagramar un camino alternativo para poder realizar las microesferas de quitosano que se deseaban como soporte. El nuevo método ideado consistió en la preparación inicial de microesferas con gel de quitosano empleando el método de neutralización, seguido de recuperación de las mismas y posterior reacción de aminación reductiva basada en la técnica de Abdel-Magid et al. (1996) a fin de obtener unidades moleculares monosustituidas.

Experimental: microesferas de gel de quitosano previamente preparadas (como se explicó en la Sección 5.4), fueron suspendidas en etanol (10 ml/g quitosano seco inicial). Entonces, una cantidad de dodecil aldehído determinada por la relación monomolar $\text{NH}_2/\text{aldehído}$ fue disuelto en etanol (28.0 mL/g aldehído) y añadidos al medio contenedor de las microesferas bajo agitación muy intensa. Una vez transcurrido el tiempo de reacción establecido para el aldehído, la reducción fue realizada agregando NaCNBH_3 en exceso (3 moles $\text{NaCNBH}_3/\text{monomol}$ quitosano seco inicial). La mezcla se agitó durante 1 h, y para finalizar las microesferas fueron separadas, lavadas con etanol para remover los residuos del medio de reacción, lavadas con agua destilada y secadas a 40 °C hasta peso constante. Una mejor descripción de esta técnica para una relación monomolar dada de $\text{NH}_2/\text{aldehído}$ con las cantidades asociadas, se detalla en la Sección 2.3.2

Para corroborar que los lavados con etanol removieran completamente del soporte el aldehído y el agente reductor que no reaccionaron, se ideó una técnica de control para esta etapa. Empleando el espectrofotómetro UV/Vis se realizó el espectro de la solución de reacción frente a etanol. Dado que la misma mostró un pico de absorbancia a 270 nm, este valor puntual fue usado para las lecturas de absorción del etanol luego de cada lavado. De este modo, los lavados sobre el soporte se continuaron hasta que la absorbancia del solvente empleado para el lavado se volvió nula frente a la de etanol. Este lavado cuidadoso del soporte permitió principalmente que los residuos de cianuro sean eliminados, para que estos no afecten ni a la enzima durante la inmovilización ni al producto obtenido con la utilización de los biocatalizadores en las reacciones de acidólisis.

Mediante el trabajo experimental aquí detallado se pudieron obtener microesferas de quitosano modificadas, más específicamente alquiladas, para ser empleadas como soporte de lipasas de *Rhizomucor miehei*. Hasta el momento de la realización experimental aquí descrita, los reportes sobre la utilización de la técnica de aminación reductiva indicaban que solo había sido empleada en soluciones de quitosano (Desbrières et al., 1996; Klotzbach et al., 2006), por lo que uno de los *aspectos innovadores de esta tesis* es el uso de esta técnica en partículas de quitosano previamente preparadas.

Dado que otra de las cuestiones que se presentó tuvo que ver con determinar el grado de modificación óptimo sobre las microesferas, y por ende su carácter hidrofóbico óptimo, para ser utilizados como soporte de inmovilización de lipasas, un estudio detallado al respecto junto con la caracterización de los diferentes soportes obtenidos, se da en una próxima sección.

5.6. Estudio preliminar: ensayo con microesferas de quitosano, quitosano modificadas y Octadecyl-Sepabeads

Como se especificó en el capítulo anterior, el primer protocolo de inmovilización se realizó empleando 3 soportes diferentes: uno comercial, Octadecyl-Sepabeads® (Resindion SRL, Italia) (ODSB), y dos preparados en el marco de esta tesis, microesferas de quitosano (Q) y microesferas de quitosano modificadas (obtenidas empleando una relación monomolar 1:1 NH₂/aldehído y 1 h de reacción con el aldehído) (Fig.5.5). El trabajo experimental mencionado en esa sección (4.3.2) tuvo como objetivo evaluar en forma simultánea la técnica de inmovilización propuesta y el desempeño de los materiales mencionados al ser usados como soporte. Principalmente, lo que mas interés suscitaba era el comportamiento que demostrarían los soportes preparados frente a un soporte comercial con excelentes referencias (Palomo et al., 2002; Nieto et al. 2005; Mateo et al. 2007; Branco et al., 2010).

Octadecyl-Sepabeads® es un soporte comercial hidrofóbico formado por una matriz polimérica metaacrílica rígida que posee su superficie recubierta por grupos octadecil. Es

altamente estable física y químicamente, y tiene baja mojabilidad en la mayoría de los solventes. Cuenta con un rango de tamaño de partícula comprendido entre los 100 y 300 μm , y un tamaño de poro entre 10-20 nm, lo que le otorga una buena capacidad para la adsorción superficial. Por otra parte, las características asociadas a las microesferas de quitosano modificadas y sin modificar se dan más adelante.

Como puede observarse en el capítulo anterior, desde el punto de vista de la inmovilización, la mayor diferencia hallada entre ODSB y las microesferas de quitosano, modificadas (QM) y sin modificar (Q), estuvo relacionada a la carga de proteínas presente en los derivados enzimáticos obtenidos, la cual resultó mayor en el soporte comercial. En lo que respecta a la actividad demostrada en la reacción de acidólisis, que en definitiva resulta ser el parámetro de evaluación más importante para esta tesis, empleando un test de Tukey para comparación de medias se halló que los biocatalizadores obtenidos con los soportes QM y ODSB no mostraron diferencias significativas en su actividad ($P > 0.05$), cosa que sí ocurrió cuando se comparó Q con cada uno de ellos. Este resultado inicial fue muy alentador, ya que indicó que las microesferas obtenidas por la modificación propuesta podrían ser efectivamente empleadas como soporte, logrando en las mismas condiciones un desempeño similar al OSDB.

Por otra parte, el manejo del ODSB y el biocatalizador obtenido a partir de él fue mucho más dificultoso debido a su pequeño tamaño de partícula, como puede apreciarse en la Fig. 5.4. Esto se notó durante la inmovilización y luego de las reacciones en la etapa de recuperación del biocatalizador. Este aspecto resalta la ventaja que conlleva la preparación del propio biocatalizador, específicamente en lo relacionado al soporte, ya que se tiene la posibilidad de definir características concretas como el tamaño adecuado que permita un mejor manejo del mismo.



Figura 5.4. Fotografía digital de Octadecyl-Sepabeads.

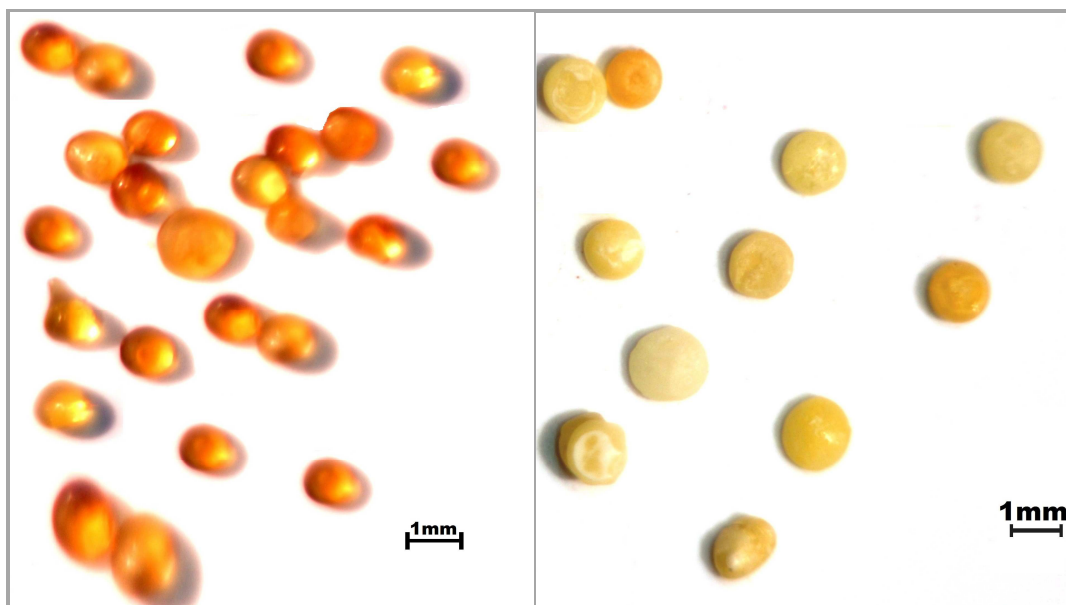


Figura 5.5. Fotografías digitales de microesferas de quitosano (izquierda) y microesferas de quitosano modificadas (derecha).

5.7. Estudio: Microesferas de quitosano con diferente grado de hidrofobicidad

La adsorción interfacial de las lipasas sobre soportes hidrofóbicos ha sido reportada como un método simple y muy eficaz para la obtención de biocatalizadores (Fernandez-Lafuente et al., 1998). En esta, la conformación abierta y activa de la lipasa puede ser fijada gracias a las interacciones generadas entre los alrededores hidrofóbicos del centro activo y el área hidrofóbica del soporte (Fig. 5.6.). Por ende, es de esperar que cambios en la naturaleza del soporte, como la hidrofobicidad o la morfología, puedan alterar la fuerza de adsorción y la estructura de los alrededores del centro activo de la lipasa, condicionando la actividad catalítica final del biocatalizador.

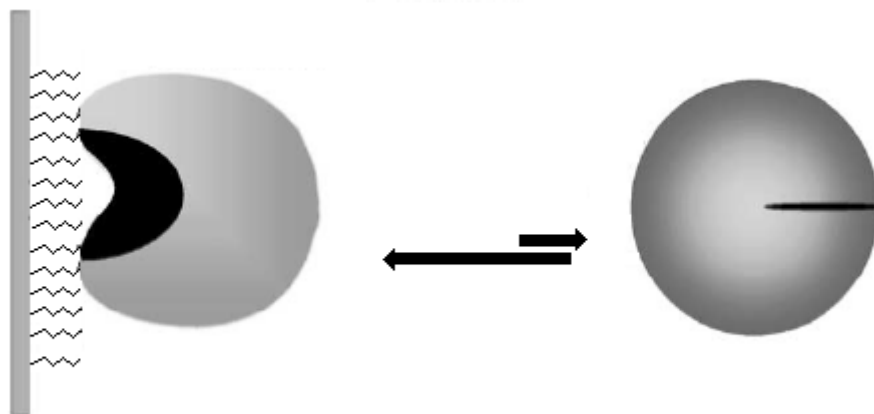


Figura 5.6. Adsorción interfacial de lipasas sobre soportes hidrofóbicos.

Con el propósito de hallar un soporte hidrofóbico que de lugar a la conformación hiperactivada de las lipasas, se propuso la preparación de microesferas de quitosano modificadas con diferente grado de hidrofobicidad. Para lograr esto, se llevó a cabo la reacción de aminación reductiva variando las relaciones monomolares $\text{NH}_2/\text{aldehído}$ y, dado que la reacción se realiza en dos etapas, se planteó adicionalmente variar el tiempo de reacción con el aldehído. El trabajo experimental asociado consistió en la realización de microesferas de quitosano en gel y posteriormente su separación en diferentes tandas acorde al número de tratamientos a realizar. Una de estas fracciones fue directamente

llevada a estufa a 40 °C y mantenidas allí hasta alcanzar peso constante. Estos soportes correspondieron a las microesferas de quitosano original (Q).

A fin de obtener el soporte más adecuado, se analizó el efecto del tiempo de reacción con el aldehído, la relación estequiométrica y su interacción. Las microesferas modificadas se obtuvieron como se describió anteriormente (sección 5.5), empleando dos relaciones $\text{NH}_2/\text{aldehído}$ (relación AA), cantidad estequiométrica (1:1) y la mitad de la cantidad estequiométrica (1:0.5), y empleando tiempos de contacto con el aldehído (ART) que variaron entre 0.5 y 2 h. De este procedimiento se obtuvieron 7 soportes, además del que correspondió a las microesferas sin modificar. En la Tabla 5.1 se detalla la denominación que recibió cada uno en función del tratamiento recibido para su obtención.

5.7.1 Caracterización de las microesferas de quitosano/quitosano modificadas

Para corroborar la transformación química realizada sobre las microesferas de quitosano y el grado de hidrofobicidad logrado en cada caso debido a las variaciones impuestas en el método de modificación, se emplearon varias técnicas de caracterización de materiales. Las mismas, en su conjunto, permiten registrar desde cambios a nivel composicional y estructural, hasta morfológicos y de comportamiento físico.

5.7.1.1. Análisis de tamaño de partícula

De los métodos disponibles para determinar tamaño de partículas, se seleccionó la medición por imágenes, teniendo presente la escasa cantidad de material que se disponía y la dimensión estimada de las mismas. Con este fin, se tomaron micrografías digitales empleando un microscopio óptico de polimerización Karl Zeiss (Phomi III Pol, Alemania). Se procesaron imágenes de 30 microesferas distintas por tipo de soporte (acorde a la descripción de la Tabla 5.1) empleando el software ImageJ. Se midieron 4 diámetros por partícula y finalmente, el diámetro promedio para cada tipo fue calculado según la siguiente ecuación:

$$D_{promedio} = \left(\sum_{i=1}^{30} \left(\sum_{j=1}^4 D_{ij} / 4 \right) \right) / 30 \quad (5.2)$$

5.7.1.2. Determinación de área BET y tamaño de poro

El área disponible para la adsorción y el tamaño de poro de los soportes preparados se midió empleando un Analizador de Área Superficial y Tamaño de Poro NOVA 1200e (Quantachrome Instruments). Para ello, la muestra fue introducida en el equipo y tras eliminar el contenido de humedad, se registró la adsorción de gas N₂ a una presión de 1.5 atm de vacío.

5.7.1.3. Análisis del ángulo de contacto aire-agua

Es un hecho conocido que la hidrofobicidad/ hidrofiliidad de los films poliméricos puede ser fácilmente analizada por medio de mediciones del ángulo de contacto que se forma entre una gota de agua que se deposita sobre ellos y el aire (Tangpasuthadol et al., 2003). Análogamente, en tiempos recientes se han desarrollado métodos que permiten caracterizar la mojabilidad de materiales particulados mediante el ángulo descrito en la interfase líquido-partícula-aire. Estos métodos son muy usados debido a que pueden emplearse en un rango amplio de tamaño de partículas, formas y composiciones (Forward et al., 2007).

Las mediciones de ángulo de contacto agua-partícula fueron hechas usando el método desarrollado por Forward et al. (2007). Para ello, se construyeron portaobjetos de policarbonato, y espaciadores de vidrio de 1 mm de espesor. El procedimiento consistió en situar una gota de agua desionizada, empleando un jeringa de punta plana, en la superficie de un portaobjeto. Luego, una microesfera se colocó sobre la gota y, ubicando los espaciadores y el portaobjeto superior, se generó una estructura a modo de sándwich (Fig. 5.7). Posteriormente se tomaron fotografías digitales de la interfase agua-partícula-aire formada, empleando un microscopio óptico de polimerización Karl Zeiss (Phomi III Pol, Alemania). Un software procesador de imágenes, ImageJ, fue usado para obtener la medida del ángulo de contacto.

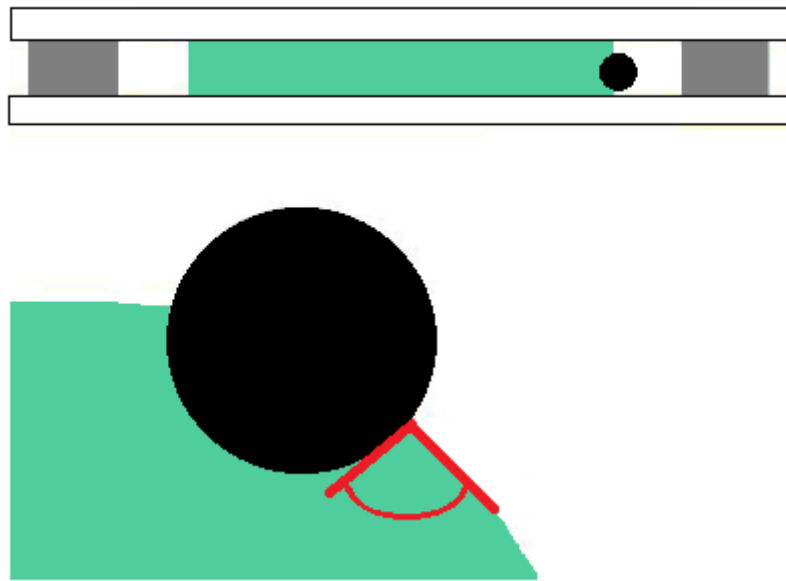


Figura 5.7. Metodología experimental para la medición del ángulo de contacto agua-aire sobre las partículas. **Arriba:** vista lateral de la estructura tipo sándwich (placa superior e inferior: portaobjetos; en gris: separadores; en verde: gota de agua; en negro: partícula). **Abajo:** vista superior ampliada, con representación del ángulo de contacto.

5.7.1.4. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Las propiedades térmicas de las microesferas fueron medidas en un Calorímetro diferencial de barrido DSC Pyris I (Perkin Elmer). Para ello, aproximadamente 10 mg de muestra se colocó en una cápsula de aluminio, usada como elemento contenedor, la cual fue introducida en la celda del equipo para medición. El programa de temperaturas empleado fue: 1 min a 30 °C, seguido de calentamiento de 30 a 350 °C a una velocidad de 10 °C/min. Nitrógeno fue empleado como gas de purga a un caudal de 20 cm³/min.

5.7.1.5. Difracción de rayos-X (XRD)

Los patrones de difracción de rayos-X de las microesferas fueron obtenidos en un Difractómetro Rigaku Geiger Flex D Max III-C, con un detector operando a 35 kV y 15 mA, usando radiación Cu K α . El alcance del escaneo para 2 θ fue desde 3° hasta 50°, a temperatura ambiente.

Un parámetro comúnmente empleado que permite medir las características estructurales de los materiales y realizar las comparaciones pertinentes es el Índice de Cristalinidad (CrI). Para el caso del quitosano y sus derivados, este índice puede determinarse siguiendo el método aplicado por Focher et al. (1990), usando la ecuación:

$$CrI = (I_{110} - I_{am}) / I_{110} \cdot 100 \quad (5.3)$$

donde I_{110} es la intensidad máxima de difracción a $2\theta = 20^\circ$ y I_{am} es la intensidad de la difracción amorfa a $2\theta = 16^\circ$.

5.7.1.6. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las microesferas de quitosano modificadas y sin modificar fue estudiada empleando un microscopio JEOL 35CF, operando a 15 kV, equipado con un detector de electrones secundario y un sistema para microanálisis por energía dispersiva de rayos-X (EDX). Las muestras fueron secadas bajo vacío, para evitar la interferencia del agua en la técnica de microanálisis, y recubiertas con una fina capa de oro previo a la observación.

5.7.1.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las microesferas de quitosano y de las de quitosano modificadas, fueron recolectados empleando un espectrómetro Nicolet FTIR 520. Las muestras se prepararon moliendo inicialmente las microesferas en mortero de ágata hasta obtener un material particulado bien fino. Luego, se tomaron 3 mg y se los mezcló con 97 mg de KBr, hasta lograr homogeneidad. Empleando una prensa hidráulica se formaron discos de poco espesor (pastilla), los cuales fueron introducidos en el equipo para medición. Adicionalmente, se preparó una pastilla de KBr para emplear como blanco.

Las muestras fueron escaneadas y contrarrestadas con el blanco en un rango de longitud de onda de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

5.7.1.8. Test de solubilidad

La solubilidad de las microesferas de quitosano modificadas fue evaluada con el fin de poder determinar la factibilidad de realizar el análisis de resonancia magnética nuclear

de hidrógeno (^1H NMR), comúnmente empleado para la caracterización de derivados del quitosano. Los solventes empleados fueron: solución acuosa de HCl a pH 3.0, diclorometano y cloroformo.

Para su realización se tomó una dada masa de un tipo específico de microesfera, y se la puso en contacto con la cantidad de solvente que permitiera lograr una concentración de 6 mg/ml (relación empleada en las determinaciones de ^1H NMR para lograr buena resolución en las señales) (Rinaudo et al., 2005). Ambos componentes se mantuvieron en contacto hasta 72 h, agitando en forma continua. Se realizaron breves calentamientos intermedios, permaneciendo el resto del tiempo a temperatura ambiente.

5.7.1.9. Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de sólidos

La determinación de los espectros de ^{13}C NMR se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Resonancia Magnética en Sólidos (Córdoba, Argentina) mediante el empleo de un Espectrómetro BRUKER AVANCE II- 300. Para ello, 200 mg de microesferas de quitosano y de cada una de las de quitosano modificadas obtenidas fueron suministradas en forma de polvo. La muestra pulverizada fue irradiada con radiofrecuencias en presencia de un campo magnético. La respuesta obtenida permitió identificar los átomos presentes, sus enlaces químicos y las condiciones dinámicas del ambiente en el que estaban inmersos.

Mediante los espectros obtenidos y la apropiada identificación de los picos es posible determinar el grado de desacetilación (DD) del material, según la ecuación propuesta por Kassai (2010):

$$DD = 100 - 100 \cdot I_{\text{NCO-CH}_3} / \left(\frac{1}{6} \cdot \sum I_{\text{Carbonos Anillo Glucopiranososa}} \right) \quad (5.4)$$

donde I_i refiere a la intensidad de la señal obtenida para los átomos de carbono del grupo i .

Dado que no hay antecedentes respecto a la cuantificación del grado de sustitución (SD) empleando ^{13}C NMR, ya que los derivados que se preparan son modificados en muy bajo nivel y por ende resultan solubles, para la determinación de este parámetro se propuso

la siguiente ecuación para emplear con 3 criterios, que se basa en la intensidad (I) de los picos característicos de los derivados alquílicos:

$$SD = 100 \cdot \left(\alpha \cdot I_{R-CH_2-X} / I_{NCO-CH_3} \right) \cdot DD \quad (5.5)$$

donde: $\alpha = 1$ para X=H (R-CH₃) ó X=N (R-CH₂-N)

$\alpha = 9$ para X=R (R-CH₂-R)

5.7.2. Inmovilización de lipasas y contenido de proteína

La inmovilización de las lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre los diferentes soportes preparados se realizó siguiendo el protocolo detallado en la Sección 2.3.3. Tras este procedimiento 8 biocatalizadores fueron obtenidos conforme a los tipos de microesferas empleadas, según lo especificado en la Tabla 5.1.

El contenido de proteína de los preparados enzimáticos se determinó por el método colorimétrico Proti II (Wiener lab., Argentina), siguiendo la técnica especificada en la Sección 2.3.4.2.

5.7.3. Estabilidad en el reuso

Un análisis de la actividad enzimática en reacciones de acidólisis fue realizado con todos los biocatalizadores, con los sucesivos usos. Para ello, luego de cada reacción ensayada el producto fue retirado para análisis y se realizó el lavado del biocatalizador con el propósito de remover del mismo los residuos de la mezcla reactiva. El lavado consistió en añadir 5 ml de hexano al tubo de reacción que contenía el biocatalizador y someterlo a un breve calentamiento (temperatura máxima 60°C) y agitación. Este paso se repitió durante 3 veces, removiendo en cada oportunidad el hexano residual. Por último, para eliminar el solvente remanente en el biocatalizador se lo expuso a una corriente de nitrógeno.

Posteriormente, se dio comienzo a una nueva reacción transfiriendo el biocatalizador a un tubo que contuviera una nueva mezcla de sustratos y hexano. Los resultados fueron expresados en base a la actividad relativa, calculada como la composición de ácidos palmítico y esteárico en los productos de reacción en un dado uso, respecto de la

composición promedio de los usos consecutivos entre los que no se halló diferencias significativas.

5.8. Resultados y Discusiones

5.8.1. Caracterización del Quitosano

5.8.1.1. Peso molecular viscosimétrico medio

El peso molecular viscosimétrico medio del quitosano y la viscosidad intrínseca, ambos calculados a través de la ecuación de Mark-Houwink (Ec. 5.1) para las condiciones experimentales ensayadas, fueron $M=569.8$ kDa y $\eta=553.26$ cm³/g. Estos valores resultaron consistentes con los reportados previamente por Kasaai (2007) para muestras de quitosano con grado similar de desacetilación.

Un aspecto interesante para destacar es que es necesario ser cuidadoso con el empleo de las técnicas desarrolladas y los criterios asociados para la medición de M . Por un lado, los parámetros introducidos correspondientes a la ecuación de Mark-Houwink, α y K , solo son válidos para el rango de pesos moleculares definidos por el autor. A modo de ejemplo, en un ensayo anterior al reportado, en el que se siguió la técnica propuesta por Rinaudo et al. (1993) empleando soluciones de quitosano en buffer de 0.25 M HAc/0.25 M NaAc y sus parámetros correspondientes, los valores obtenidos para M cayeron fuera de rango, con lo que el ensayo no fue válido. Por otro lado, tal como especifica la norma ASTM Standard D 2857, se debe respetar la relación de tiempos entre el solvente y solución para no introducir errores en la medición (tiempo de la solución: entre 1.2 y 2 veces el del solvente). Este hecho se notó cuando se usaron soluciones muy diluidas, las cuales mostraron tiempos muy cercanos a los del solvente, dando lugar a comportamientos anómalos.

5.8.1.2. Viscosidad de Brookfield

La viscosidad de una solución al 1% de quitosano en 1 % de ácido acético a 25°C fue de 97.0 ± 2.5 mPas, con un comportamiento Newtoniano en el rango analizado, lo que correspondería a un polímero de bajo peso molecular. Dado que esta medición se llevó a

cabo sobre el material donado por el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas en Quitina de la Universidad Nacional del Sur, disponer de este dato resulta útil para el caso que se desee adquirir un quitosano comercial con similares características.

5.8.2. Caracterización de las microesferas de quitosano

5.8.2.1. Análisis de tamaño de partícula

El diámetro promedio y el desvío estándar correspondiente de las microesferas obtenidas para ser empleadas como soporte de inmovilización, se muestra en la Tabla 5.1. Como puede observarse, las microesferas de quitosano, con un diámetro promedio de 1260 μm , resultaron ser las partículas más pequeñas de todas, mostrando diferencias significativas en su tamaño con respecto al de las microesferas modificadas ($P < 0.05$). Por otro lado, aquí puede notarse cuantitativamente la gran diferencia de tamaño entre estas microesferas y las del soporte comercial ODSB (100-300 μm), ya mencionada en la Sección 5.6.

En lo que a las microesferas modificadas se refiere, puede observarse que aquellas obtenidas empleando la mitad del aldehído estequiométrico requerido en la reacción de aminación reductiva (Serie QM0.5), parecieran seguir una tendencia en la que el diámetro se incrementa a medida que aumenta el tiempo de reacción. Sin embargo, este comportamiento no dio lugar a diferencias significativas. Una tendencia similar fue mostrada por las microesferas obtenidas usando la cantidad de aldehído estequiométrica requerida (Serie QM1), no obstante tampoco se encontraron diferencias estadísticas. Por otra parte, las microesferas de la serie QM1 tuvieron un diámetro promedio de partícula más alto que las de la serie QM0.5 ($P = 0.0593$). En consecuencia, puede decirse que se obtuvo un incremento en el tamaño de las partículas debido a la modificación realizada sobre las microesferas, probablemente debido a la incorporación de cadenas carbonadas largas a la estructura original del polisacárido.

Tabla 5.1.

Denominación de los soportes obtenidos y su diámetro promedio en función de las condiciones de reacción empleadas.

Relación monomolar NH₂ / Aldehído (AA) (mol/mol)	Tiempo de Reacción (ART) (h)	Denominación del Soporte	Diámetro (μm)
1 : 0	0	Q	1260 ± 100
1 : 0.5	1	QM0.5-1	1525 ± 116
1 : 0.5	1.5	QM0.5-1.5	1534 ± 106
1 : 0.5	2	QM0.5-2	1537 ± 93
1 : 1	0.5	QM1-0.5	1659 ± 103
1 : 1	1	QM1-1	1665 ± 135
1 : 1	1.5	QM1-1.5	1675 ± 104
1 : 1	2	QM1-2	1703 ± 108

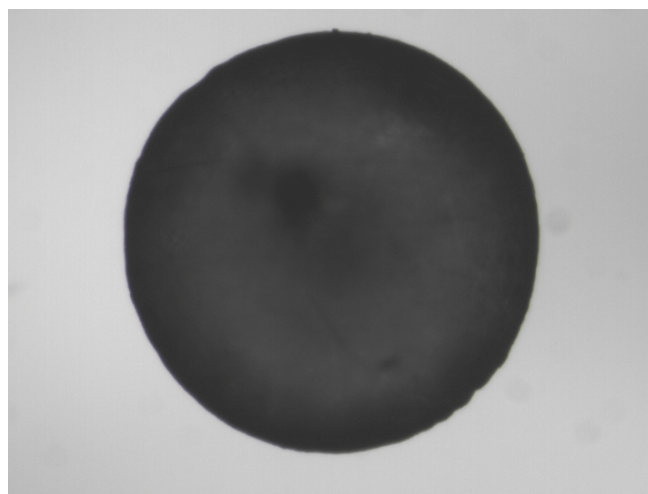


Fig. 5.8. Imagen de microesfera obtenida con microscopio óptico, empleada para la determinación del tamaño de partícula.

5.8.2.2. Determinación de área BET y tamaño de poro

La cuantificación del área total disponible para la adsorción es un parámetro muy empleado en la caracterización de catalizadores químicos. Si bien no es tan común la evaluación de este parámetro en los soportes empleados para preparar biocatalizadores, la información que suministra permitiría realizar las comparaciones pertinentes entre los diferentes soportes preparados y también con ODSB. Adicionalmente, se podría determinar en función del tamaño de los poros del material y el diámetro de la lipasa, si puede darse la inmovilización de la enzima en su interior.

Sin embargo, esta técnica presenta inconvenientes cuando los materiales no tienen grandes áreas superficiales, al requerir de mayor tamaño de muestra para poder realizar las determinaciones. A modo de ejemplo, cuando se emplearon 700 mg de microesferas de QM1-1, la curva de adsorción de N₂ reportó valores negativos, sin sentido físico. Esto a su vez implicaría que los poros son muy pequeños, del orden del error del instrumento (5 Å). Nuevamente es pertinente la comparación con el soporte comercial, el cual posee tamaño de poro entre 100-200 Å.

Considerando que no se disponía de mayor masa de soporte de cada uno de los tipos, las comparaciones deseadas no se pudieron efectuar.

5.8.2.3. Análisis del ángulo de contacto aire-agua

Los valores de ángulo de contacto para las partículas obtenidas se muestran en la Fig. 5.9. El ángulo de contacto para las microesferas de quitosano fue $87^\circ \pm 0.6$. Este resultado fue consistente con lo reportado en la literatura para el ángulo de contacto de agua con films de quitosano ($89^\circ \pm 6$) (Tangpasuthadol et al., 2003), lo que permitió asegurar que la medición había sido correctamente efectuada y dio validez a los resultados. Tal como se esperaba, todas las microesferas modificadas presentaron mayores ángulos de contacto que las sin modificar, demostrando que su carácter hidrofóbico había sido incrementado. Las microesferas de la serie QM0.5 parecieron seguir una tendencia lineal, donde el ángulo de contacto se acrecentó a medida que el tiempo de reacción con el aldehído (ART) también lo hacía. Un comportamiento similar se observa para las microesferas de la serie QM1, pero con valores más altos para el ángulo de contacto, lo que

se corresponde con una mayor modificación de la superficie del material. El efecto de ambos parámetros considerados en la reacción de modificación de las microesferas y su interacción resultaron estadísticamente significativos para la modificación del ángulo de contacto (ART y AA con $P < 0.0001$ y $ART*AA$, $P = 0.0063$).

En otras palabras, la serie estequiométrica QM1 mostró un mayor carácter hidrofóbico que la serie QM0.5, y este carácter aumentó, en ambos casos, cuanto más duró el tiempo de reacción de la aminación reductiva. Esta técnica permitió resaltar la naturaleza hidrofóbica de la superficie del material, independientemente del grado de modificación existente en el interior de la microesfera. De ahí que este análisis fue beneficioso para conocer, luego, la clase de superficie a por la cual las lipasas de *Rhizomucor miehei* presentan mayor afinidad para la adsorción.

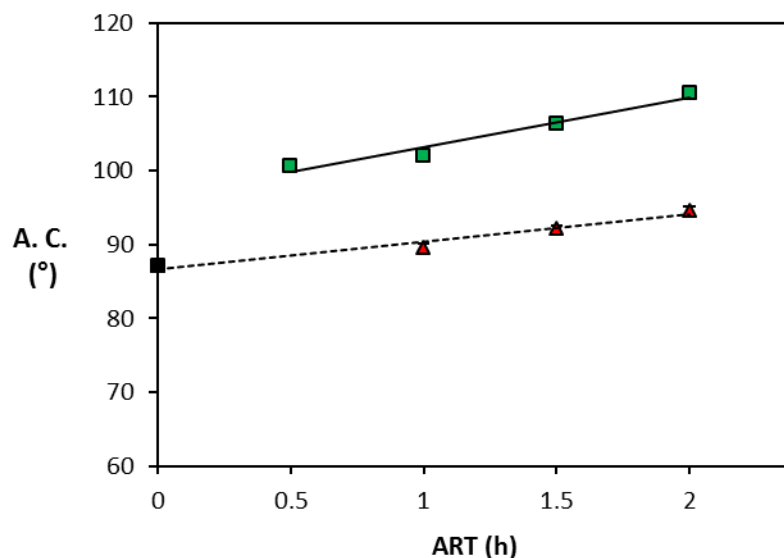


Figura 5.9. Ángulos de contacto (A.C.) agua-aire sobre las microesferas de quitosano: Q (■), Serie QM0.5: (Δ) y Serie QM1: (□). Ver nomenclatura en Tabla 5.1.

5.8.2.4. Calorimetría de barrido diferencial

Los termogramas de DSC de las microesferas de quitosano y las microesferas de quitosano modificadas se muestran en la Fig. 5.10. Como puede apreciarse, no se evidenció

transición vítrea en ninguno de los tipos de microesfera, aunque sí fueron detectados picos correspondientes a la descomposición térmica. Las microesferas de quitosano, Q, mostraron un pico asociado a la descomposición térmica a 294°C y un pico endotérmico a 260°C probablemente debido a la fusión de la estructura cristalina. Los picos exotérmicos de QM1-0.5, QM1-1, QM1-1.5 y QM1-2 se registraron a 289, 282, 277 y 273°C, respectivamente (Fig. 5.10 A), y los picos exotérmicos de QM0.5-1, QM0.5-1.5 y QM0.5-2 a 282, 278, y 273°C, respectivamente (Fig. 5.10 B), correspondiendo con su descomposición térmica. Del análisis de estos valores se deduce que cuanto mayor fue el tiempo correspondiente a la reacción de aminación, menor resultó la temperatura de descomposición, independientemente de la relación de aldehído empleada. Por consiguiente, desde el punto de vista de la estabilidad térmica, la modificación estructural de las partículas de quitosano pareciera estar controlada por el tiempo de reacción y no por la relación molar de aldehído, en el rango estudiado. En comparación con las microesferas de quitosano, las microesferas modificadas exhibieron una temperatura de descomposición decreciente con el aumento del grado de modificación. Esto indicaría que la estabilidad térmica resultaría disminuida por la introducción de grupos alquilo. La incorporación de sustituyentes en las estructuras polisacáridas podría afectar la estructura cristalina del quitosano, especialmente a través de la pérdida de uniones puente hidrógeno (Zong et al., 2000; Ma et al., 2008). Pequeños picos aparecieron más allá del punto de descomposición, probablemente debido a reacciones adicionales de degradación. Zong et al. (2000) observaron un comportamiento similar en termogramas de DSC de quitosanos acetilados, y sugirieron que el mismo se debe al proceso de descomposición que provoca desintegración en pequeños fragmentos.

Por otro lado, tampoco se observaron variaciones en los termogramas en la zona cercana a los 100°C, lo cual permite afirmar que la técnica empleada para el secado de las microesferas ha resultado efectiva. Este hecho resulta muy importante cuando se piensa en la utilidad que se les dará a las mismas.

Los resultados reportados aquí corroboraron indirectamente la modificación de las partículas hacia un carácter más hidrofóbico. Adicionalmente, demostraron que los soportes obtenidos resultaron térmicamente estables en el rango de temperaturas generalmente

usadas durante las reacciones de acidólisis enzimática (por debajo de 100°C) (Pacheco et al., 2010). Finalmente, estos resultados permitirían a los futuros usuarios conocer el límite de temperatura a la cual podrían ser expuestos los soportes preparados.

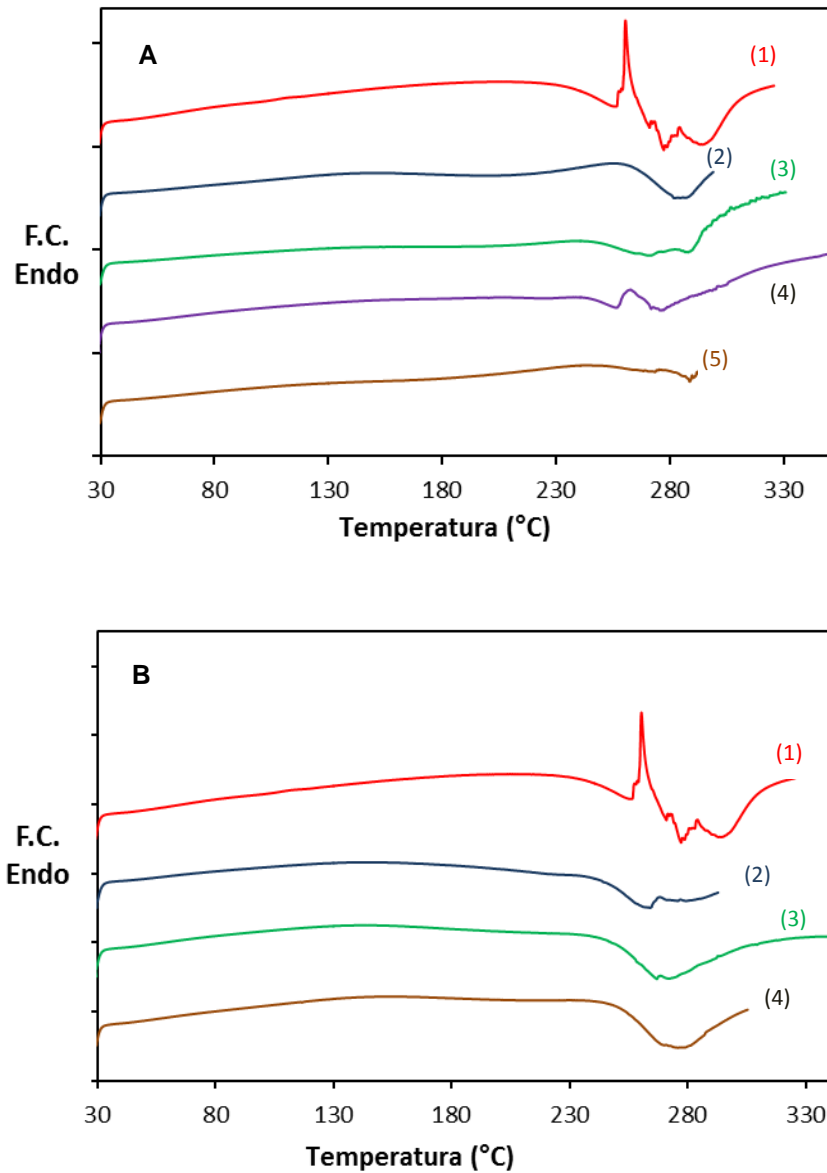


Figura 5.10. Termogramas DSC (Flujo de Calor Endo vs. Temperatura) de: **(A)**, (1) microesferas de quitosano, Q, y microesferas de quitosano modificadas: (2) QM1-0.5, (3) QM1-1, (4) QM1-1.5 y (5) QM1-2; **(B)**, (1) microesferas de quitosano, Q, y microesferas de quitosano modificadas: (2) QM0.5-1, (3) QM0.5-1.5, y (4) QM0.5-2. Por nomenclatura, ver Tabla 5.1.

5.8.2.5. Difracción de rayos-X.

Con el propósito de observar los cambios en la cristalinidad de las microesferas de quitosano, inducidas por el proceso de modificación, la técnica de difracción de rayos-X se realizó sobre microesferas de material sin modificar, Q y sobre un tipo de las modificadas, QM1-1. Los difractogramas de ambas microesferas mostraron cierta semejanza estructural (Fig. 5.11), exhibiendo picos cristalinos característicos del quitosano en polvo a $2\theta = 9.96^\circ$ y 20.16° (Yen et al., 2009). Sin embargo, en base al cálculo del Índice de Cristalinidad (CrI) (Ec. 5.2), el material modificado presentó una cristalinidad más baja con respecto al sin modificar, 55 vs. 70% respectivamente. Esto significa que la reacción de aminación reductiva aplicada a microesferas de quitosano, un proceso que se da desde la superficie de la partícula, fue la causante de este cambio en la cristalinidad. Esta conclusión estuvo acorde a los resultados obtenidos en el análisis de la temperatura de descomposición, presentado en la Sección 5.8.2.4.

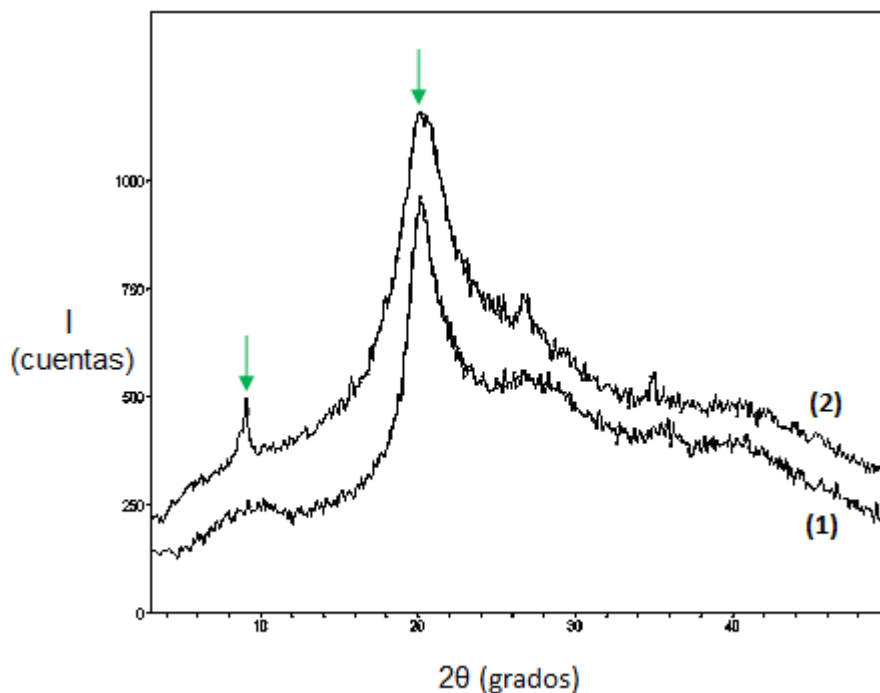


Figura 5.11. Patrones de XRD de (1) Q y (2) QM1-1. Las flechas indican los picos característicos del quitosano.

5.8.2.6. Microscopia Electrónica de Barrido

El análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM), fue llevado a cabo con el propósito de examinar la morfología de las microesferas de quitosano modificadas y de las sin modificar. A efectos de comparación, se muestra la imagen correspondiente a una microesfera perteneciente al tipo QM1-1. Las micrografías mostraron que las microesferas, ya sean modificadas o no, exhibieron una buena esfericidad (Figs. 5.12.A y 5.12.D). En lo que al aspecto de las superficies se refiere, las microesferas sin modificar presentaron una superficie lisa (Fig. 5.12.B), mientras que la de las modificadas resultó rugosa, exhibiendo una apariencia similar a filamentos (Fig. 5.12.E). Esta última imagen concuerda con la presencia de largas cadenas carbonadas sobre la superficie, contribuyendo a confirmar la modificación química impuesta sobre las partículas. Por otro lado, la porosidad de las mismas puede apreciarse al aumentar la magnificación; las microesferas de quitosano exhiben poros muy pequeños y regulares (Fig. 5.12.C), mientras que las modificadas muestran una amplitud mayor en el tamaño de los mismos (Fig. 5.12.F). Cabe recordar aquí que el tamaño de poros de este tipo de microesferas no pudo ser cuantificado expresamente por el método de adsorción de N_2 , pero que cualitativamente se pudo decir que los mismos rondarían los 5 Å (Sección 5.8.2.2). En la Fig. 5.12.F puede observarse que los poros de las microesferas modificadas serían de diámetro promedio menor a 50 Å.

Con respecto a la técnica de microanálisis, puede decirse que ésta ha sido empleada para la caracterización estructural de quitosano y sus derivados. En el caso de estos últimos, es posible determinar el grado de sustitución de la cadena macromolecular y la presencia de unidades mono y disustituidas mediante estimaciones del contenido en peso de carbono (C) y nitrógeno (N) (Desbrières et al., 1996). En consecuencia, esta técnica podría haber resultado muy provechosa para caracterizar los soportes obtenidos, al permitir la determinación del grado de sustitución de cada tipo de microesfera. Sin embargo, como puede observarse en las Fig. 5.13 y Fig. 5.14, hubo un solapamiento de las bandas de C y N obtenidas en los espectros de las microesferas modificadas y sin modificar. Consecuentemente, no pudo realizarse ninguna clase de cálculo. Por otro lado, cuando microesferas modificadas con lipasas inmovilizadas sobre ellas, fueron sometidas a este

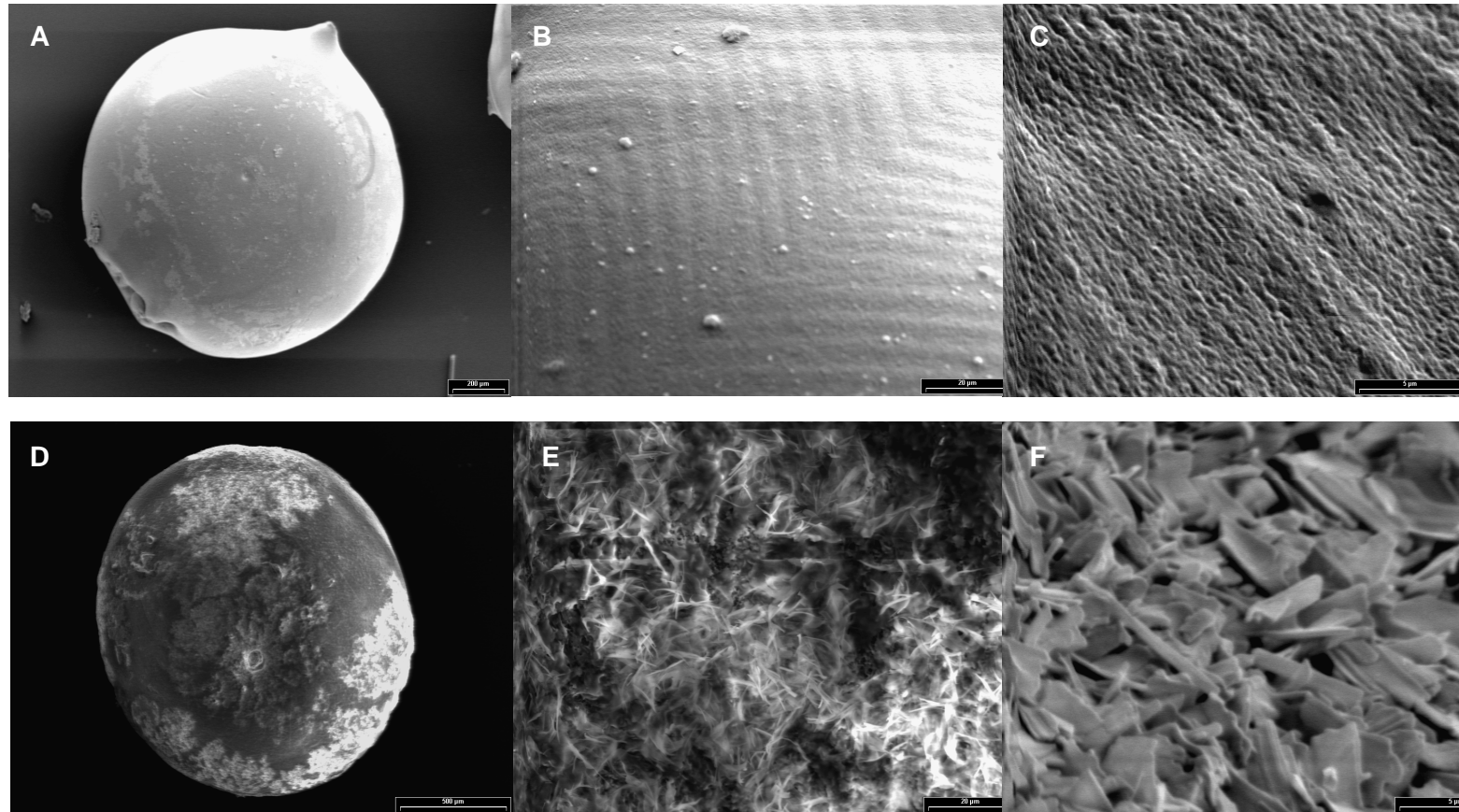


Figura 5.12. Micrografías de superficie de: **Arriba**, microesfera de quitosano y **Abajo**, microesfera de quitosano modificado (QM1-1). Ambas en 3 magnificaciones, A y D: 66x (barra de escala: 200 μm), B y E: 1000x (barra de escala: 20 μm) y C y F: 5400x de (barra de escala: 5 μm).

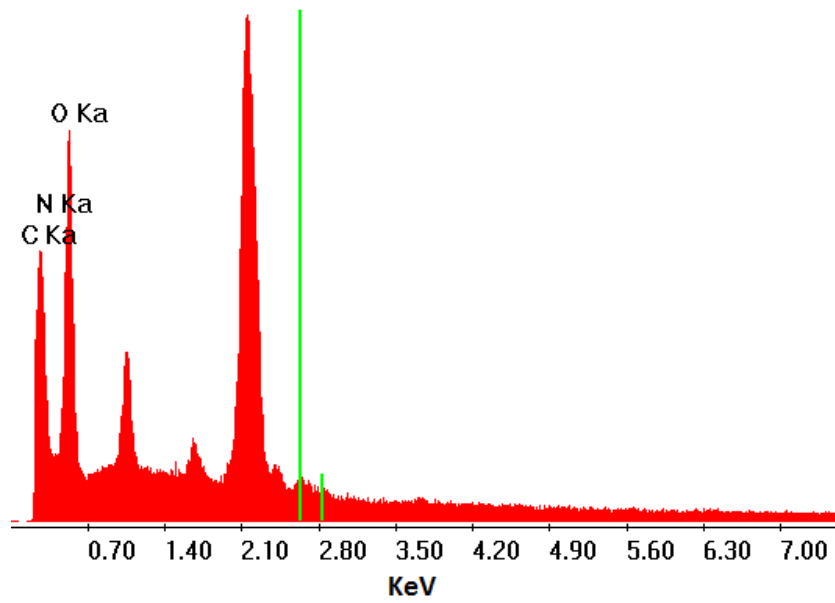


Figura 5.13. Espectro EDAX de microesfera de quitosano, 1000x. Presencia de bandas de C y N (solapadas), y O; las bandas no rotuladas pertenecen a Au.

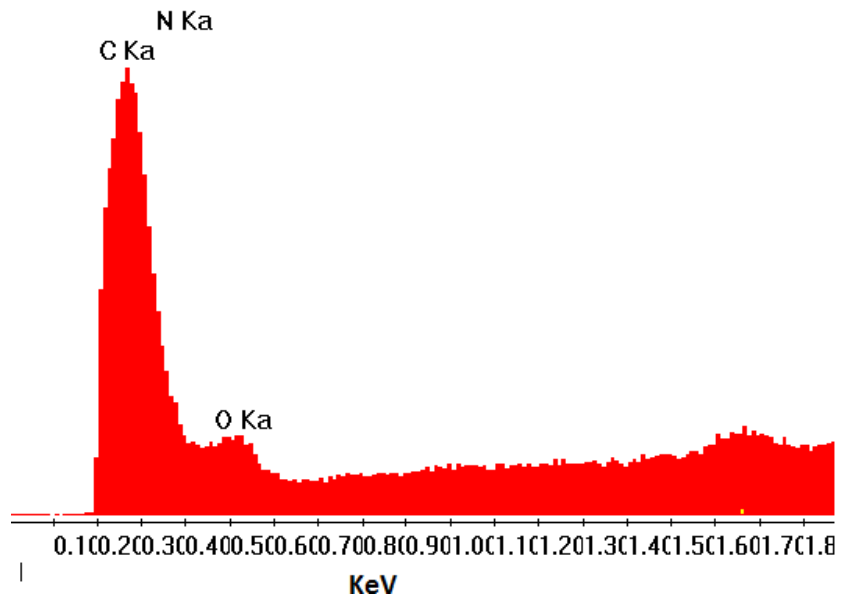


Figura 5.14. Espectro EDAX de microesfera de quitosano modificada, 1000x. Presencia de bandas de C y N (solapadas), y O.

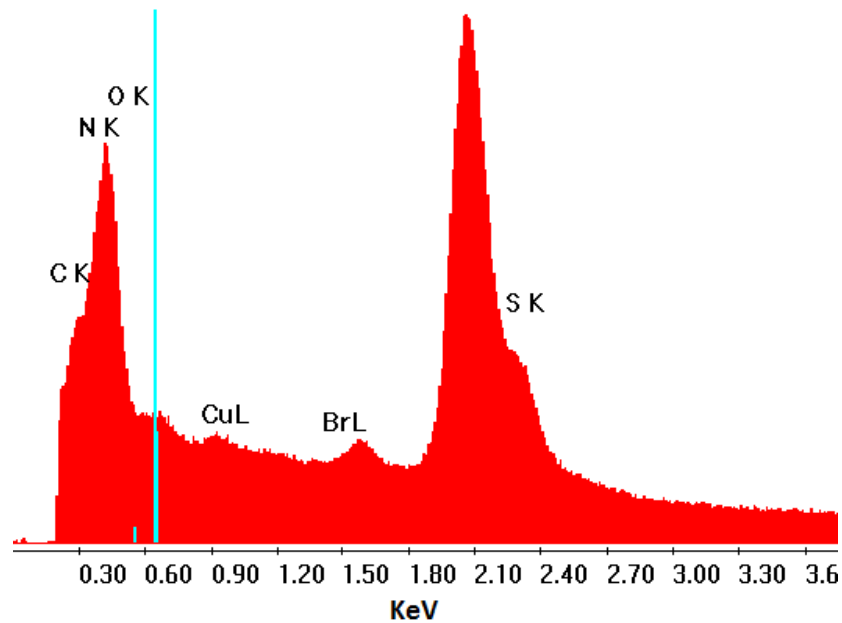


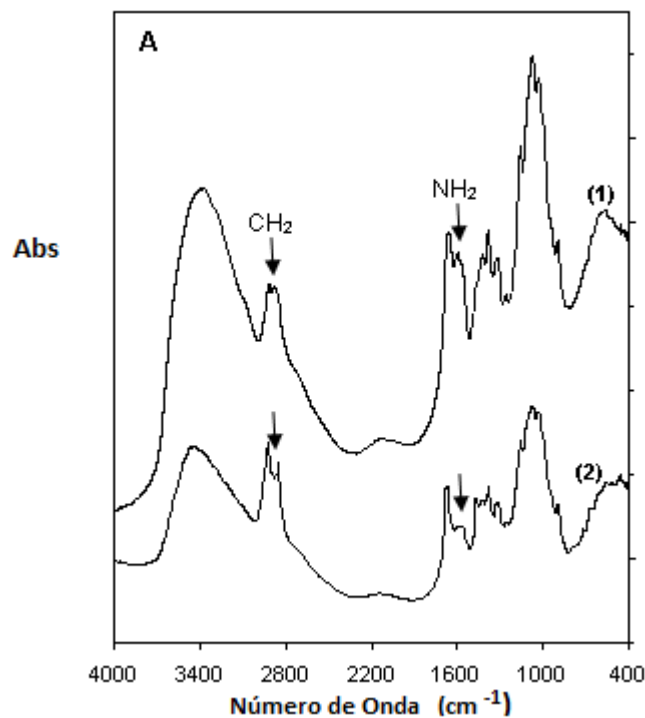
Figura 5.15. Espectro EDAX de microesfera de quitosano modificada con lipasas inmovilizadas, 5400x. Presencia de bandas de C, N y O (solapadas); y de Cu y S.

análisis, se registraron bandas adicionales de Cu y de S, que correspondieron a la enzima (Fig. 5. 15).

5.8.2.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

En la Fig. 5.16.A pueden observarse los espectros FTIR de las microesferas de quitosano y las de quitosano modificadas del tipo QM1-1. En lo que respecta a los bandas encontradas, puede decirse que las obtenidas en ambas muestras resultaron acordes a las características del quitosano en espectros FTIR reportados por otros autores (Ma et al., 2008; Sajomsang et al. 2008). Las bandas más importantes resultaron ser: 3440 cm^{-1} (tensión del grupo -OH solapada con la tensión del grupo N-H), 2924 y 2853 cm^{-1} (tensión del grupo C-H , correspondiente a grupos CH_2 y CH_3), 1665 cm^{-1} y 1378 cm^{-1} (estiramiento del C=O y C-O del grupo amida, respectivamnete), 1599 cm^{-1} (doblaje del grupo -NH_2), 1155 cm^{-1} (tensión antisimétrica del puente C-O-C), 1079 y 1029 cm^{-1} (vibraciones del esqueleto propias de su estructura pironósica).

Aunque a simple vista ambos espectros resulten similares por el formato de los mismos, se encontraron interesantes diferencias en las intensidades de absorción. Al comparar los espectros, puede notarse que el perteneciente a las microesferas de quitosano modificadas mostró una mayor intensidad en las bandas correspondientes a las frecuencias 2924 y 2853 cm^{-1} asignados al modo asimétrico y simétrico del grupo CH_2 respectivamente; y un debilitamiento de la banda a 1599 cm^{-1} atribuido al grupo amina NH_2 , lo que se corresponde con la modificación impuesta por adición de cadenas alquiladas al grupo funcional NH_2 . Al amplificar la escala (Fig. 5.16.B), es posible distinguir más claramente una nueva banda a 720 cm^{-1} asignada al $\text{C}-(\text{CH}_2)_n$ con $n > 4$, lo que concuerda con la cadena carbonada injertada en la estructura molecular del quitosano.



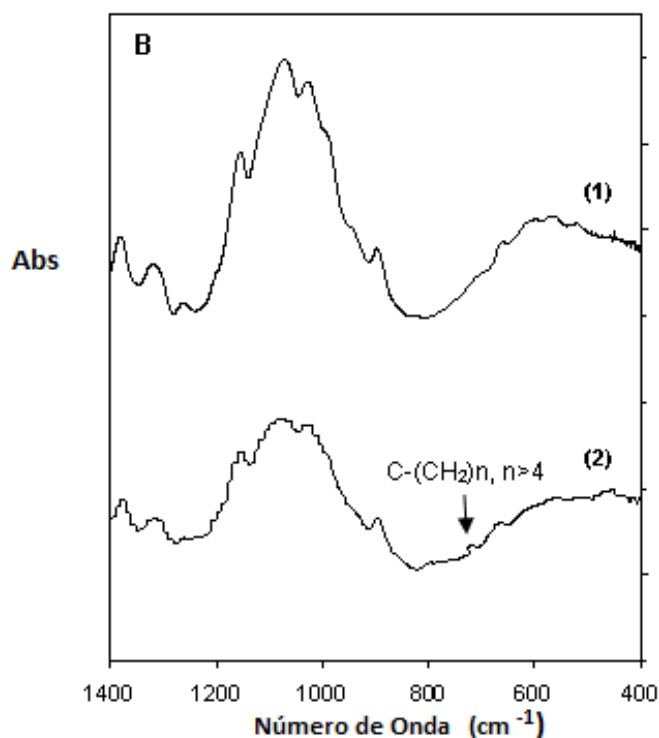


Figura 5.16. (A) Espectro FTIR de: (1) microesferas de quitosano y (2) microesferas de quitosano modificadas, QM1-1. (B) Amplificación de la Fig. 5.16.A.

5.8.2.8. Test de Solubilidad

Al someter a los diferentes tipos de microesferas de quitosano modificadas al test de solubilidad, se encontró que ninguna de ellas resultó soluble en los medios ácidos ni en los solventes orgánicos empleados. En consecuencia, el grado de sustitución de las microesferas modificadas no pudo ser determinado mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (¹H NMR por sus siglas en inglés) como lo reportó Rinaudo et al. (2005). Esto indicaría que las microesferas preparadas en este trabajo podrían estar sustituidas en mayor grado que los N-docedil quitosanos obtenidos en la mencionada investigación. También, Sajomsang et al. (2008) han reportado problemas en la cuantificación del grado de sustitución usando ¹H NMR debido a la insolubilidad del material al emplear D₂O/CF₃COOD en la disolución de N-octil quitosano. Por otro lado, la insolubilidad exhibida por las partículas de quitosano

mostró que estos soportes serían adecuados para usarse en reacciones que empleen solventes orgánicos.

5.8.2.9. NRM de sólidos para cuantificación del grado de sustitución

Dado que las microesferas resultaron insolubles en los solventes empleados en NMR por disolución, con el objetivo de realizar la caracterización de los soportes obtenidos a través del grado de sustitución, se empleó la espectroscopia ^{13}C NMR para materiales en estado sólido. Esta novedosa técnica, al igual que NMR tradicional, permite la elucidación de estructuras moleculares y puede emplearse con fines cuantitativos.

Los espectros correspondientes a las microesferas de quitosano y a un tipo particular de microesfera modificada, QM1-1.5, se muestran en las Fig. 5.17. Como puede apreciarse, en ambos se observan los picos característicos del quitosano, los cuales resultaron acordes a los reportados por Kasai (2010) para ^{13}C NMR en solución, y por Van de Velde y Kiekens (2004) para ^{13}C NMR de sólidos. Los picos adicionales del material alquilado corresponden a las señales emitidas por las cadenas injertadas a la cadena carbonada. En la Tabla 5.2 se muestra en detalle las identificaciones de los picos en función de su posición; para algunas señales se reportan dos valores debido al corrimiento que se genera en el material modificado. Por la misma causa, las microesferas de quitosano modificado muestran un solapamiento en las señales de C_2 y C_6 .

En base al espectro obtenido para las microesferas de quitosano sin modificar, se cuantificó el grado de desacetilación del material, empleando para ello el cociente entre las áreas correspondientes al pico del carbono metílico (CH_3) y al de los carbonos correspondientes al anillo D-glucosamínico ($\text{C}_1\text{-C}_6$). El valor de desacetilación así calculado fue 79.5%, muy similar al valor proporcionado por quienes suministraron el quitosano en escamas inicial, 80.2% (previamente obtenido mediante la realización de ^1H NMR) lo que permitió validar el análisis.

Empleando el espectro correspondiente a las microesferas de quitosano modificadas, el grado de desacetilación no resultó similar, probablemente debido a que las señales de los $\text{C}_1\text{-C}_6$ fueron distorsionadas por la presencia de las cadenas alquílicas. Sin

embargo, la relación de áreas de los grupos carbonilo y metilo de las unidades remanentes de quitina permaneció inalterada, por lo que se seleccionó a este último grupo como referencia para cuantificar el grado de sustitución. Los picos relacionados a la cadena alquílica que se emplearon para obtener este parámetro, mediante la relación entre el área correspondiente y el área de la referencia, fueron: R-CH₃, N-CH₂ y R-CH₂-R, obteniéndose los siguientes valores: 7.3 %, 7.8 % y 8.7 % respectivamente; esto resultó en un grado de sustitución promedio de 7.9% ± 0.7 (promedio ± desvío estándar). La similitud hallada (varianza < 10%) indicaría que esta técnica es apropiada y consistente para cuantificar el grado de sustitución global de microesferas alquiladas. Los valores relativamente bajos del grado de sustitución están asociados a que el análisis se realizó sobre el total del material mientras que la modificación impuesta fue relativamente superficial.

Un aspecto muy importante para destacar es que, las mediciones y los resultados antes mencionados forman parte *inicial* del desarrollo de una técnica para cuantificar el grado de sustitución de *qitosano alquilado en gran manera* (muestras que se tornan insolubles en los solventes convencionales para el análisis clásico) empleando ¹³C NMR y ¹⁵N NMR, algo que por el momento no se cuenta con antecedentes. Por esta razón, el análisis del grado de sustitución de los restantes soportes y el empleo de ¹⁵N NMR no serán reportados, ya que al momento se sigue trabajando en esto.

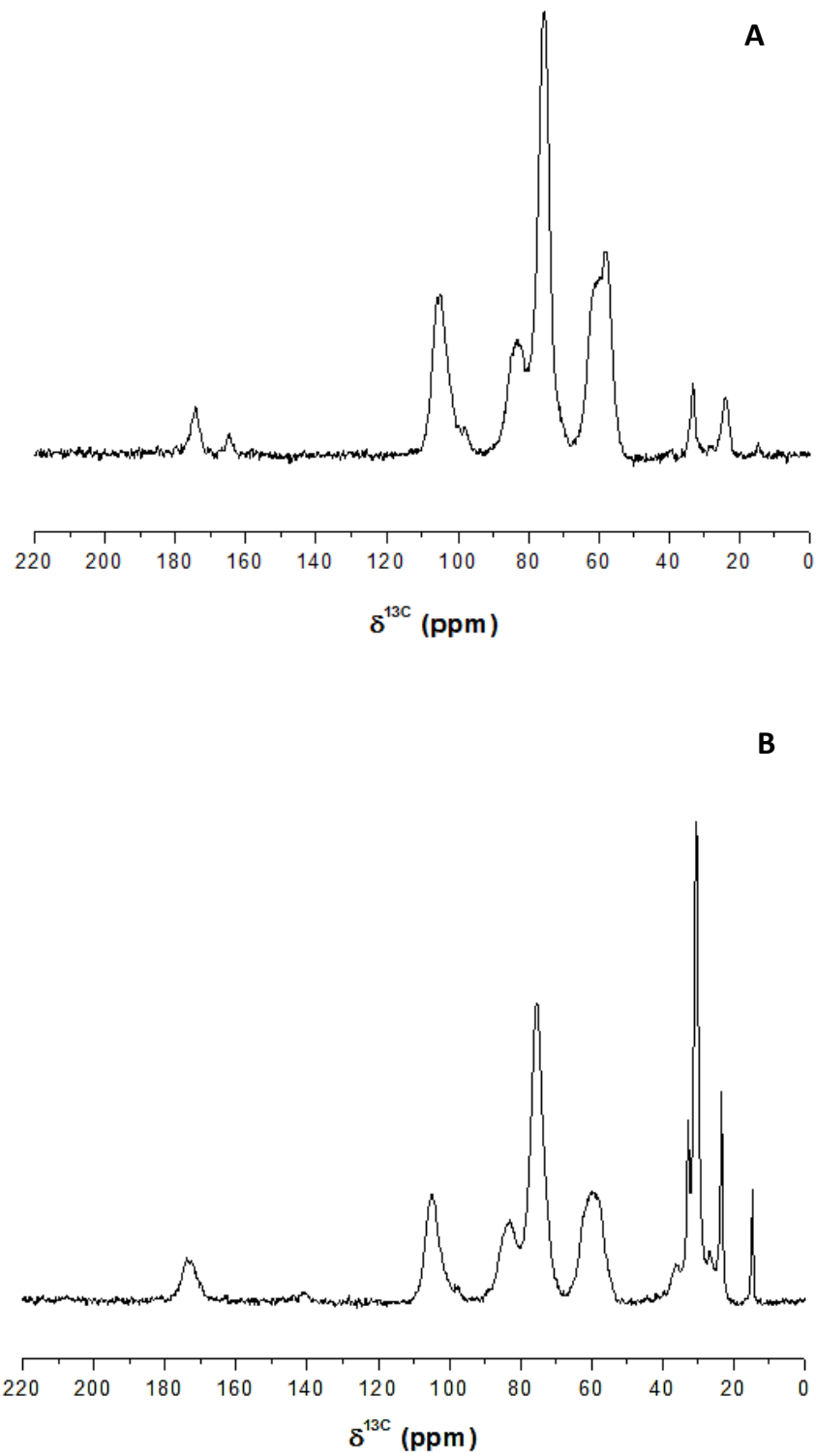


Figura 5.17. Espectro ^{13}C NMR de microesferas de: A) quitosano (Q); B) quitosano modificadas (QM1-1.5).

Tabla 5.2.

Señales químicas de los carbonos correspondientes a las microesferas de quitosano y quitosano modificadas (QM1-1.5).

Tipo de Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
C ₁	105.0 - 105.2
C ₂	57.9
C ₃ - C ₅	75.3 - 75.6
C ₄	83.0
C ₆	60.8
CH ₃ -N	23.4 - 23.9
N-C=O	173.8 - 174.2
CH ₃ -R	14.7
N-CH ₂	32.8
R-(CH ₂)-R	30.5
(CH ₂) _{10,11}	26.9

La línea separa: señales características del quitosano parcialmente desacetilado (parte superior) y los picos adicionales producto de la modificación (parte inferior).

5.8.2.10. Contenido de proteína de los biocatalizadores preparados

Las mediciones del contenido de proteína en los biocatalizadores desarrollados fueron realizadas con dos propósitos. Primero, éstas fueron usadas para examinar la relación entre el carácter hidrofóbico de los soportes preparados y la adsorción de las lipasas. Segundo, con la información anterior disponible, fue posible comparar la actividad específica de cada uno de los biocatalizadores con la de la enzima libre, al añadir la *misma cantidad de proteína* en los medios de reacción. Los resultados de la proteína adsorbida en cada biocatalizador son mostrados en la Fig. 5.18. Como se puede apreciar, los soportes de la Serie QM0.5 (relación 1:0.5 NH₂/aldehído) mostraron que a mayor modificación del material, correspondiente a mayores tiempos de reacción, más proteína fue adsorbida. Este comportamiento pareció seguir una tendencia lineal positiva. Por otra parte, los soportes de la Serie QM1 (relación 1:1 NH₂/aldehído) incorporaron menor cantidad de proteína que el material sin modificar (Q) independientemente del tiempo de la reacción de aminación.

Cabe mencionar que los soportes de la Serie QM1 resultaron más hidrofóbicos que los de la serie QM0.5 (sección 5.8.2.3). Este resultado sugiere que la hidrofobicidad del soporte y la morfología de su superficie, obtenidas en base a la concentración de cadenas de aldehído injertadas, pueden definir la adsorción de las lipasas sobre el soporte. Nieto et al. (2005) llevaron a cabo la inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* por adsorción sobre soportes hidrofóbicos comerciales (Butyl-Sepabeads, Octyl-agarose y Octadecyl-Sepabeads) y observaron que la carga de proteína decrecía cuando el material era extremadamente hidrofóbico. Esto resulta consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Una explicación de este hallazgo es realizada en la próxima sección. Por otro lado, Branco et al. (2010) estudiaron la inmovilización de lipasas de *Pyrococcus furiosus* sobre Butyl-Sepabeads y Octadecyl-Sepabeads, y observaron que a medida que la hidrofobicidad del soporte se incrementaba, más lipasas eran adsorbidas. Este resultado sugiere que la adsorción no solo está determinada por las características del soporte sino también por las peculiaridades de la lipasa (tamaño del lid, número de residuos hidrofóbicos, etc.) o incluso del preparado enzimático del cual se parte.

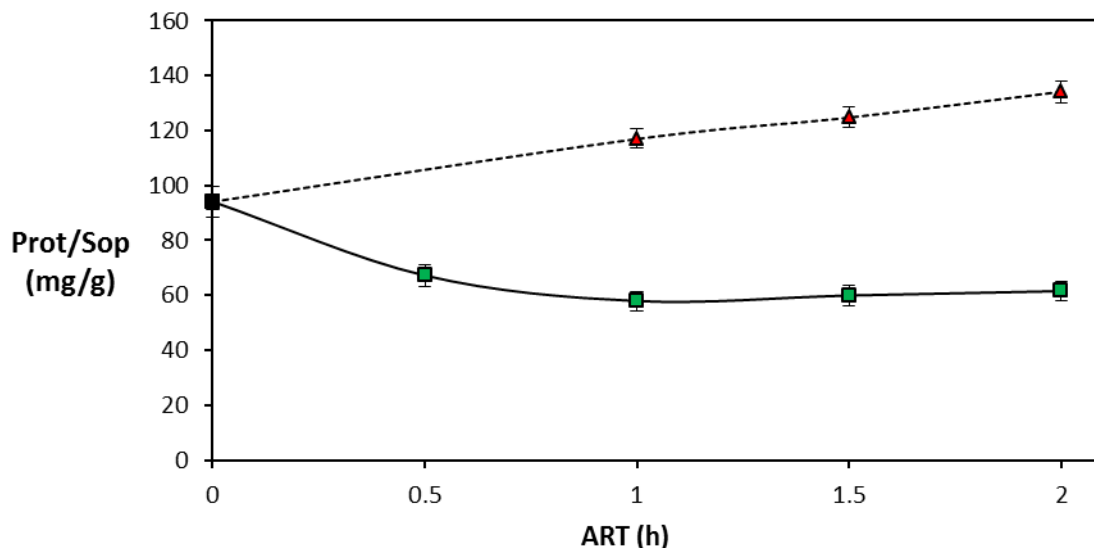


Figura 5.18. Contenido de proteína en los biocatalizadores preparados (Prot/Sop), identificados en término de las condiciones empleadas para obtener los soportes: Q (■), Serie QM0.5 (Δ), y Serie QM1(□).

5.8.2.11. Ensayos de actividad enzimática

El comportamiento catalítico de los biocatalizadores obtenidos y de la enzima libre fue evaluado mediante la reacción de interés (acidólisis). La composición de ácidos grasos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en los glicéridos (P+St) en los lípidos estructurados (SL), productos tras 24 h de reacción, son reportados en la Fig. 5.19. Como puede notarse, casi todos los biocatalizadores obtenidos usando microesferas de quitosano modificadas como soporte, Serie QM0.5 y Serie QM1, fueron más activos que el obtenido empleando microesferas de quitosano (Q). Además, para ambas relaciones $\text{NH}_2/\text{aldehído}$, las proteínas adsorbidas mostraron una mayor actividad catalítica a medida que los tiempos asociados a la reacción de aminación de sus soportes se incrementó, hasta alcanzar una condición a partir de la cual la actividad disminuyó, haciéndose similar a la de los biocatalizadores preparados con las microesferas de quitosano sin modificar (tiempo de aminación= 0 h). Los efectos de los factores relación molar $\text{NH}_2/\text{aldehído}$, tiempo de aminación y su interacción, resultaron ser significativos sobre la actividad de la lipasa inmovilizada ($P = 0.0351, 0.0002, \text{ and } 0.0009$, respectivamente).

El biocatalizador que logró la mayor modificación sobre el aceite de girasol fue el preparado empleando QM1-1.5 como soporte; el mismo condujo a un cambio en la composición de los ácidos palmítico y esteárico, desde un valor inicial de 9.6% en el aceite hasta 49.1% en el lípido estructurado final. Cabe destacar, que QM1-1.5 fue uno de los soportes con menor cantidad de proteína adsorbida (Fig. 5.18). Sin embargo, conforme al análisis del ángulo de contacto, éste resultó ser uno de los soportes más hidrofóbicos. Este comportamiento observado permite postular lo siguiente: en el caso de los soportes de la Serie QM1 pareciera que una modificación superficial mayor asociada a un carácter más hidrofóbico, hace que las lipasas se adsorban en una conformación más abierta. Al principio ésta podría ser una conformación más activa, pero cuando la modificación del soporte supera un cierto grado, la conformación de la lipasa inmovilizada podría volverse demasiado abierta y /o con el sitio activo más cercano al soporte provocando una menor actividad o impedimento estérico que bloquea físicamente el acceso del sustrato (Mateo et al., 2007). Esta forma abierta o expandida de la lipasa podría involucrar más cadenas de aldehído que

cuando se emplean soportes de la Serie 1:0.5 (conformación más cerrada). Por lo tanto, la capacidad de los soportes de la Serie QM1 para adsorber proteínas podría estar restringido por este hecho, lo que justifica el menor contenido de proteína alcanzado con estos (Fig. 5.18). El incremento de actividad debido a la inmovilización de lipasas en soportes fuertemente hidrofóbicos ha sido reportado en numerosos trabajos (Palomo et al., 2002; Nieto et al., 2005). Otras investigaciones han informado que la mayor hiperactivación se logró cuando una baja cantidad de proteína fue adsorbida sobre los soportes. Para explicar esto, los autores sugieren que tendría lugar la formación de un microambiente que envuelve la superficie del soporte, el sitio activo de la enzima y el sustrato, el cual favorecería la eficiencia catalítica de la enzima (Almeida et al., 2008; Branco et al. 2010).

Cuando se emplearon como catalizador lipasas de *Rhizomucor miehei* libres y el biocatalizador preparado con las microesferas sin modificar (Fig. 5.20, ART: 0 h), se obtuvo una incorporación similar de ácidos grasos saturados en los productos de reacción. Sin embargo el biocatalizador más activo (QM1-1.5) tuvo una actividad casi 3 veces mayor que estos. Los resultados aquí reportados demostraron que la lipasa inmovilizada logró una condición de hiperactivación en algunos de los soportes modificados. Vale mencionar que esta hiperactivación no fue tan alta como las que se han reportado en otros trabajos (Fernandez-Lafuente et al., 1998; Palomo et al., 2002; Nieto et al., 2005). Esto podría deberse a la diferencia en las reacciones ensayadas y en el tipo de sustratos usados. Por ejemplo, Palomo et al. (2002) mostró que lipasas de *M. miehei* inmovilizada en Octadecyl-Sepabeads fue 20 veces más activa que la enzima soluble en la hidrólisis de *p*-nitrofenil propianato. Sin embargo, el mismo derivado enzimático alcanzó solo un incremento en un factor de 5 comparado con la enzima soluble cuando fue usado en la hidrólisis de etil butirato.

Por otro lado, tanto la enzima libre como la inmovilizada exhibieron similar preferencia por incorporar ácido esteárico en lugar de palmítico. Usando la misma cantidad de proteína, las incorporaciones de palmítico y esteárico fueron las siguientes: 60.0% y 104.1%, respectivamente, con lipasas de *Rhizomucor miehei* libre y 351.3% y 536.4%, respectivamente, con QM1-1.5. Esto sugiere que los soportes obtenidos, junto con el

proceso de inmovilización empleado, no cambiaron las características naturales de las lipasas en este sentido (Lee y Akoh, 1998).

Por otra parte, en lo que se refiere a la condición impuesta sobre los biocatalizadores de ser altamente resistentes a la atrición, este aspecto fue corroborado después de cada reacción realizada, por inspección visual. Todos los biocatalizadores permanecieron inalterados en las condiciones de reacción estudiadas. Además, y también en términos cualitativos, la dureza de los biocatalizadores se pudo confirmar cuando los mismos debieron llevarse a la forma de polvo para los análisis de FTIR y ^{13}C NMR.

La comparación del desempeño de los biocatalizadores preparados en este trabajo con el de otras lipasas inmovilizadas sobre quitosano, reportadas en estudios previos, no pudo realizarse debido a que no se halló ningún tipo de investigación en la que se produzcan lípidos estructurados con estos derivados enzimáticos. La información publicada muestra que otras lipasas han sido inmovilizadas sobre microesferas de quitosano sin modificar y usadas generalmente en reacciones de hidrólisis. Por ejemplo, lipasas de *Candida rugosa* inmovilizadas han sido ensayadas en la hidrólisis de *p*-nitrofenil palmitato (Chiou y Wu, 2004); aunque principalmente otros tipos de enzimas han sido inmovilizadas, por ejemplo β -galactosidasa para ser empleada en la hidrólisis de lactosa (Carrara et al. 1994, Rejikumar y Devi, 1995). Así también β -glucosidasa, fosfatasa ácida y α -amilasa, entre otras, han sido usadas en sus reacciones específicas (Krajewska, 2004). Esto indica que el trabajo que se detalla en este capítulo resultó innovador, no solo desde el punto de vista de la modificación realizada sobre el quitosano para obtener un soporte más adecuado, sino también debido a la aplicación que se le da al biocatalizador desarrollado.

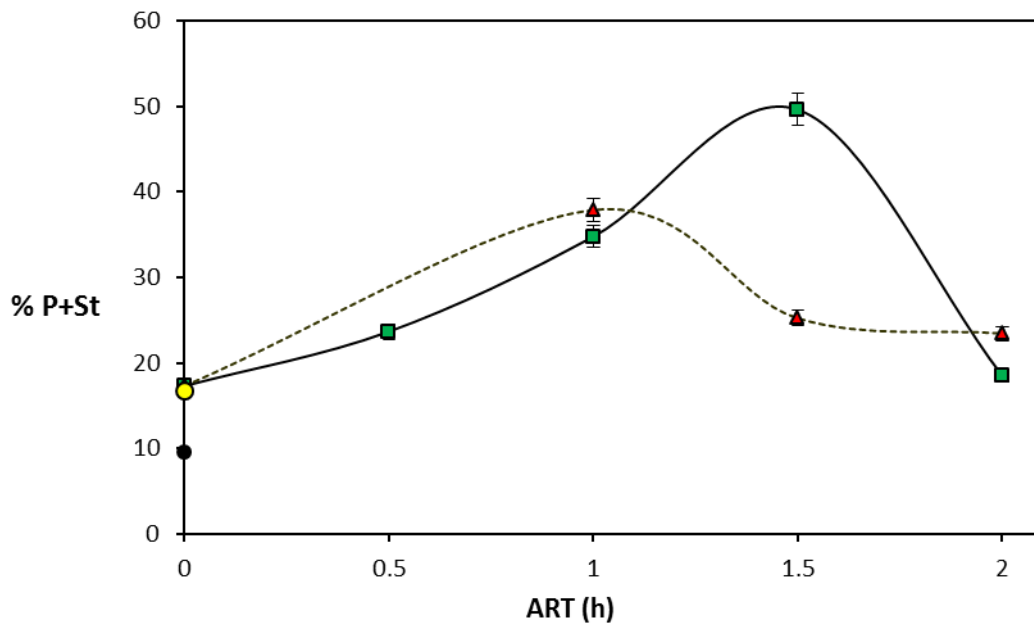


Figura 5.19. Composición de ácidos palmítico y esteárico (P+St) en los lípidos estructurados (SL) obtenidos por acidólisis catalizada con los biocatalizadores preparados: Q (■), Serie QM0.5 (▲), y Serie QM1 (□). Acidólisis catalizada por lipasas libres de RM: ○. Aceite de girasol: ●. Condiciones de reacción: 6 mol StPFA/mol SO, 3ml hexano/g sustrato, 33 mg de proteína/g sustrato, a 60°C y 24h.

5.8.2.12. Estabilidad en el reuso

Un estudio de estabilidad operacional se llevó a cabo con todos los biocatalizadores. Los resultados para los 3 primeros usos ensayados se muestran en la Fig. 5.20. Como puede apreciarse, la actividad del biocatalizador obtenido a partir del material sin modificar (Q) decreció con los reusos en forma significativa ($P < 0.05$), en concordancia con los hallazgos reportados por Tang et al. (2007). La actividad de los biocatalizadores obtenidos de microesferas de quitosano modificadas, en algunos casos fue moderadamente mantenida y en otros, en general disminuyó. La estabilidad de QM1-1.5, mejor biocatalizador obtenido desde el punto de vista de su actividad catalítica, fue testada durante 10 usos consecutivos. Como puede observarse en la Fig. 5.21., el mismo mantuvo su actividad durante los primeros 7 usos de 24 h cada uno ($P > 0.05$). Esto indica que durante este tiempo, 7 ciclos de uso (168 h totales), las lipasas adsorbidas sobre las microesferas modificadas no fueron desactivadas por las condiciones a las que se llevó a cabo la reacción de acidólisis,

tampoco liberadas al medio de reacción, ni desorbidas en los lavados intermedios. Después de 10 usos sucesivos, el biocatalizador mantuvo más del 70% de la actividad inicial, estando aún en un nivel de actividad más alto que el de la enzima libre. Esto revela una fuerte adsorción de la lipasa al soporte hidrofóbico, en parte debida a la interacción física específica entre la lipasa y el soporte, la cual por otro lado se vio favorecida por la fase orgánica donde la reacción de acidólisis fue realizada.

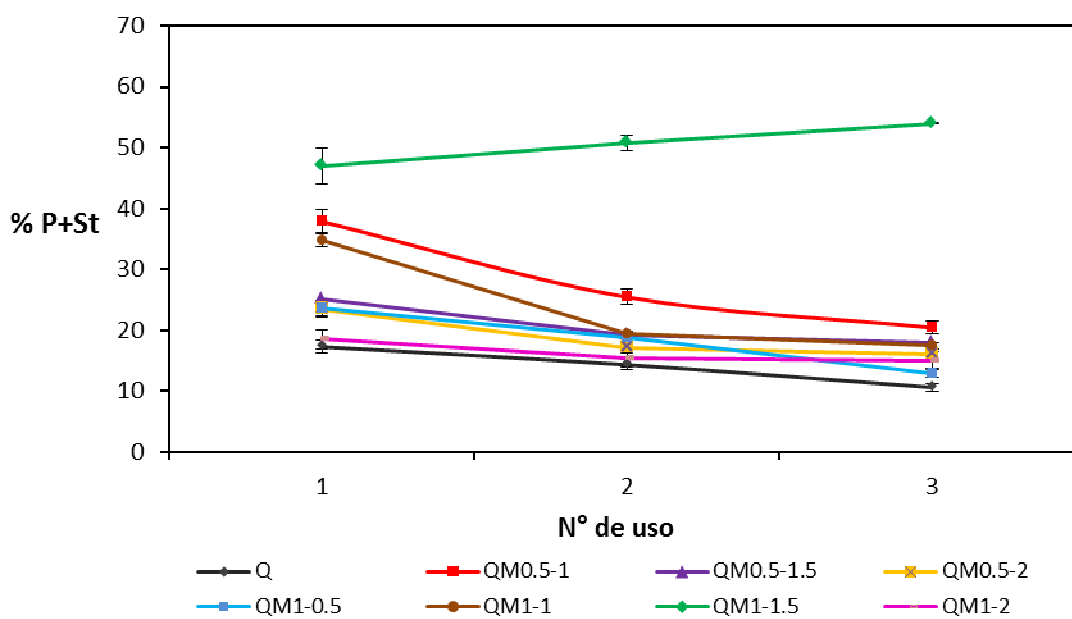


Figura 5.20. Composición de ácido palmítico y esteárico (P+St) en los productos de reacción obtenidos en sucesivos usos para todos los biocatalizadores preparados. Condiciones de reacción: 6 mol StPFA/mol SO, 3ml hexano/g sustrato, 33 mg de proteína/g sustrato, a 60°C y 24h.

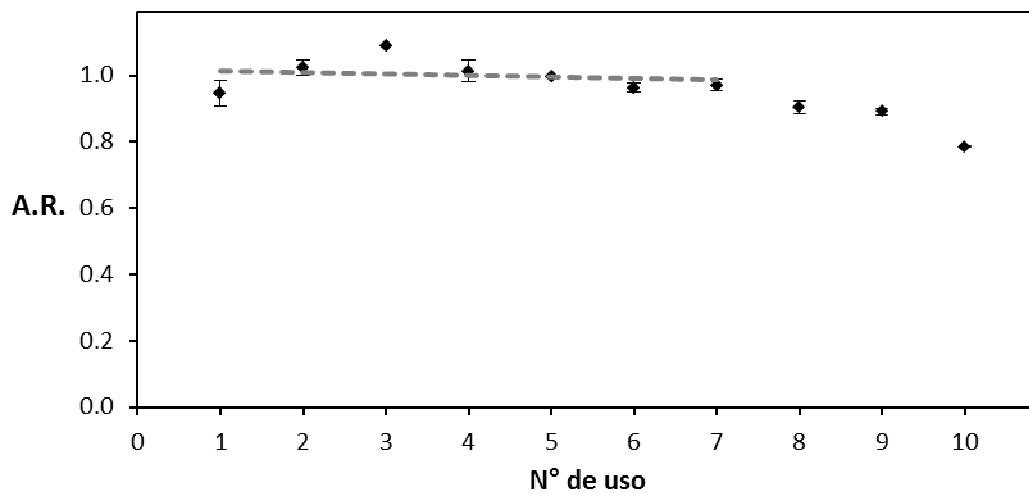


Figura 5.21. Actividad relativa (A.R.) en usos sucesivos, correspondiente al biocatalizador más activo, QM1-1.5. Condiciones de reacción: ver Fig. 5.20.

5.9. Conclusiones

En la preparación de biocatalizadores, el soporte merece tanta atención como la enzima misma y el proceso empleado para la unión o inmovilización. Esto se debe a que un soporte elegido en forma adecuada puede mejorar significativamente el rendimiento del derivado enzimático. Por esta razón, se optó por la preparación del propio soporte a fin de poder otorgarle las características deseadas.

En ese sentido, microesferas de quitosano fueron preparadas exitosamente por neutralización y posterior reacción de aminación reductiva a fin de modificar la naturaleza hidrofílica del quitosano a una más hidrofóbica. Dado que esta técnica no había sido empleada antes para microesferas de gel, la modificación química fue corroborada mediante diferentes métodos de caracterización de materiales. Los resultados revelaron que, para las condiciones bajo estudio, la concentración de aldehído en el medio de reacción y el tiempo de contacto con el mismo influyeron en la hidrofobicidad de las partículas obtenidas. Pudo notarse un incremento en el tamaño de las partículas debido a la modificación efectuada sobre las microesferas, probablemente debido a la incorporación superficial de largas cadenas carbonadas a la estructura original del polisacárido. Todas las

partículas obtenidas mostraron estabilidad térmica hasta al menos 250 °C. Por otra parte las lipasas de *Rhizomucor miehei* fueron efectivamente inmovilizadas por adsorción sobre las microesferas modificadas, mostrando una mayor actividad a medida que el material era más hidrofóbico, salvo para aquellos que resultaron altamente hidrofóbicos. El biocatalizador QM1-1.5, obtenido de uno de los soportes más modificados, logró la mayor transformación sobre el aceite de girasol en la reacción de acidólisis, alcanzando un cambio en la composición de los ácidos palmítico y esteárico desde un valor de 9.6 % en el aceite original a 49.1 % en el lípido estructurado final. Esta alta conversión, 3 veces mayor que la obtenida con la enzima libre, fue mantenida durante 7 usos consecutivos de 24 h cada uno, transcurso en el cual no se detectaron problemas de atrición. De este modo, el biocatalizador preparado que mostró el mejor desempeño podría ser adecuado para usarse en sistemas discontinuos con altas velocidades de agitación y asimismo, en sistemas continuos como catalizador en un lecho empacado. Este último aspecto es motivo de estudio en el Capítulo 8.

El trabajo que se detalla en este capítulo fue divulgado a través de la siguiente publicación científica:

Palla C., Pacheco C., Carrín M.E., *Preparation and modification of chitosan particles for Rhizomucor miehei lipase immobilization*, Biochemical Engineering Journal 55 (2011) 199-207.

5.10. Referencias

Abdel-Magid A.F., Carson K.G., Harris B.D., Maryanoff C.A., Shah R.D., Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride, Studies on direct and indirect reductive amination procedures, Journal of Organic Chemistry 61 (1996) 3849-3862.

Almeida R.V., Branco R.V., Peixoto B., Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: isotherms, hyperactivation and purification, *Biochemical Engineering Journal* 39 (2008) 531–537.

ASTM Standard D 2857, 1995 (2001), "Standard Practice for Dilute Solution Viscosity of Polymers," ASTM International, West Conshohocken, PA, 2001, DOI: 10.1520/D2857-95R07, www.astm.org.

Balcão V.M., Kemppinen A., Malcata F.X., Kalo P.J., Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998) 1347-1358.

Biro E., Nemeth A.S., Sisak C., Feczko T., Gyenis J., Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2008) 1240-1246.

Bódalo A., Gomez J.L, Cabanes A.L., Gómez E., Bastida J., Análisis y simulación de reactores de lecho fijo para sistemas de enzimas inmovilizadas, Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia, (1986).

Branco R.V., Limoeiro M., Gutarra E., Guimarães Freire D.M., Almeida R.V., Immobilization and characterization of a recombinant thermostable lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on supports with different degrees of hydrophobicity, *Enzyme Research* 2010 (2010) 8 pages. DOI:10.4061/2010/180418

Carrara C.R., Rubiolo A.C., Immobilization of β -galactosidase on chitosan, *Biotechnology Progress* 10 (1994) 220-224.

Carrín M.E., Crapiste G.H., Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture, *Journal of Food Engineering* 84 (2008) 243-249.

Castro H.F., Silva M.L.C.P., Silva G.L.J.P, Evaluation of inorganic matrixes as supports for immobilization of microbial lipase, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (2000) 849-858.

Chiou S-H, Wu W-T, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials* 25 (2004) 197-204.

Desbrières J., Martinez C., Rinaudo M., Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour, *International Journal of Biological Macromolecules* 19 (1996) 21-28.

Esteban L., Muñío M.d.M., Robles A., Hita E., Jiménez M.J., González P.A., Camacho B., Molina E., Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types, *Biochemical Engineering Journal* 44 (2009) 271-279.

Fernandez-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports, *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1998) 185-197.

Fernandez-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M., Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties, *Process Biochemistry* 43 (2008) 1061–1067.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Cabrera Z., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports *Enzyme and Microbial Technology* 41 (2007) 565–569.

Focher B., Beltrame P.L., Naggi A., Torri G., Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications, *Carbohydrate Polymers* 12 (1990) 405-418.

Foresti M.L., Ferreira M.L., Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 769–777.

Forward K.M., Moster A.L., Schwartz D.K., Lacks D.J., Contact angles of submillimeter particles: Connecting wettability to nanoscale surface topography, *Langmuir* 23 (2007) 5255-5258.

Guibal E., Milot C.I., Tobin J.M., Metal-anion sorption by chitosan beads: equilibrium and kinetic studies, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 37 (1998) 1454-1463.

Hita E., Robles A., Camacho B., Gonzalez P.A., Esteban L., Jimenez M.J., Muño M.M., Molina E., Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor, *Biochemical Engineering Journal* 46 (2009) 257-264.

Iqbal J., Wattoo F.H., M.H.S. Wattoo M.H.S., Malik R., Tirmizi S.A., Imran M., Ghangro A.B., Adsorption of acid yellow dye on flakes of chitosan prepared from fishery wastes, *Arabian Journal of Chemistry* 4 (2011) 389-395.

Jiménez M.J., Esteban L., Robles A., Hita E., González P.A., Muño M.M., Molina E., Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis, *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 172-179.

Kasaai M.R., Arul J., Charlet C., Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 38 (2000) 2591-2598.

Kasaai M.R., Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data, *Carbohydrate Polymers* 68 (2007) 477-488.

Kassai M.R., Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review, *Carbohydrate Polymers* 79 (2010) 801–810.

Kittikun A. H, Kaewthong W., Cheirsilp B., Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS, *Biochemical Engineering Journal* 40 (2008) 116-120.

Klotzbach T., Watt M., Ansari Y., Minteer S.D., Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization, *Journal of Membrane Science* 282 (2006) 276-283.

Krajewska B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2004) 126-139.

Lee K.-T, Akoh C.C., Immobilization of Lipases on Clay, Celite 545, Diethylaminoethyl-, and Carboxymethyl-Sephadex and their Interesterification Activity, *Biotechnology Techniques* 12 (1998) 381-384.

Ma G.P., Yang D.Z., Zhou Y.S., Xiao M., Kennedy J.F., Nie J., Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan, *Carbohydrate Polymers* 74 (2008) 121-126.

Malcata F.X., Reyes H.R., Garcia H.S., Hill Jr. C.G., Amundson C.H., Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67 (1990) 890-910.

Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007) 1451-1463.

Nieto I., Rocchietti S., Ubiali D., Speranza G., Morelli C.F., Fuentes I.E., Alcantara A.R., Terreni M., Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor miehei* lipase crude extract - Enzymatic resolution of (R,S)-2-Tetralol, *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 514-520.

Ortona O., D'Errico G., Mangiapia G., Ciccarelli D., The aggregative behavior of hydrophobically modified chitosans with high substitution degree in aqueous solution, *Carbohydrate Polymers* 74 (2008) 16-22.

Osborn H.T., Akoh C.C, Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1 (2002) 93-103.

Pacheco C., Crapiste G.H., Carrin M.E., Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: Kinetic behavior, *Journal of Food Engineering* 98 (2010) 492-497.

Palomo J.M., Muñoz G., Fernandez-Lorente G., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19 (2002) 279-286.

Pillai C.K.S., Paul W., Sharma C.P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science* 34 (2009) 641–678.

Ramos V.M., Rodríguez N.M., Rodríguez M.S., Heras A., Agullo E., Modified chitosan carrying phosphonic and alkyl groups, *Carbohydrate Polymers* 51 (2003) 425–429.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008.

Rejikumar S., Devi S., Immobilization of β -galactosidase onto polymeric supports, *J Applied Polymer Science* 55 (1995) 871-878.

Rinaudo M., Auzely R., Vallin C., Mullagaliev I., Specific interactions in modified chitosan systems, *Biomacromolecules* 6 (2005) 2396-2407.

Rinaudo M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Progress Polymer Science* 31 (2006) 603–632.

Rinaudo M., Milas M., Dung P.L., Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion, *International Journal of Biological Macromolecules* 15 (1993) 281-285.

Rodrigues R.C., R. Fernandez-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010) 1-22.

Sajomsang W., Tantayanon S., Tangpasuthadol V., Thatte M., Daly W.H., Synthesis and characterization of N-aryl chitosan derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules* 43 (2008) 79-87.

Tang Z.X., Qian J.Q., Shi L.E., Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles, *Materials Letter* 61 (2007) 37-40.

Tangpasuthadol V., Pongchaisirikul N., Hoven V.P., Surface modification of chitosan films. Effects of hydrophobicity on protein adsorption, *Carbohydrate Research* 338 (2003) 937-942.

Vikbjerg A.F., Peng L.F., Mu H.L., Xu X.B., Continuous production of structured phospholipids in a packed red reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82 (2005) 237-242.

Wilson L., Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Illanes A., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R., Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports, *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006) 975–980

Xu X.B., Porsgaard T., Zhang H., Adler-Nissen J., Hoy C. E., Production of structured lipids in a packed-bed reactor with *Thermomyces lanuginosa* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (2002) 561-565.

Xue Z.X., Yang G.P., Zhang Z.P., He B.L., Application of chitosan microspheres as carriers of LH-RH analogue TX46, *Reactive & Functional Polymers* 66 (2006) 893–901.

Yalpani M., Hall L.D., Tung M.A., Brooks D.E., Unusual rheology of a branched, water-soluble chitosan derivative, *Nature* 302 (1983) 812-814.

Yen M.T., Yang J.H., Mau J.L., Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells, *Carbohydrate Polymers* 75 (2009) 15-21.

Zong Z., Kimura Y., Takahashi M., Yamane H., Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans, *Polymer* 41 (2000) 899-906.

ACIDÓLISIS: SELECCIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS

6.1. Introducción

Como se detalló en la sección anterior, mediante modificaciones en la reacción de alquilación, se obtuvieron soportes para inmovilización con distinto grado de hidrofobicidad. Con la consecuente inmovilización de la lipasa *Rhizomucor miehei* sobre ellos, fue posible obtener 8 tipos de biocatalizadores. La capacidad catalizadora de los mismos fue probada en la acidólisis de aceite de girasol y ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, en una condición de reacción única y específica. El biocatalizador más activo logró un cambio en la composición en ácidos palmítico y esteárico desde un valor de 9.6% en el aceite original, a 49.1% en producto final.

Si bien este resultado logró ser muy satisfactorio en cuanto a la conversión alcanzada, en lo que a acidólisis se refiere, resulta necesario desarrollar un conocimiento más amplio de la influencia que tienen las variables de reacción. Esto se hace aún más imperioso si se tiene presente que la reacción de acidólisis consiste en pasos de hidrólisis y reesterificación. Ciertas condiciones podrían favorecer la hidrólisis provocando una formación excesiva de diglicéridos (DAG) y monoglicéridos, incluso hasta de glicerol, que si

permanecen como tales en el producto final disminuirían el rendimiento de los lípidos estructurados deseados. Adicionalmente, la presencia de DAG puede dar lugar a reacciones indeseadas. Se ha reportado que ciertas cantidades de DAG en la mezcla de reacción han provocado la acil migración de grupos acilo de cadena larga de la posición *sn*-2 a *sn*-1 o *sn*-3, lo que también conlleva a un menor rendimiento y pureza (Xu et al., 1998; Xu et al., 1999; Yang et al., 2005).

Por otro lado, este tipo de estudio también resulta necesario cuando procesos de esta clase se desean implementar en escala industrial, donde se usan por lo general, reactores de lecho empacado. En este caso, las mezclas de reacción deben tener una relación sustratos/solvente adecuada para que no ocurra solidificación en las líneas del sistema. Esto es debido a que la temperatura de trabajo por lo general es cercana a la temperatura de fusión de los ácidos grasos.

Las variables que pueden ser analizadas en una reacción de acidólisis enzimática son: tiempo, temperatura, relación entre sustratos, concentración inicial de agua en el medio de reacción, concentración de enzima, concentración de solvente y tipo de enzima empleada, entre otros (Xu et al., 1998; Sharma et al., 2009; de Araújo et al., 2011). La selección de los parámetros a estudiar dependerá de los requerimientos propios.

De este modo, el trabajo experimental y posterior análisis que se detalla en este capítulo, se realizó con el objetivo de lograr una mayor comprensión del efecto que tienen los parámetros de reacción más importantes cuando un novedoso biocatalizador especialmente preparado para modificación de lípidos es usado. Asimismo, se buscó hallar las condiciones de reacción más adecuadas sobre la base de consideraciones prácticas, a fin de producir el mayor cambio en la composición del aceite de girasol.

6.2. Métodos empleados

6.2.1. Diseño Experimental

Para que un conjunto de experimentos se realice en la forma más eficiente, es necesario emplear métodos científicos en su planificación. El diseño estadístico de experimentos es el proceso de planear un conjunto de experimentos para obtener datos apropiados que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, con el objetivo de lograr conclusiones válidas y objetivas. Para obtener conclusiones significativas a partir de datos que involucran errores experimentales se requiere de un enfoque estadístico del diseño de experimentos (Montgomery, 2005).

Básicamente, un diseño experimental consiste en desarrollar una serie de experimentos, previamente planeados, en los que se varían los valores de las variables de entrada (variables independientes) y se miden los valores de respuesta (variables dependientes) a la salida (luego de realizar el experimento). Más específicamente, diseños que involucran las metodologías de superficie de respuesta, permiten analizar simultáneamente varias variables con un mínimo número de ensayos, ya que se basan en diseños factoriales. Estas metodologías tienen la ventaja de ser menos costosas y de consumir menos tiempo que los métodos clásicos (de Araújo et al., 2007).

En base a lo anterior, se seleccionó un diseño de superficie de respuesta de tipo Box-Behnken, para evaluar la influencia de los parámetros de reacción elegidos sobre las variables de respuesta. El mismo consistió en un diseño factorial incompleto de tres niveles y tres factores con tres puntos centrales (Fig. 6.1), en el cual los puntos experimentales han sido especialmente escogidos para permitir una estimación eficiente de los coeficientes de los modelos de segundo grado que este tipo de diseño permite obtener. Los tres factores seleccionados fueron: cantidad de biocatalizador (E), relación molar de sustratos (SR) y cantidad de solvente (H). Estos se eligieron en base a trabajos de investigación similares (Shieh et al., 1995; Hita et al., 2009; de Araújo et al., 2011) donde estas variables tuvieron efectos significativos. Los niveles de los factores se determinaron de acuerdo a estudios

anteriores y consideraciones prácticas. La cantidad de solvente, hexano, en el medio de reacción se fijó de modo que pudieran representarse sistemas diluidos en sustrato, de uso común en operaciones continuas, y sistemas "verdes", en los que no se emplean disolventes. Los rangos analizados fueron: E (0.21 a 0.39 g), SR (3 - 6 mol SPFA / mol SO) y H (0.0 -3.2 ml).

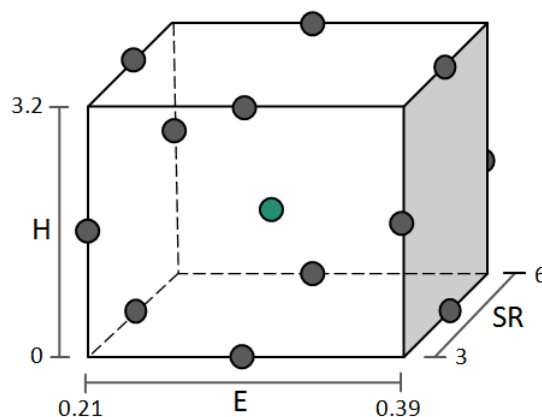


Figura 6.1. Diseño de Box-Behnken de 3 factores con 3 niveles.

Las variables de respuesta seleccionadas y el justificativo de su elección se detallan a continuación.

- % P+St: composición de ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, respecto a los ácidos grasos totales en glicéridos. La cantidad de ácidos palmítico y esteárico presente en los glicéridos luego de transcurrida la reacción es una medida directa de la actividad neta de la lipasa (reacciones de hidrólisis y esterificación). Representa además una característica que permite apreciar claramente cuanto se modificaron los lípidos originales.

- % BP: composición de subproductos (mono y diglicéridos) respecto al total de glicéridos. Como ya se mencionó, la reacción de acidólisis se inicia cuando la enzima hidroliza los ácidos grasos presentes en la estructura del triglicérido, lo que permite la posterior esterificación con cadenas acilo presentes en el medio de reacción. En consecuencia, los productos de la hidrólisis, ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y

diacilgliceroles, son intermediarios necesarios en la reacción. Sin embargo, la presencia de estos compuestos en el producto final implica un decrecimiento en el rendimiento a lípidos estructurados.

- % SUS: triglicéridos monoinsaturados respecto al total de triglicéridos. Fue el lípido deseado por su estructuración en tipo de ácidos grasos. Estos lípidos contienen dos ácidos grasos saturados que dan las características de grasas sólidas o semisólidas. Además, conserva el ácido graso insaturado en la posición *sn-2*, siempre y cuando la enzima sea específica (que solo catalice las reacciones en las posiciones *sn-1* y *sn-3*) y no ocurra migración del ácido graso original de esta posición.

- % SSS: triglicéridos trisaturados respecto al total de triglicéridos. La presencia de triglicéridos trisaturados en el producto de reacción se debe a la existencia de la acil migración como reacción secundaria. Por esta razón, el contenido de TAG trisaturados puede ser empleado como un indicador de esta reacción indeseada.

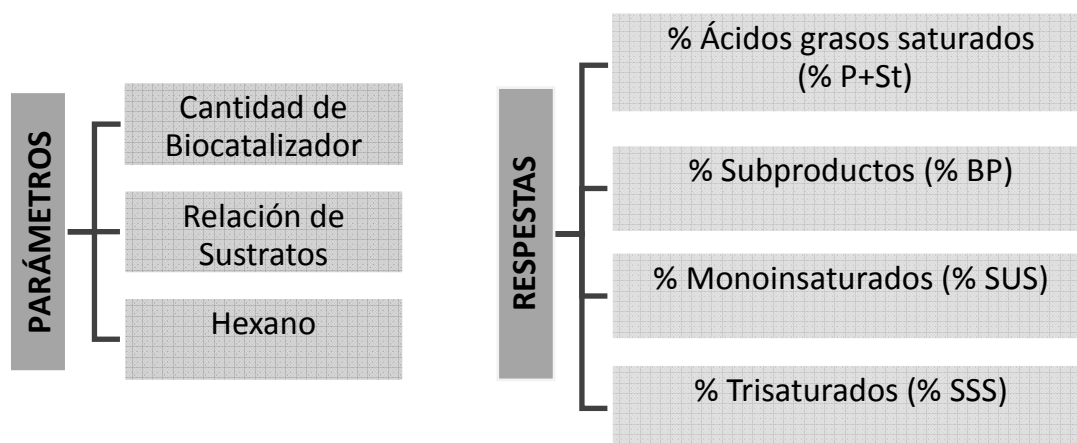


Figura 6.2. Factores y variables de respuesta seleccionados para el diseño factorial incompleto de 3 factores con 3 niveles.

La matriz de diseño fue realizada empleando el software Design-Ease® (Stat-Ease Inc., 2006). La misma dio lugar a 15 experiencias, de las cuales 2 son réplicas del punto central. Los niveles de los factores empleados en cada uno de estos ensayos, en término de las variables reales, se muestran en la tabla 6.1. Las experiencias se efectuaron en forma aleatoria.

Este mismo software se empleó también para el análisis estadístico a través de modelos de ajuste, que relacionan las distintas variables independientes y sus interacciones con la variable dependiente o respuesta considerada. En estos, los coeficientes se calculan en base a las respuestas experimentales y se obtienen según la siguiente ecuación de regresión múltiple:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (6.1)$$

donde \hat{y} es la respuesta en estudio, β_0 la intersección, β_i el coeficiente para el efecto principal del factor i , β_{ij} el coeficiente que involucra la interacción entre i y j , y por último, x_i y x_j representan cada uno de los factores considerados.

La bondad del ajuste fue testada mediante el análisis de la varianza (ANOVA), el cual emplea coeficientes estadísticos para describir los modelos. Estos son:

- Coeficiente de determinación (R^2): es una medida de la variación de la media explicada por el modelo.
- Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}): es una medida de la variación alrededor de la media explicada por el modelo, ajustada por el número de términos presentes en el modelo.
- Coeficiente de determinación predicho: (R^2_{pred}): es una medida de la capacidad predictiva del modelo.

La diferencia entre R^2_{pred} y R^2_{adj} no debería ser mayor que el 20%, de lo contrario podría haber un problema con los datos o el modelo. Otros parámetros descriptivos que se emplean son:

- Falta de ajuste (LOF): el valor correspondiente no debe ser significativo.
- Precisión Adeq (AP): mide la relación entre los valores predichos y el error promedio de la predicción. Son adecuados los valores mayores a 4, en cuyo caso el modelo puede ser usado para navegar en el espacio del diseño.
- Valor P: es un estadístico que determina la significancia de los términos del modelo. Valores de $P > F$ menores que 0.05 indican que el término del modelo es significativo y valores mayores a 0.1, indican que es no significativo. Cabe mencionar que algunos términos que mostraron ser no significativos fueron conservados en los modelos con el fin de aumentar la calidad del ajuste.

En base a lo anterior, un modelo de ajuste fue obtenido para cada respuesta con su correspondiente análisis estadístico.

6.2.2. Preparación del Biocatalizador

El biocatalizador empleado para la realización de las reacciones se preparó según lo especificado en el capítulo anterior, en las condiciones que permitieron obtener el catalizador más activo. Esto significó emplear dodecil aldehído en la relación monomolar 1:1 NH₂/aldehído y un tiempo de contacto de 1.5 h.

De igual manera, la inmovilización de la lipasa sobre los soportes obtenidos se llevó a cabo como se detalla en el mencionado capítulo.

6.2.3. Reacciones de Acidólisis

Las reacciones entre aceite de girasol (SO) y la mezcla de ácidos grasos palmítico y esteárico (SPFA) fueron realizadas como se detalla a continuación: 110 mg de SO y la cantidad correspondiente de SPFA, necesaria para obtener las relaciones molares de sustrato deseadas, fueron mezcladas con la cantidad adecuada de hexano y calentadas a 60 °C. La reacción comenzó cuando el biocatalizador fue añadido.

El sistema de reacción consistió en recipientes cilíndricos de vidrio de base plana con tapas roscadas, en los cuales se colocaron las mezclas de reacción y se introdujeron en un baño de agua provisto de control de temperatura y agitación magnética a 250 rpm.

Después de 12 h, las reacciones se detuvieron removiendo la enzima por filtrado. Luego, los productos de reacción fueron colocados bajo atmósfera de nitrógeno para retirar el solvente y posteriormente almacenados a - 20°C hasta su análisis.

6.2.4. Análisis de productos de reacción

Los productos de reacción obtenidos fueron analizados por cromatografía gaseosa, previa purificación cuando fue requerida. Las técnicas usadas fueron las que se detallan a continuación.

6.2.4.1. Determinación de ácidos grasos en glicéridos

Se empleó el método descrito en la Sección 2.3.7.

6.2.4.2. Determinación del perfil de triglicéridos (TAG)

Se empleó el método descrito en la Sección 2.3.8. Tras la identificación de las especies de TAG, las mismas se agruparon en cuatro categorías diferentes de acuerdo al número de ácidos grasos saturados (S) o insaturados (U) presentes en la molécula (sin distinguir isómeros de posición). De este modo el contenido de TAG en los productos fue reportado como SSS, SUS, UUS, y UUU (% g /100 g TAG total).

6.2.4.3. Cuantificación de subproductos (BP)

El análisis se realizó en los productos de reacción no deacidificados, siguiendo el método descrito en la Sección 2.3.8, por lo que los ácidos grasos libres cuantificados no sólo fueron subproducto sino también reactivo remanente de la reacción. Por esta razón, con el fin de comparar las distintas experiencias, el porcentaje de subproductos se calculó como porcentaje en peso de monoglicéridos y diglicéridos respecto al total de glicéridos.

6.2.5. Optimización Multirespuesta y verificación de los modelos de ajuste

En lo que a optimización de procesos se refiere, es común que varias variables de respuesta sean de interés. Con lo cual, la determinación de las condiciones óptimas de las variables independientes requiere la consideración simultánea de todas las respuestas, con el fin de hallar un óptimo global. Estos tipos de análisis en diseños experimentales, denominados de optimización multirespuesta, pueden ser resueltos a través de diversas técnicas que se agrupan en 3 grandes enfoques: metodologías de superficie de respuesta, metodologías de diseño robusto de Taguchi y metodologías basadas en una función denominada, función de deseabilidad (D). Este último enfoque consiste en la realización de superficies de respuesta individuales para cada respuesta. Los valores predichos, obtenidos de cada superficie de respuesta, son transformados a una escala adimensional y denominados deseabilidad individual, d_i . D se calcula combinando los valores de deseabilidad individual, y el rango de valores que puede tomar varía entre $D = 0$ (valor inaceptable) y $D = 1$ (valor completamente deseable) (Ferreira et al., 2007). El valor de las variables que maximiza D puede ser determinado mediante el empleo de software adecuados como Design-Ease® (Stat-Ease Inc., 2006).

Teniendo presente lo anterior, la técnica de la función D fue empleada para el análisis de optimización. Para ello se impusieron diferentes especificaciones sobre las variables de respuesta, con el objetivo de obtener los valores de los parámetros que satisficieran dichos requerimientos. Inicialmente se impuso, en simultáneo, la maximización de % P+St y %SUS, y la minimización de % BP y % SSS, permitiendo a los parámetros de reacción tomar cualquier valor dentro de los rangos analizados. Luego, en base a la solución obtenida y consideraciones prácticas, otros criterios fueron evaluados. Las condiciones seleccionadas como óptimas fueron ensayadas en experimentos independientes y empleadas para verificar la precisión de los modelos de ajuste.

6.3. Resultados y discusiones

6.3.1. Diseño experimental: Análisis de los productos de acidólisis

6.3.1.1. Composición de ácidos grasos en glicéridos.

La composición en ácidos grasos para los lípidos estructurados obtenidos se puede observar en la Tabla 6.1. Adicionalmente, se incluye en ésta la composición del aceite de girasol a efectos de favorecer la comparación. Como puede observarse, todos los productos de reacción mostraron una mayor composición en ácidos palmítico y esteárico que el SO, y un decrecimiento correspondiente de los ácidos oleico y linoleico (datos no mostrados).

Para el diseño propuesto, los lípidos estructurados obtenidos alcanzaron una composición de P+St comprendida entre 30.1 - 45.1 %, lo cual representa un incremento de 225 - 372 % respecto al aceite original (9.6 %).

6.3.1.2. Perfil de Triacilglicérols (TAG)

La especificación de las especies de TAG del aceite de girasol y de todos los lípidos estructurados productos de acidólisis, se puede apreciar en la Tabla 6.2. Como puede notarse, la composición correspondiente a las especies predominantes en SO fue: 27.36% de OLL (L= ácido linoleico, O = ácido oleico), 21.81% de LLL, 15.23% de OOL, 8.30% de PLL (P = ácido palmítico) y 8.12% de OOO.

A fin de evaluar los cambios en las especies tras la reacción, se seleccionó al SL del ensayo 12 (N=12), producto con mayor incorporación de ácidos grasos saturados, para la comparación. En éste, las especies mayoritarias y sus porcentajes asociados fueron: 10.55% de PLSt (St = ácido esteárico), 9.90% de OLL, 8.50% de PLL, 8.40% de POL y 7.86% de PLP. Al confrontar con SO, se detectó la presencia de nuevas especies: PPP, PPSt y StStL. Adicionalmente, la cantidad de especies de TAG con ácidos grasos saturados aumentó, mientras que la cantidad de especies con ácidos grasos insaturados disminuyó. Tal comportamiento era el esperado, considerando que la acidólisis se realizó empleando ácidos grasos palmítico y esteárico como acil donador.

A través del análisis por grupos de TAG, se registraron los siguientes porcentajes, para SO: 71.57% de UUU, 24.22% de UUS, 2.51% de SUS y 0.11% de SSS y para SL(N=12): 26.12% de UUU, 34.77% de UUS, 32.61% de SUS y 6.19 % de SSS. Este análisis también evidenció el cambio de la composición de triglicéridos, a través de una considerable disminución del grupo UUU y un aumento de los grupos restantes.

Respecto al grupo SUS, el tipo de triglicérido deseado como producto principal de reacción, pudo observarse un notable aumento de éste en todos los productos de reacción respecto al contenido inicial en aceite, lo que se corresponde con los altos valores de incorporación logrados. Los lípidos estructurados obtenidos alcanzaron una composición de SUS entre 21.1 y 37.3%, lo que representa un aumento del 740-1346% respecto del aceite original (2.51%).

Por otro lado, el hecho de que el grupo UUS aumentó, reveló que fue un intermediario de reacción entre UUU y SUS. También se halló una cantidad mayor del grupo SSS en los lípidos estructurados obtenidos. Esto, junto con el hecho que la composición másica de ácidos grasos saturados de la posición *sn-2* del aceite de girasol utilizado no supera el 3%, demuestra la existencia de acil migración, lo que implica el traslado de los ácidos grasos saturados de *sn-1* o *sn-3* a la posición *sn-2*. Esta reacción no enzimática no es deseable ya que reduce la selectividad de los TAG deseados.

6.3.1.3. Análisis de subproductos

La Tabla 6.1 muestra el % de subproductos en los lípidos estructurados productos de reacción. Mientras que el aceite tuvo un contenido de subproductos de 0.01%, los productos obtenidos tuvieron un contenido mucho más alto, entre 16.3-25.2%. Este rango de % BP se encontró como resultado de las condiciones de reacción ensayadas, por lo que, un análisis del efecto de los parámetros de reacción sobre los subproductos se realiza en una próxima sección.

Cabe mencionar que no se detectó glicerol en ninguna de las muestras, lo que significa que la reacción de hidrólisis no se completó en el rango analizado de las variables experimentales.

Tabla 6.1

Variables experimentales y variables de respuesta seleccionadas para la acidólisis catalizada por lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas en microesferas de quitosano modificado (QM1-1.5) a 60 °C y 12 h de reacción.

N ^a	Factores Experimentales			Variables de Respuesta ^b			
	SR (mol SPFA/mol SO)	E (g)	H (ml)	P+St (%)	SUS (%)	BP (%)	SSS (%)
1	4.5	0.30	1.6	39.1 (39.3)	34.5 (35.8)	22.5 (22.2)	8.6 (8.5)
2	3	0.30	0	37.9 (39.0)	30.6 (33.1)	19.6 (19.7)	5.5 (5.4)
3	4.5	0.39	3.2	38.5 (38.4)	36.8 (37.1)	24.3 (24.8)	9.5 (9.4)
4	6	0.39	1.6	41.0 (41.9)	32.9 (33.3)	20.1 (20.6)	9.7 (9.2)
5	4.5	0.21	0	38.0 (37.4)	30.2 (29.8)	19.3 (19.2)	4.8 (4.9)
6	6	0.21	1.6	31.1 (32.6)	21.9 (23.5)	16.3 (16.4)	5.2 (5.6)
7	4.5	0.30	1.6	42.2 (39.3)	35.6 (35.8)	21.9 (22.2)	8.9 (8.5)
8	3	0.39	1.6	37.6 (36.8)	36.7 (35.9)	25.2 (24.8)	8.7 (8.8)
9	4.5	0.21	3.2	30.1 (29.4)	21.1 (21.0)	18.4 (18.7)	4.7 (4.3)
10	6	0.30	3.2	36.3 (35.8)	27.9 (28.0)	17.5 (16.9)	6.4 (6.8)
11	3	0.21	1.6	34.5 (34.3)	27.2 (26.1)	19.9 (20.5)	5.3 (5.2)
12	6	0.30	0	45.1 (44.5)	32.6 (30.5)	17.8 (17.7)	6.2 (5.8)
13	4.5	0.30	1.6	37.8 (39.3)	37.3 (35.8)	23.2 (22.2)	8.1 (8.5)
14	3	0.30	3.2	36.7 (37.8)	31.0 (30.6)	23.6 (23.3)	6.3 (6.4)
15	4.5	0.39	0	40.3 (40.3)	33.3 (33.3)	21.3 (21.5)	6.5 (6.9)
Aceite de Girasol				9.55	2.51	0.01	0.11

^a N: Número de experiencia.

^b Valores experimentales (valores predichos por el modelo correspondiente).

Tabla 6.2

Perfil de triglicéridos del aceite de girasol (SO) y de los lípidos estructurados obtenidos mediante el diseño experimental y la optimización multirespuesta (m%).

TAG ^a	Tipo de TAG ^b	SO	N							
			1	2	3	4	5	6	7	8
PPP	SSS	ND ^c	1.75	0.88	1.93	2.02	0.96	1.11	1.85	1.76
PPSt	SSS	ND	3.39	1.77	3.77	3.90	1.93	2.15	3.53	3.44
POP	SUS	0.30	3.42	3.07	3.67	3.24	3.02	2.22	3.61	3.74
PLP	SUS	0.98	7.94	7.11	8.42	7.83	7.16	5.58	8.21	8.16
StStP	SSS	0.07	2.60	1.68	2.93	2.89	1.50	1.58	2.66	2.60
POSt	SUS	0.29	5.60	5.03	6.09	5.21	4.81	3.38	5.92	6.26
POO	UUS	2.80	3.17	3.46	3.08	3.02	3.60	3.23	3.22	3.31
PLSt	SUS	0.85	11.12	9.79	11.72	10.69	9.76	7.19	11.46	11.63
POL	UUS	6.54	8.27	9.37	8.37	7.71	9.13	7.94	8.47	9.44
PLL	UUS	8.30	8.08	9.39	8.22	7.81	8.98	8.52	8.15	8.91
StStSt	SSS	0.04	0.82	1.21	0.91	0.85	0.42	0.39	0.85	0.86
StStO	SUS	0.13	1.99	1.79	2.19	1.86	1.74	1.00	2.10	2.23
OOS	UUS	1.26	2.37	2.53	2.29	2.18	2.61	2.16	2.32	2.44
StStL	SUS	ND	4.40	3.85	4.70	4.05	3.66	2.55	4.31	4.66
OOO	UUU	8.12	2.66	2.41	2.15	3.11	3.01	4.69	2.39	1.41
StOL	UUS	2.59	6.83	7.56	6.84	6.02	7.19	5.58	6.82	7.95
OOL	UUU	15.23	5.17	5.63	4.49	5.94	6.07	9.12	4.95	3.94
StLL	UUS	3.06	6.39	6.75	6.10	5.54	6.52	5.35	5.96	6.87
OLL	UUU	27.36	8.30	9.57	7.10	9.44	10.21	14.94	7.87	6.17
LLL	UUU	21.81	5.58	6.98	4.84	6.56	7.52	10.75	5.16	4.03
	NI ^f	0.29	0.15	0.15	0.20	0.12	0.18	0.57	0.19	0.19
	∑ SSS	0.11	8.56	5.54	9.53	9.67	4.82	5.24	8.89	8.66
	∑ SUS	2.51	34.47	30.65	36.79	32.89	30.15	21.92	35.61	36.67
	∑ UUS	24.22	35.11	39.07	34.90	32.29	38.03	32.77	34.93	38.93
	∑ UUU	71.57	21.71	24.59	18.59	25.04	26.82	39.50	20.38	15.56

^a P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico. ^b S: ácido saturado, U: ácido insaturado. ^c ND: no detectado.

Tabla 6.2 (Continuación)

Perfil de triglicéridos del aceite de girasol y de los SL obtenidos mediante el diseño experimental y la optimización multirespuesta (w %).

TAG ^a	Tipo de TAG ^b	SO	N							SLO2
			9	10	11	12 (SLO1)	13	14	15	
PPP	SSS	ND ^c	1.00	1.39	1.16	1.34	1.72	1.30	1.33	1.58
PPSt	SSS	ND	1.83	2.62	2.12	2.46	3.27	2.50	2.59	3.03
POP	SUS	0.30	2.07	2.81	2.80	3.27	4.42	3.12	3.30	3.47
PLP	SUS	0.98	5.20	7.06	6.84	7.86	8.54	7.20	7.79	8.09
StStP	SSS	0.07	1.43	1.90	1.62	1.82	2.47	1.91	1.99	2.28
POSt	SUS	0.29	3.27	4.32	4.35	5.20	6.87	5.17	5.48	5.57
POO	UUS	2.80	3.15	3.24	3.31	3.25	4.25	3.34	3.29	3.36
PLSt	SUS	0.85	6.95	9.09	8.66	10.55	10.94	9.97	10.64	10.87
POL	UUS	6.54	7.88	7.86	9.08	8.40	8.95	9.10	8.68	9.10
PLL	UUS	8.30	8.46	8.13	9.18	8.50	7.07	8.93	8.69	9.10
StStSt	SSS	0.04	0.43	0.49	0.42	0.57	0.68	0.58	0.55	0.73
StStO	SUS	0.13	1.17	1.42	1.40	1.82	2.26	1.74	1.91	1.96
OOS	UUS	1.26	2.13	2.09	2.27	2.28	3.05	2.39	2.38	2.37
StStL	SUS	ND	2.42	3.19	3.18	3.91	4.28	3.81	4.15	3.93
OOO	UUU	8.12	5.14	4.16	3.51	3.19	3.23	2.87	2.50	2.47
StOL	UUS	2.59	5.49	5.64	6.71	6.46	6.80	7.32	6.90	7.01
OOL	UUU	15.23	9.45	7.71	7.06	6.17	5.39	5.99	5.37	4.76
StLL	UUS	3.06	5.20	5.24	6.12	5.87	4.65	6.68	6.30	6.35
OLL	UUU	27.36	15.75	12.27	11.30	9.90	6.61	9.54	9.02	7.88
LLL	UUU	21.81	11.40	8.64	7.76	6.87	3.54	6.39	6.73	5.55
	NI ^f	0.29	0.18	0.71	1.15	0.31	1.01	0.16	0.41	0.54
	∑ SSS	0.11	4.68	6.40	5.32	6.19	8.13	6.29	6.45	7.62
	∑ SUS	2.51	21.09	27.89	27.23	32.61	37.31	31.02	33.27	33.88
	∑ UUS	24.22	32.31	32.21	36.67	34.77	34.78	37.75	36.23	37.29
	∑ UUU	71.57	41.74	32.79	29.63	26.12	18.77	24.79	23.63	20.67

^d SL O1: lípido estructurado obtenido de la optimización: máximo de % P+St y % SUS, y mínimo de % BP y % SSS. ^e SL O2: lípido estructurado obtenido de la optimización: máximo de % P+St con SR=3 y H= 3.2. ^f NI: no identificado

6.3.2. Modelos de ajuste

Todos los modelos presentaron valores de AP mayores que 12.7, lo que indica que las señales obtenidas fueron adecuadas. Por otro lado, los valores de falta de ajuste (LOF) no resultaron significativos.

6.3.2.1. Composición de ácidos saturados palmítico y esteárico.

El efecto de los factores experimentales sobre la composición de ácidos grasos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en los glicéridos (% P+St), considerando un modelo cuadrático e interacciones entre las variables independientes, se muestra en la Fig.6.3. Conforme al R², este modelo explica un 91.24 % de la variabilidad en % P+St, lo cual indica que es adecuado para representar la relación existente entre los parámetros de reacción. Respecto al R²_{adj} y el R²_{pred}, sus valores fueron de 82.49% and 66.20% respectivamente, los cuales estuvieron dentro de los márgenes considerados como adecuados. El modelo de ajuste obtenido fue:

$$\begin{aligned} \% \text{ P+St} = & 13.524 - 1.978 \text{ SR} + 174.629 \text{ E} - 1.215 \text{ H} + 12.683 \text{ SR}^* \text{ E} - 0.783 \text{ SR}^* \text{ H} \\ & + 10.621 \text{ E}^* \text{ H} - 359.507 \text{ E}^2 \end{aligned} \quad (6.2)$$

Analizando los coeficientes del modelo con el test-t, los factores más significativos para determinar el % P+St, conforme a sus valor P, fueron los términos lineal y cuadrático correspondientes a la cantidad de biocatalizador (E) y el término lineal correspondiente a la cantidad de hexano (H): E (P= 0.0013), E² (P = 0.0105) y H (P= 0.0035). La relación molar entre sustratos (SR) y la interacción E*H no fueron significativas (P> 0.1). Las interacciones SR*E (P= 0.0731) y SR*H (P= 0.0540) resultaron moderadamente significativas.

Los mayores niveles de incorporación de los ácidos palmítico y esteárico se lograron, para todas las cantidades de hexano, utilizando la mayor cantidad de enzima y la más alta relación de sustrato en el medio de reacción (Fig. 6.3.A). El hecho de que el aumento de la relación molar de sustratos incrementó la actividad de la enzima, indicaría que no se produjo inhibición del biocatalizador por la acidificación del microambiente, la cual se generaría por el exceso de ácidos grasos libres (Yankah y Akoh, 2008). Más aún, la reacción

enzimática pudo haber sido limitada por baja disponibilidad de ácidos grasos libres en el medio de reacción.

La interacción SR*H se muestra en la Fig. 6.3.B. Como puede apreciarse, en el nivel más bajo de SR, independientemente de la cantidad de H, y a la más alta cantidad de H, independientemente del nivel de SR, el porcentaje de P+St no cambió significativamente. Por otro lado, esta respuesta se maximizó cuando se empleó el más alto nivel de SR en ausencia de H.

A pesar de que la interacción E*H mostró ser no significativa como resultado general, se observó un comportamiento particular en el punto central de SR (Fig. 6.3.C). Trabajando al más bajo nivel de hexano (0 ml), se halló que el porcentaje de P+St se incrementó con el aumento de la cantidad de enzima en el medio de reacción hasta un valor aproximado de 0.33 g. Mayores aumentos de la concentración de enzima en el medio no produjeron ningún incremento en el % P+St. En el nivel más alto de hexano (3.2 ml), la composición de palmítico y esteárico se acrecentó rápidamente a medida que la cantidad de biocatalizador aumentaba, observándose este comportamiento hasta un valor de E=0.30 g. Después de éste valor, permaneció prácticamente constante. Por otra parte, en el nivel más alto de enzima la composición de palmítico y esteárico fue casi la misma para todas las cantidades de hexano, mientras que en el nivel más bajo de enzima, el incremento de la cantidad de hexano resultó en una rápida disminución en la incorporación de P+St. Estos resultados podrían reflejar un comportamiento diferente del sistema cuando hay presencia o no del solvente, ya que la incorporación de hexano al medio de reacción no solo disminuye la viscosidad del sistema y favorece la solubilidad de los sustratos, sino que también los diluye.

Conforme a los resultados del análisis estadístico, la cantidad de biocatalizador fue el factor más significativo en lo que a la incorporación de palmítico y esteárico se refiere, lo cual evidencia que en el rango de E explorado, no hubo aglomeración del biocatalizador. Seguramente, el uso de una enzima inmovilizada como biocatalizador contribuyó a evitar su agregación (Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010). Estos resultados además, permitieron

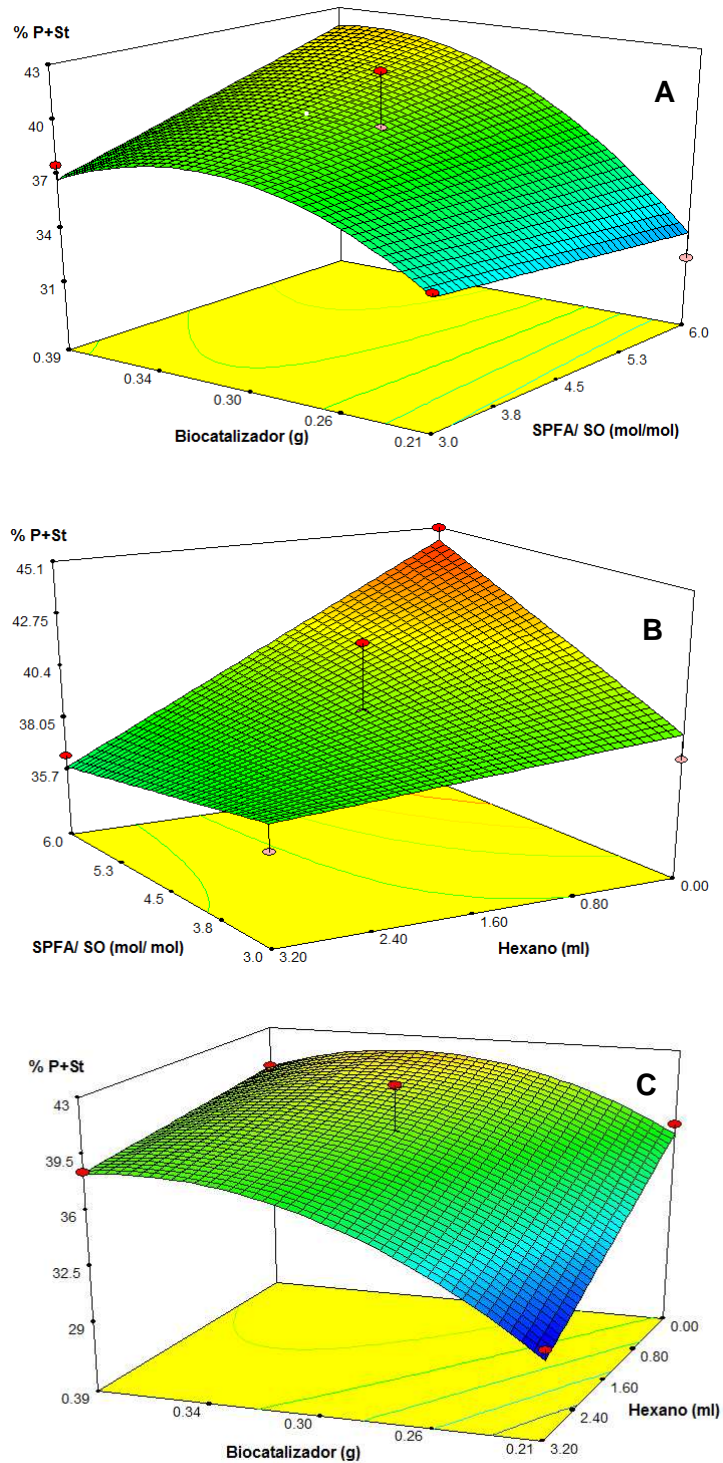


Figura 6.3. Superficies de respuesta: Composición de ácidos palmítico y esteárico respecto al total de ácidos grasos en glicéridos (% P+St). Efecto de: A) cantidad de biocatalizador y relación molar de sustratos para una cantidad de hexano de 1.6 ml (punto central); B) cantidad de hexano y relación molar de sustratos para una cantidad de biocatalizador de 0.3 g (punto central); C) cantidad de biocatalizador y de hexano para una relación molar de sustrato de 4.5 (punto central).

demostrar que el soporte de inmovilización preparado es adecuado para su uso con lipasas en las condiciones de trabajo ensayadas.

6.3.2.2. Triglicéridos monoinsaturados como TAG deseados

Los efectos de los factores experimentales sobre la concentración de triglicéridos monoinsaturados (TAG deseados) respecto del total de triglicéridos (% SUS) se muestra en la Fig. 6.4. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó que el modelo representado por la Ec. 6.3, cuadrática en SR, E y H, fue el más adecuado para representar la relación entre la respuesta y los factores significativos, exhibiendo un $R^2 = 94.49\%$. El R^2_{adj} y el R^2_{pred} fueron 88.99% y 79.15% respectivamente, lo cual resultó acorde. El mejor modelo predictivo para % SUS en término de los factores reales fue:

$$\begin{aligned} \% \text{ SUS} = & - 29.079 + 10.965 \text{ SR} + 254.1984 \text{ E} - 4.44289 \text{ H} + 21.835 \text{ E} * \text{H} \\ & - 1.313 \text{ SR}^2 - 391.081 \text{ E}^2 - 0.900 \text{ H}^2 \end{aligned} \quad (6.3)$$

Para este modelo, el factor más significativo fue la cantidad de biocatalizador en el medio de reacción ($P < 0.0001$). Otros términos significativos fueron: SR^2 ($P=0.0114$), E^2 ($P=0.0082$), H^2 ($P=0.0328$) y la interacción $\text{E} * \text{H}$ ($P=0.007$). Los términos lineales de SR y H resultaron moderadamente significativo con valores $P= 0.0664$ y $P= 0.0744$, respectivamente.

La Fig. 6.4.A muestra el efecto de la cantidad de biocatalizador, la cantidad de hexano y su interacción sobre % SUS. En el nivel más bajo de hexano, el % SUS aumentó con el incremento de la cantidad de biocatalizador, hasta un cierto valor (0.33g). Luego, mayores incrementos en E dieron lugar a un pequeño decrecimiento en la respuesta analizada. Al más alto nivel de hexano, el % SUS tuvo un aumento creciente con el incremento de la cantidad de biocatalizador hasta alcanzar el valor máximo. Además se pudo notar que, trabajando con la menor cantidad de enzima, el % SUS decreció con el aumento de la cantidad de hexano. Trabajando al más alto nivel de la enzima, el % SUS se acrecentó con el aumento de la cantidad de disolvente hasta un cierto valor (2.4 ml), disminuyendo ligeramente cuando se emplearon mayores cantidades. Esto indicaría que la adición de

hexano a medios de reacción con baja cantidad de biocatalizador provoca un efecto de dilución que posiblemente hace que los sustratos no estén tan disponibles para la enzima.

El efecto de la relación molar de sustratos sobre % SUS fue muy débil, mostrando para cada nivel de biocatalizador casi el mismo valor de respuesta en el rango de SR comprendido entre 3-5.3. Esto muestra la insignificancia de la interacción E*SR. Por otra parte, altos valores de ácidos grasos libres en el medio, resultaron en un pequeño decrecimiento en % SUS (Fig. 6.4.B).

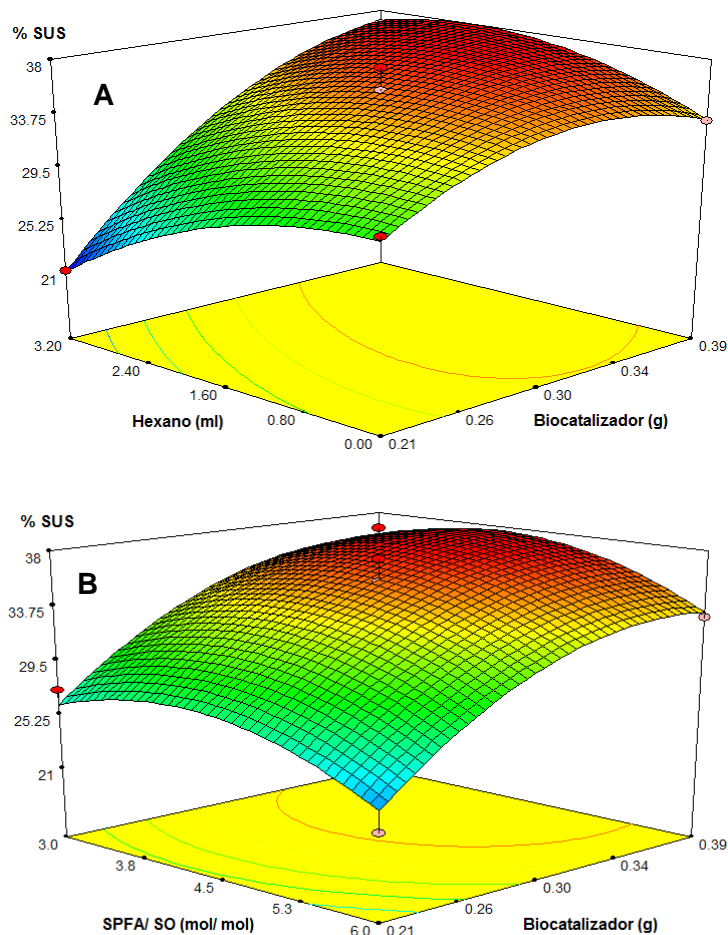


Figura 6.4. Superficie de Respuesta: Triglicéridos monoinsaturados respecto al total de triglicéridos (% SUS). Efecto de: A) cantidad de biocatalizador y de hexano para una relación molar de sustrato de 4.5 (punto central); B) cantidad de biocatalizador y relación molar de sustratos para una cantidad de hexano de 1.6 ml (punto central).

6.3.2.3. Subproductos: mono y diglicéridos

El efecto de los factores experimentales sobre los subproductos (mono y diglicéridos) respecto al total de glicéridos (% BP) se muestra en la Fig. 6.5. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó que el modelo representado por la Ec. 6.4, cuadrática en SR y H, fue el más adecuado para representar la relación entre la respuesta y los factores significativos, con un $R^2 = 97.26\%$. El R^2_{adj} y el R^2_{pred} fueron adecuados, 94.52% y 86.64% respectivamente. El modelo predictivo para el % BP en términos de los factores reales fue:

$$\begin{aligned} \% \text{ BP} = & 4.681 + 5.884 \text{ SR} + 13.144 \text{ E} + 1.949 \text{ H} - 0.445 \text{ SR}^* \text{ H} + 6.590 \text{ E}^* \text{ H} \\ & - 0.729 \text{ SR}^2 - 0.463 \text{ H}^2 \end{aligned} \quad (6.4)$$

Acorde al valor P, los términos lineales correspondientes a la relación molar de sustratos (SR) y a la cantidad de biocatalizador (E) mostraron ser factores altamente significativos ($P < 0.0001$) para determinar el % BP. Los términos restantes del modelo que resultaron significativos fueron: H ($P=0.0155$), SR^2 ($P=0.0015$), H^2 ($P=0.0082$) y las interacciones $\text{SR}^* \text{H}$ ($P=0.0113$) y $\text{E}^* \text{H}$ ($P=0.0192$).

Como puede observarse en la Fig. 6.5.A, para todas las cantidades de hexano (0 - 3.2 ml), el % BP decreció con el aumento en la relación molar de sustratos. A bajos valores de SR el incremento en H resultó en aumento del % BP. Sin embargo, tan pronto como los valores de SR fueron más altos, el efecto de H sobre el % BP se volvió insignificante. Del mismo modo, la Fig. 6.5.B muestra que para todas las cantidades de E, el % BP decreció con el aumento de SR.

Independientemente de la cantidad de hexano, un aumento en la cantidad de biocatalizador incrementó la cantidad de subproductos. Probablemente, el uso de una mayor cantidad de enzima significó la adición de más agua al sistema y favoreció la etapa de hidrólisis (Xu et al., 1999). Por otro lado, un incremento en la relación molar de sustratos causó una disminución de esta respuesta. Esto podría explicarse en base a que, un incremento en la cantidad de ácidos grasos libres en el medio de reacción hace posible que los compuestos intermediarios puedan ser reesterificados más rápidamente por acción de

las lipasas. Resultados acorde a lo mencionado han sido previamente reportados por Bloomer et al. (1991) en la acidólisis entre trioleína y ácido palmítico, quienes hallaron que el contenido de DAG decrecía cuanto mayor era la relación palmítico/trioleína. Del mismo modo, Xu et al. (1999) mostró que la formación de DAG se incrementaba con el aumento en la relación de sustratos, definido éste en forma inversa a la variable SR aquí presentada, es decir como la relación molar aceite/ácido cáprico, en la acidólisis entre ellos. Este hecho podría ser cierto para valores altos de E, ya que en estas condiciones se obtuvieron elevadas incorporaciones de palmítico y esteárico (% P+St). Sin embargo, a bajos valores de E, no solo disminuyó el % BP con el incremento en SR, sino también % P+St y % SUS. Esto permitiría deducir que la acidificación del medio de reacción influye sobre la actividad hidrolítica de la lipasa cuando ésta se encuentra en el rango dependiente de E.

Referido a la Fig. 6.5.C puede notarse que en todo el rango de hexano (H) analizado, el % BP se incrementó con el aumento de la cantidad de biocatalizador. Más aún, puede observarse que para el mayor nivel de hexano, cuanto más grande es la cantidad de E más importante resulta el incremento en % BP. Sin presencia de hexano en el medio de reacción los sustratos son más viscosos. En consecuencia, los pasos de hidrólisis o esterificación podrían estar limitados por mecanismos de transferencia de masa.

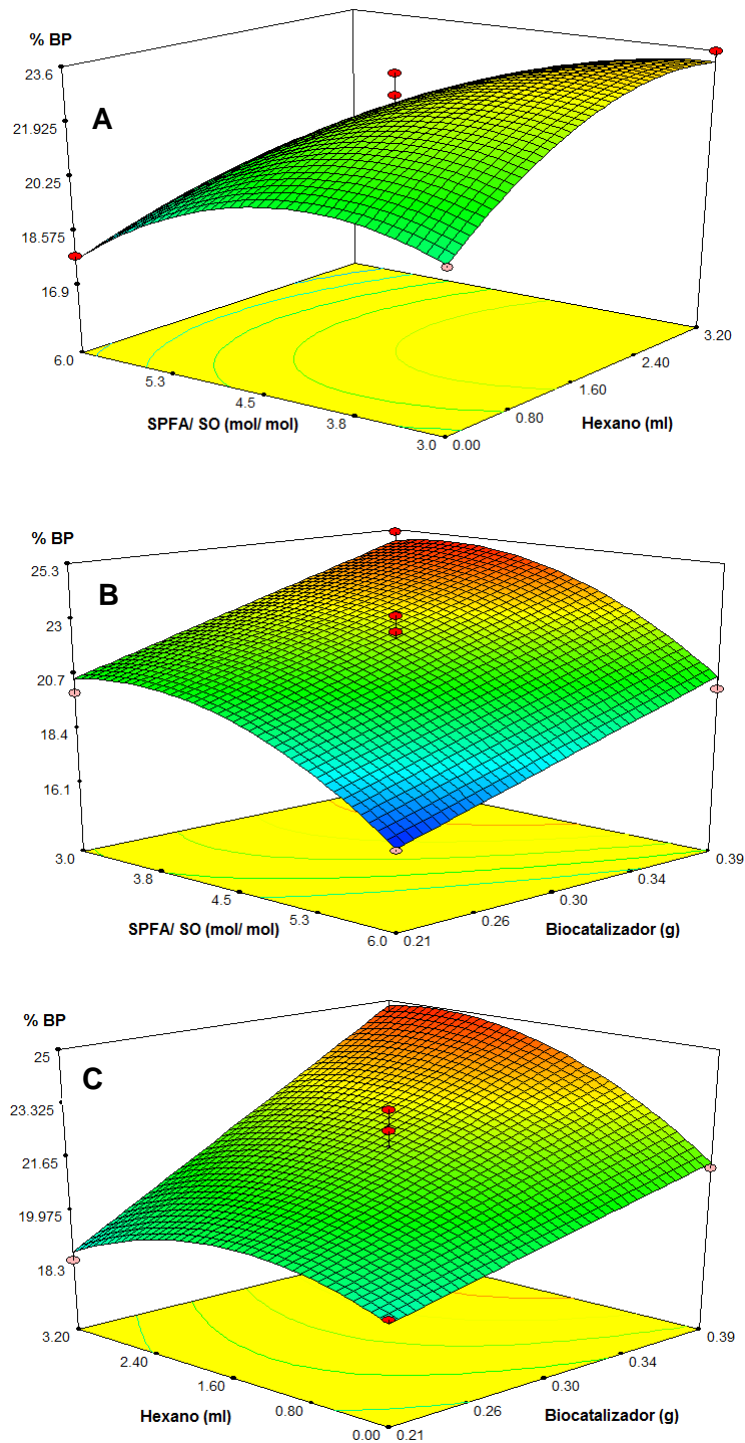


Figura 6.5. Superficie de Respuesta: Subproductos (monoglicéridos y diglicéridos) respecto al total de glicéridos (% BP). Efecto de: A) cantidad de hexano y relación molar de sustratos para una cantidad de biocatalizador de 0.3 g (punto central); B) cantidad de biocatalizador y relación molar de sustratos para una cantidad de hexano de 1.6 ml (punto central); C) cantidad de biocatalizador y de hexano para una relación molar de sustratos de 4.5 (punto central).

6.3.2.4. Triglicéridos trisaturados: indicador de la acil migración

El efecto de los factores experimentales sobre la composición de triglicéridos trisaturados respecto al total de triglicéridos (% SSS) se muestra en la Fig. 6.6. El análisis de la varianza (ANOVA) indicó que el modelo representado por la Ec. 6.5, cuadrático en SR, E y H, mostró ser el más adecuado para representar la relación entre los factores significativos y la respuesta, exhibiendo un $R^2 = 96.87\%$. El R^2_{adj} and R^2_{pred} fueron 93.74% y 79.04% respectivamente, lo cual resultó apropiado. El modelo predictivo para el % SSS expresado en término de los factores fue:

$$\begin{aligned} \% \text{ SSS} = & -10.345 + 3.286 \text{ SR} + 49.397 \text{ E} + 0.674 \text{ H} + 5.581 \text{ E}^* \text{ H} - 0.350 \text{ SR}^2 \\ & - 64.239 \text{ E}^2 - 0.639 \text{ H}^2 \end{aligned} \quad (6.5)$$

Una vez más la cantidad de biocatalizador resultó ser el factor más significativo ($P < 0.0001$). Otros factores que resultaron significativos fueron: H ($P = 0.0166$), SR^2 ($P = 0.011$), E^2 ($P = 0.0576$), H^2 ($P = 0.0002$) y la interacción $\text{E}^* \text{ H}$ ($P = 0.0082$). El término lineal SR no resultó significativo ($P > 0.1$).

Un examen de la Fig. 6.6.A indica que para todas las cantidades de hexano, el porcentaje de triglicéridos trisaturados aumentó cuando se incrementó la cantidad de biocatalizador en el medio. Este efecto fue más notable para altos niveles de hexano (interacción $\text{E}^* \text{ H}$ significativa). De igual manera, para todas las relaciones de sustrato se encontró que el porcentaje de % SSS se acrecentó rápidamente cuando la cantidad de enzima era mayor (Fig. 6.6.B). Sin embargo, en este caso la interacción $\text{E}^* \text{ SR}$ no fue significativa. En otras palabras, el efecto de E sobre el % SSS fue similar para cada SR analizado y viceversa.

Por otra parte, el efecto combinado de la cantidad de sustrato y la cantidad de hexano sobre la respuesta analizada se aprecia en la Fig. 6.6.C. Ésta muestra que para todas las relaciones de sustratos, el % SSS se incrementó con el aumento en la cantidad de hexano hasta alcanzar el valor de 1.9 ml. Mas allá de este valor, éste decreció gradualmente con el aumento en la cantidad de dicho solvente. Un comportamiento similar pudo observarse para todas las cantidades de hexano, cuando la relación de sustratos fue variada. El % SSS

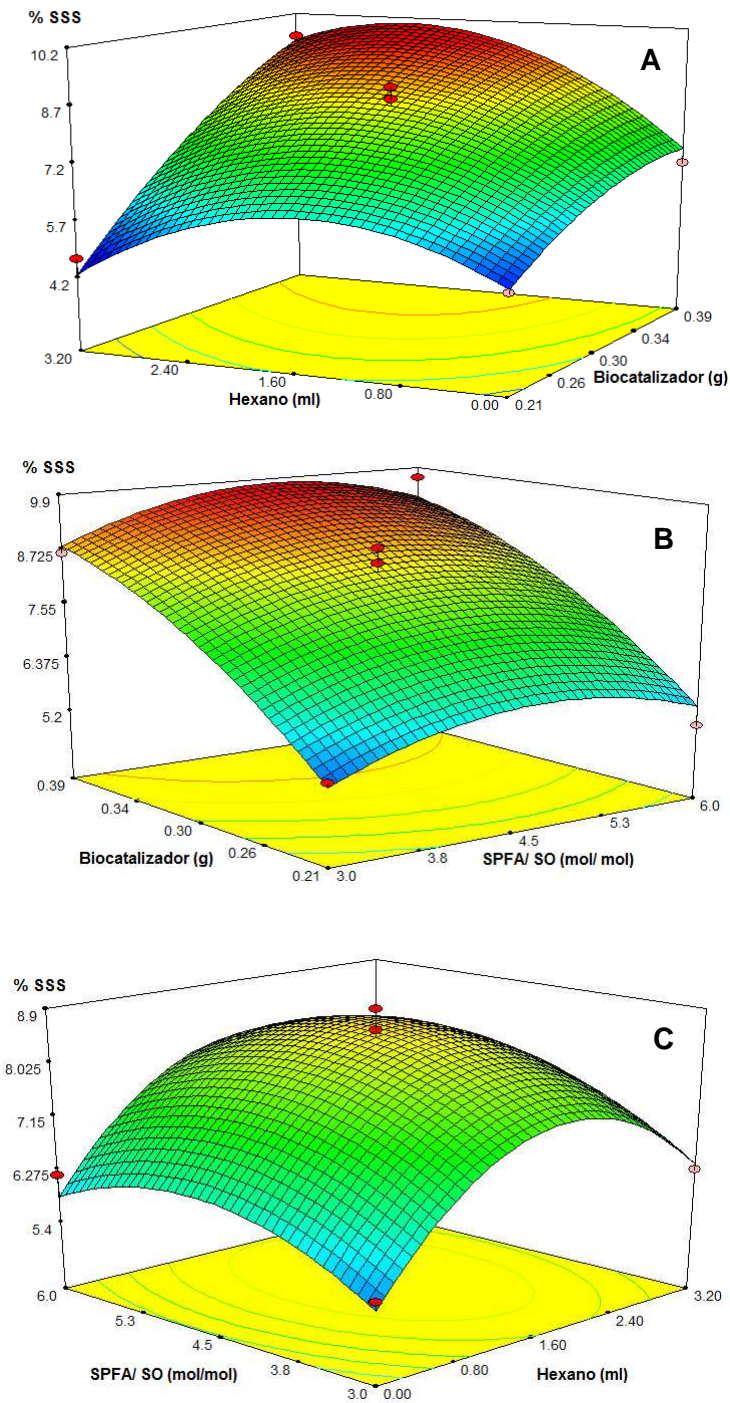


Figura 6.6. Superficie de Respuesta: Triglicéridos trisaturados respecto a triglicéridos totales (% SSS). Efecto de: A) cantidad de biocatalizador y de hexano para una relación molar de sustratos de 4.5 (punto central); B) cantidad de biocatalizador y relación molar de sustratos para una cantidad de hexano de 1.6 ml (punto central); C) cantidad de hexano y relación molar de sustratos para una cantidad de biocatalizador de 0.3 g (punto central).

aumentó con el incremento de SR hasta un cierto valor (4.5 mol/mol), disminuyendo luego a un ritmo similar, a valores mayores.

La cantidad de biocatalizador en el medio de reacción fue el factor más influyente. La cantidad de E más alta produjo el mayor contenido de SSS en los lípidos estructurados. Este resultado estuvo en concordancia con el obtenido en el análisis de subproductos, ya que mayores cantidades de MAG y DAG promueven la acil migración (Xu et al., 1999). De este modo, ácidos grasos insaturados de la posición sn-2 podrían migrar, permitiendo que la enzima los remueva de los triglicéridos. Consecuentemente, podría tener lugar la migración de los ácidos grasos saturados permitiendo así la formación de compuestos SSS.

Con respecto al efecto del hexano, algunos trabajos han reportado que su presencia en el medio reduce la velocidad de la acil migración (Xu et al., 1998). Sin embargo, en este estudio, este fenómeno se observó tras alcanzar un cierto valor de dicho solvente.

La calidad de los modelos de ajuste también se puede observar en la Tabla 6.1, donde se reportan los valores predichos por los modelos presentados para cada respuesta en cada punto del diseño experimental. Para todas las variables de respuesta, los valores predichos resultaron muy cercanos a los valores experimentales, lo cual indica que los modelos experimentales se ajustaron adecuadamente.

6.3.3. Optimización Multirespuesta y verificación de los modelos

El objetivo de la optimización multirespuesta fue encontrar un conjunto de condiciones adecuadas para los parámetros o variables independientes, que permitieran cumplir con los requisitos impuestos sobre las variables de respuesta. En primer lugar se impuso la maximización de % P+St y % SUS y la minimización de % BP y % SSS, permitiendo que los parámetros de reacción tomaran cualquier valor dentro del rango analizado en el diseño experimental. El valor máximo de D ($D = 0.787$) se obtuvo cuando la reacción de acidólisis se lleva a cabo en las siguientes condiciones: SR = 6 mol/mol, E = 0.30 g y H = 0 ml, donde los valores de respuesta previstos son: % P+St = 44.49, % SUS = 30.48, % BP = 17.66 y % SSS = 5.82. Esta combinación de valores de los parámetros, que coincidió con uno de los

ensayos del diseño experimental (N=12), cumplió en gran medida con los criterios impuestos y demostró que los sistemas "verdes" libres de solvente son los más efectivos. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, cuando se opera en sistemas continuos o semicontinuos, resulta más fácil llevar a cabo las reacciones en presencia de solvente, preferentemente en medios diluidos para evitar bloqueos en las líneas del sistema. En consecuencia, se realizó otra optimización teniendo en cuenta la mayor factibilidad de los sistemas con solventes. Los criterios impuestos fueron: máxima cantidad de hexano, mínima relación molar de sustratos y máximo % P+St. El resultado óptimo correspondiente fue: SR = 3 mol/mol, E = 0.34 g y H = 3.2 ml, donde los valores de respuesta predichos fueron: % P+St = 38.50, % SUS= 33.71, % BP = 24.73 y % SSS = 7.50; y el correspondiente valor D fue de 0,825 (mayor al anterior debido a la menor cantidad de restricciones en las respuestas). Estas nuevas condiciones óptimas se utilizaron en cuatro ensayos independientes para corroborar la validez de los modelos de predicción. Los valores de respuesta experimentales hallados fueron: % P+St = 38.60 ± 0.09 , % SUS = 33.88 ± 0.75 , % BP = 24.97 ± 0.37 y % SSS = 7.62 ± 0.17 , los cuales resultaron muy cercanos a los valores previstos.

El perfil de TAG del lípido estructurado obtenido en estas condiciones (SL O2 en la Tabla 6.2) tuvo como especies mayoritarias: PLSt, POL, PLL, PLP y OLL. Similar al resultado de la primera optimización (SL O1 que corresponde a N12), pero con diferentes distribuciones. Esto se vió reflejado en la obtención de una mayor proporción en los TAG del grupo SSS, asociada a la existencia de mayor cantidad de enzima y de solvente en el medio; y una mayor en los de UUS, lo cual está directamente relacionado con el efecto de dilución generado por combinar baja relación de sustratos y alta cantidad de hexano. Pudo apreciarse además, una mayor cantidad de subproductos, lo que indica que la velocidad de reacción asociada a la hidrólisis fue mayor que la de esterificación. Cabe mencionar, que este estudio se focalizó únicamente en las características químicas de los lípidos estructurados. Por ende, un estudio de las propiedades físicas de los mismos resultaría adecuado para determinar su campo de aplicación final.

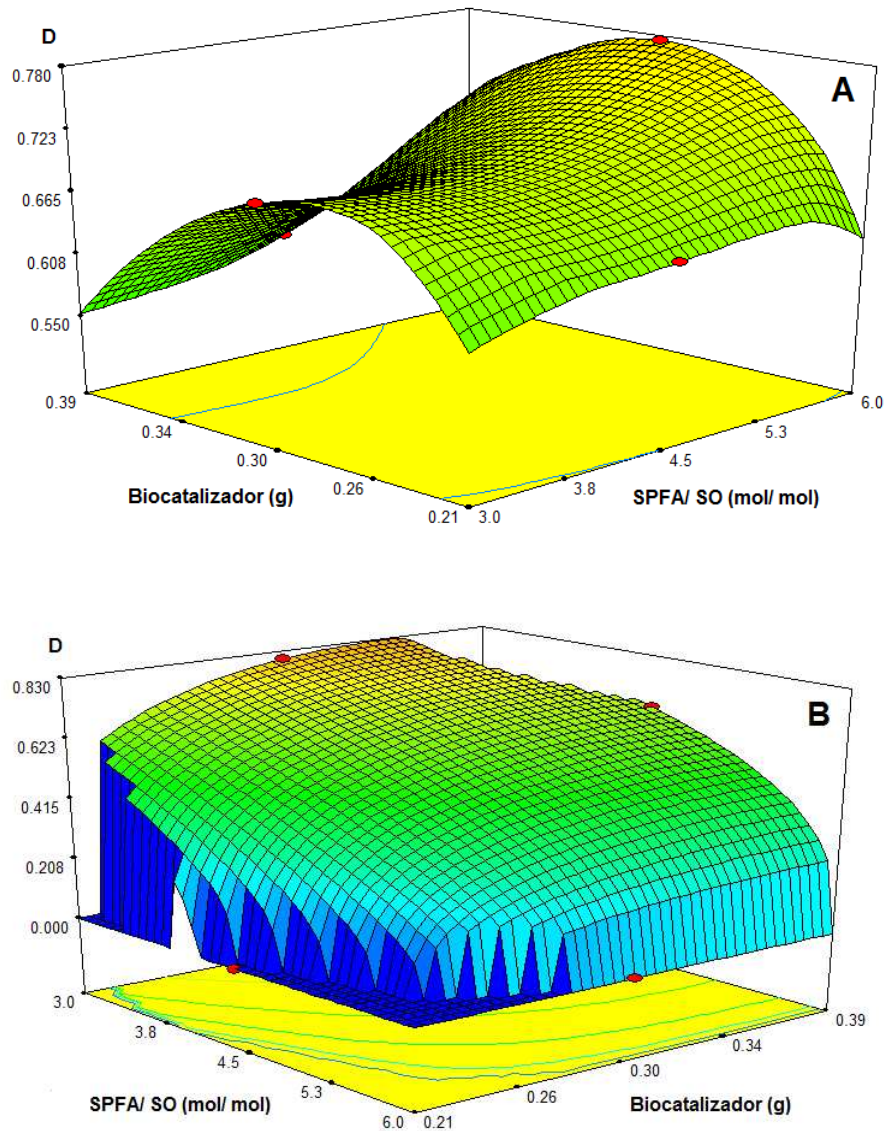


Figura 6.7. Superficie de Respuesta para la función de deseabilidad (D) como resultado de: A) la maximización de % P+St y % SUS y la minimización de % BP y % SSS; B) maximización de la cantidad de hexano y de % P+St, y minimización de la relación de molar de sustrato.

6.4. Conclusiones

La necesidad de conocer el comportamiento de un novedoso biocatalizador obtenido en un estudio previo suscitó el trabajo de investigación detallado en el presente capítulo. El biocatalizador preparado por la inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre microesferas de quitosano alquiladas, se utilizó para catalizar la acidólisis entre aceite de

girasol y ácidos grasos palmítico y esteárico, en distintas condiciones de relación de sustratos, cantidad de enzima y solvente.

El análisis estadístico de los resultados demostró que la cantidad de biocatalizador fue la variable más significativa en cada respuesta analizada, dividiendo el comportamiento de la reacción en una zona de alta y una de moderada dependencia de la cantidad de biocatalizador. La presencia de hexano contribuyó a resaltar este comportamiento.

El análisis de optimización multirespuesta llevado a cabo a través de la función de deseabilidad reveló que, para el rango estudiado, cuando el criterio es maximizar % SUS y % P+St, y minimizar % SSS y % BP, la reacción debe ser llevada a cabo sin hexano con la mayor relación molar de sustratos y en un valor intermedio de cantidad de enzima. Estas condiciones serían adecuadas desde un punto de vista medio ambiental pero posiblemente dificultosas a nivel operativo, lo que permite deducir que diversos criterios deben ser analizados para hallar un escenario óptimo y a la vez factible. La imposición de la condición con presencia elevada de solvente, más adecuado para representar los sistemas operativos reales, dió lugar a productos con menor incorporación de ácidos grasos saturados. Esto demuestra que la evaluación de la calidad del producto deseado y las condiciones operativas del proceso debe generar una decisión de compromiso.

El trabajo que se detalla en este capítulo fue divulgado a través de la siguiente publicación científica:

Palla C., Pacheco C., Carrín M.E., *Production of structured lipids by acidolysis with immobilized Rhizomucor miehei lipases: selection of suitable reaction conditions*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 76 (2012) 106–115.

6.5. Referencias

Bloomer S., Adlercreutz P., Mattiasson B., Triglyceride interesterification by lipases: 2. Reaction parameters for the reduction of trisaturated impurities and diglycerides in batch reactions, *Biocatalysis and Biotransformation* 5 (1991) 145 – 162.

de Araújo M.E.M.B., Campos P.R.B., Noso T.M., Alberici R. M., da Silva Cunha I. B., Simas R.C., Eberlin M.N., P. O. Carvalho, Response surface modelling of the production of structured lipids from soybean oil using *Rhizomucor miehei* lipase, *Food Chemistry* 127 (2011) 28 – 33.

Ferreira S.L.C., Bruns R.E., Ferreira H.S., Mato G.D., David J.M., Brandão G.C., da Silva E.G.P., Portugal L.A., dos Reis P.S., Souza A.S., dos Santos W.N.L., Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods – Review, *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 179 – 186.

Hita E., Robles , B. Camacho A., Gonzalez P.A., Esteban L., Jimenez M.J., Munio M.M., Molina E., Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor, *Biochemical Engineering Journal* 46 (2009) 257-264.

Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R., Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010) 1 – 22.

Sharma M., Rastogi N.K., Lokesh B.R., Synthesis of structured lipid with balanced omega-3: omega-6 ratio by lipase-catalyzed acidolysis reaction: optimization of reaction using response surface methodology, *Process Biochemistry* 44 (2009) 1284 – 1288.

Shieh C.J., Akoh C.C., Koehler P., Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (1995) 619 – 623.

Xu X., A. Skands, C. Høy, H. Mu, S. Balchen , J. Adler-Nissen, Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998), 1179 –1186.

Xu X., Mu H., Skands A.R.H., Hoy C.E., Nissen J.A., Parameters affecting diacylglycerol formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (1999) 175 – 181.

Xu X., Fomuso L.B., Akoh C.C., Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor, *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 3 – 10.

Yang T., Fruekilde M.B., Xu X., Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming, *Food Chemistry* 92 (2005) 101–107.

Yankah V.V., Akoh C.C., Lipase-catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprylic acids to produce structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77 (2008) 495 – 500.

CINÉTICA DE LIPASAS INMOVILIZADAS

7

7.1. Introducción

La mayoría de las investigaciones dedicadas a la síntesis de lípidos estructurados han sido dirigidas a estudiar el efecto de las condiciones de reacción, ya sea que se trate de estudios de laboratorio o en escala piloto, incluyendo procesos batch o continuos (Camacho et al., 2007). Se ha analizado el efecto de variables tales como el tipo de disolvente, temperatura, relación molar de sustratos (Fomuso y Akoh, 2002), concentraciones de sustrato, contenido de agua (Torres y Hill, 2002) y el modo de funcionamiento (Xu et al, 1998a; Shimada et al., 1999; Xu, 2003). Sin embargo, poco se ha informado sobre parámetros experimentales de la cinética de reacción catalizada por lipasas, y del modelado del comportamiento de la reacción de acidólisis, especialmente entre ácidos grasos y triglicéridos heterogéneos (Garcia et al., 1999; Camacho et al., 2002; Pacheco et al., 2010), los cuales son muy necesarios para controlar, optimizar y diseñar reactores industriales. Por otra parte, muchos de los estudios concernientes a las reacciones de acidólisis han sido enfocados en los productos de reacción sin reportar otra información pertinente como concentraciones de los medios de reacción asociados o de los productos intermediarios de la reacción (Garcia et al., 1999). En consecuencia, no todos los resultados disponibles sobre

reacciones de acidólisis podrían ser utilizados para obtener parámetros cinéticos, especialmente cuando se desea emplear un modelo más sofisticado (Pacheco et al., 2010).

La mayor parte del modelado disponible para la reacción acidólisis se basa en la metodología de superficie de respuesta (Shieh et al., 1995; Xu et al., 1998b; Sharma et al., 2009). Esta metodología es muy útil para optimizar el sistema de reacción estudiado en sí, pero sus parámetros son difíciles o imposibles de ser comparados en diferentes condiciones o sistemas.

Teniendo presente lo anterior, la acidólisis de aceite de girasol con ácidos grasos palmítico y esteárico en presencia de solvente y empleando el biocatalizador óptimo preparado, fue estudiada desde el punto de vista de la cinética de reacción, empleando para ello modelos con diferentes grados de complejidad. El efecto de las condiciones de reacción (temperatura, tiempo) sobre los parámetros cinéticos y de equilibrio, así como en la formación de productos intermediarios de reacción (monoglicéridos y diglicéridos) fue analizado. El objetivo de este estudio fue contribuir a aumentar el conocimiento sobre el comportamiento de reacciones de acidólisis utilizando expresiones de velocidad propuestas en la literatura para comprobar su aplicabilidad a este sistema específico, y la obtención de nuevos valores experimentales de constantes cinéticas a diferentes condiciones.

7.2. Trabajo experimental

La reacción de acidólisis entre aceite de girasol (SO) y la mezcla de ácidos grasos saturados (StPFA), palmítico y esteárico, fue llevada a cabo en las condiciones determinadas como óptimas desde el punto de vista operativo, en el capítulo anterior. Estas son: relación molar de sustratos= 3 mol StPFA/mol SO, biocatalizador = 0.34 g y hexano = 3.2 ml. Para obtener la cinética, las reacciones se llevaron a cabo a dos temperaturas, 50 °C y 60°C, para tiempos de reacción de 2, 4, 8, 12, 24 y 72 h.

Cabe mencionar que el biocatalizador empleado fue el denominado QM1-1.5, por ser el de mayor actividad alcanzada, como se demostró en el Capítulo 5. Asimismo, las temperaturas de reacción fueron elegidas en base a estudios previos donde se corroboró

que permitían lograr mayor modificación del lípido original, que la temperatura óptima de la lipasa libre. Trabajar a temperaturas más elevadas (a presión atmosférica) no es aconsejable, debido a la cercanía con el punto de ebullición del hexano (69°C).

Los análisis realizados sobre los productos de reacción fueron composición de ácidos grasos saturados palmítico y esteárico en los glicéridos, composición en especies de triglicéridos, y subproductos (mono- y diglicéridos respecto del total de glicéridos). Las técnicas empleadas para cada determinación son las detalladas en el Capítulo 2.

7.3. Modelado matemático de la cinética de acidólisis

7.3.1. Antecedentes y consideraciones generales

Sin lugar a dudas, la ecuación más empleada a lo largo del tiempo para describir cinéticas enzimáticas ha sido la ecuación de Michaelis-Menten. Esta ha sido utilizada para representar adecuadamente numerosas reacciones enzimáticas en las que hay involucradas un único reactante, el sistema es homogéneo y se esta en la etapa inicial de la reacción (Georgakis et al. 1975; Lee y Lin, 1996; Uragami et al., 2006; Çil et al., 2007).

Sin embargo, reacciones más complejas donde participan dos o más reactantes, como la acidólisis enzimática donde se suma que la reacción tiene lugar en un sistema heterogéneo (interfase lípido-acuosa), no pueden ser descritas por la ecuación de Michaelis-Menten y sus variantes, ya que no cumplen con las condiciones anteriormente especificadas. En estas, la complejidad se presenta por el modo en que los sustratos y productos se unen y liberan del sitio activo. La forma más común de representar esto incluye:

I) Mecanismo ordenado: un sustrato debe unirse antes que el otro;

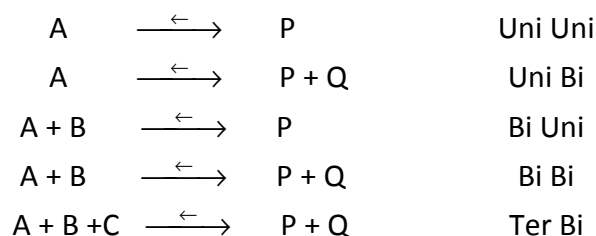
II) Mecanismo aleatorio: los sustratos pueden unirse en cualquier orden;

III) Mecanismo de doble desplazamiento ó Ping -Pong: tras la unión del primer sustrato se libera uno de los productos, en una reacción parcial en la que se genera una

forma modificada de la enzima. Esta forma se une al siguiente sustrato, catalizando la formación del segundo producto con regeneración de la forma nativa de la enzima.

Estos tres diferentes mecanismos pueden generar expresiones diferentes de la velocidad de reacción, que influyen en la precisión de los modelos generados (Sauro, 2011).

Por otro lado, el mecanismo se puede clasificar en función al número de sustratos y productos que intervienen en la reacción. Cleland (1975) desarrolló una notación para diferenciar estas reacciones, denominando A y B a los sustratos, y Q y P a los productos, dando lugar a las siguientes combinaciones:



En lo que a antecedentes de modelado cinético para reacciones de acidólisis se refiere, Balcão y Malcata (1996) presentaron el modelado matemático de un mecanismo Ping Pong Bi Bi genérico aplicado a una reacción catalizada por lipasas y la expresión de la velocidad asociada, suponiendo estado pseudo-estacionario. Ese modelo se puede simplificar dependiendo de los supuestos cinéticos, donde generalmente no menos de cuatro parámetros quedan involucrados. Reyes y Hill (1994) utilizaron un mecanismo Ping Pong Bi Bi, en una forma simplificada, para modelar el comportamiento dinámico de las reacciones de acidólisis en ausencia de disolvente. Obtuvieron dos expresiones que requieren el conocimiento de un total de cinco parámetros cinéticos y de las concentraciones de cinco componentes a través del tiempo. Ortega et al. (2004) aplicaron este modelo para representar con éxito la incorporación de ácido linoleico conjugado en aceite de soja completamente hidrogenado en un sistema con solvente. Xu et al. (1998c) propusieron un modelo simplificado para la cinética de las reacciones de acidólisis en un sistema libre de disolvente, donde la incorporación estaba sujeta al tiempo de reacción en una manera similar a como la velocidad de reacción lo hace con la concentración de sustrato

en la ecuación de Michaelis-Menten. Camacho et al. (2007) postularon un modelo cinético de parámetros agrupados para la acidólisis catalizada por lipasas inmovilizadas en un sistema con disolvente. Dicho modelo requiere el conocimiento de tres parámetros experimentales y sólo una variable en el tiempo. Çiftçi et al. (2009) presentaron un enfoque de programación para expresión de genes comparando sus predicciones con un modelo de red neuronal más robusto. Encontraron un buen rendimiento aplicando este modelo empírico para representar la reacción de acidólisis entre trioleína y ácido palmítico en un sistema con disolvente. Sin embargo, éste utiliza 28 parámetros de ajuste en la predicción de tres concentraciones de TAG para la reacción involucrada.

7.3.2. Mecanismo Ping-Pong Bi Bi

En base a lo anterior, puede notarse que el mecanismo Ping-Pong Bi Bi ha sido de los más empleados para describir la cinética de las reacciones de acidólisis. Por ello, en esta sección se da una breve descripción de los pasos de reacción implicados a fin de lograr un entendimiento más completo del proceso.

La Fig. 7.1 muestra el ciclo catalítico para la acidólisis entre los triglicéridos del aceite de girasol y los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, libres. El mismo está basado en la dinámica planteada por Reyes y Hill (1994), que da lugar al Modelo III empleado más adelante. El ciclo se divide en dos secciones, la parte superior representa la etapa de hidrólisis y la parte inferior el paso de reesterificación. En la práctica, estos dos pasos ocurren simultáneamente dando lugar a una combinación de reacciones en serie y en paralelo, con múltiples entradas y salidas de reactivos y productos de manera que el mecanismo global es de tipo Ping Pong. El proceso en su forma simplificada implicaría, la unión de la lipasa a una molécula de glicérido (más específicamente, a la región de la molécula que contiene el enlace éster) y la posterior ruptura del enlace. Esta ruptura es seguida por la formación de un complejo acilo mixto entre el ácido graso "liberado" del glicérido y la lipasa. Subsecuentemente, el gliceril procedente del glicérido es liberado. A continuación, una molécula de agua es capturada dando lugar a la desacilación, que permite que el ácido graso sea liberado por la enzima al medio.

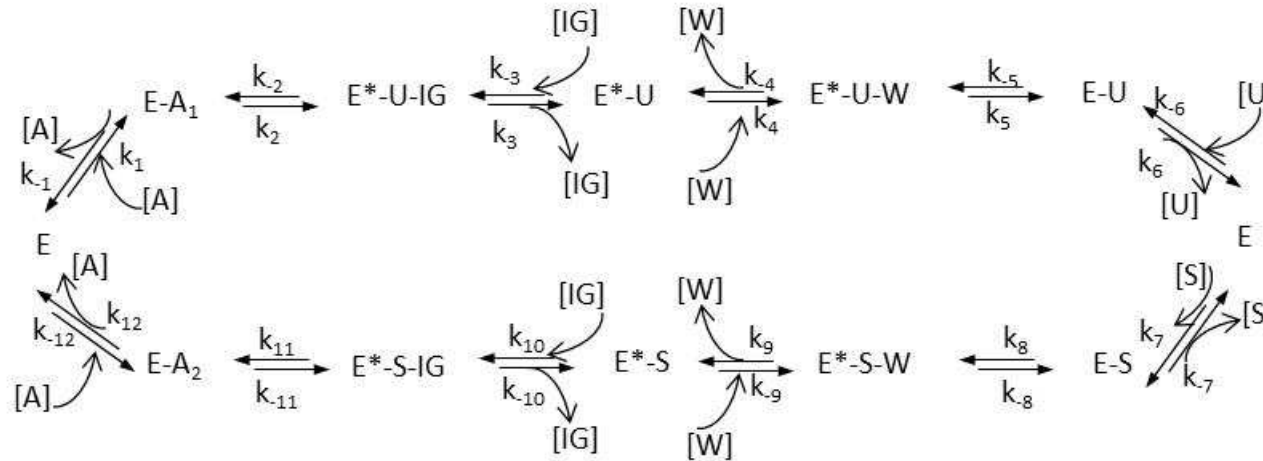


Figura 7.1. Esquema de reacción de acidólisis para un mecanismo Ping-Pong Bi Bi. El agua ingresa al ciclo catalítico en los pasos de acilación/desacilación.

Donde:

A= unión éster; A1= unión éster original (glicérido reactante); A2= nueva unión éster formada con el ácido graso incorporado

U= ácido graso insaturado liberado del triglicérido original (oleico, linoleico)

S=ácido graso saturado, a ser incorporado (palmítico, esteárico)

IG=glicérido intermediario (glicerol, mono - , diglicéridos)

E= enzima

E*= complejo acil- enzima.

W= agua

k_i= constante cinética del paso i.

La incorporación de un nuevo ácido graso del medio a un gliceril, requiere de la unión de la enzima al ácido para formar un complejo que mediante la acilación da lugar a la formación de una molécula de agua que es liberada al medio. Posteriormente, el complejo acil-enzima se une a un gliceril llevando a cabo una unión ester con el nuevo ácido graso. Tras la liberación de este nuevo glicérido y la regeneración de la enzima, esta última queda disponible para catalizar alguno de los dos pasos de reacción.

Desde el punto de vista de los ácidos grasos libres, las expresiones de velocidad necesarias para describir este sistema son dos, una que describa la aparición en el medio de los ácidos grasos hidrolizados (los cuales pueden ser agrupados, independientemente de sus diferencias químicas) y otra que exprese la desaparición del medio del ácido graso a incorporarse. El último tipo se puede interpretar como la velocidad de reacción de acidólisis.

7.3.3. Modelos cinéticos

A continuación se detallan los modelos probados para el ajuste de los puntos experimentales resultado de la acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos saturados. Cabe mencionar que aquí solo se presenta la ecuación correspondiente al modelo y las suposiciones que los autores realizaron para desarrollarlas. La deducción de las mismas, con las ecuaciones asociadas, puede ser encontrada en las referencias citadas.

7.3.3.1. Modelo Cinético I

El modelo más sencillo disponible en la literatura para representar en acidólisis la incorporación de los ácidos grasos reactantes con el tiempo de reacción, es el propuesto por Xu et al. (1998c). Éste se desarrolló observando que la curva que describe el comportamiento de la incorporación versus el tiempo de reacción, tiene una forma similar a la representada por la ecuación de Michaelis- Menten. Al reemplazar en ésta la velocidad de reacción por la incorporación y la concentración de sustratos por el tiempo, se tiene la siguiente expresión:

$$F_M = \frac{F_{Me} \cdot t}{K_i + t} \quad (7.1)$$

donde, F_{Me} es la incorporación máxima de ácidos grasos reactantes, correspondiente al equilibrio, y K_i es una constante a ser determinada experimentalmente. Esta expresión no tiene asociada ninguna hipótesis ni simplificación, y los ácidos grasos incorporados son los ácidos grasos que fueron reactivo y ahora están presentes en los glicéridos, independientemente de la posición.

7.3.3.2. Modelo Cinético I Modificado

De manera similar a como Xu et al. desarrollaron el modelo anterior, la inspección de las curvas de incorporación de ácidos grasos reactantes vs. el tiempo de reacción permitieron observar su tendencia a comportarse según el tipo sigmoideas, incluyendo un periodo "lag" en el cual no se obtuvo una apreciable incorporación. Esto llevó a buscar una ecuación que pudiera describir adecuadamente este comportamiento. La denominada ecuación de Hill (Weiss, 1997), empleada para enzimas alostéricas, puede en estos casos ser usada reemplazando las variables velocidad de reacción y concentración de sustrato por incorporación y tiempo, respectivamente.

$$F_M = \frac{F_{Me} \cdot t^n}{K_i^n + t^n} \quad (7.2)$$

donde, F_{Me} es la incorporación máxima de ácidos grasos reactantes, correspondiente al equilibrio, y K_i y n son constantes a ser determinadas experimentalmente.

7.3.3.3. Modelo Cinético II

Un modelo cinético de parámetros agrupados para la acidólisis de triglicéridos (TAG) y ácidos grasos libres (FFA), en medio no acuoso y catalizada por una lipasa inmovilizada *sn*-1,3 específica, fue propuesto por Camacho et al. (2007). Este modelo fue desarrollado basándose en el mecanismo de reacción de la acidólisis considerando las siguientes hipótesis:

1- Debido a la especificidad posicional de la lipasa (*sn*-1,3 específica) solo los ácidos grasos ubicados en las posiciones 1 y 3 del triglicérido participan en la reacción.

2- La sustitución en una posición, no depende de la naturaleza del ácido graso presente en la otra posición posible de ser sustituido, es decir, ambas posiciones son equivalentes.

3- La concentración de diglicéridos en el medio de reacción se asume en estado estacionario y posee un valor bajo, ya que no se añade agua al sistema (lo que favorecería la hidrólisis) y la relación de sustratos FFA/TAG es alta.

4- Los únicos intermediarios donde la enzima participa que tienen considerable duración como para ser tenidos en cuenta son los complejos acil-enzima. Estos están en equilibrio con los ácidos grasos libres.

5- La concentración del complejo acil-enzima es mucho mayor que la concentración de enzima libre en el medio de reacción.

El modelo representa la variación de los ácidos grasos incorporados, expresados en fracción molar mediante la variable F_M , con la intensidad del tratamiento θ como una función de parámetros cinéticos, el equilibrio y F_M , según la siguiente ecuación:

$$\frac{dF_M}{d\theta} = \frac{(k_{-L}E_T/3K_M)[(2-3F_M)(m_0-3F_M)-(1/K_e)(3F_M)^2]}{[(K_L/K_M)(3F_M)+(m_0-3F_M)][(k_LK_L/k_MK_M)(3F_M)+(m_0-3F_M)]} \quad (7.3)$$

donde θ se define en términos de la masa de biocatalizador (m_e), del volumen de reacción (V), de la concentración inicial de triglicéridos ($[TAG]_0$) y del tiempo de reacción (t), como:

$$\theta = \left(\frac{m_e}{V[TAG]_0} \right) t \quad (7.4)$$

La constante de equilibrio (K_e) se obtiene en base al valor de F_M en el estado estacionario (F_{Me}), según la ecuación que sigue:

$$K_e = \frac{(3F_{Me})^2}{(2 - 3F_{Me})(m_0 - 3F_{Me})} \quad (7.5)$$

La forma reducida del modelo se obtiene agrupando parámetros en la ecuación 7.3:

$$\frac{dF_M}{d\theta} = \frac{A[(2 - 3F_M)(m_0 - 3F_M) - (1/K_e)(3F_M)^2]}{[B(3F_M) + (m_0 - 3F_M)][(BC)(3F_M) + (m_0 - 3F_M)]} \quad (7.6)$$

donde A, B y C, parámetros cinéticos condensados, se definieron tomando en cuenta el significado de las variables que se estaban agrupando:

$A = k_{-L} E_T / (3K_M)$, relación entre la constante cinética de formación del complejo acil-enzima del triglicérido original (k_{-L}), la concentración de enzima activa (E_T) y la constante de equilibrio de formación del complejo acil-enzima de los ácidos grasos libres reactantes (K_M).

$B = K_L / K_M$, relación entre las constantes de equilibrio de formación del complejo acil-enzima del ácido graso libre *liberado* (K_L) y del ácido graso libre *reactante* (K_M).

$C = k_L / k_M$, relación entre las constantes cinéticas de esterificación de diglicéridos con ácidos grasos del triglicérido original (k_L) y con ácidos grasos reactantes (k_M).

La expresión determinada por la ecuación 7.6 fue la empleada para ajustar los datos experimentales.

7.3.3.4. Modelo Cinético III

Reyes y Hill (1994) postularon tres mecanismos diferentes para describir la acidólisis entre ácidos grasos libres y un triglicérido heterogéneo, como aceite de oliva o leche, difiriendo uno del otro en el punto en el cual la molécula de agua ingresa en el ciclo catalítico. Las expresiones desarrolladas para describirlos tomaron en cuenta el efecto de la concentración de todas las especies participantes en la reacción, dando lugar a modelos más complejos que los anteriormente descritos. Las asunciones que llevaron a cabo los autores para desarrollarlos fueron:

1- Todos los ácidos grasos liberados del triglicérido sustrato pueden ser considerados juntos como un solo producto (P_r).

2- Las especies de glicéridos minoritarias (glicerol, mono- y diglicéridos) pueden ser agrupadas en un único compuesto intermediario, cuya composición en ácidos grasos es IG.

3- El paso determinante de la velocidad es el que involucra la ruptura de la unión éster, asumiendo que los demás pasos alcanzan un rápido equilibrio.

En este caso, los autores emplearon como variables a analizar, la velocidad de aparición de ácidos grasos en los productos (r_{Pr}) y la velocidad de desaparición de los ácidos grasos libres ($-r_s$), en vez del porcentaje o fracción molar de incorporación como en los anteriores modelos. Cuando cada uno de los tres modelos desarrollados por Reyes y Hill (1994), derivado de cada mecanismo planteado, fue probado en el ajuste de sus datos experimentales obtenidos en la acidólisis sin solvente, hallaron que la versión reducida de la expresión de la velocidad correspondiente al mecanismo que denominaron 1 (en el cual el agua ingresa al ciclo catalítico durante los pasos de acilación/deacilación), dio lugar al mejor ajuste:

$$-r_s = \frac{(V_{R1}[S][IG] - V_{M2}[W][Q])E_T}{(1 + K_{II}[IG])([S] + [P_r])} \quad (7.7)$$

donde V_{R1} , V_{M2} y K_{II} son parámetros cinéticos que, junto con la concentración inicial de agua (W_0), son obtenidos experimentalmente.

Es necesario realizar una aclaración respecto al contenido de agua inicial del sistema. Reyes y Hill (1994) encontraron diferencias, en reacciones de acidólisis, entre el contenido inicial de agua calculado y el teórico necesario para alcanzar los niveles de hidrólisis observados al finalizar la reacción. En consecuencia, los autores sugirieron considerar a la concentración inicial de agua como un parámetro adicional a incorporar al modelo.

7.4. Resultados y discusiones

7.4.1. Composición de los productos de reacción de acidólisis: efecto del tiempo y la temperatura de reacción

7.4.1.1. Composición en ácidos palmítico y esteárico

La Fig. 7.2 muestra la evolución en el tiempo de la composición en ácidos palmítico y esteárico de los productos de reacción para las dos temperaturas ensayadas, 50 y 60°C. Como puede notarse, no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la temperatura para las primeras 2 a 4 h de reacción. Después de ese tiempo, la incorporación fue marcadamente más rápida a 60°C; luego de 24 h los lípidos estructurados contenían alrededor de 50 % en masa de ácidos palmítico y esteárico, mientras que a 50°C contenían aproximadamente el 30 %, lo que indicó que una temperatura mayor tuvo un efecto positivo. Resultados similares han sido reportados en trabajos previos para lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas comerciales (Lipozyme RMIM). Por ejemplo, Carrín y Crapiste (2008) reportaron la mayor incorporación de ácidos grasos saturados a 60°C al llevar a cabo la misma reacción de interés de esta tesis entre 40 y 60°C. En concordancia, Sahin et al. (2005) realizaron la acidólisis entre tripalmitina, ácidos grasos de aceite de avellana y ácido esteárico, y encontraron que la mayor incorporación de ácido esteárico fue lograda también a 60 °C.

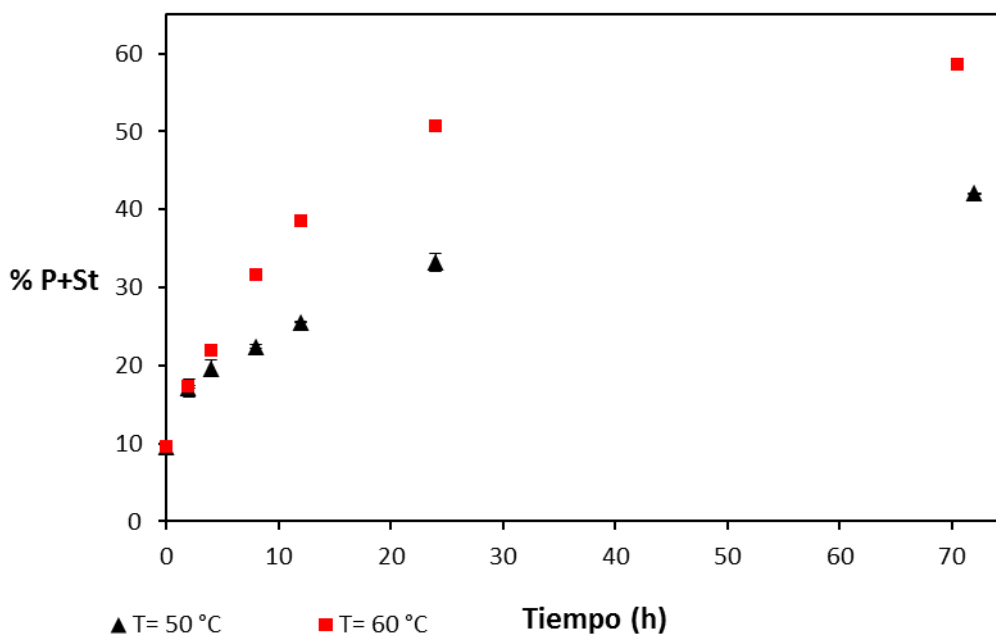


Figura 7.2. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: Composición de ácidos palmítico y esteárico (% P+St) en los productos de reacción a 50 °C y 60 °C.

7.4.1.2. Contenido de subproductos

La generación de subproductos mostró un comportamiento similar a la composición de ácidos palmítico y esteárico incorporados durante las primeras 4 h de reacción (Fig. 7.3). Después de ese tiempo, aumentó significativamente con la temperatura, alcanzando el estado estacionario después de las 12 h, siendo alrededor de 24 y 14% para 60 y 50°C, respectivamente. Al comparar el contenido de subproductos con el contenido de los ácidos palmítico y esteárico en los productos de reacción, pudo concluirse que los pasos de la reacción enzimática general (hidrolisis y esterificación) progresaron al mismo nivel después de las 12 h aproximadamente.

Dado que el contenido de subproductos se calculó en base a la composición en mono y diglicéridos respecto del total de glicéridos (mono, di y triglicéridos), ya que los ácidos grasos libres no se consideraron porque en su mayoría son reactivos de la reacción, la variación de estos 3 componentes en el tiempo se muestra en la Fig. 7.4. Al analizar simultáneamente las curvas que representan a los mono-, di- y triglicéridos, para una dada

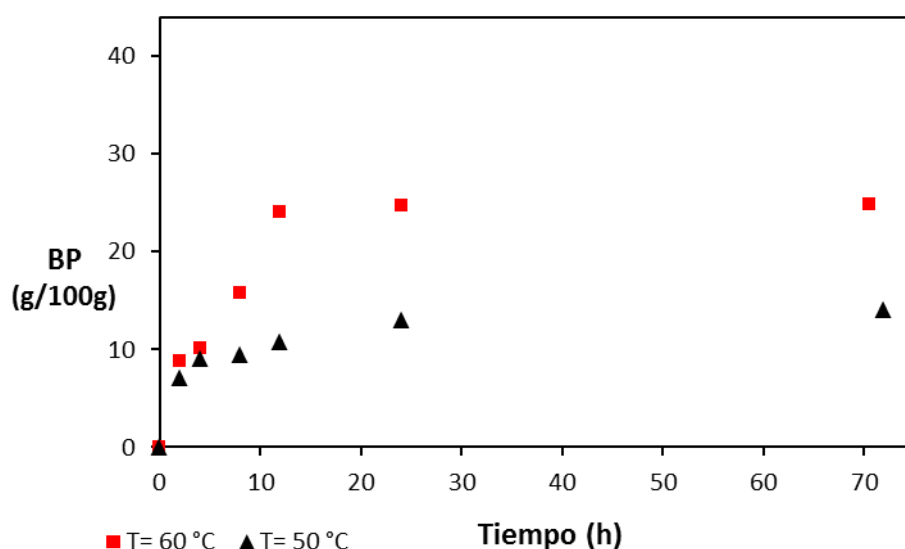


Figura 7.3. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: Composición de subproductos (BP) en lo productos de reacción a 50 °C (▲) y 60 °C (■).

temperatura, puede apreciarse que inicialmente todos los glicéridos eran en su mayoría triglicéridos. Con el transcurso de la acidólisis se comienzan a generar diglicéridos y en bastante menor proporción monoglicéridos, lo que conlleva una disminución de los glicéridos mayoritarios. Los cambios más importantes en las composiciones de triglicéridos y de diglicéridos se aprecian desde que comienza la reacción hasta aproximadamente las 12 h, luego las mismas logran paulatinamente estabilizarse hasta alcanzar el estado de equilibrio. Por otro lado, en lo que a monoglicéridos se refiere, si bien su composición es muy baja, se aprecia al ampliar la escala (Fig.7.4.B) que este contenido no pareciera estabilizarse a 60 °C, sino continuar creciendo, aunque de modo más lento teniendo en cuenta las horas de reacción y los valores alcanzados. Asimismo, en este análisis se hace también evidente como una mayor temperatura de reacción genera mayores modificaciones en la composición global de glicéridos.

Cabe mencionar que los valores aquí representados, en términos de composiciones molares, fueron parte de los datos experimentales empleados en el Modelo III. Por otro lado no se encontró glicerol en ninguno de los lípidos estructurados productos de reacción, indicando que la hidrólisis nunca fue completa.

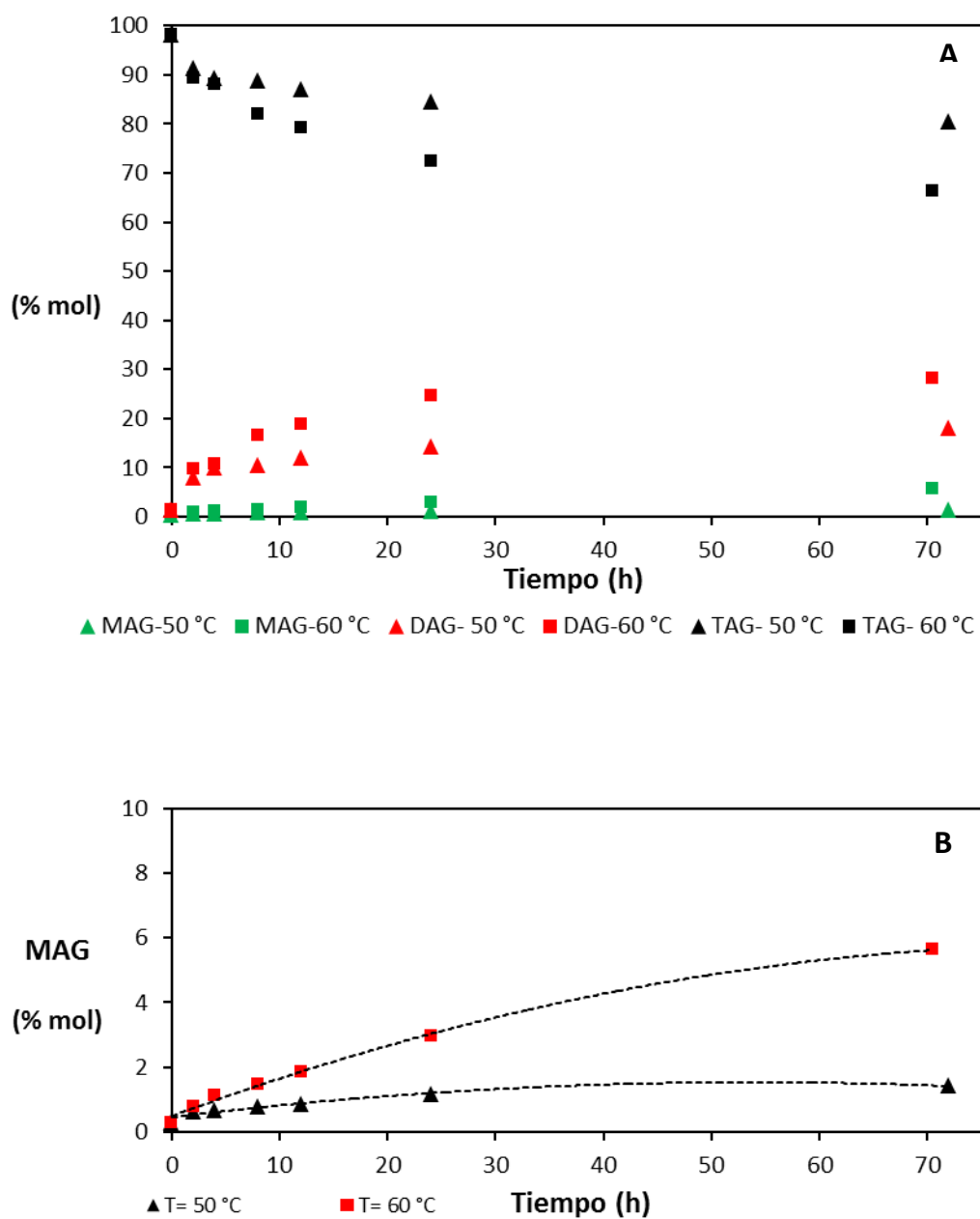


Figura 7.4. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: Composición de A) triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos, a 50 °C y 60 °C; B) Ampliación de la Fig 7.4.A (Zona de MAG).

7.4.1.3. Distribución de triglicéridos

Tras la identificación de todas las especies de triglicéridos presentes en los lípidos estructurados productos de reacción, los mismos fueron agrupados en cuatro categorías diferentes de acuerdo al número de ácidos grasos saturados (S) o insaturados (U) presentes

en cada molécula (sin distinguir isómeros de posición). De este modo el contenido de triglicéridos se analizó en base a la evolución de SSS, SUS, UUS y UUU (% g /100 g TAG total). La distribución de estos grupos es mostrada en la Fig.7.5.A y Fig.7.5.B para las dos temperaturas empleadas, 50 y 60 °C.

Como puede notarse, el grupo UUU disminuye en todo el tiempo de reacción, mostrando el mayor decrecimiento hasta la hora 12, siendo el mismo más notorio a 60 °C que a 50°C. Más aún, esta disminución fue prácticamente lineal a la mayor temperatura, mientras que a 50 °C puede observarse una desaceleración en el cambio de esta concentración desde tiempos iniciales. Luego de las 12 h de reacción, el decrecimiento fue mucho menor. Cabe notar que el grupo UUU es el mayoritario en el aceite (sustrato de glicéridos iniciales), por lo cual su disminución está directamente relacionada con la velocidad relativa de hidrólisis.

El grupo UUS, segundo mayoritario en el aceite, se incrementó en ambas temperaturas, siendo el aumento un poco más rápido a 60 °C. Esto demuestra que sobre este grupo prevaleció, en forma relativa, la reacción de esterificación por sobre la de hidrólisis. Adicionalmente, puede notarse que a 50°C este grupo pareciera haber alcanzado un nivel estable y máximo en su concentración (35% aproximadamente). En cambio, a 60°C se observa que antes de las 72 h de reacción se produciría un máximo en la concentración de UUS (igual o superior a 40%) y luego tiende a disminuir (hasta aproximadamente 30% a las 72 h). Por un lado, se podría pensar que a 50°C el máximo no se encontró por falta de datos en tiempos intermedios entre 24 y 72 h. Por otro lado, con el cambio de temperatura muy probablemente cambien los valores de las constantes cinéticas y de equilibrio, lo cual se reflejará en cambios en los perfiles obtenidos. La disminución encontrada a 60°C a tiempos prolongados de reacción podría deberse a la continuación del proceso de cambio de ácidos grasos saturados en los glicéridos, dejando en evidencia que el grupo UUS sería un compuesto intermediario para luego generar otro tipo de glicérido.

Respecto al grupo SUS, el tipo de triglicéridos deseados, su incremento fue mayor a 60 °C. A esta temperatura, pudo notarse un incremento prácticamente lineal hasta las 12 h.

Luego de este tiempo, su crecimiento progresó a mucha menor velocidad, llegando a convertirse en el grupo mayoritario y representando aproximadamente un 40% del total de TAG a las 72 h de reacción. Por otro lado, a 50 °C la concentración de SUS se incrementa a mayor velocidad inicialmente (aunque menor que la observada para 60 °C) y luego se observa una constante disminución de su velocidad de producción con el transcurso del tiempo. Superadas las 24 h de reacción, este grupo se convierte en el mayoritario dentro de los TAG, alcanzando a las 72 h un valor cercano al 30%.

Por último, el grupo SSS mostró un aumento lineal durante las primeras 24 h de reacción a 50 °C; luego se observa una aceleración en su producción, obteniéndose a las 72 h de reacción un valor de aproximadamente 14%, en vez del 9% esperado si su velocidad de producción se hubiese mantenido igual a la inicial. A 60 °C se observa un periodo inicial similar al de 50°C, pero de menor duración, ya que luego de 4 h la producción de SSS se acelera, incrementándose a mayor velocidad hasta superadas las 12 h. Luego, su crecimiento se estabiliza en una velocidad inferior a ésta hasta las 72 h donde logra superar el 20%. En ambos casos, este grupo pareció seguir la tendencia de crecimiento de SUS y del contenido de subproductos, lo cual era esperado ya que son obtenidos tras la hidrólisis de los triglicéridos del tipo SUS. Teniendo en cuenta la especificidad *sn*-1,3 de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Rodrigues y Fernandez-Lafuente, 2010), la formación por su acción de triglicéridos trisaturados, SSS, debería estar limitada por el contenido de ácidos grasos saturados en la posición *sn*-2 de los triglicéridos del aceite (3.1% m/m). Por lo tanto, el hecho de encontrar valores que superen esta limitación (aproximadamente 12 y 13% SSS/muestra a los mayores tiempos de reacción y a 50 y 60°C, respectivamente, respecto al límite superior de 9.3% debido a la composición inicial en *sn*-2) implica la ocurrencia del reordenamiento de los ácidos grasos en las distintas posiciones del esqueleto del glicerol por la reacción química de acil migración.

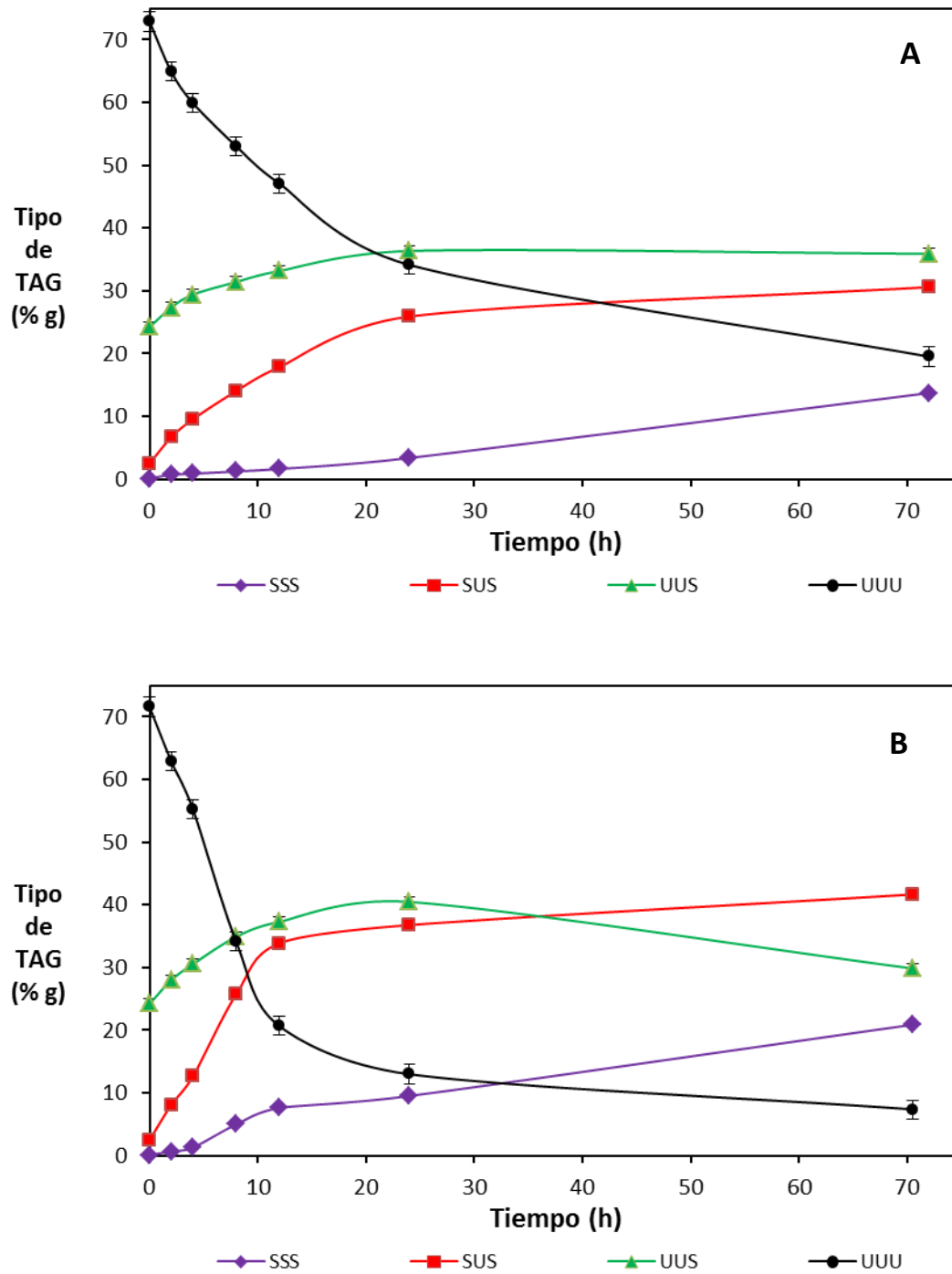


Figura 7.5. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: Distribución de los grupos de triglicéridos con el tiempo de reacción. A) Temperatura = 50 °C; B) Temperatura= 60 °C.

Como puede ser observado, la temperatura y el tiempo tuvieron un efecto positivo en el % SSS y en consecuencia, sobre la acil migración, siendo el efecto de la temperatura el más significativo.

Asimismo, es un hecho conocido que los ácidos grasos de diferente longitud de cadena y número de dobles enlaces, pueden presentar diferente velocidad de migración. Este comportamiento puede ser estimado para los ácidos palmítico y esteárico, al comparar los incrementos entre las especies tripalmitina (PPP) y triestearina (StStSt). Luego de 72/70.5 h de reacción, la cantidad de PPP cambió desde no detectada hasta 2.67 y 4.02% para 50 y 60°C, respectivamente; y la de StStSt de 0.04 a 1.34 y 2.15% para 50 y 60°C, respectivamente. Además, de las 4 especies que componen el grupo SSS (PPP, StStSt, PPSt y StStP), la formación de StStSt fue la menos favorecida (Tabla 7.1). Esto sugeriría que existiría una mayor tendencia a incorporar ácido palmítico en los triglicéridos y/o que este ácido presentaría mayor velocidad de migración respecto al ácido esteárico. Un resultado similar fue encontrado por Sahin et al. (2005), quienes reportaron que las posiciones *sn*-2 del lípido estructurado obtenido en su investigación empleando Lipozyme RMIM como catalizador, fueron predominantemente ocupadas por el ácido palmítico, seguido de los ácidos oleico, esteárico y linoleico. Por lo tanto, se podría pensar que al usar únicamente ácido esteárico en la reacción de acidólisis, en lugar de la mezcla, se podría mejorar la calidad del producto.

La Fig. 7.6 muestra los perfiles de ambos triglicéridos trisaturados; como puede observarse las curvas obtenidas para tripalmitina a 50 y 60 °C tuvieron un comportamiento similar, siendo mayor el contenido alcanzado a la temperatura más alta. En forma análoga lo mismo sucedió para triestearina. Los cambios más importantes, tanto para tripalmitina como para triestearina, se obtuvieron después de las 12 y 24 h de reacción, a 60 °C y 50 °C, respectivamente. Estos tiempos se corresponderían con las condiciones en las que comienza a haber una cantidad más importante de diglicéridos y monoglicéridos disponibles para ser reesterificados. Principalmente, los componentes más influyentes serían los diglicéridos, ya que como se puede notar en la Fig. 7.4.B, el contenido de los mismos para la hora 12 a 60 °C resulta igual al contenido para la hora 24 a 50 °C.

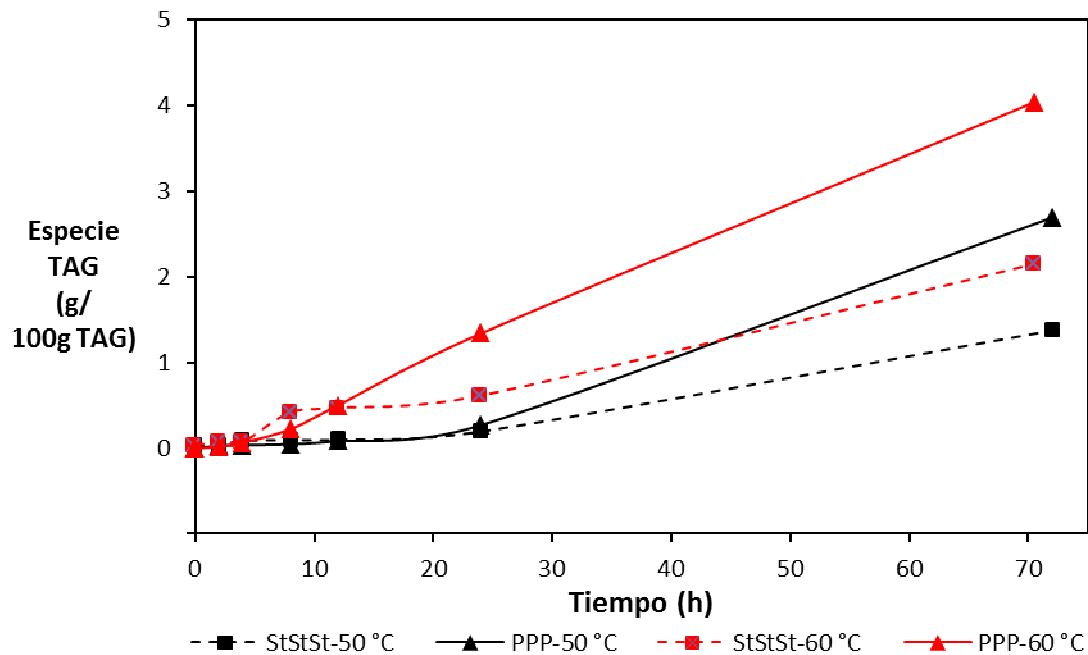


Figura 7.6. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: seguimiento de las especies trisaturadas, tripalmitina (PPP) y triestearina (StStSt), a 50 y 60 °C.

De las 20 especies diferentes de triglicéridos identificadas en los productos de reacción (Tabla 7.1), podría decirse que las que más importancia revisten respecto de la modificación deseada son las monoinsaturadas (SUS); esto está en concordancia con el hecho que la lipasa es *sn*-1,3 específica, por lo cual se incorporaron ácidos grasos saturados manteniendo el insaturado original en la posición *sn*-2, con los beneficios que esto conlleva para la salud del consumidor. Por ello en las Figs. 7.7.A y 7.7.B, se muestran los perfiles de 5 especies de este tipo: POP, PLP, StOSt, StLSt y PLSt (el orden de los ácidos grasos puede no ser el representado ya que no se distinguieron isómeros de posición). La especie mayoritaria tras 70.5/72 h de reacción fue PLSt, que alcanzó un contenido de 9.36 y 11.85 % a 50 y 60 °C, respectivamente. Éste se fue incrementando en todo el rango de tiempo analizado. De las especies monoinsaturadas aquí analizadas, el orden obtenido en contenido decreciente fue: PLSt > PLP ~ POSt > POP ~ StLSt > StOSt, coincidiendo para las dos temperaturas. El que los monoinsaturados hayan contenido predominantemente ácido linoleico debería estar relacionado al hecho de que este ácido es el predominante en los triglicéridos del aceite original. Más aún, es el ácido graso predominante en la posición *sn*-2 de los mismos (64.63%).

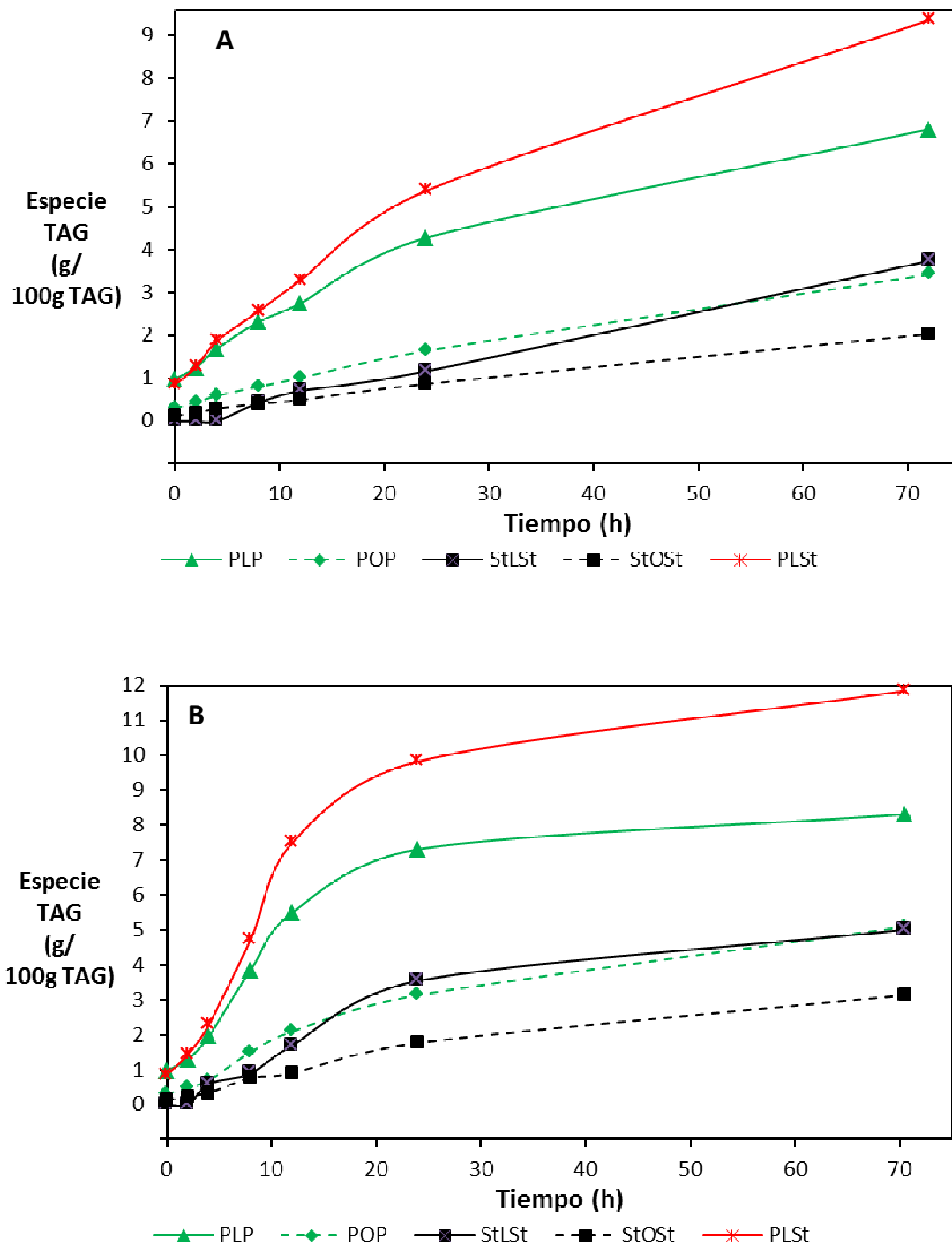


Figura 7.7. Evolución de la acidólisis de SO y StPFA: seguimiento de algunas especies de TAG monoinsaturadas, P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico, a A) 50°C y B) 60 °C.

Tabla 7.1

Perfil de triglicéridos (TAG) del aceite de girasol (SO) y de los productos de reacción (SL) obtenidos al final de las 72 h de reacción para 50°C y de las 70.5 h para 60 °C (% m/m).

TAG ^a	Tipo de TAG ^b	SO	SL -50 °C	SL -60 °C
PPP	SSS	ND ^c	2.67	4.02
PPSt	SSS	ND	5.53	8.45
POP	SUS	0.30	3.37	5.09
PLP	SUS	0.98	6.78	8.31
StStP	SSS	0.07	4.11	6.22
POSt	SUS	0.29	5.33	8.20
POO	UUS	2.80	2.96	2.78
PLSt	SUS	0.85	9.33	11.85
POL	UUS	6.54	9.14	7.68
PLL	UUS	8.30	8.54	5.94
StStSt	SSS	0.04	1.34	2.15
StStO	SUS	0.13	2.01	3.14
OOS	UUS	1.26	2.17	2.28
StStL	SUS	ND	3.68	5.01
OOO	UUU	8.12	1.66	0.67
StOL	UUS	2.59	7.08	6.60
OOL	UUU	15.23	4.86	2.19
StLL	UUS	3.06	6.10	4.55
OLL	UUU	27.36	8.19	3.09
LLL	UUU	21.81	4.93	1.61
	NI ^d	0.29	0.23	0.18
	∑ SSS	0.11	13.65	20.84
	∑ SUS	2.51	30.50	41.60
	∑ UUS	24.22	35.97	29.82
	∑ UUU	71.57	19.64	7.55

^a P: ácido palmítico, St: ácido esteárico, O: ácido oleico, L: ácido linoleico. ^b S: ácido graso saturado, U: ácido graso insaturado. ^c ND: no detectado, ^d NI: no identificado.

Por otra parte, al observar las curvas pareciera notarse que mientras la formación de triglicéridos monoinsaturados conteniendo palmítico tuvo lugar a una velocidad alta desde el inicio de la reacción, los triglicéridos monoinsaturados conteniendo esteárico mostraron una velocidad mucho menor al inicio que para tiempos posteriores. Esto podría indicar que es necesario un mayor contenido de diglicéridos en el microentorno de la lipasa para que esta incorpore ácido esteárico.

7.4.2. Modelado matemático de la cinética de reacción

Los datos experimentales fueron ajustados con los modelos propuestos utilizando algoritmos lineales y no lineales contenidos en el programa Origin Pro8 (OriginLab, 2007) y Systat (Systat 13, 2009). Los resultados obtenidos en cada caso se muestran a continuación. El Modelo I Modificado no necesito ser empleado con el biocatalizador preparado en reacciones batch ya que no se observó periodo lag en las mismas.

7.4.2.1. Modelo Cinético I

El empleo del Modelo cinético I significó el ajuste de los datos experimentales con la Ec. 7.1. Los parámetros asociados, F_{Me} y K_i , mostraron tener dependencia con la temperatura (Tabla 7.2). Como puede apreciarse, la incorporación máxima F_{Me} se incrementó notablemente, mientras que K_i disminuyó con el aumento de la temperatura. Los valores de F_{Me} resultaron superiores y con mayor dependencia con la temperatura que los reportados por Pacheco et al. (2010) para los mismos sustratos, pero empleando en su caso un biocatalizador comercial, Lipozyme RMIM, en otras relaciones molares y de dilución. Para ambas temperaturas, los ajustes lograron describir adecuadamente los puntos experimentales teniendo presente los valores del coeficiente de determinación (Fig. 7.8). Al examinar cuidadosamente los ajustes, se aprecia una mejor representación del Modelo I para 60 °C a tiempos cortos de reacción, mientras que para 50 °C se adecua mejor a tiempos mayores que 8 h.

Al comparar los parámetros anteriores con los obtenidos para el modelado de la lipasa en su estado libre (Capítulo 3), para 50 °C puede notarse que la incorporación esperada en el equilibrio (F_{Me}) resultó muy similar (40.85% para la lipasa libre), así también

el valor de K_i (15.945 h para la lipasa libre). Por otro lado, los resultados obtenidos a la temperatura óptima para la lipasa inmovilizada, 60°C, pueden compararse con los obtenidos a la óptima de la lipasa libre, 40 °C, lo cual muestra que las incorporaciones para el equilibrio también resultaron similares (50.27% para la lipasa libre), de igual modo el valor de K_i (6.194 h para la lipasa libre). Por lo tanto, se podría decir que los parámetros cinéticos no se verían afectados por el proceso de inmovilización. Cabe mencionar que las cantidades de proteína en cada caso fueron distintas, porque en cada oportunidad se buscó lograr buenas incorporaciones, requiriéndose menores cantidades cuando la lipasa estaba libre que en su forma inmovilizada para evitar formación de agregados inactivos.

Tabla 7.2.

Parámetros del Modelo I (Ec. 7.1) para cada temperatura de reacción ensayada y el coeficiente de determinación correspondiente.

T (°C)	F _{Me} (% molar)	K _i (h)	R ²
50	38.547	13.654	0.9569
60	54.740	10.321	0.9813

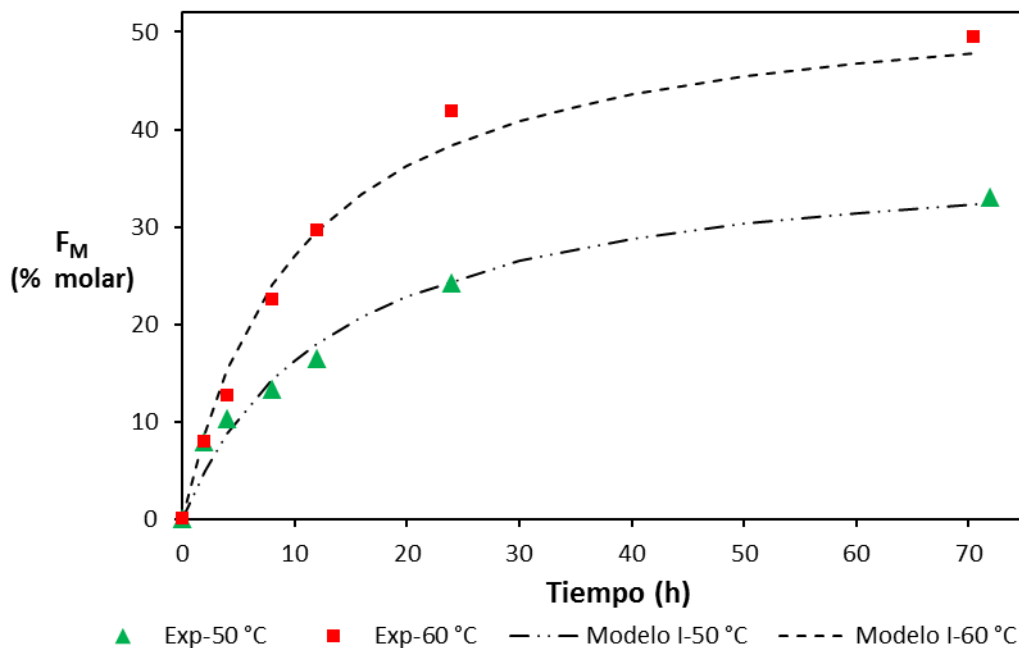


Figura 7.8. Ajuste con Modelo I de la Incorporación de ácidos grasos saturados (F_M) en SO en función del tiempo de reacción y de la temperatura. Exp: datos experimentales.

7.4.2.2. Modelo Cinético II

Los valores de la derivada involucrados en la ecuación a ajustar (Ec. 7.6) fueron calculados a partir de la expresión obtenida con el Modelo I para F_M . Los parámetros obtenidos con el ajuste según el Modelo II, A, B, C y K_e (Tabla 7.3), se compararon con los reportados en el trabajo del cual se extrajo el modelo y de un posterior trabajo en el que también se empleó. En el caso de Camacho et al. (2007) los valores hallados para la acidólisis de trioleína con ácido cáprico a 30 °C fueron: $A= 0.00782$ mol/g h, $B= 2.17$ mol/g h y $K_e =1.26$. Por otra parte, Pacheco et al. (2010) realizando la acidólisis en las condiciones que se mencionó anteriormente, a temperaturas entre 40 y 60°C hallaron: $A= 0.0038-0.0089$ mol/g h, $B= 0.53-3.68$ mol/g h y $K_e =0.64-1.42$. Como puede notarse, los valores encontrados en el sistema actual para el parámetro A resultaron muy inferiores a los reportados en ambos trabajos, mientras que los valores de los parámetros B y K_e se encontraron en el rango de variación de los mismos. El parámetro C (k_L/k_M) se mantuvo muy cercano a 1, lo cual indicó que la reacción entre los diglicéridos y el complejo acil-enzima fue muy rápida y que la temperatura no afectó la probabilidad de contacto entre ellos. Este resultado fue muy similar al reportado por Camacho et al. (2007) y Pacheco et al. (2010). En base a lo anterior, pudo concluirse que en el Modelo II el parámetro A (que involucra la concentración de enzima activa) sería el más afectado por las condiciones de reacción.

Luego que se obtuvo la ecuación correspondiente, por integración numérica de la misma, se consiguió el perfil de F_M en función del tiempo (Fig. 7.9). Claramente se observa que el modelo de parámetros agrupados representó satisfactoriamente el sistema de reacción analizado, lo que indica que este modelo de tres parámetros empíricos fue válido para predecir el comportamiento de la reacción de interés cuando lipasas inmovilizadas en microesferas de quitosano modificadas son empleadas como catalizador.

Tabla 7.3.

Parámetros del Modelo II (Ec. 7.6) para cada temperatura de reacción ensayada y el coeficiente de determinación correspondiente.

T (°C)	A (mol/gh)	B	C	K _e	R ²
50	1.56E-05	2.7124	1.0004	0.4937	0.9308
60	2.93E-05	1.7922	0.9999	2.4034	0.9981

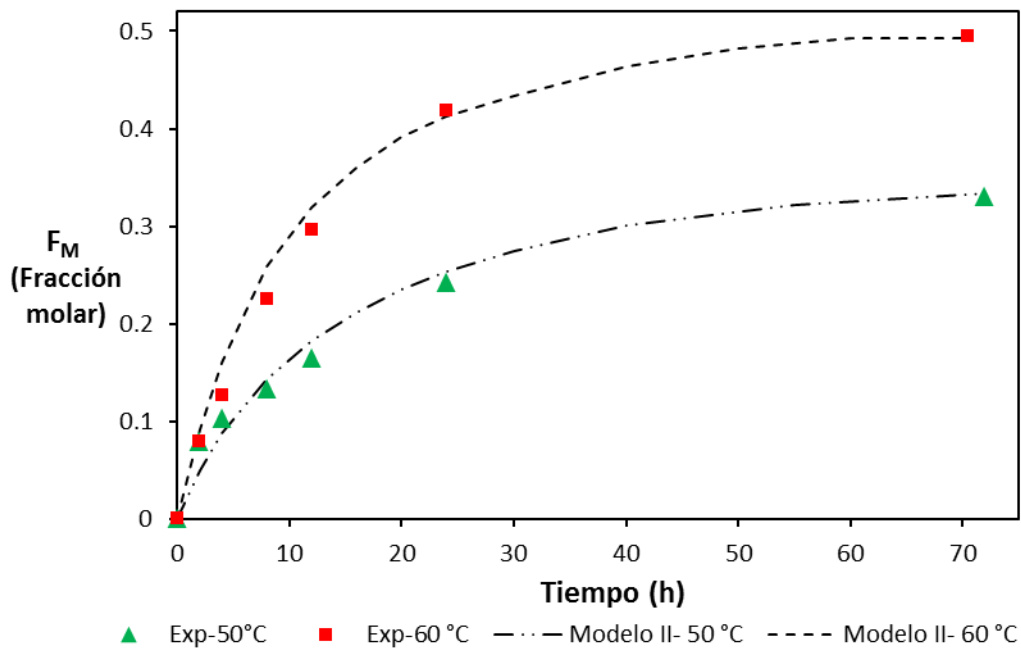


Figura 7.9. Ajuste con Modelo II de la Incorporación de ácidos grasos saturados (F_M) en SO en función del tiempo de reacción y de la temperatura. Exp: datos experimentales.

7.4.2.3. Modelo Cinético III

Los datos de la concentración molar de ácidos grasos libres reactivos (S) en el medio de reacción en función del tiempo son mostrados en la Fig. 7.10, junto con la predicción lograda con el Modelo III. Dado que este modelo sirvió para representar adecuadamente el comportamiento hasta la hora 24 de reacción, solo se representa ese rango de tiempos.

Los parámetros del ajuste se muestran en la Tabla 7.4, y como puede observarse los altos valores de coeficiente de determinación indican que el Modelo III, para ambas temperaturas, describió en forma precisa satisfactoria los datos experimentales. La relación entre los valores de los parámetros V_{R1} and V_{M2} (V_{R1}/V_{M2}) tendió a aumentar con la temperatura (de 1.45 a 50 °C a 1.85 a 60 °C), similar a lo reportado por Pacheco et al. (2010). Este hecho implica que el incremento de temperatura favorece a la velocidad de la reacción de esterificación respecto a la de hidrólisis. Por otro lado, K_{II} también aumenta con la temperatura (300 y 1850, a 50 y 60 °C, respectivamente), reflejando que la formación del complejo entre los compuestos intermedarios y la enzima se ve favorecida con su incremento. Los valores de K_{II} son muy superiores a los reportados por Pacheco et al. (2010); esta diferencia probablemente se deba a que las condiciones de reacción y las características del biocatalizador empleado en ambos trabajos son distintos.

Por otro lado, el hecho de que el Modelo III no pudiera representar el comportamiento del sistema real en todo el rango de tiempos ensayados, podría estar asociado al hecho de que algunos de los supuestos a tiempos mayores dejan de ser válidos.

Tabla 7.4.

Parámetros del Modelo III (Ec. 7.7) para cada temperatura de reacción ensayada y el coeficiente de determinación correspondiente.

T (°C)	$V_{R1}E_T$ (1/h)	$V_{M2}E_T$ (1/h)	K_{II} (1/M)	W_0 (M)	R^2
50	2.180	1.5	300	0.067	0.994
60	14.500	7.8	1850	0.072	0.969

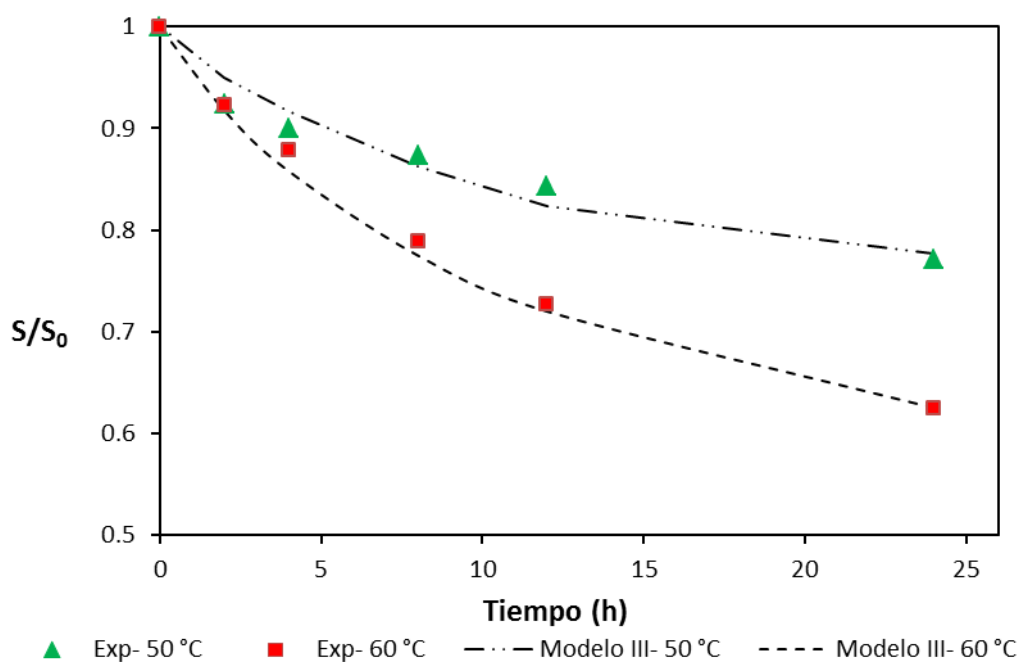


Figura 7.10. Representación de la concentración de ácidos grasos saturados reactivos respecto a la concentración inicial (S/S_0) en el medio de reacción, en función del tiempo y la temperatura de reacción.

7.5. Conclusiones

Las tareas especificadas en este capítulo de tesis estuvieron abocadas a investigar el comportamiento cinético de la acidólisis de aceite de girasol con ácidos grasos saturados, utilizando el biocatalizador preparado mediante la inmovilización de las lipasas de *Rhizomucor miehei* en microesferas de quitosano modificadas. Para ello se cuantificó el nivel de incorporación de ácidos grasos saturados en los productos y la formación de subproductos con el transcurso del tiempo de reacción, para dos temperaturas. Entre los resultados más importantes se destaca que la hidrólisis no fue completa (no se detectó formación de glicerol), que la formación de diglicéridos fue mayor que la de monoglicéridos, y que su contenido en el medio predispondría la incorporación de un ácido de graso sobre otro. La formación de subproductos y de triglicéridos trisaturados se vió favorecida por el aumento de la temperatura. El rendimiento en triglicéridos pudo ser estabilizado para la temperatura óptima, 60 °C, después de 12 h de reacción. Sin embargo, las especies de

triglicéridos continuaron cambiando, lo que indica que se alcanzó para el paso de reacción de hidrólisis la misma velocidad que para el de esterificación. Las especies que se convirtieron en mayoritarias a tiempos prolongados de reacción fueron las agrupadas en la categoría de triglicéridos monoinsaturados (SUS).

Por otro lado, para representar la evolución de la acidólisis en el tiempo fueron probados 3 modelos cinéticos de diferente complejidad, lográndose en todos los casos ajustes muy satisfactorios para los datos experimentales. En el caso puntual del modelo III, solo se logró representar la cinética para tiempos cortos de reacción. Los parámetros de cada uno de los modelos fueron obtenidos para permitir su comparación con datos obtenidos en sistemas similares de reacción en otros trabajos científicos y su implementación en futuras aplicaciones de diseño, optimización y/o control de procesos.

7.6. Nomenclatura

A, B, C	parámetros cinéticos agrupados del Modelo II
E_T	unidades de concentración de enzima (U)
F_M	incorporación de ácidos grasos (mol/mol)
F_{Me}	incorporación de ácidos grasos en el equilibrio (mol/mol)
IG	ácidos grasos en compuestos intermediarios (M)
K_e	constante de equilibrio del Modelo II
K_I	constante cinética del Modelo I (h)
K_{II}	constante cinética del Modelo III (1/M)
m_0	relación molar de sustratos StPFA/TAG (mol/mol)
m_e	masa de biocatalizador (g)

P_r	ácidos grasos liberados (M)
Q	nuevo glicérido formado, producto de la esterificación (M)
S	ácidos grasos reactantes (M)
$-r_s$	velocidad de desaparición de S del medio de reacción (M/h)
t	tiempo de reacción (h)
θ	parámetro de intensidad del tratamiento (g h/mol)
V	volumen de reacción (L)
V_{R1}, V_{M2}	parámetros cinéticos del Modelo III (1/(h U))
W	agua (M)

7.7. Referencias

Balcão V.M., Malcata F.X., Reactors with immobilized lipase: mathematical modeling. In F.X. Malcata (Ed), Engineering of/with Lipases, Kluwer Academic Publishers, London (1996) 435-454.

Camacho F., Robles, A., Camacho B., González P.A., Esteban L., Molina E, Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor, Chemical Engineering Science 62 (2007) 3127-3141.

Carrín M.E., Crapiste G.H., Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture, Journal of Food Engineering 84 (2008) 243 – 249.

Çiftçi O.N., Fadiloğlu S., Göğüş F., Güven A., Genetic programming approach to predict a model acidolysis system, *Engineering Applications of Artificial Intelligence* 22 (2009) 759-766.

Çil M., Büyükbayram A.E., Kıralp S., Toppare L., Yağcı Y., Various applications of immobilized glucose oxidase and polyphenol oxidase in a conducting polymer matrix, *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (2007) 49-55.

Cleland, W. W., The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations, *Biochimical Biophysical Acta* 67 (1963) 104–137

Fomuso, L.B., Akoh, C.C. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor, *Food Research International* 35 (2002), 15-21.

García H.S., Arcos J.A., Keough K.J., Charles G., Hill Jr. C.H., Immobilized lipase-mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and packed bed reactor studies, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) 623–632.

Georgakis C., Chan P. C.-H. Aris R., The design of stirred reactors with hollow fiber catalysts for Michaelis-Menten kinetics, *Biotechnology and Bioengineering* 17(1975) 99–106.

Lee C.-K., Lin K.-C., n-carbamoyl-d-p-hydroxyphenylglycine production using immobilized d-hydantoinase from recombinant E. coli, *Enzyme and Microbial Technology* 19 (1996) 623-627.

Ortega J., López-Hernandez A., García H.S., Hill Jr. C.G., Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid, *Journal of Food Science* 69 (2004), FEP 1-6.

Pacheco C., Crapiste G.H., Carrín M.E., Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: kinetic behavior, *Journal of Food Engineering* 98 (2010) 492 – 497.

Palla C.A., Pacheco C., M.E. Carrín, Production of structured lipids by acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases: Selection of suitable reaction conditions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76 (2012) 106-115.

Reske J., Siebrecht J., Hazebroek J., Triacylglycerol composition and structure in genetically modified sunflower and soybean oils, *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (1997) 989 – 998.

Reyes H.R., Hill Jr. C.G, Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase, *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994) 171-182.

Sahin N., Akoh C.C., Karaali A., Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5779 -5783.

Sauro H.M. *Enzyme Kinetics for Systems Biology* (2011 first edition, Ambrosius Publishing).

Serrano-Vega M., Martínez-Force E., Garcés R., Lipid characterization of seed oils from high-palmitic, low-palmitoleic, and very high-stearic acid sunflower lines, *Lipids* 40 (2005) 369 – 374.

Sharma M., Rastogi N.K., Lokesh B.R., Synthesis of structured lipid with balanced omega-3: omega-6 ratio by lipase-catalyzed acidolysis reaction: optimization of reaction using response surface methodology, *Process Biochemistry* 44 (2009) 1284 – 1288.

Shieh C.J., Akoh C.C., Koehler P., Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists Society* 72 (1995) 619 – 623.

Shimada Y., Suenaga M., Sugihara A. Nakai S., Tominaga Y., Continuous production of structured lipid containing γ -linolenic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of the American Oil Chemists Society* 76 (1999) 189–193.

Torres C. F., Munir F., Lessard L. P., Hill Jr. C. G., Lipase-Mediated Acidolysis of Tristearin with CLA in a Packed-Bed Reactor: A Kinetic Study, *Journal of the American Oil Chemists Society* 79 (2002) 655–661.

Torres C.F., Hill Jr. C.G., Lipase-catalyzed acidolysis of menhaden oil with conjugated linoleic acid: effect of water content, *Biotechnology and Bioengineering* 78 (2002)509–516.

Uragami T., Ueguchi K., Watanabe M., Miyata T., Preparation of urease-immobilized polymeric membranes and their function, *Catalysis Today* 118 (2006) 158-165.

Weiss J.N., The Hill equation revisited: uses and misuses, *The FASEB Journal* 11 (1997) 835-41.

Xu X., Balchen S., Hoy C.E., Adler-Nissen J., Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor, *Journal of the American Oil Chemists Society* 75 (1998a) 1573–1579.

Xu X., Skands A., Høy C., Mu H., Balchen S., Adler-Nissen J., Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design, *Journal of the American Oil Chemists Society* 75 (1998b), 1179 –1186.

Xu X., Balchen S., Høy C.-E., Adler-Nissen J., Pilot Batch Production of Specific-Structured Lipids by Lipase-Catalyzed Interesterification: Preliminary Study on Incorporation and Acyl Migration, *Journal of the American Oil Chemists Society* 75 (1998c) 301-308.

Xu X., Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, *European Journal of Lipids Science Technology* 105 (2003) 289–304.

Xu X., Fomuso L.B., Akoh C.C., Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 3 – 10.

ACIDÓLISIS EN LECHO EMPACADO

8.1. Introducción

Para llevar a cabo la producción de lípidos estructurados en escala industrial son preferibles los procesos continuos a los batch por su alta productividad, el mejoramiento en el rendimiento del producto, y por un mejor control del proceso. Existen varias clases de reactores que pueden emplearse en operaciones continuas tales como: reactor de tanque agitado continuo (CSTR), reactor de lecho empacado (PBR), reactor de lecho fluidizado (FBR) y reactores de membrana (MR). De todos ellos, el PBR ha sido tradicionalmente usado para reacciones catalíticas en gran escala, por su alta eficiencia, bajo costo y su relativa facilidad de construcción, operación y mantenimiento (Kittikun et al., 2008).

Reactores de lecho empacado han sido empleados en una amplia variedad de reacciones enzimáticas para modificación de grasas y aceites, ya sea en escala laboratorio, piloto o industrial. A modo de ejemplo de la utilización de PBR: Hita et al. (2009) llevaron a cabo la producción de lípidos estructurados ricos en ácido docosahexanoico (DHA) en posición *sn*-2, mediante la acidólisis de aceite de atún y ácido caprílico catalizada por lipasa inmovilizadas, obteniendo altas incorporaciones del ácido graso; Torres et al. (2002)

realizaron la acidólisis de triestearina y ácido linoleico conjugado (CLA) catalizada por Lipozyme TL IM logrando conversiones de hasta el 38 %; Jiménez et al. (2010) obtuvieron triglicéridos ricos en ácido palmítico en la posición *sn*-2, mediante acidólisis entre estearina de palma y ácido palmítico; Kittikun et al. (2002) produjeron en forma continua monoglicéridos de oleína de palma por glicerólisis, también empleando lipasas comerciales inmovilizadas; Vikbjerg et al. (2005) obtuvieron fosfolípidos estructurados por acidólisis en continuo de fosfolípidos de soja y ácido caprílico, logrando incorporaciones de alrededor del 30 %.

Teniendo presente la importancia de poder llevar a cabo la reacción de interés en un reactor de lecho empacado, las tareas desarrolladas durante el transcurso de esta tesis fueron realizadas desde un principio teniendo en mente este objetivo como el final del trabajo. Esto se tuvo en cuenta en la preparación del biocatalizador, al definir el tamaño de partícula del soporte así como también la resistencia mecánica que debía tener el mismo; Luego, al realizar una optimización de modo de hallar las condiciones de reacción que permitían obtener máxima incorporación en sistemas con alta concentración de disolvente; y finalmente al evaluar para este escenario, la cinética de reacción junto con la formación de subproductos y triglicéridos deseados, entre otros.

De este modo, en este capítulo se especifican las tareas abocadas al diseño y construcción del reactor de lecho empacado y las consideraciones que debieron realizarse para poder llevarlo a cabo. Luego, se describen los ensayos realizados a fin de producir lípidos estructurados con considerable composición en ácidos grasos saturados y se compara el desempeño logrado con el obtenido en el reactor batch. Finalmente, se lleva a cabo el modelado y simulación de la reacción de acidólisis en el reactor PBR a fin de representar y predecir el comportamiento del sistema.

8.2. Consideraciones generales y antecedentes

El reactor empacado de lecho fijo ha sido hasta el momento el más usado en operaciones en continuo con sistemas de enzimas inmovilizadas. Consiste en un recipiente

cilíndrico, por lo general ubicado en forma vertical, en el cual partículas con enzimas inmovilizadas (biocatalizadores) son introducidas y retenidas. Una corriente líquida conteniendo los sustratos se hace pasar a través del mismo para dar lugar a la reacción. Bajo condiciones de flujo pistón, el reactor empacado produce conversiones más elevadas que el batch, para un mismo tiempo de residencia (Bódalo et al., 1986). El relleno de los lechos empacados enzimáticos puede estar constituido por enzimas inmovilizadas en soportes de diferente geometría, tamaño y material.

En este tipo de reactores el área de contacto fluido-enzima es elevada, pero en contrapartida, pueden aparecer problemas debido a la fuerte caída de presión, sobre todo si las partículas que se introducen en el reactor son deformables o agregativas, pudiendo además producirse una distribución irregular del flujo (Bódalo et al., 1986).

El tiempo que la corriente de sustrato permanece dentro del lecho es denominado tiempo de residencia y está determinado por el volumen hueco disponible para el paso del fluido y el caudal del mismo (Q).

$$\tau = \frac{\pi \cdot r^2 \cdot L \cdot \varepsilon}{Q} \quad (8.1)$$

donde r , L y ε representan el radio interno, la longitud y la porosidad del lecho, respectivamente.

Si bien hay una variedad de trabajos donde diversas reacciones son llevadas a cabo en un reactor de lecho empacado, las variables medidas y los estudios realizados en este tipo de sistemas son acotados. En general se ha analizado el efecto de variables del proceso para el sistema operando en continuo, de modo de optimizar la conversión. En acidólisis más específicamente, se ha analizado el efecto de la relación de sustratos, de la cantidad de disolvente, de la temperatura de reacción, del contenido de agua del medio y del tiempo de residencia en el reactor, sobre la incorporación de un dado ácido graso (Mu et al., 1998; García et al., 2001; Vikbjerg et al., 2005; Kittikun et al., 2007). Por otro lado, se han llevado a cabo estudios abocados a determinar las velocidades de reacción y las constantes cinéticas

aparentes. En estos, diversos caudales de alimentación son empleados, para dar lugar a diferentes tiempos de residencia y en consecuencia distintos grados de incorporación (García et al., 1999; Torres et al., 2002). Asimismo, en otras investigaciones este tipo de reactor ha sido empleado en condiciones específicas a un caudal elevado en modo de recirculación. De esta manera, el sistema operaría como si fuera un reactor batch donde no hay resistencia a la transferencia de masa. Tras determinar el estado estacionario para esta condición, empleando un parámetro que caracteriza la intensidad del tratamiento, denominado IOT, es posible relacionar las condiciones de operación discontinua con las continuas y dilucidar a que caudal se debería trabajar, en continuo, para tener a la salida del lecho un producto con las mismas características que el obtenido durante la operación discontinua, cuando el resto de las variables permanecen constantes. Esto es válido siempre y cuando no hayan resistencias externas a la transferencia de materia. Las ecuaciones para el cálculo del IOT que permiten comparar ambas operaciones o ambos reactores, en el caso de que se use uno batch, son:

$$IOT_{Batch} = \frac{m_L \cdot t}{V \cdot [TAG]_0} \quad (8.2)$$

$$IOT_{Continuo} = \frac{m_L}{Q \cdot [TAG]_0} \quad (8.3)$$

donde m_L , t , V , Q y $[TAG]_0$ representan la masa de biocatalizador utilizada, el tiempo y volumen de reacción, el caudal de operación y la concentración inicial de triglicéridos en la mezcla de reacción, respectivamente.

A modo de ejemplo, Hita et al. (2009) llevaron a cabo la acidólisis de ácido caprílico y aceite de atún empleando lipasas de Palatase 20000L inmovilizadas; inicialmente, recircularon la mezcla de reacción en el reactor de lecho empacado a un caudal de 200 ml/h. En estas condiciones determinaron una incorporación en el equilibrio de 53% de ácido caprílico para un IOT de 2730 g lipasa h/mol TAG. Luego, relacionando las ecuaciones 8.2 y 8.3, estimaron el caudal necesario trabajando en continuo para lograr el mismo nivel de incorporación, 63 ml/min. Al poner en práctica esto y comparar las incorporaciones

alcanzadas, pudieron determinar la existencia de resistencia a la transferencia de masa al operar en modo continuo. Vale destacar que el IOT es generalmente informado en unidades de tiempo.

Con menor frecuencia, algunos trabajos han desarrollado el modelado matemático de la reacción en el lecho empacado, incorporando balances de masa y en algunos casos de energía, cinéticas enzimáticas, cinéticas de desactivación si se requiere y, si la partícula que compone el relleno es un sólido poroso el transporte de masa intrapartícula también ha sido tomado en cuenta (Carrara y Rubiolo, 1997; Mammarella y Rubiolo, 2006; Berendsen et al., 2007). Cabe mencionar que, al momento, no se han hallado antecedentes de modelado de reactores empacados usados en reacciones de acidólisis, donde las expresiones cinéticas del tipo Michaelis-Menten no son aplicables.

8.3. Diseño y construcción del reactor de lecho empacado

El diseño del reactor de lecho empacado a escala laboratorio se desarrolló tomando como base otros reactores de este tipo reportados en la literatura y en función de consideraciones prácticas, tales como cantidad de biocatalizador disponible, volumen de mezcla reactiva a emplear, caudales suministrados por la bomba, etc.

Las características de alguno de los lechos empacados reportados en la literatura, empleados en reacciones de acidólisis u otra similar para modificación de lípidos, son mostrados en la Tabla 8.1. Como puede notarse las dimensiones son relativamente similares, al igual que los caudales empleados.

Tabla 8.1.

Características de los lechos empacados de laboratorio, publicados en la literatura.

Diámetro (cm)	Altura (cm)	Biocatalizador		Caudal/ tiempo de residencia (ml/min) / (min)	Referencia
		Cantidad (g)	Tipo		
0.64	10	1.9	Lipozyme TL IM	N.I./N.I.	Torres et al. (2002)
0.66	25	2/3	Lipozyme RM IM	0.5 - 3.33 / 0.96 - 7.67	Camacho et al. (2007)
0.68	25	1.5	PS/Accurel EP- 100	0.01 - 0.06 / 150 - 900	Kittikun et al. (2008)
1.13	10	3.26	Chirazyme L-2	N.I. / 10 - 720	Garcia et al. (2001)
1.5	15	6	Lipozyme IM	0.5 - 3.33 / 0.96 - 7.67	Camacho et al. (2007)
2.1-2.6	19.6-23	36-48	Lipozyme TL IM	0.1 - 1.1 / 48 - 780	Vikbjerg et al. (2005)
2.5	25	14.1	Rd y Palatase20000L /Accurel MP1000	0.42 - 3.33 / N.I.	Hita et al. (2009)
2.6	38	58	Lipozyme IM	0.09 - 2.8 /13- 425	Mu et al. (1998)
6.6	23.5	2.5/ 56	QLM/tierras de diatomeas	1.42 - 3.33 / N.I.	Jimenez et al. (2010)

N.I. = no informado

Un párrafo aparte merece el hecho de que la reacción de interés en esta tesis es llevada a cabo empleando hexano como solvente. Si bien su uso se debe a que disminuye la viscosidad del medio y permite que el mismo sea homogéneo gracias a la adecuada solubilización del aceite de girasol y de los ácidos grasos saturados, dada su inflamabilidad y toxicidad el volumen a emplear debe ser lo más bajo posible. Adicionalmente, en la mayoría de los trabajos de modificación de aceites y grasas llevados a cabo en reactores de lecho empacado usando solventes, los medios de reacción se emplean diluidos en gran manera,

generalmente relaciones alrededor de 1:10 (m/v) sustratos/hexano. Esto evita que en el caso que hubiese un punto más frío en el sistema, la mezcla solidifique generando taponamientos y aumentos de presión. Teniendo presente esta situación de compromisos, los componentes del reactor fueron diseñados de modo de tener un bajo volumen de mezcla dentro del sistema y manteniendo las condiciones de reacción determinadas como óptimas, en base a consideraciones prácticas, especificadas en el Capítulo 6.

8.3.1. Componentes del reactor de lecho empacado

A continuación se detallan los componentes del reactor de lecho empacado, y sus características, los cuales pueden ser identificados esquemáticamente en la Fig. 8.1.

- *Reactor.* El reactor consistió en una columna de vidrio de 12 cm de alto y 0.9 cm de diámetro interno, con una camisa exterior, la cual fue conectada a un baño recirculador de agua para controlar la temperatura (Fig. 8.2.A). La base de la columna estuvo formada por un disco de vidrio con perforaciones de menor diámetro que las partículas del relleno, de forma tal de sostener el lecho biocatalizador y permitir el ingreso de la corriente de sustratos. La parte superior fue diseñada de forma desmontable de modo de posibilitar el llenado de la columna con el biocatalizador. Adicionalmente, se realizaron perforaciones en un disco interno de la pieza superior desmontable para permitir el paso de la mezcla de reacción y contener las partículas del lecho que pudieran llegar hasta este punto.

- *Reservorio para sustratos.* El mismo fue realizado en vidrio contando con una camisa del mismo material, la cual fue conectada al baño de agua termostatizado (Fig. 8.2.B). Para evitar la evaporación del hexano de la mezcla de reacción, se construyó una tapa con cuatro orificios del diámetro de las mangueras empleadas. Estos orificios permitieron la salida de sustratos, el ingreso de los mismos cuando se trabajó con bypass, la toma de muestras y el escape de gases (para evitar la presurización del sistema) mediante una manguera conectada a una columna de vidrio ubicada en el exterior, para su posterior condensación.

- *Reservorio para producto.* Cuando el sistema operó en continuo el producto de reacción fue recolectado y almacenado en un recipiente. A tiempos intermedios, cuando se requirió tomar muestra de la corriente de salida, estas fueron recolectadas directamente en recipientes especiales.

- *Caja controladora de temperatura del aire.* Para evitar pérdidas de calor debido a la diferencia de temperatura entre el sistema de reacción y el ambiente, todos los componentes del lecho, salvo la bomba, fueron introducidos en una caja de acrílico especialmente construida. Las dimensiones de la caja fueron: 90 cm de alto, 35 cm de ancho y 43 cm de profundidad y la misma se colocó dentro de una campana de extracción de laboratorio. El calor al interior de la caja se suministró mediante lámparas lumínicas y se distribuyó mediante un microventilador. Todas las conexiones eléctricas fueron realizadas en el exterior de la caja. El acceso al interior de la caja fue posible mediante una puerta frontal. Por otra parte, mientras la misma permanecía cerrada el sistema se mantenía prácticamente hermético. Algunas perforaciones fueron requeridas en la caja, estas se usaron para: la salida hasta la bomba de la manguera que conectaba el reservorio con el lecho, la entrada y salida de las mangueras auxiliares que se conectaban al baño termostatzado, salida de la perilla de la válvula reguladora de caudal, entrada de la sonda medidora de temperatura del aire, salida de la manguera que se conectaba a la columna condensadora de vapores de hexano. Cuando fue necesario, el sellado de los orificios se realizó con pegamento siliconado.

- *Controlador de la temperatura interior del aire de la caja.* Un sistema controlador de temperatura fue conectado a las fuentes de calor de la caja de modo de regular la intensidad de la energía suministrada. Para ello, una sonda acoplada al controlador registraba en forma continua el valor de esta variable. El punto de ajuste (set point) suministrado fue de alrededor de 42 °C.

- *Mangueras.* Las mangueras empleadas para trasladar la mezcla entre los componentes principales del sistema fueron seleccionadas para su uso con solventes. Las mismas fueron de Vyton de 0.8 cm de diámetro interno (Masterflex) aptas para uso con

solventes y altas temperaturas. Las mangueras auxiliares, para el transporte del agua caliente, se seleccionaron de modo que no fueran afectadas por el calor.

- *Mangueras de contención.* Las mangueras del circuito que transportó la mezcla de reacción fueron recubiertas por mangueras de PVC transparente cristal de modo de que sirvieran de elemento contenedor en el caso de ruptura. Adicionalmente, el aire entre ambas mangueras se aprovechó como aislante, para evitar la pérdida de calor.

- *Baño termostatzado con controlador de temperatura.* Baño (Alpha RA 8, Lauda) (Fig. 8.2.C).

- *Bomba peristáltica.* La bomba empleada (BPX-DS500) fue seleccionada de modo que las mangueras no quedaran totalmente estranguladas en su cabezal (Fig. 8.2.D). La misma contó con regulador de velocidad permitiendo suministrar diversos caudales.

- *Válvula reguladora y medidora de caudal.* Una válvula con estas características (Thermo Scientific Gilmont) fue empleada para controlar manualmente el caudal que pasaba por el lecho.

Todas las uniones entre las mangueras y los componentes del sistema fueron correctamente aseguradas, para evitar pérdidas, mediante el empleo de abrazaderas regulables. Adicionalmente, cabe mencionar que inicialmente se hicieron determinaciones de la caída de presión generada en el lecho a distintos caudales; como los resultados demostraron que estas eran muy bajas, se optó por no mantener este dispositivo durante todas las experiencias para evitar así sumar más complicaciones inherentes a las distintas uniones físicas.

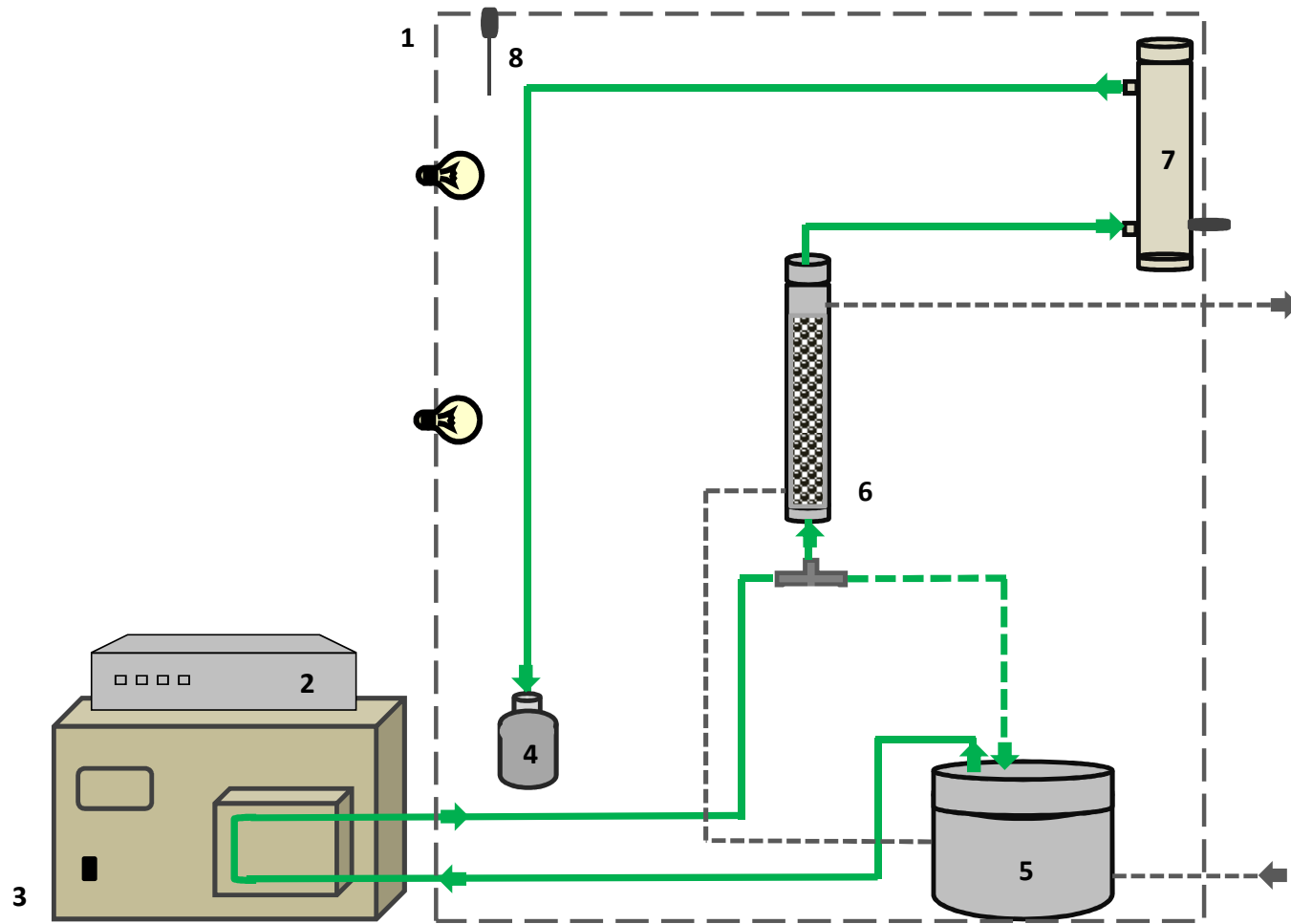


Figura 8.1. Esquema del reactor de lecho empacado operando en continuo. Principales componentes: (1) caja controladora de temperatura, (2) controlador de la temperatura del aire interior, (3) bomba peristáltica, (4) reservorio de producto, (5) reservorio de sustrato, (6) columna encamisada con lecho de lipasas inmovilizadas, (7) válvula medidora reguladora de caudal, (8) sonda para medición de temperatura. En línea punteada gris la corriente calefactora.

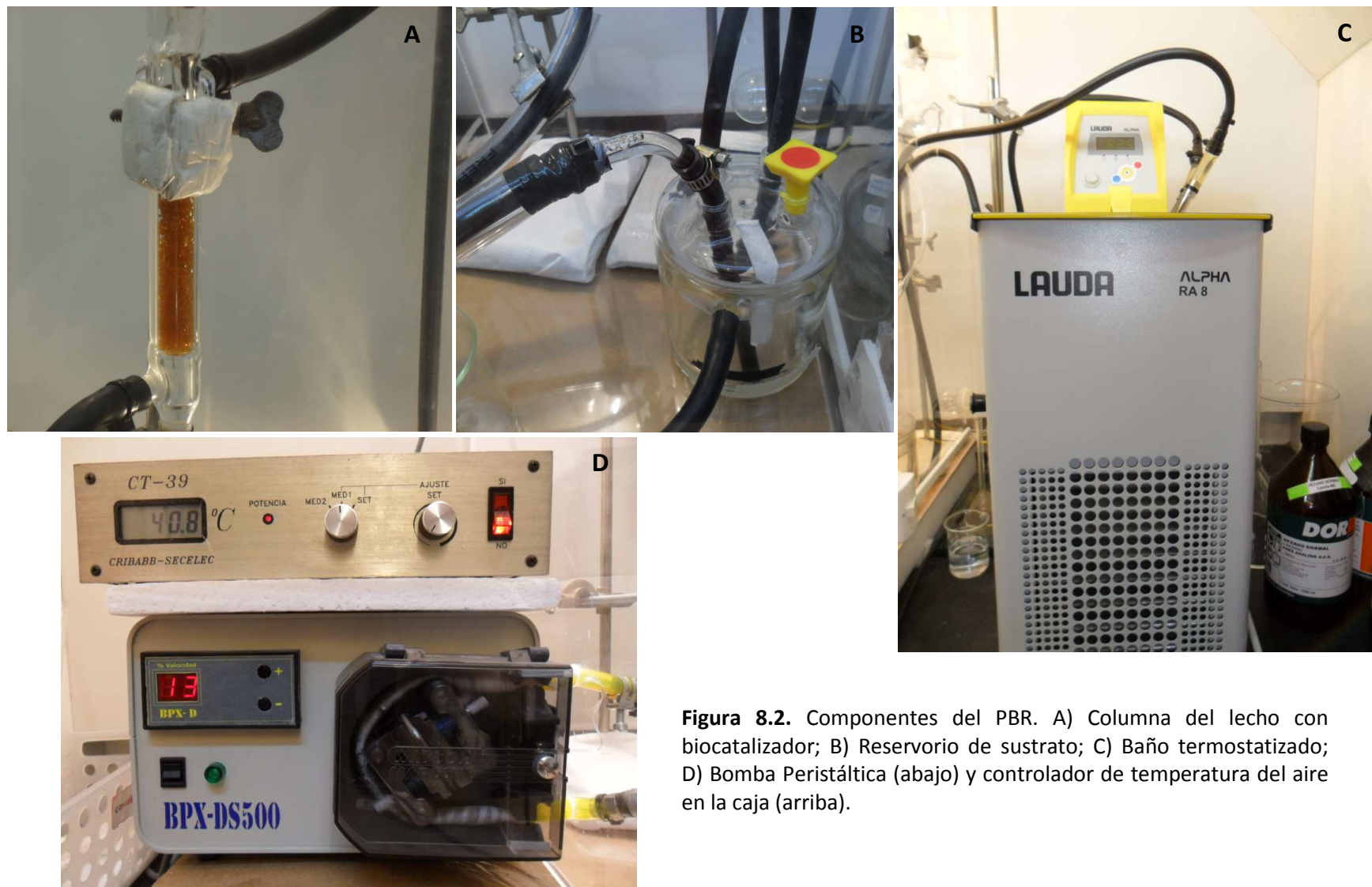


Figura 8.2. Componentes del PBR. A) Columna del lecho con biocatalizador; B) Reservorio de sustrato; C) Baño termostatzado; D) Bomba Peristáltica (abajo) y controlador de temperatura del aire en la caja (arriba).

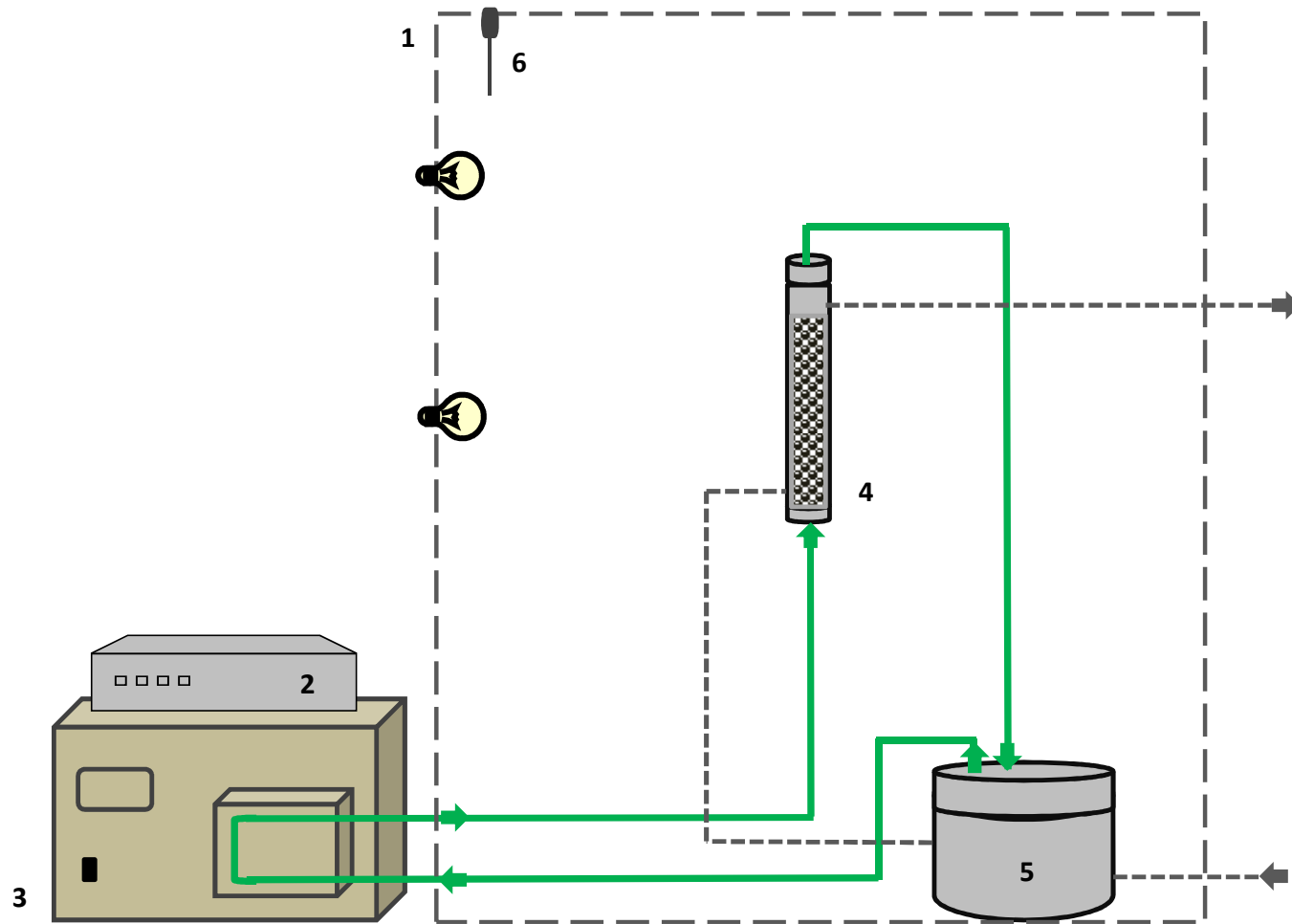


Figura 8.3. Esquema del reactor de lecho empacado operando en modo recirculación. Principales componentes: (1) caja controladora de temperatura, (2) controlador de la temperatura del aire interior, (3) bomba peristáltica, (4) columna encamisada con lipasas inmovilizadas, (5) reservorio de sustratos, (8) sonda para medición de temperatura. En línea punteada gris la corriente calefactora.

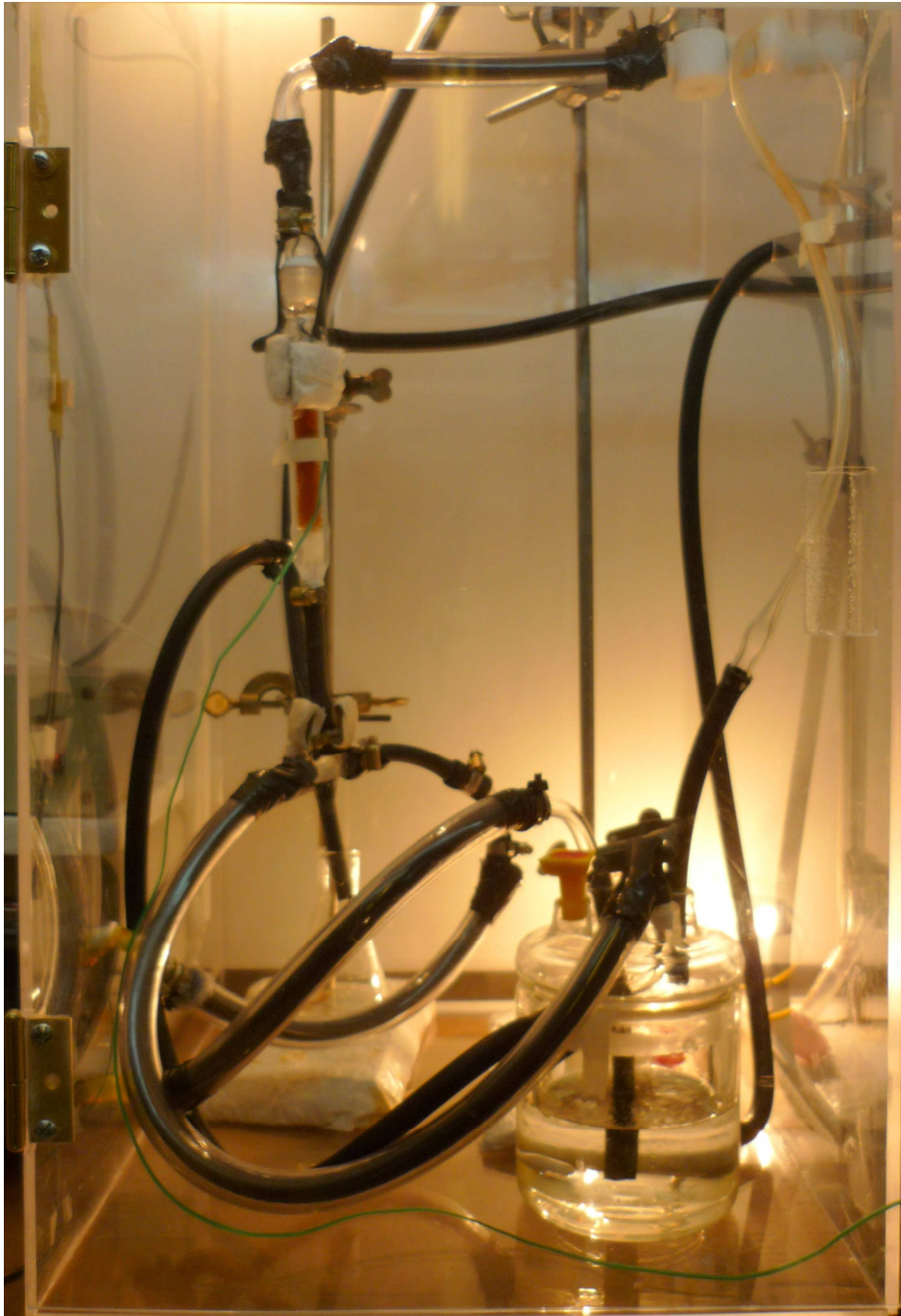


Figura 8.4. Reactor de lecho empacado con biocatalizador, en funcionamiento en modo continuo.

8.4. Operación del reactor de lecho empacado

El procedimiento para poner en funcionamiento el lecho consistió inicialmente en introducir una dada cantidad de biocatalizador, 4.73 g de microesferas de quitosano modificadas del tipo QM1-1.5 (nomenclatura en Capítulo 5), conteniendo lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas, en el interior del lecho. La altura de lecho alcanzada fue de 9 cm. Posteriormente, se procedió a calentar el aire contenido en la caja controladora y se puso en funcionamiento el baño termostatzado de modo de favorecer el calentamiento de los componentes principales. La mezcla de reacción preparada en el momento fue introducida en el reservorio de sustratos y mantenida allí hasta alcanzar la temperatura de reacción. Cada ensayo comenzó cuando la mezcla de sustratos se alimentó, mediante la bomba peristáltica, al lecho. Para producir bajos caudales en el lecho parte de la mezcla impulsada fue derivada al recipiente de sustratos, ya que si por el cabezal de la bomba (ubicado fuera de la caja termostatzada) se hacía circular esta mezcla a muy bajo caudal se corría el riesgo de tener solidificación de los ácidos grasos saturados.

La introducción del medio de reacción se realizó por la parte inferior de la columna, ya que de este modo se minimiza la compresión del lecho y el atascamiento de partículas en los orificios de pasaje (Shin et al., 1998). Luego de que un volumen de mezcla igual a 2 veces el volumen vacío del reactor fue pasado a través del mismo se dio inicio al registro de tiempo de reacción. Esta práctica, habitual para este tipo de configuraciones, se hizo con el propósito de eliminar el aire presente en el reactor (Garcia et al., 2001).

Si bien inicialmente se había previsto realizar la agitación magnética de la solución contenida en el reservorio de sustratos, en los dos modos operativos utilizados y descriptos a continuación se observó que el movimiento generado por la corriente de retorno a dicho reservorio fue suficiente para mantener la homogeneidad de la solución de sustratos.

8.4.1. PBR en recirculación

La operación en modo discontinuo se realizó conectando el conducto que salía del lecho directamente al recipiente conteniendo la solución de los sustratos (Fig. 8.3). La

reacción fue monitoreada tomando muestras en el reservorio de sustratos a diferentes tiempos entre 5 y 47 h. El caudal empleado fue de 10 ml/min. La mezcla de reacción fue preparada en las proporciones determinadas como óptimas en el estudio desarrollado en el Capítulo 6 (3 mol StPFA/mol SO y 14.87 ml hexano/g sustratos), y se partió de un volumen total de solución de sustratos de 100 ml. La temperatura de reacción fue de 60 °C.

8.4.2. PBR en continuo

La operación en continuo implicó la recolección del producto de reacción tras su paso por el lecho (Figs. 8.1 y 8.4). Diversos caudales fueron empleados, los cuales se regularon y determinaron mediante la válvula dispuesta para tal efecto. La reacción fue monitoreada tomando muestras de la corriente de salida a diferentes tiempos comprendidos entre 1 y 8 h, según el caudal empleado, de modo de asegurarse de haber alcanzado el estado estacionario. La solución de sustratos inicial y la temperatura de reacción fueron iguales a las descriptas en la Sección 8.4.1.

8.4.3. Determinación de la fracción vacía (ϵ)

Un parámetro requerido para realizar la comparación de desempeño entre el PBR y el batch, a través del parámetro IOT, y en el modelado de los reactores de lecho empacado es la fracción hueca dentro del lecho, ya que permite conocer cual es el volumen disponible para el paso de la mezcla de reacción dentro del reactor. Su determinación se realizó de modo similar a lo propuesto por Vikbjerg et al. (2005). Para ello se colocó el biocatalizador dentro de una probeta hasta una altura determinada y se registró el peso obtenido. Luego se agregó hexano hasta ese mismo nivel y se tomó el nuevo peso. Por diferencia entre el peso final e inicial, se calculó la masa de hexano presente y empleando el valor de su densidad se halló el volumen del mismo, el cual correspondió al volumen hueco (V_{Hueco}). Luego, con las dimensiones de la probeta (área de base y altura de lecho de partículas) se calculó el volumen total (V_{Total}). La fracción hueca se determinó relacionando ambas cantidades, según:

$$\varepsilon = \frac{V_{Hueco}}{V_{Total}} \quad (8.4)$$

8.5. Modelado y simulación del sistema reacción-reactor

En el desarrollo de modelos matemáticos para reactores enzimáticos de lecho empacado pueden hacerse algunas suposiciones que simplifican el análisis matemático considerablemente; estas son:

- Dada las bajas temperaturas óptimas de las lipasas inmovilizadas, y las bajas entalpías de las reacciones, el proceso en el lecho se mantiene en condiciones isotérmicas (Bódalo et al., 1986).
- Las microesferas con lipasas inmovilizadas se encuentran distribuidas de manera uniforme, por lo tanto, no hay variaciones de la actividad enzimática entre dos puntos cualesquiera del reactor (Berendsen et al., 2007).
- En los reactores isotérmicos tubulares puede suponerse una contribución despreciable de la dispersión turbulenta longitudinal en relación con el transporte debido al flujo global, así como que no hay gradientes de concentración en la dirección radial (Bódalo et al., 1986).
- Las partículas catalíticas son esféricas y empacadas al azar en el interior del reactor (Berendsen et al., 2007).
- La desactivación térmica no es tomada en cuenta, ya que las lipasas de *Rhizomucor miehei* en su estado inmovilizado muestran muy buena estabilidad a altas temperaturas.
- La desactivación debida al tiempo en uso no es incorporada, considerando que el biocatalizador fue empleado durante el periodo de tiempo estipulado en el cual su actividad permanece constante (Capítulo 5).

8.5.1. Balance de materia

La ecuación matemática que describe la concentración de sustrato en la corriente líquida a lo largo de un reactor de lecho empacado isotérmico, en el estado estacionario y en condiciones de flujo pistón, es la siguiente (Carrara y Rubiolo, 1997):

$$U \cdot \frac{d[S]}{dZ} = v \quad (8.5)$$

Con la condición de borde: $S(Z = 0) = S_0$

donde S es la concentración de sustrato, ácidos grasos palmítico y esteárico, en el seno de la corriente líquida, Z es la posición a lo largo del reactor, U es la velocidad superficial del fluido en el lecho y v es la velocidad de reacción.

8.5.2. Velocidad de reacción

Las expresiones que describen la cinética de la acidólisis de aceite de girasol y la mezcla de ácidos grasos libres catalizada por lipasas de *Rhizomucor miehei* inmovilizadas en las microesferas de quitosano modificadas (QM1-1.5), para las condiciones de reacción: 3 mol StPFA/mol SO, 14.87 ml hexano/g sustratos, 1.58 g biocatalizador/g sustratos, son los modelos detallados en el Capítulo 7. Sin embargo, dos de éstos se encuentran definidos en términos del tiempo de reacción, con lo que necesitan ser reescritos en términos de la concentración de sustrato. En lo que al Modelo I se refiere, el cambio de variable conduce a la ecuación de Michaelis-Menten y como ya se mencionó para reacciones de acidólisis ésta no logra ajustar los puntos experimentales, con lo cual no pudo ser empleada. Por otra parte, modelos cinéticos en el que intervienen un gran número de variables, al ser resueltos en simultáneo con el resto de las ecuaciones que modelan el comportamiento del reactor, puede dificultar la resolución de las ecuaciones. En consecuencia, fue necesario realizar la transformación de las ecuaciones involucradas; a continuación se detallan los procedimientos realizados.

8.5.2.1. Modelo Cinético II expresado en S

La expresión asociada al Modelo II (Ec.7.6), que describe la fracción molar de ácidos grasos palmítico y esteárico respecto a los glicéridos totales (F_M) como función de la variable θ (coincidente con la expresión del IOT), es:

$$\frac{dF_M}{d\theta} = \frac{A[(2-3F_M)(m_0-3F_M)-(1/K_e)(3F_M)^2]}{[B(3F_M)+(m_0-3F_M)][(BC)(3F_M)+(m_0-3F_M)]} \quad (8.6)$$

$$\theta = \left(\frac{m_e}{V[TG]_0} \right) t \quad (8.7)$$

La relación entre la concentración de los ácidos palmítico y esteárico en los glicéridos producto de reacción ($[P_r]$) y en el medio está dada por:

$$[P_r] = [S_0] - [S] \quad (8.8)$$

donde $[S_0]$ y $[S]$ son las concentraciones de ácidos palmítico y esteárico en el medio de reacción, inicial y para un tiempo dado, respectivamente.

La concentración de producto en función de F_M es:

$$[P_r] = F_M \cdot (3 \cdot [TAG] + 2 \cdot [DAG] + [MAG]) \quad (8.9)$$

Asumiendo que la concentración de ácidos grasos en los glicéridos en el tiempo puede representarse como un valor promedio en todo el rango de tiempo, pudiendo expresarse en función de la concentración inicial de ácidos grasos en los triglicéridos afectada por un parámetro a ajustar, n , queda:

$$n \cdot 3 \cdot [TAG_0] = (3 \cdot [TAG] + 2 \cdot [DAG] + [MAG]) \quad (8.10)$$

$$F_M = \frac{[S_0] - [S]}{3 \cdot n \cdot [TAG_0]} \quad (8.11)$$

Dado que la relación de concentraciones molares iniciales entre los ácidos grasos saturados libres y el aceite de girasol, siendo este último compuesto formado al momento prácticamente por triglicéridos, fue de 3:1 (relación estequiométrica impuesta experimentalmente), se tiene:

$$[S_0] = 3 \cdot [TAG_0] \quad (8.12)$$

$$F_M = \frac{1}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \quad (8.13)$$

$$\frac{dF_M}{dt} = -\frac{1}{3 \cdot n \cdot [TAG_0]} \cdot \frac{d[S]}{dt} \quad (8.14)$$

Del modelo (Ecs. 8.6 y 8.7) se tiene:

$$\frac{dF_M}{dt} = \frac{dF_M}{d\theta} \cdot \frac{d\theta}{dt} = \frac{A \left[(2 - 3F_M)(m_0 - 3F_M) - (1/K_e)(3F_M)^2 \right]}{[B(3F_M) + (m_0 - 3F_M)][(BC)(3F_M) + (m_0 - 3F_M)]} \cdot \left(\frac{m_e}{V[TAG]_0} \right) \quad (8.15)$$

Igualando las expresiones 8.14 y 8.15 se obtiene:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{3 \cdot n \cdot m_e}{V} \cdot \frac{A \left[(2 - 3F_M)(m_0 - 3F_M) - (1/K_e)(3F_M)^2 \right]}{[B(3F_M) + (m_0 - 3F_M)][(BC)(3F_M) + (m_0 - 3F_M)]} \quad (8.16)$$

Expresando en la ecuación anterior F_M en términos de S , se tiene la expresión de velocidad en términos de S para el Modelo II:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{A^* n \cdot \left[\left(2 - \frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) \left(m_0 - \frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) - (1/K_e) \left(\frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right)^2 \right]}{\left[B \left(\frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) + \left(m_0 - \frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) \right] \left[(BC) \left(\frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) + \left(m_0 - \frac{3}{n} \cdot \left(1 - \frac{[S]}{[S_0]} \right) \right) \right]} \quad (8.17)$$

donde: $A^* = \frac{3 \cdot A \cdot m_e}{V}$

8.5.2.2. Modelo Cinético III simplificado

El Modelo cinético III (Ec. 7.7) se encuentra definido en términos de la concentración de los ácidos grasos palmítico y esteárico en el medio de reacción, con lo cual no fue necesario realizar en este sentido ningún tipo de modificación. No obstante, una forma simplificada de la ecuación del modelo puede desarrollarse a fin de facilitar el manejo matemático requerido para modelar el reactor.

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{(V_{R1}E_T[S][IG] - V_{M2}E_T[Q]([W_0] - [IG_f]))}{(1 + K_{II}[IG])([S] + [P_r])} \quad (8.18)$$

$$[S_0] = [S] + [P_r] = \text{constante} \quad (8.19)$$

$$[IG_f] = [IG] - [IG_0] \quad (8.20)$$

$$[Q] = [P_r] - [P_{r_0}] \quad (8.21)$$

donde V_{R1} , V_{M2} y K_{II} son parámetros cinéticos que junto con la concentración inicial de agua (W_0) son obtenidos del ajuste; IG e IG_0 corresponden a la concentración de ácidos grasos en los glicéridos intermediarios (mono y diglicéridos) en el medio de reacción al tiempo t e inicialmente, respectivamente, mientras que IG_f corresponde a la concentración de ácidos grasos en los glicéridos intermediarios formados hasta el tiempo t ; y Q corresponde a la concentración de ácidos grasos en los nuevos glicéridos formados, producto de la esterificación.

Asumiendo que la concentración de glicéridos intermediarios se mantiene constante durante la reacción, pudiendo expresarse en función de la concentración de triglicéridos inicial afectada por un parámetro a ajustar, j , queda:

$$[IG] = 3j \cdot [TAG_0] \quad (8.22)$$

Empleando lo anterior, junto con el hecho que la concentración inicial de glicéridos intermediarios es prácticamente despreciable, la Ec. 8.18 puede ser escrita en su forma simplificada como:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{(V_{R1}E_T[S] \cdot 3j \cdot [TAG_0] - V_{M2}E_T([S_0] - [S])) \cdot ([W_0] - 3j \cdot [TAG_0])}{(1 + K_H \cdot 3j \cdot [TAG_0])[S_0]} \quad (8.23)$$

8.5.3. Resistencia a la transferencia de materia

Cuando la concentración de sustrato disponible en el microambiente de la enzima es menor a la del medio líquido, se puede hablar de la existencia de una resistencia de masa externa que limita la velocidad de reacción. En este caso, la concentración disponible de sustrato se denomina S_i , y la forma en la que interviene en la reacción esta dada por la siguiente ecuación, en la que se asume que no existe un efecto de partición dado que el sustrato no tiene una carga neta que modifique su distribución entre el líquido y el microambiente (Carrara y Rubiolo, 1997):

$$v = k_s a ([S] - [S_i]) \quad (8.24)$$

donde k_s es el coeficiente de transferencia de masa y a el área de las partículas por unidad de volumen del lecho, que puede ser estimada empleando la siguiente ecuación:

$$a = \frac{6(1 - \varepsilon)}{d_p} \quad (8.25)$$

siendo d_p el diámetro promedio de las microsferas y ε la fracción vacía del lecho.

Cuando la resistencia a la transferencia de masa debe ser incorporada en el modelado del reactor, las expresiones cinéticas deben escribirse en términos de la variable S_i en vez de S , por ser la concentración real disponible para la catálisis enzimática.

8.6. Resultados y discusiones

8.6.1. PBR en recirculación

El perfil de composiciones de ácidos grasos palmítico y esteárico en los glicéridos (% P+St) en función de la intensidad del tratamiento, IOT, para el reactor de lecho empacado operando en modo de recirculación se muestra en la Fig. 8.5. Adicionalmente se han representado los puntos experimentales correspondientes a la reacción realizada en modo batch a la misma temperatura y empleando una mezcla de reacción de igual concentración, para comparación. Como puede apreciarse, los datos mostraron el mismo comportamiento para todo el rango de IOT con el que se operó el PBR en recirculación, quedando así demostrado que cuando el reactor de lecho empacado trabaja a altas velocidades se obtiene un mezclado perfecto en el que no existen resistencias externas a la transferencia de materia. Cabe mencionar que, para el caudal empleado el lecho no permaneció fijo sino que tuvo lugar la fluidización de las partículas, lo que favoreció en gran manera al mezclado.

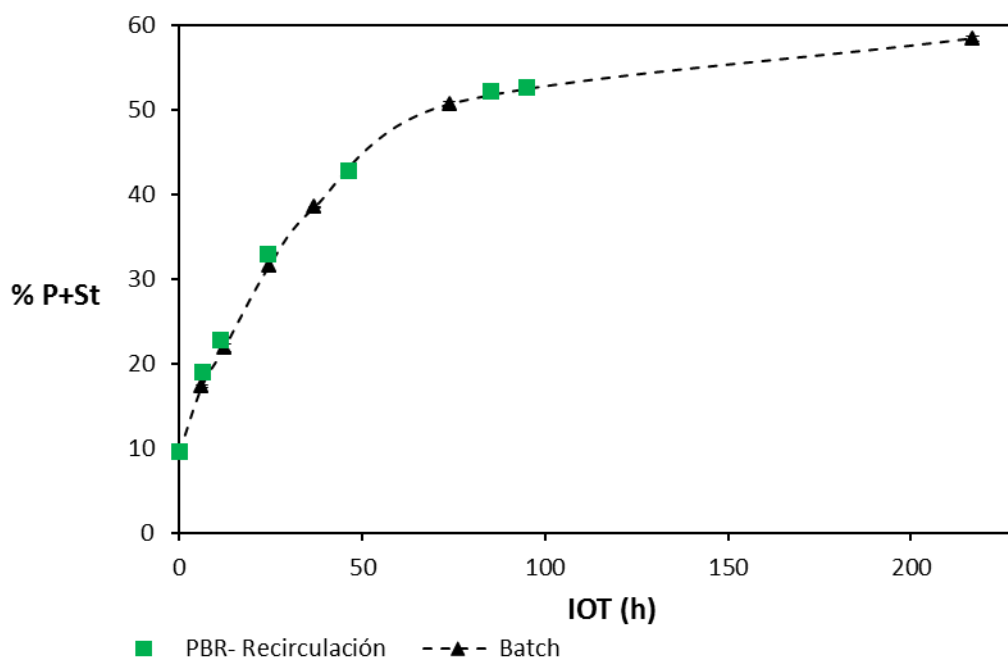


Figura 8.5. Variación de la composición en ácidos grasos palmítico y esteárico en los glicéridos (% P+St) del producto de reacción obtenido en el lecho operando en recirculación ($Q=10$ ml/min) y en reactor batch. Condiciones de reacción: 3 mol StPFA/mol SO, 1.58 g QM1-1.5/g sustratos, 14.87 ml hexano/g sustratos, 60°C.

8.6.2. PBR en continuo

La Fig. 8.6 muestra la composición de ácidos palmítico y esteárico en los glicéridos a la salida del lecho empacado operando en modo continuo para un caudal de 0.009 ml/min, a diferentes tiempos desde que se dio comienzo a la reacción. Como puede observarse, a tiempos cortos tiene lugar la salida de productos que poseen las incorporaciones más bajas debido a que el sistema aún no se encuentra equilibrado. A medida que transcurre el tiempo, el producto de salida corresponde a una mezcla que ha alcanzado la composición de estado estacionario; la cual se estabiliza tras las 4 h de reacción, correspondiéndose con el tiempo de residencia para estas condiciones (3.18 h, calculado mediante la Ec. 8.1).

La representación de las composiciones en ácidos grasos saturados de los productos de salida, en estado estacionario, cuando el reactor se operó en caudales comprendidos entre 0.009 y 0.2 ml/min es dada en la Fig. 8.7.A. A cada uno de estos puntos experimentales le correspondió un perfil de concentraciones del tipo de la Fig. 8.6 que no es aquí mostrada. Como puede apreciarse la incorporación se incrementó a medida que los caudales disminuyeron, dado que esto permitió mayores tiempos de residencia dentro del reactor. Los caudales más altos tuvieron un menor tiempo de contacto con las lipasas. Resultados en concordancia fueron reportados por Garcia et al. (1999), Torres et al. (2002) y Chen et al. (2011). Por otro lado, un notable aumento tuvo lugar para los caudales más bajos empleados, comprendidos entre 0.009 y 0.02 ml/min, la cual mereció un análisis que es realizado más adelante. La mayor composición de ácidos palmítico y esteárico lograda en el lecho operando en continuo fue de 19.24 %.

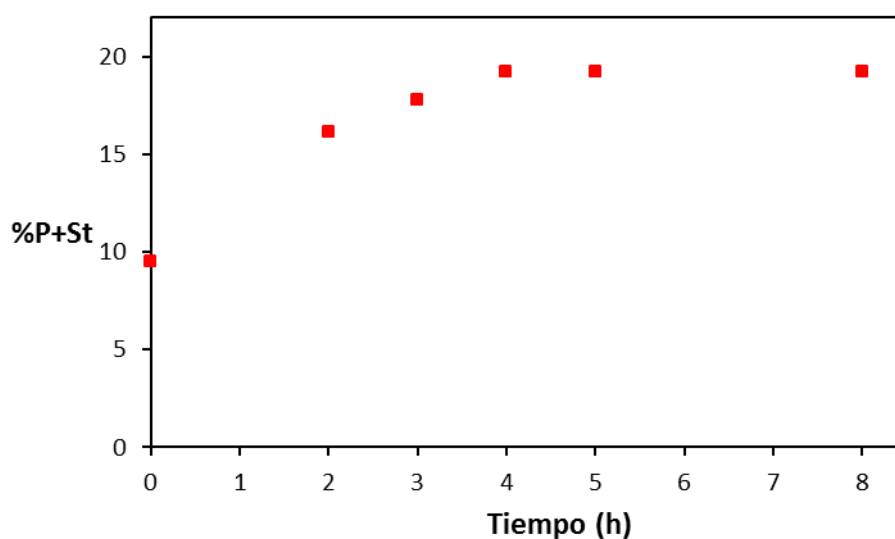


Figura 8.6. Composición en ácidos grasos palmítico y esteárico en los glicéridos (% P+St) del producto de salida del reactor operando en continuo, a un caudal de 0.009 ml/min.

La Fig. 8.7.B muestra la composición de estos productos representada en función de la intensidad del tratamiento, IOT. A partir de la forma de esta curva se puede deducir que para los IOT que se pudieron ensayar (ya que por las condiciones del sistema no era posible lograr y registrar menores caudales) se estaría en una zona de velocidad inicial, ya que la pendiente fue prácticamente la misma desde el IOT de 78.97 h hasta el último, 263.25 h. Esto demuestra que si se deseara alcanzar la composición de equilibrio lograda en el sistema batch sería necesario usar caudales aún menores. Un aspecto interesante a señalar es que a nivel industrial es deseable operar en esta condición de máxima velocidad de reacción, para lo cual se emplean varios lechos empacados en serie de modo de aumentar la conversión final (Nie et al., 2006; Halim et al., 2009).

Por otra parte, para lograr mayores incorporaciones manteniendo los caudales empleados, se podría pensar en diseñar una columna para el lecho con una mayor longitud, que permita incorporar mayor cantidad de biocatalizador y así aumente los tiempos de residencia.

La comparación de la modificación alcanzada al emplear las diferentes configuraciones de reactor (batch, lecho empacado operando en continuo y lecho empacado operando en recirculación) es mostrada en la Fig. 8.8. Para un mismo IOT se esperaría misma composición de ácidos palmítico y esteárico en los productos de reacción, independientemente del reactor, si es que no existe resistencia externa a la transferencia de materia. Pero, como puede apreciarse, mientras que esta condición se alcanzó operando el reactor a altos caudales (modo en recirculación), no ocurrió lo mismo cuando se trabajó a bajos caudales, en continuo. Esto último denota la existencia de una resistencia a la transferencia de materia que gobierna la velocidad de reacción y que hace que para mismos valores de IOT la incorporación lograda por la lipasa sea bastante menor.

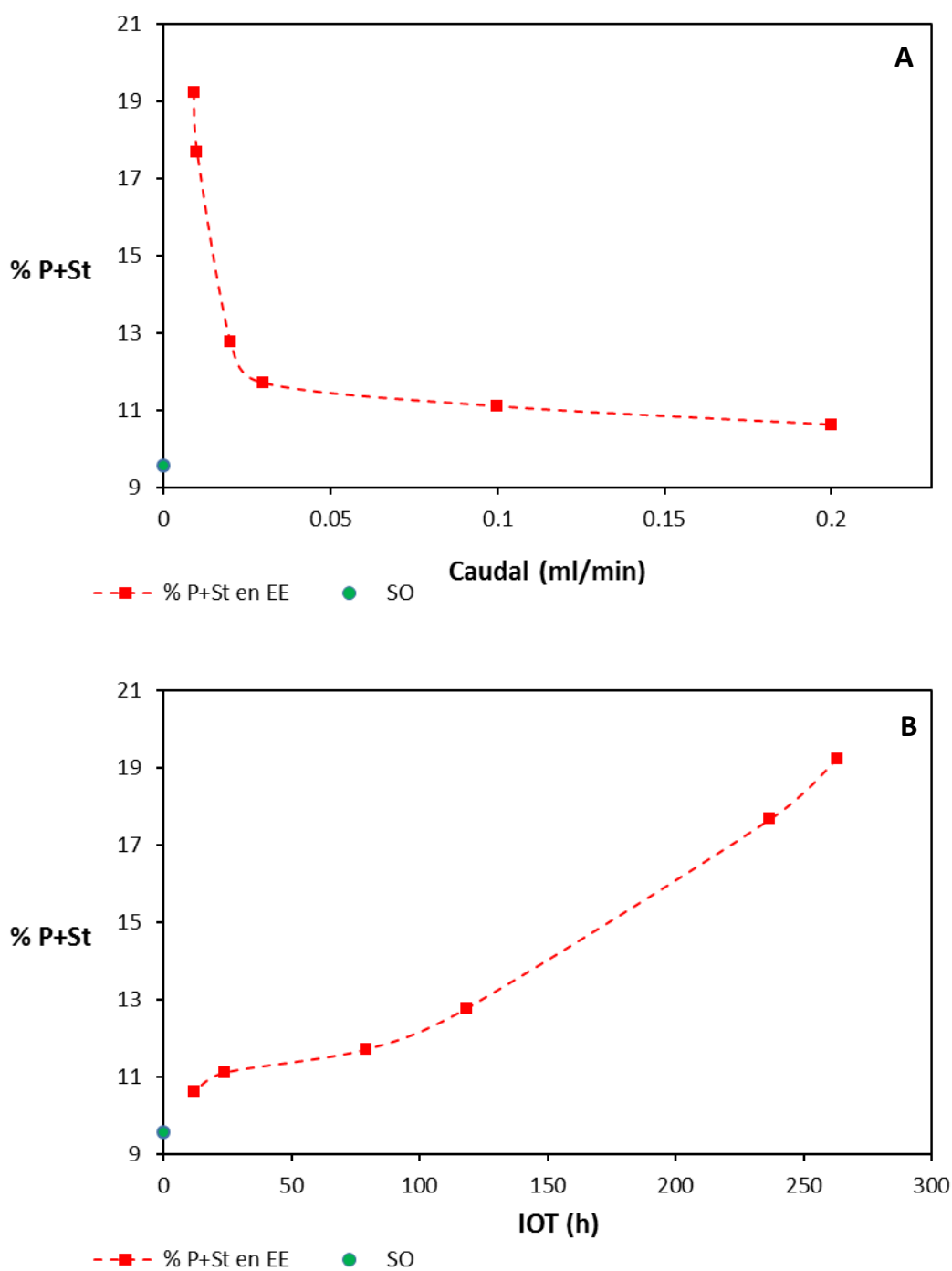


Figura 8.7. Composición de estado estacionario en ácidos grasos palmítico y esteárico en los glicéridos (% P+St) de los productos de salida del reactor operando en continuo, como una función de: A) Caudal empleado, B) IOT.

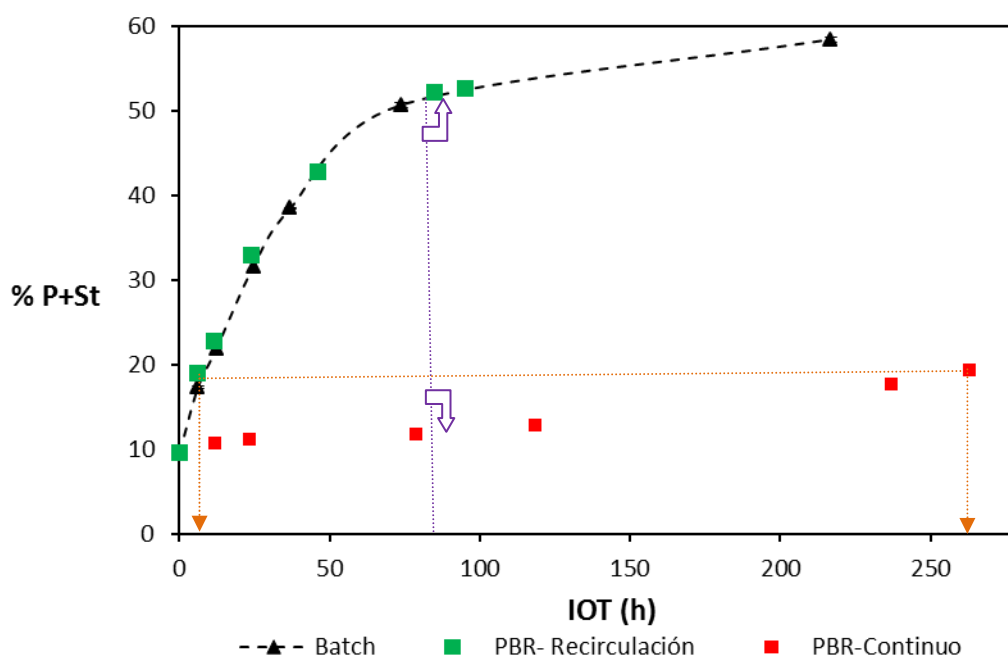


Figura 8.8. Comparación de la actividad alcanzada en los diferentes reactores ensayados. En línea punteada violeta se marca para un valor específico de IOT, los valores de composición asociados. En línea punteada naranja se indica para una misma composición, los IOT asociados.

Para cuantificar la diferencia asociada por llevar a cabo la reacción en el lecho empacado operando en continuo en vez del reactor batch, se procedió a relacionar los IOT correspondientes a una misma composición de ácidos saturados en el producto de reacción. La línea punteada naranja en la Fig. 8.8 representa gráficamente esta comparación. Para ello se calculó una eficiencia, E, la cual se determinó en base a la siguiente expresión:

$$E = \frac{IOT_{Batch}|_{P+St=x}}{IOT_{Continuo}|_{P+St=x}} \quad (8.26)$$

La Fig. 8.9 representa gráficamente los valores hallados en función del caudal empleado en el PBR operando en continuo.

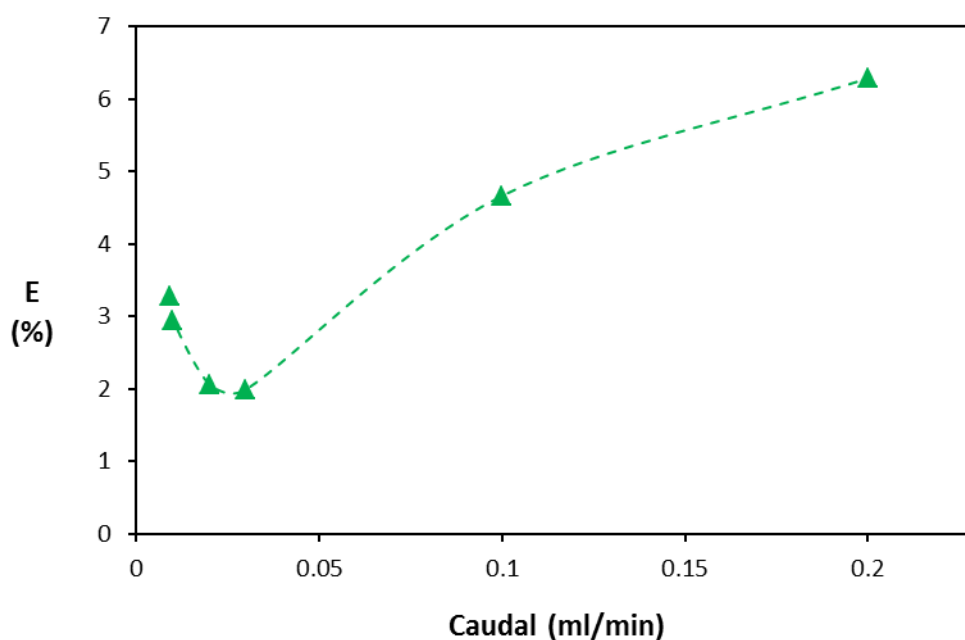


Figura 8.9. Eficiencia (E) de la reacción llevada a cabo en el reactor de lecho empacado operando en continuo, respecto del batch.

Como puede apreciarse, si bien las eficiencias fueron bajas, los valores mayores se dieron en los valores extremos de los caudales ensayados. Es esperado que al trabajar en un reactor de lecho empacado la eficiencia de la reacción aumente cuando el caudal se incrementa debido a que disminuye el efecto de la resistencia a la transferencia de materia, pero por otro lado, mayores caudales dan lugar a tiempos de contacto menores con la enzima, con lo cual el fenómeno que más influya de estos dos es el que termina definiendo la eficiencia del proceso. En el caso de los caudales altos la eficiencia fue mayor porque la reacción se vio favorecida por una menor resistencia a la transferencia de materia (Camacho et al., 2007), mientras que a bajos caudales, la eficiencia se incrementó debido al mayor contacto con la lipasa (Chei et al., 2011).

Cabe mencionar que por inspección visual del biocatalizador tras cada uso pudo comprobarse que el mismo no sufrió roturas ni desgaste durante la operación, con lo cual se cumplió con el objetivo de tener un biocatalizador resistente para su empleo en reactores de lecho empacado.

8.6.3. Modelado y simulación del sistema reacción-reactor

Con el propósito de representar el comportamiento real del reactor enzimático de lecho empacado usado para la acidólisis de aceite de girasol y la mezcla de ácidos grasos saturados, se llevaron a cabo tareas de simulación y modelado.

La simulación consistió en predecir la composición del producto de reacción para cada punto del lecho incluyendo la salida, cuando no existe resistencia externa a la transferencia de materia y por ende la velocidad de reacción es la dada por el modelo cinético. En este caso la ecuación del balance de materia (Ec. 8.5) es igualada a la expresión de velocidad dada por el modelo cinético y se asume que la concentración de sustrato a lo largo del reactor ($S(z)$) es la misma que se encuentra disponible para la lipasa.

Por otro lado, el modelado consistió en describir al mejor grado posible los puntos experimentales del sistema, al incorporar el efecto de la resistencia externa a la transferencia de materia. En este caso se resolvieron en forma conjunta el balance de masa (Ec. 8.5), la ecuación que describe este fenómeno de resistencia (Ec. 8.24) y la expresión de velocidad dada por el modelo cinético correspondiente. Este último, expresado en términos de S_i , ya que ésta corresponde a la concentración de sustrato en el microambiente de la lipasa y por ende la disponible para la reacción. En la resolución matemática, el parámetro k_s se ajustó de modo de obtener para un determinado caudal el valor de S hallado experimentalmente.

Tanto el modelado como la simulación fueron resueltos empleando el software Maple 15 (Waterloo Maple Inc., Canadá).

Tabla 8.2. Parámetros del sistema reactor-reacción empleados en el modelado y la simulación.

Radio interior de la columna (cm)	0.45
Longitud de la columna (cm)	9
Área de la columna(cm ²)	0.64
Fracción hueca (ϵ)	0.3
Área de partículas /volumen de lecho, (a)(cm ² /cm ³)	0.7035
Diámetro de partícula promedio (cm)	0.1675
Masa de biocatalizador (g)	4.73 g
$S_0 \times 10^3$ (M)	112.45
Parámetros cinéticos del Modelo II	
A^* (mol/g h L)	0.00901
B	1.79221
C	0.99998
K_e	2.40342
Parámetros cinéticos del Modelo III	
$V_{R1}E_T$ (1/h)	9.147
$V_{M2}E_T$ (1/h)	7.850
W_0 (M)	0.037
K_{II} (1/M)	1850.0
Parámetros de ajuste	
n	1.0432
j	0.1100

La Tabla 8.2 muestra los parámetros característicos del reactor, del biocatalizador, de los modelos cinéticos y del ajuste, n y j , representando así toda la información requerida para llevar a cabo el modelado y la simulación. Recordará el lector, que los parámetros n y j fue introducido para simplificar los Modelos II y III, de forma que la concentración en el

tiempo de los ácidos grasos en los glicéridos y de los glicéridos intermedios, respectivamente, pudieran ser expresadas como un valor constante, afectando por este valor a la concentración inicial de triglicéridos. Para poder hallar un valor adecuado para n , los datos experimentales correspondientes a la acidólisis realizada en batch, ajustados en el Capítulo 7, fueron usados con la concentración de sustrato como variable independiente, y empleando la Ecs.8.17 con los parámetros correspondientes de la Tabla 8.1. De este modo, n se obtuvo como el valor que permitió representar mejor, esos datos experimentales. El ajuste logrado se muestra en la Fig. 8.10. El valor obtenido para n fue 1.0432 y el ajuste resultó sensible a este parámetro.

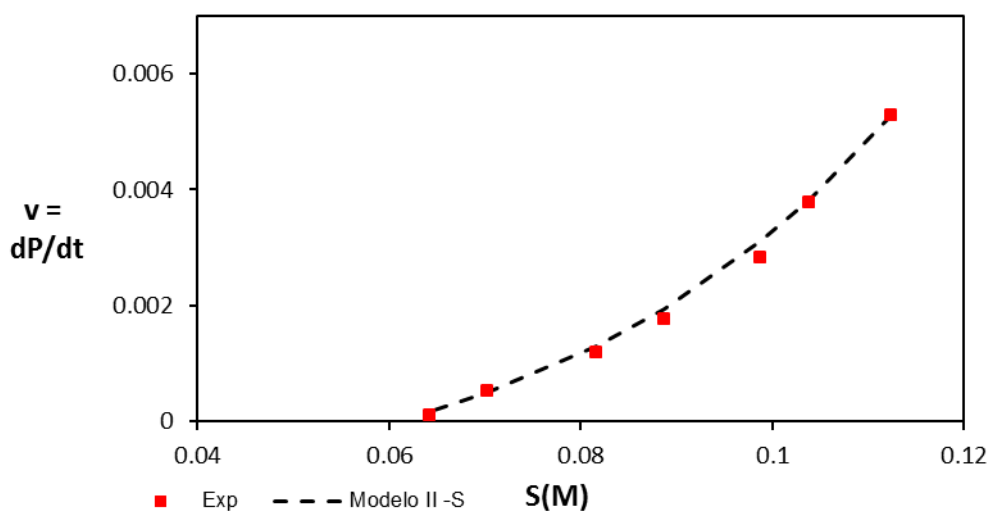


Figura 8.10. Ajuste de los datos experimentales de la reacción llevada a cabo en batch empleando el Modelo II en S , $n=1.0432$.

De modo similar se procedió para hallar j empleando la Ec. 8.23 y hallando nuevos parámetros cinéticos. Estos valores son mostrados en la Tabla 8.2. En este caso, el valor obtenido para el parámetro j , 0.11, está directamente relacionado con la proporción de glicéridos intermedios formados durante el transcurso de la reacción respecto a la concentración inicial de triglicéridos. Más aún, coincide con el valor promedio de esta relación en todo el tiempo de reacción. Cabe mencionar que la simplificación impuesta a

través de la inclusión de este parámetro en el modelo cinético no afectó la bondad del ajuste (coeficiente de determinación ajustado=0.95).

Una vez que se dispuso de los parámetros de ajuste requeridos en los modelos cinéticos, se procedió a realizar la simulación del reactor de lecho empacado. Los resultados empleando cada una de las cinéticas propuestas se muestran en la Fig. 8.11. Como puede notarse, ambas simulaciones describieron de manera muy similar el comportamiento real del sistema; la representación del comportamiento para la zona de altos caudales fue relativamente aceptable, mientras que se alejaron considerablemente de los valores experimentales en el rango de caudales más bajos. En esta zona, predijeron menor cantidad de ácidos grasos saturados en la mezcla de reacción, lo que correspondería a mayores incorporaciones; este resultado se relaciona directamente con el hecho de no haber considerado el efecto negativo de la resistencia externa a la transferencia de masa.

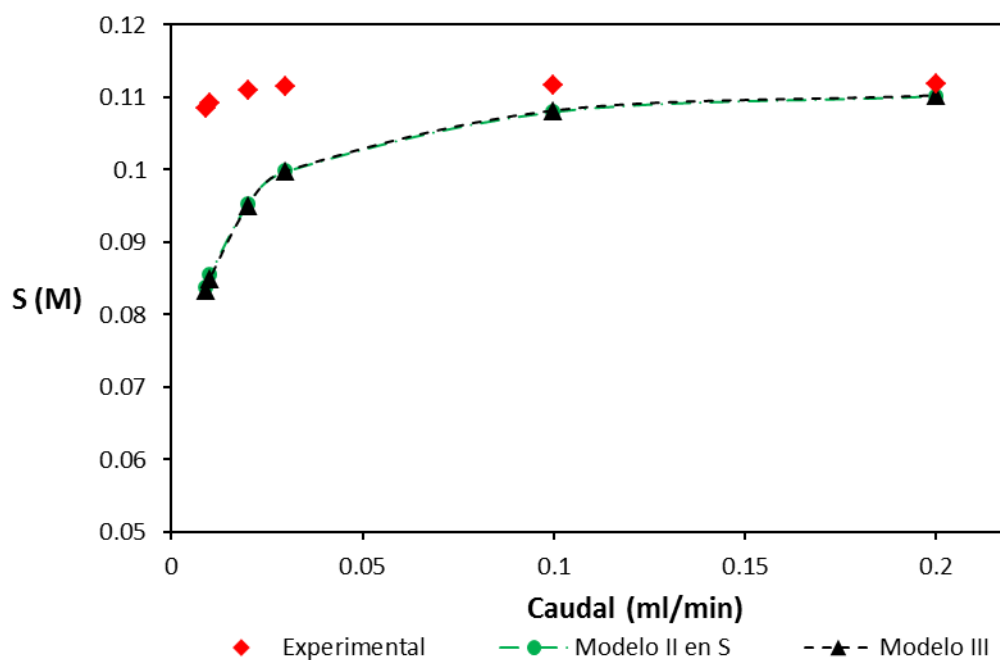


Figura 8.11. Simulación de la concentración de sustrato a la salida del PBR.

Al realizar el modelado del reactor de lecho empacado, se impuso el ajuste mediante la determinación del coeficiente k_s , el cual fue calculado para cada caudal en cada una de las cinéticas empleadas. En consecuencia, se pudieron representar en forma sumamente precisas todos los puntos experimentales del sistema, tal como lo indica la Fig. 8.12.

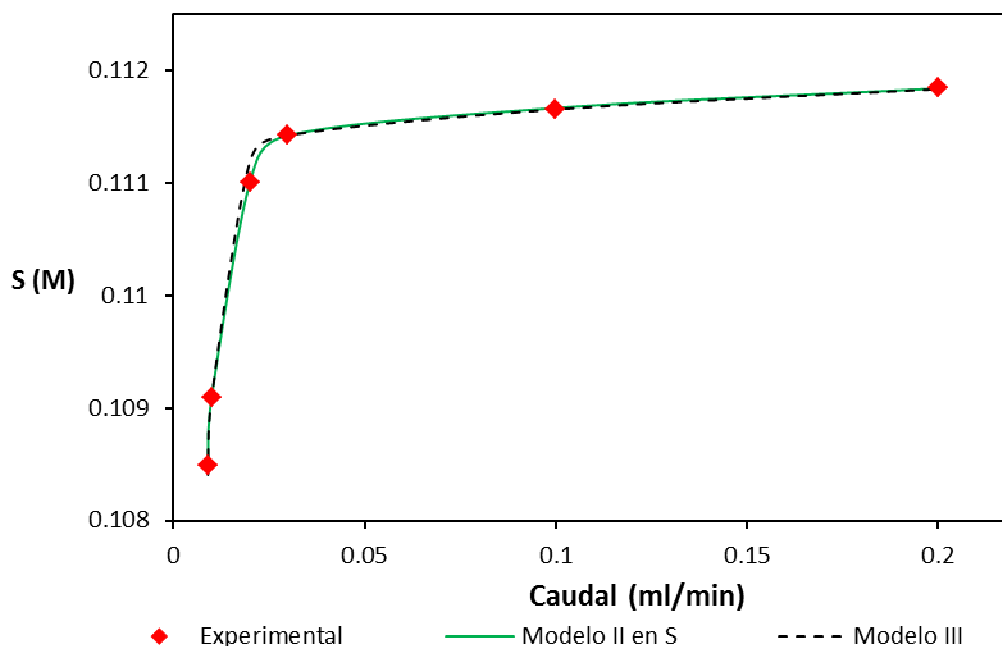


Figura 8.12. Modelado de la concentración de sustrato a la salida del PBR, considerando la resistencia a la transferencia de masa.

Los valores de k_s obtenidos en cada ajuste fueron representados en términos de la velocidad superficial del lecho, según el modelo cinético usado para describir la velocidad de reacción (Fig. 8.13). En teoría, valores de k_s mayores están asociados a resistencias externas a la transferencia de masa más bajas. Justamente, esto fue lo que se obtuvo para las velocidades superficiales mayores. Sin embargo, el valor del coeficiente k_s pareciera mantenerse prácticamente constante o incluso presentar una leve tendencia a aumentar para la región de velocidades superficiales más bajas. Esto podría explicarse si se piensa que este parámetro fue usado para ajustar los modelos a los puntos experimentales; por ende, k_s en este caso estaría siendo no solo un parámetro que permite cuantificar el efecto de la resistencia a la transferencia de masa sino también el efecto del contacto de la lipasa con el

sustrato. Este hecho se hizo evidente experimentalmente ya que, para ningún caudal se logró mantener el lecho completamente cubierto de líquido (los pulsos generados por el accionar de la bomba peristáltica originaban la formación de algunas burbujas dentro del lecho). Este fenómeno se vio disminuido cuando los caudales empleados eran menores, acorde a las menores velocidades usadas en estos casos en la bomba. Por ende, una disminución de la cantidad de burbujas permitió un mejor contacto entre biocatalizadores y sustratos, lo que también se vio favorecido por los mayores tiempos de residencia. En consecuencia, los valores de k_s obtenidos aquí deben considerarse como valores aparentes ya que reflejan más de un fenómeno.

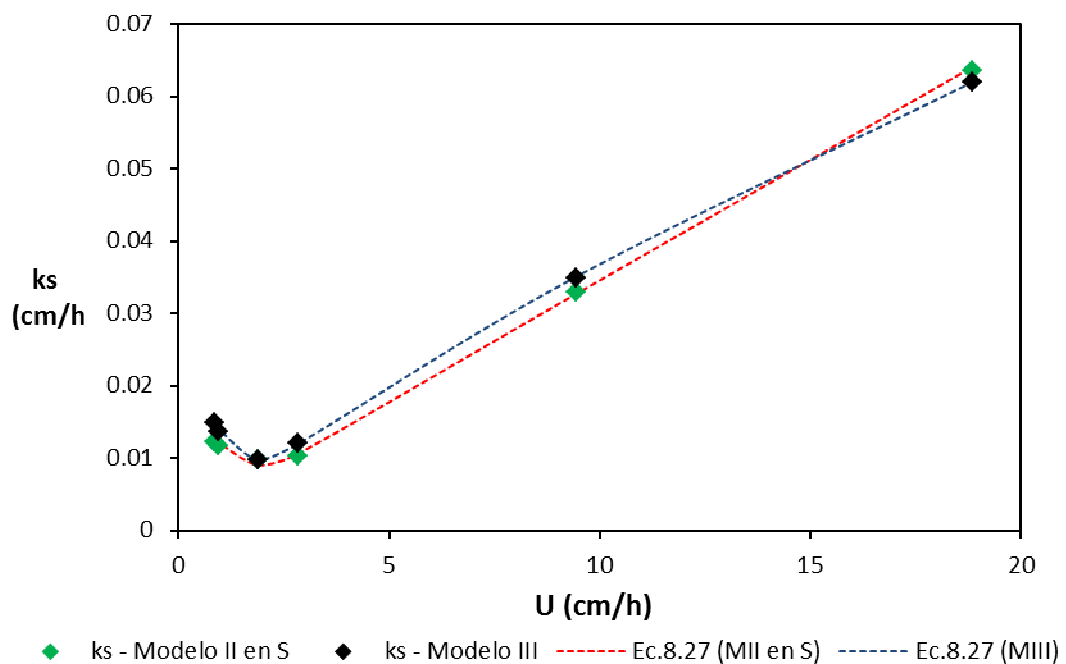


Figura 8.13. Coeficiente k_s en función de la velocidad superficial en el lecho. Se incluyen los modelos propuestos para describir su comportamiento (Ec. 8.27) cuando se emplea en el modelado del reactor el Modelo Cinético II en S (MII en S) o el modelo III (MIII).

Prácticamente, mismos valores de k_s fueron necesarios para representar los resultados experimentales al emplear ambos modelos cinéticos, en concordancia con el

hecho de que mostraron un alejamiento similar de los valores experimentales en la Fig. 8.11.

A fin de disponer de una expresión que represente a k_s en función de la velocidad superficial en el lecho (U), el software Origin 8.0 fue empleado. La ecuación que mejor logró describir a k_s en el rango estudiado fue del tipo polinómica, siendo la expresión asociada:

$$k_s = A \cdot |U - U_c|^p + k_{s0} \quad (8.27)$$

donde A , U_c , p y k_{s0} representan parámetros de ajuste del modelo.

La precisión de los modelos desarrollados para k_s en función de la velocidad superficial fue muy alta, considerando los valores del coeficiente de determinación. La Tabla 8.3 muestra estos valores en conjunto con los parámetros determinados para cada modelo cinético.

Tabla 8.3. Parámetros para el modelado de k_s en función de la velocidad superficial en el lecho, que debe emplearse en forma acoplada a cada cinética.

	A	U_c	p	k_{s0}	R^2
Modelo II en S	0.00337	2.12651	0.99669	0.00825	0.99916
Modelo III	0.00509	2.12946	0.83711	0.00820	0.99938

8.7. Conclusiones

Con este capítulo se finalizan las tareas abocadas al estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores batch y en continuo, para esta tesis. Como pudo notarse, mientras que el primero, el reactor empleado en la mayor parte del trabajo experimental, fue extremadamente sencillo en su conformación, el diseño y construcción de un reactor de lecho empacado fue una tarea compleja en el que muchas consideraciones debieron tomarse en cuenta. Esto se hizo a fin de desarrollar un proceso seguro desde el punto de

vista operativo y que pudiera ser empleado durante un lapso considerable de tiempo. Una vez que el reactor fue realizado, resultó fácil de operar y su uso tuvo como ventaja que el biocatalizador permaneció confinado en la columna del reactor.

Los productos de reacción obtenidos en el reactor de lecho empacado operando en continuo no alcanzaron una composición tan alta en ácidos palmítico y esteárico como se logró trabajando en el reactor batch. Esto se debió a que tuvo lugar la resistencia externa a la transferencia de masa, que el contacto biocatalizador-sustratos no fue el óptimo y que adicionalmente los tiempos de residencia no fueron lo suficientemente elevados. Para mejorar estos resultados se propone cambiar el sistema de bombeo y la construcción de una columna rellena de mayor longitud o el empleo de reactores en serie.

Mientras que la simulación de la operación del reactor solo logró representar adecuadamente el comportamiento en los caudales más altos, el modelado del sistema logró llevarse a cabo de manera muy precisa para todos los caudales empleados; esto gracias a emplear un coeficiente de transferencia de masa aparente como parámetro de ajuste. Este coeficiente aparente no solo contempla el efecto de la resistencia de transferencia de materia sino también el de la eficiencia de contacto biocatalizador-sustratos, disminuida principalmente por la generación de burbujas. De esta forma y recalculando este coeficiente de transferencia de masa aparente con el uso de otro sistema de bombeo, el modelado matemático en conjunto con los otros parámetros obtenidos, podrían ser usados en el desarrollo de procesos a mayor escala para producir lípidos estructurados mediante una tecnología "verde" que se vale de la capacidad de componentes biológicos para la transformación del aceite de girasol hacia productos grasos semisólidos.

8.8. Nomenclatura

S: concentración de sustrato (M), representa la concentración de los ácidos grasos palmítico y esteárico en el seno de la corriente líquida.

Z: coordenada axial (cm)

U: velocidad superficial del fluido en el lecho (cm/s)

v: velocidad de reacción (M/s)

k_s : coeficiente de transferencia de masa (cm/h)

ϵ : fracción hueca, también denominada porosidad.

a : área de partículas /volumen de lecho (cm²/cm³)

IG: concentración de ácidos grasos en los glicéridos intermediarios (M)

IG_f: concentración de ácidos grasos en los glicéridos intermediarios formados (M)

8.9. Referencias

Berendsen W.R., Lapin A., Reuss M., Non-isothermal lipase-catalyzed kinetic resolution in a packed bed reactor: Modeling, simulation and miniplant studies, Chemical Engineering Science 62 (2007) 2375-2385.

Bódalo A., Gomez J.L, Cabanes A.L., Gómez E., Bastida J., Análisis y simulación de reactores de lecho fijo para sistemas de enzimas inmovilizadas, Secretariado de Publicaciones, Universidad de Murcia, (1986).

Camacho F., Robles, A., Camacho B., González P.A., Esteban L., Molina E, Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor, Chemical Engineering Science 62 (2007) 3127-3141.

Carrara C.R., Rubiolo A.C., A method for evaluating lactose hydrolysis in a fixed bed reactor with β -galactosidase immobilized on chitosan, *Chemical Engineering Journal* 65 (1997) 93-98.

Chen H.-C., Ju H.-Y., Wu T.-T, Liu Y.-C., Lee C.-C., Chang C., Chung Y.-L., Shieh C.-J., Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and enzyme reuse study, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011.

Garcia H.S., Arcos J.A., Keough K.J., Hill Jr. C.G., Immobilized lipase-mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and packed bed reactor studies, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (2001) 623-632.

Garcia H.S., Keough K.J., Arcos J.A., Hill C.G., Continuous interesterification of butteroil and conjugated linoleic acid in a tubular reactor packed with an immobilized lipase, *Biotechnology Techniques*, 13 (1999) 369-373.

Halim S.F.A., Kamaruddin A.H., Fernando W.J.N., Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies, *Bioresource Technology* 100 (2009) 710-716.

Hita E., Robles A., Camacho B., González P.A., Esteban L., Jiménez M.J., Muñío M.M., Molina E., Production of structured triacylglycerols by acidolysis catalyzed by lipases immobilized in a packed bed reactor, *Biochemical Engineering Journal* 46 (2009) 257-264.

Jiménez M.J., Esteban L., Robles A., Hita E., González P.A., Muñío M.M., Molina E., Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at *sn*-2 position by lipase-catalyzed acidolysis, *Biochemical Engineering Journal* 51 (2010) 172-179.

Kittikun A.H, Kaewthong W., Cheirsilp B., Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS, *Biochemical Engineering Journal* 40 (2008) 116-120.

Mammarella E.J., Rubiolo A.C., Predicting the packed-bed reactor performance with immobilized microbial lactase, *Process Biochemistry* 41 (2006) 1627-1636.

Mu H., Xu X., Høy C. , Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (1998) 1187-1193.

Nie K., Xie F., Wang F., Tan T., Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43 (2006) 142-147.

Shin H.-J., Park J.-M., Yang J.-W., Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads, *Process Biochemistry* 33 (1998) 787-792.

Torres C., Munir F., Lessard L., Hill C., Lipase-mediated acidolysis of tristearin with CLA in a packed-bed reactor: A kinetic study, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (2002) 655-661.

Vikbjerg A., Peng L., Mu H., Xu X., Continuous production of structured phospholipids in a packed bed reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa*, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82 (2005) 237-242.

CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO A FUTURO

Las lipasas de *Rhizomucor miehei* producidas en *Aspergillus oryzae* demostraron ser, en su estado libre, catalizadores eficaces para la producción de lípidos estructurados, alcanzando hasta un 40 % de incorporación de ácidos grasos saturados a la estructura de los glicéridos, en la mejor condición experimental ensayada. Una ventaja respecto a otros catalizadores es la baja temperatura óptima de la misma, no solo porque permite operar con bajos costos energéticos sino también porque disminuye el riesgo de producir alteraciones indeseadas en las estructuras químicas de los sustratos (degradación, formación de compuestos indeseables nutricionalmente, entre otros).

La formación de agregados bimoleculares en la lipasa en solución es un fenómeno que se hace más notable a mayor contenido de lipasa en el medio de reacción, lo cual conlleva a reducciones en la actividad tanto en la reacción de hidrólisis como en la de acidólisis. Este comportamiento puede ser evitado empleando la lipasa en su forma inmovilizada.

Por otra parte, la preferencia mostrada por las lipasas de *Rhizomucor miehei* por remover ácido oleico antes que linoleico podría explicarse en base a las interacciones que

surgen a nivel microscópico, entre la lipasa, el medio y el sustrato, usando como herramienta el modelado molecular; este queda aquí planteado como un posible trabajo a futuro.

En lo que al modelado de la cinética de acidólisis se refiere, se lograron modelos que describieron con aceptable precisión el comportamiento del sistema para las temperaturas ensayadas, los cuales pueden ser empleados para realizar la comparación con las cinéticas de la enzima inmovilizada.

El desarrollo de un nuevo biocatalizador no es tarea fácil, pues conlleva lidiar con la complejidad propia de los sistemas biológicos. En este aspecto, son aspectos fundamentales la elección de la técnica a emplear para la unión de la enzima al soporte sólido y la elección del soporte en sí.

La retención por adsorción física de las lipasas de *Rhizomucor miehei* empleando como soporte microesferas de quitosano modificadas fue favorecida por el incremento de la concentración de preparado enzimático comercial en el medio de inmovilización (en el rango analizado), sin enjuague previo del soporte con etanol ni finalización de la inmovilización con adición de acetona. La temperatura de inmovilización (entre 4°C y 25°C) no resultó tener efecto significativo sobre la actividad del biocatalizador obtenido. El lavado de los biocatalizadores con Tritón X-100 permitió recuperar los soportes.

La técnica de aminación reductiva empleada sobre las microesferas de quitosano condujo a la obtención de soportes con distinto grado de hidrofobicidad, lo que permitió establecer cual sería la modificación óptima para lograr la adsorción de lipasas de *Rhizomucor miehei* en su conformación más activa respecto a la reacción de acidólisis deseada. El biocatalizador denominado QM1-1.5, obtenido de uno de los soportes más modificados, logró la mayor transformación sobre el aceite de girasol en la reacción de acidólisis. La alta conversión, 3 veces mayor que la obtenida con la enzima libre, fue mantenida durante 7 reusos de 24 h cada uno, transcurso en el cual no se detectaron problemas de atrición. De este modo, el biocatalizador preparado que mostró el mejor

desempeño podría ser adecuado para usarse en sistemas discontinuos con altas velocidades de agitación y asimismo, en sistemas continuos como catalizador en un lecho empacado.

El biocatalizador preparado por la inmovilización de lipasas de *Rhizomucor miehei* sobre microesferas de quitosano alquiladas se utilizó para catalizar la acidólisis entre aceite de girasol y ácidos grasos palmítico y esteárico, en distintas condiciones de relación de sustratos, cantidad de enzima y solvente. La cantidad de biocatalizador fue la variable más significativa en cada respuesta analizada, dividiendo el comportamiento de la reacción en una zona de alta y una de moderada dependencia de la cantidad de biocatalizador. La presencia de hexano contribuyó a resaltar este comportamiento.

Cuando se desea maximizar el porcentaje de triglicéridos disaturados y la incorporación de ácidos grasos saturados en los glicéridos de los productos de reacción, y minimizar el porcentaje de triglicéridos trisaturados y la generación de subproductos, la optimización del sistema indica que la reacción debe ser llevada a cabo sin hexano, con la mayor relación molar de sustratos y en un valor intermedio de cantidad de enzima. Estas condiciones serían adecuadas desde un punto de vista medio ambiental pero posiblemente dificultosas a nivel operativo, lo que permite deducir que diversos criterios deben ser analizados para hallar un escenario óptimo y a la vez factible. La imposición de la condición con presencia elevada de solvente, más adecuado para representar los sistemas operativos reales, dio lugar a productos con menor incorporación de ácidos grasos saturados. Esto demuestra que la evaluación de la calidad del producto deseado y las condiciones operativas del proceso genera una decisión de compromiso.

El análisis general del progreso de la reacción de acidólisis en el tiempo, en reactor batch, indicó que la hidrólisis no fue completa, que la formación de diglicéridos fue mayor que la de monoglicéridos, y que la formación de subproductos y de triglicéridos trisaturados se vio favorecida por el aumento de la temperatura. El rendimiento en triglicéridos pudo ser estabilizado para la temperatura óptima de la enzima inmovilizada, 60 °C, después de 12 h de reacción. Sin embargo, las especies de triglicéridos continuaron cambiando, indicando que las velocidades de hidrólisis y de esterificación se habrían

igualado. Las especies que se convirtieron en mayoritarias a tiempos prolongados de reacción fueron las agrupadas en la categoría de triglicéridos monoinsaturados (SUS).

Por otro lado, se logró representar satisfactoriamente la evolución de la acidólisis en el tiempo con 3 modelos cinéticos de diferente complejidad.

El diseño y construcción de un reactor de lecho empacado a escala laboratorio fue una tarea compleja en el que muchas consideraciones debieron tomarse en cuenta. Esto se hizo a fin de desarrollar un proceso seguro desde el punto de vista operativo y que pudiera ser empleado durante un lapso considerable de tiempo. Una vez que el reactor fue realizado, resultó fácil de operar y su uso tuvo como ventaja que el biocatalizador permaneció confinado en la columna del reactor, evitándose así su manipuleo.

Los productos de reacción obtenidos en el reactor de lecho empacado operando en continuo no alcanzaron composiciones tan altas en ácidos palmítico y esteárico como se logró trabajando en el reactor batch. Esto se debió a que tuvo lugar la resistencia externa a la transferencia de masa, que el contacto biocatalizador-sustratos no fue el óptimo y que adicionalmente los tiempos de residencia no fueron lo suficientemente elevados. Para aumentar estos últimos se propone a futuro la construcción de una columna rellena de mayor longitud o el empleo de reactores de lecho empacado en serie.

Mientras que la simulación de la operación del reactor solo fue capaz de representar adecuadamente el comportamiento en los caudales más altos, el modelado del sistema se llevó a cabo de manera muy precisa para todos los caudales empleados; esto se logró gracias a emplear un coeficiente de transferencia de masa aparente como parámetro de ajuste. De esta forma y recalculando este coeficiente de transferencia de masa aparente con el uso de otro sistema de bombeo (trabajo a futuro), el modelado matemático en conjunto con los otros parámetros obtenidos, podrían ser usados en el desarrollo de procesos a mayor escala para producir lípidos estructurados mediante una tecnología "verde" que se vale de la capacidad de componentes biológicos para la transformación del aceite de girasol hacia productos grasos semisólidos.