



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS DE DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE LOS ALIMENTOS**

Propiedades Biocatalíticas de Lipasas de Origen Vegetal

Florencia Salaberría

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2017

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 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 2013 y 1 de marzo de 2018, 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

En primer lugar, quisiera agradecer enormemente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI) y la Universidad Nacional del Sur (UNS) por haberme ofrecido todos los medios necesarios para poder realizar mis estudios de doctorado.

Estos cinco años fueron para mí una experiencia invaluable y se lo debo principalmente a la gente que me acompañó durante todo el proceso. Agradezco infinitamente a María Elena Carrín, quien fue una directora ejemplar, aportando no solo su experiencia sino también su vocación, empatía y compañerismo incondicional. Gracias por estar al lado siempre, sobre todo en los momentos más difíciles, cuando la frustración era parte del día a día y se hacía difícil seguir adelante.

Gracias a mis compañeros de Alimentos por las risas compartidas, por hacerme sentir parte del grupo y ayudarme siempre que lo necesité. Gracias a Camila Palla por las numerosas veces que me ayudó con las técnicas cromatográficas y análisis de resultados y por ser una buena compañera de trabajo llena de aliento y buenos pensamientos. Agradezco la ayuda y disponibilidad de Clarisa Cicchelli y Analía Muñoz en los laboratorios y particularmente a Federico Delucchi, quien me enseñó a usar el cromatógrafo gaseoso y me asistió innumerables veces. Gracias también por haber proporcionado las semillas de ricino que se convirtieron en el núcleo principal de esta tesis.

A toda la gente de PLAPIQUI que prestó su buena voluntad: personal administrativo, taller y a Seba Farías por la asistencia en el área de cómputos. A Agustina Di Battista y a Fernanda Cabrera por la ayuda con el equipo Horiba y análisis de resultados.

A mis padres y hermanos, por darme su apoyo incondicional y escucharme siempre que lo necesité. Gracias por haberme brindado un hogar lleno de amor y por aceptar mis formas y decisiones.

A todos mis amigos, a los que están lejos o cerca, a los que son recientes y a los que me acompañan desde hace mucho. Gracias por escucharme siempre y aceptarme como soy.

Al amor de mi vida, Claudio Delpino, por ayudarme a darle perspectiva a las cosas, compartir mis sueños y hacerme feliz todos los días. Gracias también por la buena predisposición y colaboración, junto con Fernando Ramos, en los temas de la tesis que involucraron el modelado matemático.

RESUMEN

Los productos industriales obtenidos por la vía enzimática poseen propiedades y características distintivas frente a aquellos obtenidos por reacciones químicas tradicionales, lo que los hacen principalmente adecuados para su uso en la industria alimentaria. Particularmente, con la utilización de lipasas en la modificación de grasas y aceites, se evita el deterioro de los ácidos grasos insaturados y sus grupos funcionales. Con el fin de que la tecnología enzimática sea competitiva a nivel local y no tenga insumos críticos, se hace necesario tanto el desarrollo propio de catalizadores enzimáticos como el estudio y optimización de cada uno de los procesos de producción. Si bien las lipasas pueden ser de origen animal, microbiano o vegetal, actualmente, la producción de lipasas comerciales se encuentra focalizada principalmente en las de origen microbiano, seguidas por las animales.

La presente tesis estudia la posibilidad de utilizar diferentes fuentes vegetales, como girasol, trigo y ricino, para la producción de biocatalizadores con aplicación en la modificación de aceites vegetales. La hidrólisis enzimática, proceso que conlleva la liberación de los ácidos grasos del esqueleto carbonado del glicerol presente en los triglicéridos, fue la reacción principal mediante la cual se evaluaron los biocatalizadores de interés.

En el Capítulo 1 se desarrollaron los fundamentos teóricos necesarios para la comprensión de la tesis: estructuras químicas y reactividad de los lípidos, aplicaciones industriales y estado del arte de las lipasas. El Capítulo 2 describe los materiales y métodos utilizados, por lo que será frecuentemente referenciado en los capítulos restantes de la tesis. Para determinar si la metodología utilizada era confiable, se realizaron diversos ensayos, los cuales se describen en el Capítulo 3.

Los Capítulos 4 y 5 se centran en el estudio de la actividad lipásica de extractos vegetales obtenidos a partir de semillas de girasol y trigo en reacciones de hidrólisis utilizando aceite de girasol como sustrato.

El Capítulo 6 presenta el estudio de la actividad lipásica de biocatalizadores obtenidos a partir de semillas de ricino, profundizando en el estudio de características fundamentales como repetitividad del sistema de reacción, evolución de la actividad a diferentes tiempos de almacenamiento y el efecto de la concentración del biocatalizador, entre otros. En el Capítulo 7, luego de seleccionar las variables de reacción principales, se realizó la optimización de la actividad lipásica de este biocatalizador, utilizando metodologías de superficies de respuesta. Por otro lado,

el Capítulo 8 se basa en el estudio de la cinética del catalizador utilizando tiempos de reacción prolongados a diferentes condiciones, así como también incluye el modelado matemático de los perfiles cinéticos obtenidos.

Finalmente, en el Capítulo 9 se presentan las conclusiones más relevantes obtenidas mediante el desarrollo de la presente tesis, así como también los posibles ítems o lineamientos que se prevén como interesantes para ameritar su desarrollo a futuro.

ABSTRACT

The industrial products obtained by the enzymatic route have distinctive properties and characteristics over those obtained by traditional chemical reactions, which make them mainly suitable for its use in the food industry. Particularly, with the use of lipases in the modification of fats and oils, the deterioration of the unsaturated fatty acids and their functional groups is avoided. In order for the enzymatic technology to be competitive locally and without critical inputs, it is necessary both, the development of enzyme catalysts as well as the study and optimization of each of the production processes. Although lipases may be of animal, microbial or vegetable origin, the production of commercial lipases is currently mainly focused on those of microbial origin, followed by animals.

The present thesis studies the possibility of using different plant sources, such as sunflower, wheat and castor bean, for the production of biocatalysts. Enzymatic hydrolysis of vegetable oils, a process leading to the release of fatty acids from the carbon skeleton of glycerol present in triglycerides, was the main reaction by which the biocatalysts of interest were evaluated.

In Chapter 1 the theoretical foundations necessary for the understanding of this thesis were developed: chemical structures and reactivity of lipids, industrial applications and state of the art of lipases. Chapter 2 describes the materials and methods used, thus it will often be referenced in the remaining chapters of the thesis. To determine if the methodology used was reliable, several trials were performed, which are described in Chapter 3.

Chapter 4 and 5 focus on the study of the lipase activity of plant extracts obtained from sunflower and wheat seeds in hydrolysis reactions using sunflower oil as substrate.

Chapter 6 examines the lipase activity of the biocatalyst obtained from castor bean, deepening the study of fundamental characteristics such as repeatability of the reaction system, evolution of the activity at different storage times and the effect of the biocatalyst concentration, among others. In Chapter 7, after selecting the main reaction variables, the optimization of the lipase activity of this biocatalyst was performed, using response surface methodologies. On the other hand, Chapter 8 is based on the study of catalyst kinetics using extended reaction times at different conditions, as well as the mathematical modeling of the kinetic profiles.

Finally, Chapter 9 presents the most relevant conclusions obtained through the development of this thesis, as well as the possible future work.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1	Lípidos	1
1.1.1	Ácidos grasos	2
1.1.2	Acilgliceroles	3
1.1.3	Los lípidos en los alimentos y la nutrición humana	4
1.2	Aplicaciones industriales.....	5
1.2.1	Industria alimentaria	6
1.2.1.1	Manteca y pastas untables.....	6
1.2.1.2	Margarina y otras pastas saborizadas.....	7
1.2.1.3	Grasas en polvo y polvos a base de grasa	8
1.2.1.4	Grasas para pastelería.....	8
1.2.1.5	Aceites y grasas de fritura	9
1.2.1.6	Aderezos para ensalada y mayonesa	9
1.2.1.7	Chocolate.....	10
1.2.1.8	Helado	10
1.2.1.9	Incorporación de grasas vegetales en productos lácteos	10
1.2.1.10	Otros.....	11
1.2.2	Industria oleoquímica	12
1.2.2.1	Polímeros.....	12
1.2.2.2	Combustibles diésel alternativos	12
1.2.2.3	Surfactantes derivados de alcoholes grasos y ácidos grasos	13
1.2.2.4	Emolientes.....	14
1.2.2.5	Pesticidas.....	14
1.2.2.6	Lubricantes	15
1.3	Reactividad de los lípidos y sus derivados	15
1.3.1	Hidrólisis	17
1.3.2	Esterificación.....	18
1.3.2.1	Esterificación entre ácidos y alcoholes	18
1.3.2.2	Acidólisis: reacción entre ésteres y alcoholes.....	18
1.3.2.3	Alcohólisis: reacción entre ésteres y alcoholes.....	18
1.3.2.4	Interesterificación: reacción entre ésteres	19
1.4	Lipasas	20
1.4.1	Fuentes de lipasas.....	21

1.4.2	Aplicaciones de las lipasas	22
1.4.3	Ventajas potenciales de las lipasas provenientes de fuentes vegetales	23
1.4.4	Producción industrial de lipasas en el mercado	24
1.5	Problemática	26
1.6	Objetivos	26
1.7	Referencias.....	28
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1	Materiales	31
2.2	Métodos auxiliares	32
2.2.1	Caracterización de aceite alto oleico.....	32
2.2.1.1	Índice de acidez: método del indicador	32
2.2.1.2	Ácidos grasos en aceite	32
2.2.1.3	Valor peróxido.....	32
2.2.2	Contenido de aceite.....	33
2.2.3	Contenido de humedad	33
2.2.4	Contenido de proteínas:	33
2.3	Preparación de biocatalizadores de origen vegetal	34
2.3.1	Introducción.....	34
2.3.2	Procesos involucrados en la preparación de los biocatalizadores	35
2.3.2.1	Germinación	35
2.3.2.2	Descascarado, molienda y tamizado	36
2.3.2.3	Desaceitado con solventes.....	37
2.3.2.4	Extracción proteica.....	38
2.3.3	Catalizadores	39
2.4	Reacción de hidrólisis.....	40
2.4.1	Introducción.....	40
2.4.2	Medio Šinkūnienė	41
2.4.3	Medio AOCS.....	41
2.4.4	Medio Novozymes	42
2.4.5	Medio Santos-60.....	42
2.4.6	Medio Santos-10.....	42
2.4.7	Medio Sigma	42
2.4.8	Medio 1:1.....	43
2.5	Cuantificación de la actividad lipásica.....	43
2.5.1	Introducción.....	43

2.5.2	Titulación	44
2.5.2.1	Titulación empleando fenolftaleína como indicador	44
2.5.2.2	Titulación en continuo.....	45
2.5.2.3	Titulación a punto final empleando pHmetro.....	46
2.5.2.4	Curvas de titulación.....	50
2.5.3	Determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CGL.....	52
2.5.3.1	Recuperación de subproductos luego de reacción: extracción por solventes	52
2.5.3.1.1	Extracción A: metanol y cloroformo	52
2.5.3.1.2	Extracción B: hexano y éter etílico.....	53
2.5.3.2	Preparación de la muestra	53
2.5.3.3	Condiciones cromatográficas	53
2.5.3.4	Blanco de reacción	54
2.5.3.5	Cuantificación de acción lipásica.....	54
2.6	Referencias.....	55
3	EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS ELEGIDOS	59
3.1	Introducción	59
3.2	Desaceitado de semillas para la preparación de biocatalizadores de origen vegetal	59
3.2.1	Metodología	59
3.2.2	Discusión de resultados.....	60
3.3	Titulación empleando fenolftaleína como indicador	60
3.3.1	Medio Šinkūnienė y AOCS	60
3.3.1.1	Metodología.....	60
3.3.1.2	Discusión de resultados.....	61
3.3.2	Medio Santos-10.....	62
3.3.2.1	Metodología.....	62
3.3.2.2	Análisis de resultados.....	63
3.4	Titulación en continuo.....	64
3.4.1	Medio Novozymes	64
3.4.1.1	Metodología.....	64
3.4.1.2	Discusión de resultados.....	64
3.4.2	Medio Santos-60.....	65
3.4.2.1	Metodología.....	65
3.4.2.2	Discusión de resultados.....	66
3.5	Titulación a punto final empleando pHmetro	66
3.5.1	Medio Sigma	67

3.5.1.1	Metodología.....	67
3.5.1.2	Discusión de resultados.....	67
3.5.2	Medio Santos-10.....	67
3.5.2.1	Metodología.....	67
3.5.2.2	Discusión de resultados.....	68
3.6	Curvas de titulación.....	69
3.6.1	Medio Santos-10.....	69
3.6.1.1	Metodología.....	69
3.6.1.2	Discusión de resultados.....	69
3.6.2	Medio Sigma.....	71
3.6.2.1	Metodología.....	71
3.6.2.2	Discusión de resultados.....	71
3.7	Determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CGL.....	71
3.7.1	Recuperación de subproductos.....	72
3.7.1.1	Materiales.....	72
3.7.1.2	Metodología.....	72
3.7.1.3	Discusión de resultados.....	74
3.8	Caracterización de algunos medios de reacción y otros estudios complementarios.....	77
3.8.1	Estabilidad del medio Santos-10 y Sigma luego de 24 h de incubación.....	77
3.8.1.1	Metodología.....	77
3.8.1.2	Discusión de resultados.....	78
3.8.2	Densidad.....	78
3.8.2.1	Metodología.....	78
3.8.2.2	Discusión de resultados.....	78
3.8.3	Tamaño de gota de medios de reacción.....	78
3.8.3.1	Metodología general.....	78
3.8.3.2	Discusión de resultados.....	79
3.8.4	Efecto del etanol y el catalizador sobre el pH del medio de reacción.....	83
3.8.4.1	Metodología.....	83
3.8.4.2	Análisis de resultados.....	83
3.8.5	Estabilidad del pH del medio luego de 24 horas de incubación.....	84
3.8.5.1	Metodología.....	84
3.8.5.2	Discusión de resultados.....	84
3.9	Conclusiones.....	84
3.10	Referencias.....	86

4	ACTIVIDAD LIPÁSICA EN SEMILLAS DE GIRASOL	87
4.1	Introducción	87
4.2	Materiales y métodos	88
4.2.1	Materiales.....	88
4.2.2	Metodología	88
4.2.2.1	Descripción global de las experiencias realizadas.....	88
4.2.2.2	Blancos de reacción.....	92
4.3	Discusión de resultados.....	92
4.3.1.1	Experiencias determinadas mediante titulación en continuo (R1-R13)	92
4.3.1.2	Experiencias determinadas mediante titulación a punto final (R14-R24)	95
4.3.1.3	Experiencias determinadas mediante cromatografía gaseosa (R25-R31)	98
4.4	Conclusiones.....	101
4.5	Referencias.....	102
5	ACTIVIDAD LIPÁSICA DE LIPASA COMERCIAL DE GERMEN DE TRIGO	105
5.1	Introducción	105
5.2	Materiales y métodos	106
5.2.1	Materiales.....	106
5.2.2	Métodos.....	107
5.2.2.1	Hidrólisis: Método Sigma empleando aceite vegetal como sustrato	107
5.2.2.2	Acidólisis.....	108
5.2.2.3	Esterificación	109
5.3	Discusión de resultados.....	109
5.4	Conclusiones.....	112
5.5	Referencias.....	112
6	ACTIVIDAD LIPÁSICA EN SEMILLAS DE RICINO	115
6.1	Introducción	115
6.2	Materiales y métodos	117
6.2.1	Materiales.....	117
6.2.2	Métodos generales	117
6.2.3	Caracterización del tamaño de partícula.....	118
6.2.4	Repetitividad.....	119
6.2.5	Impacto del almacenamiento sobre la capacidad hidrolítica del polvo enzimático 119	
6.2.6	Titulación vs cromatografía	120
6.2.7	Masa de polvo enzimático	122

6.2.8	Reuso	122
6.2.9	Concentración de goma arábica en medio Santos-10.....	123
6.2.10	Esterificación.....	123
6.3	Discusión de resultados.....	123
6.3.1	Rendimiento de polvo y caracterización del tamaño de partícula	123
6.3.2	Repetitividad.....	125
6.3.3	Impacto del almacenamiento sobre la capacidad hidrolítica del polvo lipásico ..	126
6.3.4	Titulación vs cromatografía	130
6.3.5	Masa de polvo enzimático.....	131
6.3.6	Reuso	133
6.3.7	Concentración de goma arábica.....	134
6.3.8	Esterificación.....	134
6.3.9	Conclusiones.....	134
6.4	Referencias.....	136
7	OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DE POLVOS DE RICINO	139
7.1	Introducción	139
7.2	Materiales y métodos	140
7.2.1	Materiales.....	140
7.2.2	Preparación del polvo.....	140
7.2.3	Reacciones de hidrólisis.....	140
7.2.4	Diseño experimental.....	141
7.2.4.1	Introducción al diseño experimental	141
7.2.4.2	Factores y variable de respuesta.....	143
7.2.4.3	Codificación de variables.....	145
7.2.4.4	Box-Behnken	145
7.2.4.5	Diseño factorial	148
7.2.4.6	Análisis estadístico	149
7.2.5	Cuantificación de la actividad lipásica	149
7.2.6	Blancos de reacción	150
7.2.7	Otros cálculos	150
7.3	Discusión de resultados.....	150
7.3.1	Diseño Box-Behnken.....	150
7.3.2	Diseño factorial.....	156
7.4	Conclusión	161
7.5	Referencias.....	162

8	CINÉTICA DE HIDRÓLISIS EMPLEANDO POLVOS DE RICINO COMO BIOCATALIZADOR.....	165
8.1	Introducción	165
8.2	Fase I: obtención de datos empíricos de cinética	167
8.2.1	Materiales y métodos	167
8.2.1.1	Materiales y métodos generales	167
8.2.1.2	Efecto de la goma arábica a tiempos largos de reacción	167
8.2.1.3	Cinética de la reacción de hidrólisis	168
8.2.2	Discusión de resultados de la Fase I	169
8.2.2.1	Efecto de la goma arábica a tiempos largos de reacción	169
8.2.2.2	Cinética de la reacción de hidrólisis	171
8.3	Fase II: Modelado matemático de la cinética de reacción.....	177
8.3.1	Introducción al modelado de cinética enzimática.....	178
8.3.2	Estado del arte del modelado matemático de reacciones catalizadas por lipasas 179	
8.3.3	Metodología	181
8.3.4	Discusión de resultados de la Fase II	186
8.3.4.1	Modelado basado en datos.....	186
8.3.4.2	Modelado basado en primeros principios	188
8.4	Conclusiones.....	198
8.5	Referencias.....	200
9	CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO A FUTURO	203
10	ÍNDICE DE TABLAS	207
11	ÍNDICE DE FIGURAS	211
12	TABLA DE NOMENCLATURA.....	215
13	ANEXO A.....	217
14	ANEXO B.....	219
15	ANEXO C.....	221
16	ANEXO D.....	223

INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo

1

En la presente tesis se evaluaron diferentes alternativas para la obtención de lipasas de origen vegetal considerando distintas metodologías para la determinación de la actividad lipásica en diferentes reacciones de interés que involucran la modificación de grasas y aceites.

En este capítulo se desarrollarán los fundamentos teóricos de mayor importancia para comprender, no solo el objetivo de la tesis y la importancia de profundizar los conocimientos en relación a las lipasas de origen vegetal, sino también las metodologías experimentales aplicadas y el análisis de resultados.

Los principales temas que se desarrollarán acá involucran una sección destinada a la descripción de los diferentes lípidos que existen y sus propiedades, seguido por las reacciones de mayor interés que los involucran (hidrólisis, esterificación, acidólisis), la importancia industrial de los subproductos de reacción y las ventajas que presentan las reacciones enzimáticas frente a la síntesis química de dichos productos. A su vez, se discutirá el estado del arte de las lipasas de origen vegetal, así como también su producción a nivel mundial y nacional. Finalmente, se planteará el objetivo principal de la tesis.

1.1 Lípidos

En la naturaleza, la fuente más grande de aceite es el cultivo anual de una amplia variedad de semillas oleaginosas. En muchos casos, no solo son cultivadas por su alto contenido de aceite, sino que a partir de ellos se producen alimentos de alto contenido proteico. Como segunda fuente de aceites, se pueden mencionar los cultivos de árboles como lo son los frutos del olivo, el coco y la palma. Por el contrario, la grasa comestible proveniente del reino animal es producida mayormente a partir de tres tipos de animales domesticados: la manteca de cerdo, el sebo de ganado vacuno y de oveja, y grasa de la leche vacuna o mantequilla (O'Brien 2014). Es interesante

mencionar que, a diferencia de los cultivos oleaginosos, la grasa animal representa un producto secundario de la producción de ganado, y no como producto principal (Alm 2013).

En cuanto a su estructura, los lípidos son moléculas orgánicas cuyos componentes principales son los ácidos grasos. Las estructuras químicas de estos ácidos y sus propiedades físicas, químicas y biológicas son básicas para la comprensión de la física, la química y la bioquímica de los lípidos en general (Gunstone 1996). Si bien algunos lípidos pueden contener grupos funcionales diferentes (aminas, aldehídos, etc...) en esta tesis las estructuras de mayor importancia serán los ácidos grasos y los esteres de glicerol asociados a los mismos conocidos generalmente como mono-, di- y triglicéridos.

1.1.1 Ácidos grasos

Si bien existe una nomenclatura química para la denominación de cada ácido graso existente, los nombres más comúnmente usados son aquellos que se asocian con la semilla o fruto que les dio origen y no con su estructura química. Algunos de los nombres más conocidos son el ácido palmítico, oleico, linoleico y linolénico y cada uno de ellos representa el ácido mayoritario en los aceites de palma, oliva y lino, respectivamente (Gunstone 1996).

La estructura básica de los ácidos grasos se observa en la Figura 1.1. Como descripción general, se puede mencionar que estos ácidos se encuentran conformados por un grupo carboxilo unido a una larga cadena lineal hidrocarbonada (generalmente de 12 a 22 átomos de carbono). Pueden producirse variaciones en la estructura de la cadena (cadena ramificada, aquellos que poseen grupos oxigenados, entre otros) pero las mismas no son de interés para el entendimiento de la presente tesis.

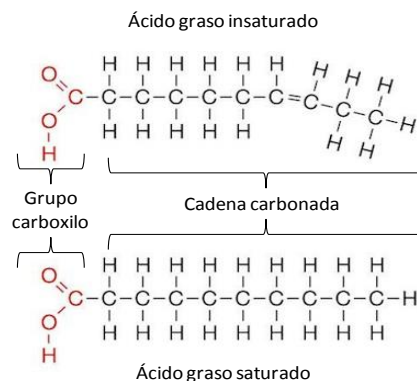


Figura 1.1 Esquema de una molécula de ácido graso saturado e insaturado.

Si bien se han descubierto más de 500 ácidos grasos provenientes de plantas y microorganismos, aproximadamente el 95 % de los mismos corresponden solo a siete ácidos diferentes: láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, y linolénico, cuya fórmula molecular se muestra en la Tabla 1.1. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. Las insaturaciones quedan definidas al existir uno o más dobles enlaces entre carbonos consecutivos y los mismos pueden localizarse en diferentes posiciones a lo largo de la cadena. Los ácidos saturados no presentan ningún doble enlace, conteniendo el número máximo admisible de átomos de hidrógeno. Esta variación estructural genera diferencias importantes en cuanto a la reactividad y a la disposición espacial de moléculas adyacentes (Sikorski et al. 2003).

Tabla 1.1 Fórmula molecular y abreviatura de los ácidos más abundantes en las grasas y aceites.

Ácido graso	Abreviatura	Estructura química	C:D ^a
Ácido láurico	La	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	C12:0
Ácido mirístico	M	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	C14:0
Ácido palmítico	P	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	C16:0
Ácido esteárico	St	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	C18:0
Ácido oleico	O	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:1 n-9
Ácido linoleico	L	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:2 n-6
α-Linolénico	Ln	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	18:3 n-3
γ-Linolénico	Ln	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	18:3 n-6

^a Se indica el número de átomos de carbono seguido del número de dobles enlaces. Si existen dobles enlaces, la posición del mismo se indica como n-x, considerando como número uno el átomo de carbono unido al grupo carboxilo.

1.1.2 Acilgliceroles

Los acilgliceroles están compuestos por uno, dos o tres residuos de ácidos grasos esterificados en los residuos hidroxilo de una molécula de glicerol (Figura 1.2) dando lugar a la formación de mono- (MAG), di- (DAG) y triacilgliceroles (TAG), respectivamente. Se conocen comúnmente bajo el nombre de lípidos complejos y los residuos carbonados pueden eliminarse o modificarse mediante diferentes reacciones químicas. En la naturaleza, los TAG representan las reservas de energía tanto en plantas (semillas) como en animales (tejido adiposo) y por lo tanto son componentes muy comúnmente encontrados en los alimentos. A su vez, la denominación de grasa o aceite, hace referencia al punto de fusión de estos compuestos. Mientras que las grasas son sólidas a temperatura ambiente, los aceites se mantienen en su estado líquido. Por otro lado, los MAG y DAG existen generalmente como precursores de la formación de TAG o fosfolípidos en los procesos metabólicos de los seres vivos. En los alimentos, su presencia también puede ser un

indicador de la degradación de los mismos mediante la desacilación química o enzimática (Sikorski et al. 2003).

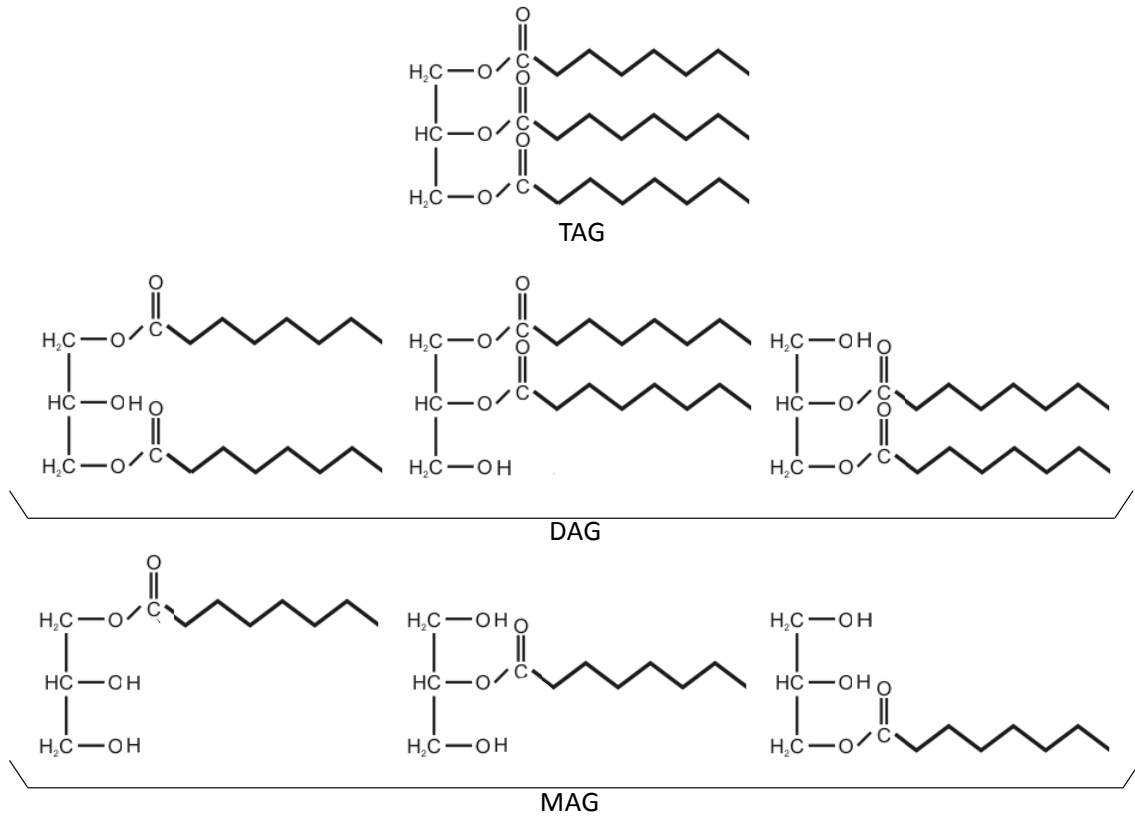


Figura 1.2 Esquemas de moléculas de tri-, di- y monoacilglicerol.

La nomenclatura de los acilgliceroles involucra una complejidad adicional ya que puede existir una composición asimétrica de residuos de ácidos grasos dependiendo de la posición respecto del esqueleto carbonado del glicerol. Para resolver este problema, el sistema de numeración estereoespecífica (sn) se utiliza para diferenciar estas posiciones (sn-1, sn-2 y sn-3) (Sikorski et al. 2003). Por practicidad, es muy común utilizar denominaciones simplificadas para hacer referencia a estas moléculas, utilizando las abreviaturas de los ácidos grasos que las conforman (Tabla 1.1). Por ejemplo, para el caso de la trioleína, su denominación simplificada es OOO.

1.1.3 Los lípidos en los alimentos y la nutrición humana

Los lípidos forman un grupo de compuestos cuya naturaleza química es extremadamente variada. Tienen propiedades físicas, químicas y fisiológicas particulares por lo que son importantes tanto en la nutrición como en la tecnología de los alimentos. Los lípidos aportan

características específicas a los alimentos, influyendo en la textura y palatabilidad de los mismos. Su naturaleza hidrofóbica afecta profundamente los fenómenos asociados a su digestión, absorción, transporte en la sangre y metabolismo a nivel celular. Los lípidos de mayor interés nutricional son TAG, fosfolípidos, esteroides, entre otros pero los TAG representan el compuesto lipídico mayoritario ingerido a través de la dieta. Los lípidos de los alimentos contienen generalmente pequeñas cantidades de otras sustancias liposolubles como vitaminas o compuestos que aportan características organolépticas particulares. Las grasas animales pueden contener vitaminas A y D, y colesterol, mientras que las grasas o aceites vegetales pueden contener carotenos, vitamina E y sitosterol, pero no contienen colesterol. Los aceites vegetales obtenidos de maíz, soja y girasol contienen menos del 15 % de ácidos grasos saturados y más del 55 % de ácidos poli-insaturados (PUFA). No obstante, no todos los aceites vegetales contienen grandes cantidades de PUFA, por ejemplo, el aceite de oliva y el de coco contienen menos de 10 % de estos lípidos. Por el contrario, las grasas animales tienen un alto porcentaje de grasas saturadas con longitudes de cadena entre 14 y 18 átomos de carbono. La grasa láctea contiene alrededor del 20 % de ácidos con cadenas entre 4 y 14 carbonos. Estos compuestos de cadena corta y media se encuentran en los lípidos de la leche y son los responsables de las propiedades organolépticas tan características de la manteca.

Se define como nutriente esencial todo aquel componente que es necesario para la función normal del cuerpo humano, pero que el mismo es incapaz de sintetizar en las cantidades adecuadas. En el caso de los lípidos pueden mencionarse dos ácidos grasos esenciales, el L y el Ln cuya biosíntesis no ocurre en el ser humano pero si existe en el reino vegetal y en algunos animales como los peces. Algunos de los síntomas comunes de la deficiencia de estos compuestos podrían ser el retraso del crecimiento, lesiones cutáneas, alteración de la reproducción, pérdida de cabello, hígado graso, reducción del aprendizaje y alteración de la visión, entre otros. Si bien en el pasado se ha fomentado que estos nutrientes esenciales debían consumirse en una relación de L a α -Ln entre 5:1 y 10:1 (Sikorski et al. 2003), el último reporte de la FAO indica que no hay evidencias suficientes para recomendar una proporción específica siempre que satisfagan las ingestas recomendadas (FAO/WHO 2008).

1.2 Aplicaciones industriales

En los últimos años (2015-2017) la producción mundial de aceites vegetales alcanzó los 180 millones de toneladas (Statista 2017) lo que equivale aproximadamente a 22 kg de aceite por año y por persona en todo el mundo. En otras palabras y basándonos en estos números, se podría asumir que existe un consumo promedio aproximado de más de 2 L de aceite por mes y por

persona (considerando aplicaciones comestibles y no comestibles). Es importante destacar que estos valores hacen referencia no solo al uso alimenticio, sino también a productos de la industria oleoquímica. Como se puede observar, este consumo es realmente elevado y se debe a la amplia variedad de aplicaciones de los lípidos a nivel industrial. A continuación, se describen las aplicaciones más importantes, considerando no solo los lípidos de origen vegetal sino también aquellos derivados de los animales.

1.2.1 Industria alimentaria

Como ya se mencionó, si bien la producción global de aceite es elevada, no todo el aceite se utiliza en la industria alimentaria. En general, se ha asumido que alrededor del 80 % se utiliza para alimentos humanos, aunque es posible que actualmente esta cifra se haya reducido debido a la creciente demanda de biodiesel. Sin embargo, esta cifra no es un buen estimativo de la ingesta de aceite por parte de la población debido a que no incluye otros tipos de grasas. Al mismo tiempo, existen grandes cantidades de aceite de desecho generado por la industria alimentaria que tampoco son consumidos de forma directa. En esta sección se describen los principales usos alimenticios de los aceites y las grasas sin considerar sus aportes nutricionales ya discutidos en la sección anterior. Para ello se utilizaron como referencias principales los libros *Oils and Fats in the Food Industry*, publicado por Gunstone (2008) y *Fats in Food Technology*, publicado por Kanés et al. (2014), cuya información sobre los diferentes productos existentes se presenta de forma breve a continuación.

1.2.1.1 Manteca y pastas untables

La leche y sus derivados son uno de los primeros alimentos conocidos por el hombre. A su vez, estos productos poseen un contenido de grasa variable: leche (2-4 %), crema (30-45 %), manteca (82 %) y queso (30-50 %).

Si bien la manteca obtenida a partir de la grasa de leche de vaca se ha utilizado sola o en productos horneados y fritos desde hace siglos, actualmente existen diferentes productos untables de alta calidad que pueden utilizarse como alternativas. A pesar de que el flavour y el perfil de lípidos de la manteca son excepcionales, existen varias desventajas asociadas a este producto: su alto valor agregado, baja untabilidad a 4 °C, alto contenido en grasa junto con altos niveles de ácidos saturados y de colesterol, y la presencia de grasas *trans*. Por esta razón comenzaron a desarrollarse nuevos productos que pudieran emplearse como sustitutos de la misma. Los productos untables alternativos están compuestos por manteca, agua y aceite vegetal, siendo el aceite de soja uno de los más utilizados. Los mismos no pueden ser vendidos bajo la denominación de 'manteca' ya que no cumplen con las especificaciones legales, pero en

algunos países reciben el nombre de 'manteca untable'. Por lo general estos productos utilizan diferentes fracciones de la grasa de la manteca (fracciones con menor punto de fusión) dejando las fracciones más 'duras' (mayor punto de fusión) para su uso en diferentes productos de pastelería. Por otro lado, los productos con niveles reducidos de grasa (40 % o menos) son muy populares para aquellos consumidores que buscan una alternativa para disminuir la ingesta diaria de lípidos. Estos productos untables contienen más agua que los productos a base de grasa y requieren emulsionantes (monoacilgliceroles o ésteres de poliglicerol). Si bien en el Código Alimentario Argentino no existe una definición establecida de la 'manteca light', en los Estados Unidos este producto debe contener menos de la mitad del nivel normal de grasa. Por el contrario, en la India, la grasa de la leche se consume en parte como manteca tradicional, pero también existe un alto consumo de un producto denominado ghee que contiene más de 99 % de grasa de leche y menos del 0,2 % de humedad.

1.2.1.2 Margarina y otras pastas saborizadas

Durante la década de 1860, grandes sectores de la población europea emigraron de un país a otro y pasaron de las áreas rurales a las urbanas. Al mismo tiempo, se produjo un rápido aumento de la población y una recesión general en la agricultura que condujo a una escasez de manteca, especialmente para la población urbana. Como consecuencia, el precio se incrementó abruptamente por lo que el gobierno francés ofreció un premio para la persona que fuera capaz de crear un sustituto de este preciado producto que fuera más barato y pudiera almacenarse por más tiempo sin que se deteriorara. El producto ganador fue descrito en su momento como una mezcla de ésteres mixtos de glicerol de ácido oleico y margárico (C17:0) y por ello se lo denominó oleo-margarina. Fue así como surgió un producto más flexible que puede ser formulado de acuerdo a los diferentes mercados para satisfacer las nuevas demandas locales y nutricionales.

Es deseable que la margarina recién tomada de la heladera (4 °C) sea fácil de untar, lo que fue posible gracias a la hidrogenación parcial así como también mediante la interesterificación de aceites no hidrogenados con fracciones de grasas más duras como aceite láurico, estearina de palma o un aceite totalmente hidrogenado. Actualmente dicha interesterificación a nivel industrial se realiza mayormente mediante el agregado de productos químicos por lo que existe la posibilidad de que en un futuro este mecanismo de reacción sea prohibido. Si esto sucediera, la interesterificación enzimática será la opción más viable para reemplazarlo (Holm et al. 2008).

Existen también pastas untables de chocolate que son cada vez más populares. Se componen de una grasa blanda (generalmente en un nivel de un 30 %) y cacao en polvo pero

también puede contener nueces, avellanas u otros frutos secos. Al igual que otros productos untables, debe existir un equilibrio apropiado entre grasas sólidas y líquidas. Están diseñados para mantenerse a temperatura ambiente, aunque a menudo se conservan en la heladera y se utilizan sobre pan, tostadas o galletas. La pasta huele y sabe como el chocolate pero no solidifica como tal.

1.2.1.3 Grasas en polvo y polvos a base de grasa

Actualmente existe una elevada demanda de alimentos y comidas pre-fabricadas, por lo que el uso de productos en polvo se ha vuelto particularmente conveniente debido a su fácil reconstitución. Los ejemplos más conocidos provienen de la industria láctea, donde hay una gran variedad concentrados proteicos disponibles en forma de polvo y que se utilizan como ingredientes y suplementos nutricionales en otros productos. En relación a los lípidos, pueden identificarse las grasas en polvo y los polvos a base de grasas. La diferencia entre ambos es que los primeros se conforman en su totalidad por grasas (o grasas y emulsificantes), mientras que los polvos basados en grasas poseen un alto contenido de grasa (hasta 80%), pero también contienen material no graso que actúa como matriz de soporte de la misma. Esto implica una restricción en su uso ya que el componente no graso debe ser compatible con la receta final del usuario. Actualmente la grasa en polvo se utiliza como un mejorador de pan aunque tienen una aplicación limitada debido a su alto punto de fusión. Sin embargo, juegan un papel importante como aceleradores de la cristalización en productos como el fondant y como agente estabilizante para productos en pasta como la mantequilla de maní. Por otro lado, los polvos a base de grasa se utilizan en diversos productos como cremas saborizadas batidas (15-20 % de grasas) o manteca en polvo (hasta 80 %), los cuales son utilizados como ingredientes de panadería (Kanes et al. 2014).

1.2.1.4 Grasas para pastelería

Los aceites y las grasas empleados en los productos de pastelería se utilizan principalmente en la fritura de alimentos (como proceso de cocción) y en forma de pastas empleadas en rellenos y coberturas. Además de las propiedades físicas deseadas, es necesario cumplir dos requisitos adicionales. Uno es la estabilidad oxidativa relacionada con la fecha de caducidad de los productos horneados y el segundo es la necesidad de responder a las demandas nutricionales actuales. Un buen producto alimenticio debe ser sabroso, con buena textura, inocuo y con una fecha de caducidad razonable en términos de rancidez, palatabilidad y textura. Las grasas utilizadas para producir esta amplia gama de productos horneados varían en sus propiedades y particularmente en su comportamiento plástico y de fusión.

La margarina empleada en los procesos industriales tiene la proporción de grasa y agua de la margarina de uso doméstico, pero difiere de la misma en sus componentes grasos, los cuales son seleccionados específicamente para producir el efecto deseado en el producto horneado final. Además de las mezclas de aceites o grasas, la combinación de emulsionantes y otros componentes menores también son importantes ya que su interacción con los componentes grasos puede cambiar la cinética de cristalización y la textura (Kanes et al. 2014).

1.2.1.5 Aceites y grasas de fritura

La fritura de un alimento puede realizarse de modo superficial o por inmersión y se lleva a cabo a una temperatura entre 165-185 °C. Es un método eficiente que permite una cocción rápida y añade sabor característico a los productos. En la fritura por inmersión, el aceite se reutiliza una y otra vez hasta que su calidad no es aceptable y entonces es desechado. Este subproducto puede añadirse a formulaciones alimenticias destinadas a la alimentación animal representando una buena fuente de energía o puede ser convertido en ésteres metílicos para la producción de biodiesel. Es deseable minimizar la penetración de aceite hacia el alimento que ocurre tanto durante la cocción como durante el enfriamiento. Si la temperatura de fritura es demasiado baja la cocción será más lenta incrementando la absorción de grasa, y si es demasiado alta se acelerarán las reacciones de deterioro en la misma. En el proceso de fritura, la presencia de aire da lugar a la oxidación del aceite, que a su vez es acompañada por reacciones de dimerización, polimerización y ciclización de ácidos grasos. Con el uso continuo el aceite comienza a producir humo, espuma y se vuelve más viscoso. Un buen aceite de fritura debe presentar alta estabilidad oxidativa, un alto punto de humo el cual es asociado a un nivel bajo de ácidos grasos libres (AGL) y mantener un color claro durante su uso. El origen del aceite o grasa puede ser elegido de acuerdo al sabor distintivo que se desee aportar a los alimentos (maíz, oliva, maní, sebo, etc...). A su vez, se prefieren niveles bajos de ácidos grasos poliinsaturados, ya que estos favorecen las reacciones de oxidación y polimerización. Por esta razón se han estado desarrollando aceites con un alto contenido de ácido oleico empleando técnicas de cultivo tradicionales o mediante la modificación genética de semillas. En algunos casos se incorpora ricinoleato de poliglicerol para mejorar la viscosidad.

1.2.1.6 Aderezos para ensalada y mayonesa

Los aceites para ensalada y aquellos empleados para hacer mayonesa y otros aderezos deben ser oxidativamente estables y libres de sólidos, incluso cuando se almacenan en la heladera a 4 °C. Aquellos aceites que contienen ácido linolénico (aceite de soja, colza, canola) suelen ser ligeramente hidrogenados para mejorar estas propiedades. A su vez deben eliminarse aquellos ésteres de glicerol de alto punto de fusión que cristalizan a baja temperatura, así como las ceras.

La mayonesa es una emulsión de aceite en agua que contiene entre 65 % y 80 % de aceite. La fase acuosa contiene vinagre, ácido cítrico y yema de huevo, que contiene lecitina la cual sirve como agente emulsionante. Los aderezos para ensalada son similares a la mayonesa pero contienen mucho menos aceite (30-40 %) y otros componentes como almidón, emulsionantes y gomas para proporcionar estabilidad y textura.

1.2.1.7 Chocolate

El chocolate es un alimento que contiene un alto contenido de grasa aportado, en su totalidad o parcialmente, por la manteca de cacao. El código Alimentario Argentino establece un mínimo de 16 % de manteca de cacao en el chocolate y un máximo de 5 % de grasas equivalentes a la manteca de cacao (EMC). Generalmente los EMC son grasas vegetales no láuricas, constituidas principalmente por triglicéridos monoinsaturados simétricos del tipo POP, P_{OS}t y StOSt (Código Alimentario Argentino 2017). El mismo límite para grasas equivalentes es aplicado en la Unión Europea (Gunstone 2008).

Los granos de cacao contienen entre 50 y 55 % de grasa. La manteca de cacao es muy especial debido a que, durante la fusión, esta grasa presenta un comportamiento muy particular, ya que a temperatura ambiente es dura y quebradiza, y su presencia en el chocolate genera una curva de fusión abrupta que permite su derretimiento completo dentro de la boca.

1.2.1.8 Helado

Tradicionalmente el helado está conformado por grasa de leche junto con algunas grasas vegetales como pueden ser el aceite de girasol, de maní o de palma. El helado contiene agua (60-70 %) y sólidos totales (30-40 %). A su vez, los sólidos corresponden a grasas (5-12 %), sólidos de leche no grasos (10-12%), sacarosa (12-14%), sólidos de glucosa (2-4%), emulsionantes (0,2-0,5 %) y estabilizantes (0,1-0,3 %). Los requisitos legales, así como el reemplazo total o parcial de la grasa láctea por grasa vegetal, varían de un país a otro. La grasa en el helado contribuye a la estructura, estabiliza la espuma, mejora la resistencia a la fusión, imparte cremosidad y contribuye al sabor.

1.2.1.9 Incorporación de grasas vegetales en productos lácteos

En otros países, existen productos lácteos con estructuras densas conocidas como leches reconstituidas (filled milk) formuladas a partir de leche en polvo descremada reconstituida con aceite vegetal. El aceite no debe contener ácido linolénico, debe tener bajo contenido de ácido linoleico y debe ser oxidativamente estable.

Los suavizantes de café no lácteos disponibles en polvo o en forma líquida, generalmente contienen 35-45 % de grasa, normalmente aceite de palma parcialmente hidrogenado. También se han desarrollado quesos blandos utilizando grasas vegetales en lugar de grasa láctea. Se han descrito varias formulaciones que incorporan aceite de soja con o sin hidrogenación, aceite de palma, aceite de colza y aceite de oliva. Actualmente existen cremas para batir sin grasa láctea, elaboradas con aceite de palma y de coco que, a diferencia de la crema de leche, presentan una larga vida útil a temperatura ambiente.

1.2.1.10 Otros

Revestimientos comestibles: A veces, los alimentos se recubren con finas capas de films comestibles para prolongar la vida útil minimizando la pérdida de humedad, proporcionando brillo y reduciendo la complejidad y el costo del envasado. Los films pueden contener hidratos de carbono, proteínas, lípidos o alguna combinación de los mismos. Los aceites vegetales utilizados para recubrir los productos alimenticios deben ser líquidos a temperatura ambiente y deben tener alta estabilidad oxidativa. Sirven como una barrera contra la humedad, portadores de aroma, lubricantes y como potenciadores de brillo entre otros. También se utilizan en forma de aerosol sobre la superficie de los alimentos previos a la cocción.

Agentes emulsionantes: Las aplicaciones de los emulsionantes o emulsificantes en alimentos incluyen: revestimientos comestibles, emulsiones estabilizadoras y desestabilizadoras, modificación de la cristalización de grasas y la texturización de alimentos a base de almidón, entre otros. Mayores detalles sobre los emulsionantes se describirán en la Sección 1.2.2.3. Los MAG son conocidos ampliamente por sus propiedades emulsificantes y se obtienen generalmente mediante la hidrólisis de TAG en presencia de un catalizador alcalino, utilizando temperaturas entre 180-230 °C. Luego de una hora la mezcla final contendrá aproximadamente 58 % MAG, 36 % DAG y 6 % TAG. Esta mezcla puede usarse como tal, o puede purificarse hasta obtener aproximadamente 90-95 % de MAG.

Alimentos funcionales: Actualmente existe un creciente interés en mantener una dieta saludable. Los alimentos funcionales contienen moléculas bioactivas que promueven la salud o reducen el riesgo a padecer determinadas enfermedades. Algunos de los componentes de mayor interés presentes en las grasas corresponden principalmente a antioxidantes como los carotenoides, tocoferoles, flavonoides, aceite de romero, arroz, salvado y sésamo, así como también fitoesteroles, ácidos omega-3 y ácido linoleico conjugado.

1.2.2 Industria oleoquímica

Los aceites vegetales han sido utilizados en la producción industrial de plásticos, productos farmacéuticos, pinturas, adhesivos, recubrimientos, entre otros. La producción industrial empleando derivados de los aceites vegetales presenta ciertas ventajas ya que involucra un recurso renovable y minimiza la toxicidad de las sustancias involucradas, así como también el tiempo de degradación de los residuos. Debido a su naturaleza biológica, generalmente estos productos son biodegradables y se mantienen neutros respecto al aporte de CO₂ ya que su ciclo parte del cultivo de las plantas que se usarán como materia prima. A su vez, a medida que las fuentes petroquímicas se vuelvan más costosas y escasas, la industria de los bio-productos se volverá competente y potencialmente más económica.

En el último tiempo se ha observado un incremento en el uso de aceites vegetales naturales para el desarrollo de la bioenergía y los biocombustibles. Sin embargo, las elevadas demandas de biodiesel que son estimuladas por los diferentes gobiernos, podrían generar no sólo una sobreproducción de glicerol, sino también una competencia contra los usos ya establecidos de los aceites vegetales (industria alimentaria y oleoquímica). Un trabajo publicado por Salimon et al. (2012) describe las diferentes aplicaciones de los aceites en la industria oleoquímica los cuales serán mencionados brevemente a continuación.

1.2.2.1 *Polímeros*

Los oleoquímicos empleados como materiales poliméricos representan un mercado relativamente pequeño, pero están bien establecidos. Un ejemplo es el aceite de lino, que se utiliza para producir linóleo y su demanda mundial ha aumentado significativamente a lo largo del tiempo, alcanzando una producción mundial de 600000 toneladas en el 2014 (Fediol, 2018). Otro ejemplo podría ser el aceite de soja epoxidado (ESO), utilizado como aditivo de plásticos y recubrimientos, que posee un mercado relativamente estable de aproximadamente 100000 toneladas/año. También existen los ácidos dicarboxílicos que se producen industrialmente por ozonólisis de ácido oleico para producir ácido azelaico o por dimerización de ácido linoleico y ácido oleico para obtener mezclas complejas de diácidos de alto peso molecular los cuales se utilizan como aditivos en diversas aplicaciones de los polímeros (recubrimientos, lubricantes, pegamentos, etc...).

1.2.2.2 *Combustibles diésel alternativos*

El uso de aceites vegetales en motores diésel es casi tan antiguo como el motor de inyección. En 1900 se utilizó por primera vez aceite de maní como combustible con fines demostrativos. La crisis energética de finales de los años setenta y principios de los ochenta, así

como las preocupaciones que acompañan al agotamiento de los recursos no renovables del mundo, proporcionaron los incentivos necesarios para buscar alternativas a los combustibles convencionales a base de petróleo. Actualmente, los aceites vegetales ocupan una posición privilegiada en el desarrollo de combustibles alternativos. Cientos de artículos científicos utilizan aceite vegetal para la producción de biodiésel y en el último tiempo estos productos han pasado de ser combustibles puramente experimentales a la comercialización y uso masivo. Sin embargo, aún existen aspectos técnicos y económicos que requieren una solución.

Los aceites vegetales involucrados son aquellos que abundan en el país donde se utilizan. Por lo tanto, el aceite de soja es de interés como fuente de biodiesel en los Estados Unidos, mientras que muchos países europeos se orientan al uso de aceite de colza. Los países con clima tropical en cambio, prefieren utilizar aceite de coco o aceite de palma. Otras fuentes de biodiésel estudiadas incluyen las grasas animales y aceites de cocina usados. A pesar de esto, el uso directo de los aceites vegetales en los motores no resulta apropiado debido a su alta viscosidad y a su baja volatilidad ya que no se queman completamente y forman depósitos no deseados. Es por esto que se han considerado diferentes maneras de reducir la alta viscosidad de los mismos empleando diferentes técnicas que involucran diluciones, emulsiones, descomposiciones térmicas, craqueo catalítico y esterificación.

Algunos problemas de rendimiento del motor, como la inyección de coque y los depósitos de carbono, todavía existen. Entre todas estas alternativas, la esterificación parece ser la mejor opción, ya que las características físicas de los ésteres de ácidos grasos (biodiésel) son muy cercanas a las del diésel y el proceso es relativamente simple. A su vez, los ésteres de metilo o etilo de ácidos grasos pueden quemarse directamente en los motores diésel generando una baja deposición de residuos.

1.2.2.3 *Surfactantes derivados de alcoholes grasos y ácidos grasos*

Los surfactantes o tensioactivos son moléculas que tienen su efecto en la superficie interfacial que existe entre sustancias inmiscibles. Son moléculas orgánicas que se componen generalmente de una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba que por lo general presenta una cadena carbonada. Algunos grupos hidrófilos comúnmente usados incluyen aminoácidos, poliglicéridos, polisacáridos y los grupos carboxilato en las cadenas de ácidos grasos. Como ejemplo se pueden mencionar los ésteres de ácidos grasos (extremo hidrófobo) empleando óxido de etileno como grupo hidrófilo aunque también pueden utilizarse carbohidratos como la lignina y la lecitina. El glicerol es otra posible fuente de bajo costo para utilizar como precursor de surfactantes.

Sus propiedades emulsificantes hacen que sus aplicaciones sean ampliamente utilizadas. El campo de aplicación más importante es el de lavado y limpieza, así como el tratamiento textil y los cosméticos; éstos utilizan más del 50 % de la cantidad total de tensioactivos. Los tensioactivos también se usan en el sector alimentario, la protección de cultivos, la minería y la producción de pinturas, revestimientos, tintas y adhesivos.

1.2.2.4 Emolientes

En una emulsión cosmética, los emolientes forman parte de la fase oleosa y la naturaleza fisicoquímica de los mismos determina los efectos en el cuidado del cabello y la piel, tales como el suavizado, fluidez y apariencia sensorial. Se han desarrollado métodos de ensayo para caracterizar y clasificar los numerosos emolientes disponibles en el mercado, tales como siliconas, parafinas y productos oleoquímicos. Estos últimos incluyen glicéridos, ésteres, alcoholes y carbonatos con estructuras específicamente diseñadas dependiendo de las necesidades. Por ejemplo, un compuesto basado en éter dioctílico a base de aceite de coco o palma, permite la formulación de productos libres de silicio ofreciendo productos de limpieza capilar con una mejor sensación al tacto y el brillo del pelo. Incluso su combinación con ésteres de ceras y polímeros catiónicos puede llevar a mejoras desde el aspecto sensorial. Otro ejemplo es un producto para el cuidado de la piel a base de carbonato de dioctilo (INCI), un emoliente seco con una excelente compatibilidad dermatológica y que permite una eficiente solubilización y dispersión de los filtros solares junto con una elevada calidad sensorial.

A partir de algunos alcoholes grasos procedentes de fuentes vegetales, como el octanol y el decanol, se producen los correspondientes alcoholes C16 y C20 mediante la catálisis alcalina a altas temperaturas (>200 °C). A lo largo de los años, ambos productos han demostrado ser emolientes eficaces en las formulaciones de productos para el cuidado de la piel, pero también se utilizan para otras aplicaciones, como los plastificantes.

1.2.2.5 Pesticidas

En general, la preparación de formulaciones pesticidas incluye dos componentes principales, los ingredientes activos y los ingredientes inertes. Los ingredientes activos corresponden al componente químico responsable del efecto deseado: prevenir, destruir, repeler o mitigar insectos, hongos, malas hierbas, roedores u otras plagas. Por otro lado, los ingredientes inertes son componentes que no tienen acción plaguicida, pero se adicionan como vehículo del mismo. Para ello, se utilizan aceites vegetales de coco, soja, maíz, palma y derivados para producir ingredientes inertes como surfactantes, humectantes, dispersantes, emulsionantes y adyuvantes, entre otros.

El aceite empleado debe ser apropiado de acuerdo con el pesticida a producir. Por ejemplo, el aceite de palma es semisólido en climas templados y por lo tanto no es adecuado para ser utilizado como adyuvante en pesticidas que requieran pulverización, aunque sí pueden emplearse las fracciones más livianas de este aceite. Algunas investigaciones señalan que los aceites vegetales provenientes de soja, algodón, lino, maní, colza y girasol se adhieren mejor a las hojas de las plantas o a los insectos, incluso después de fuertes lluvias debido a su naturaleza poliinsaturada. Esto aumenta la persistencia de los ingredientes activos, haciendo innecesario el tratamiento adicional del cultivo, reduciendo los costos y las cantidades liberadas al medio ambiente.

1.2.2.6 Lubricantes

Actualmente existe una demanda constante de lubricantes ecológicos de aproximadamente nueve millones de toneladas anuales de parte de los sectores industriales y automotrices. Los aceites vegetales proporcionan sólo una fracción de dicha demanda y presentan una excelente lubricidad, buena anti-corrosión, mejores características de viscosidad-temperatura y baja pérdida por evaporación (debido a la baja volatilidad de los TAG) en aplicaciones industriales tales como laminado, corte, extracción, entre otros. Desde el punto de vista medioambiental, su importancia es evidente, especialmente en actividades al aire libre como la minería, los ferrocarriles, dragados, pesca y sistemas hidráulicos agrícolas. Sin embargo, su uso sigue siendo limitado debido a la baja fluidez a bajas temperaturas y la escasa estabilidad termo-oxidativa aunque algunos de estos aspectos pueden mejorarse agregando aditivos, eliminando los dobles enlaces existentes y/o realizando modificaciones térmicas. A su vez, los aceites alto oleico generados mediante modificaciones genéticas son especiales para estas aplicaciones ya que junto con la incorporación de algunos aditivos es posible formular excelentes lubricantes. Los mismos exhiben una estabilidad oxidativa y una fluidez a baja temperatura similar o mejor que los lubricantes a base de petróleo.

1.3 Reactividad de los lípidos y sus derivados

La modificación de grasas y aceites a nivel industrial generalmente comienza con los lípidos en forma de TAG, por lo que la reactividad del grupo carboxilo es la pieza central dentro de los diferentes procesos. Los cambios que puede sufrir la cadena carbonada dependen principalmente de su longitud: C12 (aceites láuricos), C16/18 (palma, sebo, etc.) y C22 (aceites erúcicos) (Gunstone 1996). Las principales interacciones de los ésteres de glicerol, otros ésteres, alcoholes y compuestos nitrogenados se resumen en la Figura 1.3, aunque las reacciones más

utilizadas que involucran la modificación de grasas y aceites incluyen la reacción de hidrólisis y la de esterificación (Figura 1.4).

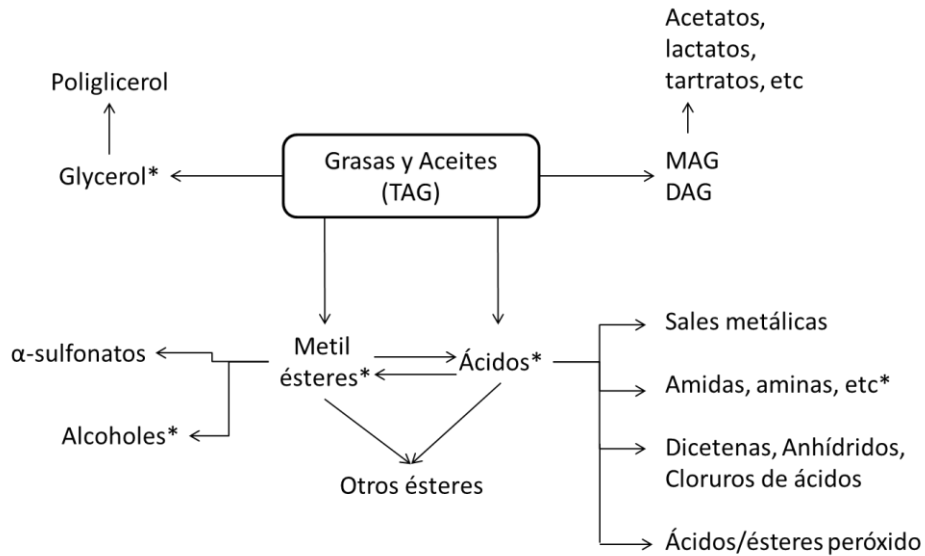


Figura 1.3 Principales interacciones de aceites, grasas y derivados (Gunstone 1996). *Oleoquímicos principales producidos industrialmente.

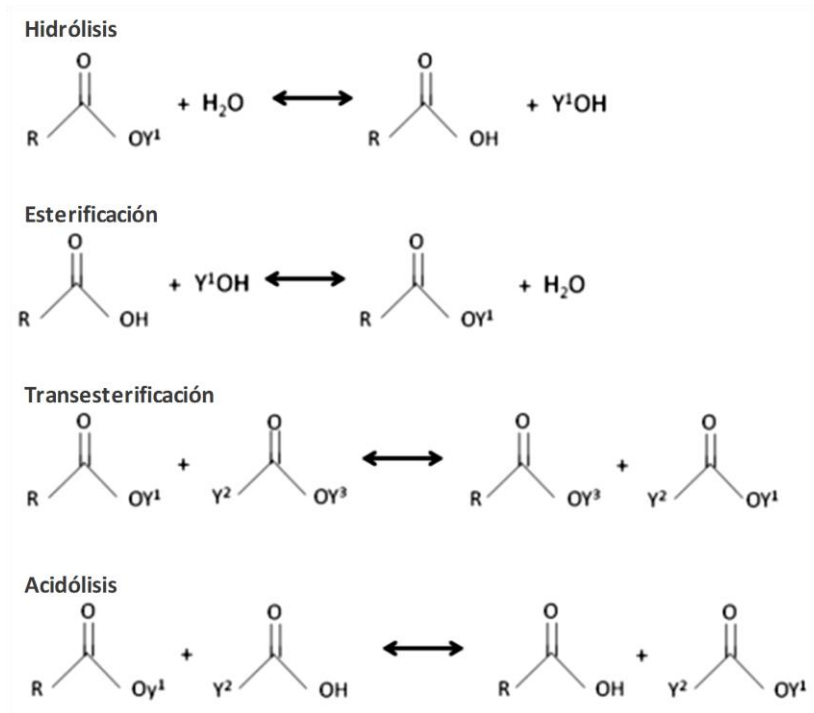


Figura 1.4 Reacciones más comunes que involucran lípidos. R, Y¹, Y² e Y³ representan cadenas carbonadas genéricas (Barros et al. 2010).

La **hidrólisis** es aquella reacción en la que, a partir de un éster de ácidos grasos como los TAG, se producen AGL, MAG, DAG y glicerol consumiendo una molécula de agua por cada enlace hidrolizado. En el caso de que la hidrólisis sea completa, los productos serían AGL y glicerol. Por otro lado, la **esterificación** corresponde a la reacción contraria en la cual un alcohol es esterificado con uno o más AGL para producir glicéridos (ej. MAG, DAG, TAG) liberando una molécula de agua por cada enlace generado. A su vez, existe un término adicional denominado **transesterificación** el cual hace referencia al conjunto de reacciones en donde se produce un intercambio entre diferentes grupos moleculares como un éster y un ácido (**acidólisis**) o entre diferentes ésteres (**interesterificación**), entre otros (Barros et al. 2010).

El libro específico de referencia para describir las principales reacciones de interés entre los lípidos fue publicado por Gunstone (1996) bajo el nombre *Fatty Acid and Lipid Chemistry*.

1.3.1 Hidrólisis

La hidrólisis de lípidos a nivel industrial suele llevarse a cabo mediante el reflujo de aceites o grasas con un álcali disuelto en agua y etanol. La posterior acidificación del hidrolizado produce AGL que pueden extraerse con un solvente orgánico como éter o hexano. El glicerol permanece en la fase acuosa pero los compuestos orgánicos no ácidos (material insaponificable) como hidrocarburos, alcoholes de cadena larga, esteroides y ésteres de glicerol acompañan a los AGL en la fase orgánica. Si es necesario, el material insaponificable puede extraerse del hidrolizado alcalino antes de la acidificación. Las diferentes fracciones obtenidas luego de la hidrólisis total de 100 g de trioleína podrían aproximarse a 95,7 g de ácido oleico y 10,4 g de glicerol, consumiendo 6,1 g de agua.

La producción de jabones por hidrólisis alcalina (saponificación) suele ser llevada a cabo a 100 °C recuperando glicerol como producto secundario. Las sales de sodio y potasio se usan como jabones mientras que otras sales metálicas se utilizan para promover la polimerización de aceites secantes, en la fabricación de grasas y lubricantes, que son luego utilizados en las formulaciones de plásticos y en piensos para animales. Los TAG también pueden ser hidrolizados a AGL por el agua, empleando alta presión, sin catalizadores y a una temperatura de 250 °C aunque se recomiendan temperaturas más bajas al utilizar aceites altamente insaturados.

La hidrólisis enzimática de los ésteres de glicerol ocurre en la naturaleza cuando las lipasas, presentes en las semillas son utilizadas por éstas para movilizar sus reservas energéticas. A pesar de esto, el aceite extraído de semillas oleaginosas suele contener bajos niveles de AGL (1-5 %) acompañados por una pequeña fracción de glicerol, DAG y MAG. Los AGL suelen ser

eliminados durante el refinado, pero la pérdida de aceite en el proceso es inevitable. En algunos casos, es posible inactivar las lipasas antes de la extracción de aceite para minimizar la hidrólisis. Si bien la hidrólisis enzimática es la base de algunas técnicas analíticas valiosas y es una parte importante en la metabolización de las grasas, el uso de la misma a escala industrial aún se encuentra en desarrollo, utilizando enzimas como *Rhizomucor miehei* y *Candida rugosa* como alternativas viables. Debido a que generalmente las reacciones enzimáticas ocurren a menor temperatura (30-50 °C) también se reducen los requerimientos energéticos (Gunstone 1996). Bajo estas condiciones los productos son más puros que los obtenidos en la hidrólisis alcalina y, por lo tanto, pueden ser recuperados más fácilmente generando menos residuos.

1.3.2 Esterificación

Como se mencionó anteriormente, los ésteres se pueden preparar a partir de ácidos (o derivados) o por intercambio de grupos alquilo o acilo entre diferentes ésteres.

1.3.2.1 Esterificación entre ácidos y alcoholes

La preparación de ésteres metílicos a partir de ácidos grasos es una reacción muy utilizada para el análisis de lípidos mediante cromatografía gaseosa. Se pueden preparar a partir de ácidos grasos utilizando un exceso de metanol a 50 °C o mayor en presencia de un catalizador ácido como el ácido sulfúrico (1-2 %), entre otros.

1.3.2.2 Acidólisis: reacción entre ésteres y alcoholes

La reacción de acidólisis entre ésteres y ácidos implica la interacción de un éster y un ácido carboxílico que intercambian grupos acilo. La acidólisis química se lleva a cabo a altas temperaturas (150 °C), empleando un catalizador como el ácido sulfúrico, óxidos metálicos o sulfato mercuríco. Por ejemplo, la reacción entre aceites vegetales y ácido láurico da lugar a la sustitución aleatoria de cadenas C16 y C18 por cadenas C12. La reacción entre el aceite de colza y el ácido láurico (mezcla 3: 1) en presencia de Lipozyme (lipasa específica de posición 1 y 3 en moléculas de TAG) a 50-70 °C conduce a la incorporación de aproximadamente 20 % de ácido láurico en los TAG obtenidos (Gunstone 1996). En base a esto, y dependiendo de los objetivos deseados, la acidólisis enzimática podría ser elegida si las temperaturas del proceso no pueden superar cierto límite o si se desea evitar el tratamiento químico.

1.3.2.3 Alcohólisis: reacción entre ésteres y alcoholes

La reacción catalítica entre un TAG y un alcohol, como por ejemplo el metanol (metanólisis), permite obtener metil-ésteres. También podría utilizarse glicerol (glicerólisis), dando como resultado una mezcla de DAG y MAG. La metanólisis requiere un gran exceso de metanol y se realiza a pequeña escala en los laboratorios para el uso de técnicas de cromatografía

gaseosa, empleando un ácido fuerte como catalizador (ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, trifluoruro de boro) o una base (metóxido sódico) siendo esta última opción la más rápida.

La metanólisis se efectúa también a escala industrial para obtener ésteres metílicos como el biodiesel. Los aceites crudos (con hasta 30 % de AGL) se hacen reaccionar primero con metanol a aproximadamente 80 °C. En primer lugar se utiliza un catalizador ácido sólido, como por ejemplo resina de intercambio iónico sulfonada, convirtiendo los AGL en ésteres; y luego se finaliza la metanólisis de los ésteres de glicerol (aproximadamente 70 °C) usando un catalizador alcalino, como hidróxido de sodio. Los aceites bajos en AGL pueden convertirse directamente en ésteres metílicos con un catalizador alcalino. En este proceso también se produce glicerol, que se recupera y es vendido como subproducto.

En la glicerólisis también se emplea un catalizador básico y el equilibrio alcanzado en la producción de DAG y MAG depende en gran medida de la concentración de glicerol disuelto en la fase oleosa. Este mecanismo es muy utilizado para la producción industrial de mezclas de DAG y MAG, empleadas comúnmente como emulsificantes. Los concentrados de MAG con purezas entre 90-95 % se obtienen mediante la posterior destilación molecular de las mezclas.

Los MAG también pueden obtenerse mediante glicerólisis enzimática. En la literatura se ha empleado *Pseudomonas sp*, obteniendo un rendimiento aproximado del 90 % utilizando sebo, aceite de palma y estearina durante 8-16 h a 42 °C y seguido por 4 días a 5 °C. En otro informe, el sebo hidrogenado de carne de vacuno y el glicerol dieron DAG con un rendimiento del 90 % después de la reacción a 60 °C durante 2 h seguido de 55 °C durante 4 h y 48 °C durante 3 días (Gunstone 1996).

1.3.2.4 Interesterificación: reacción entre ésteres

Las propiedades físicas de una grasa dependen tanto de la composición de los ácidos grasos en las moléculas de TAG, como de la posición que cada uno ocupa dentro del esqueleto carbonado del glicerol. La interesterificación de un solo aceite produce el reordenamiento de los ácidos grasos entre las diferentes moléculas de TAG mientras que la interesterificación de mezclas de aceites cambia la composición de ácidos grasos con respecto a los aceites originales. Los catalizadores incluyen hidróxido de sodio o metóxido de sodio, entre otros, y se emplean en niveles entre 0,2-0,4 %. La reacción ocurre a aproximadamente 80 °C durante 30-60 minutos. El aceite o grasa debe contener niveles mínimos de agua, AGL y/o hidroperóxidos ya que estos destruyen el catalizador. El producto obtenido debe ser purificado. La interesterificación de un único aceite genera la distribución aleatoria de los ácidos presentes en los TAG y por lo tanto

conduce a un cambio en el punto de fusión. Para algunos aceites el punto de fusión se incrementa, como es el caso del aceite de soja (de -7 a + 6 °C) y el de algodón (de 10 a 34 °C), mientras que para el aceite de palma el mismo se reduce de 46 a 35 °C. Cuando la reacción se aplica a una mezcla de grasas, todos los ácidos serán redistribuidos al azar y esto permite transferir ácidos saturados a aceites predominantemente insaturados y viceversa. Por esta razón, la interesterificación se ha utilizado industrialmente para mejorar las propiedades físicas de la manteca de cerdo y para producir sustitutos de la manteca de cacao a partir de aceites más baratos. En algunos casos, si se emplean temperaturas bajas (0-40 ° C), aquellos ésteres de glicerol saturados cristalizan en la mezcla de reacción, modificando el equilibrio de la reacción en la fase líquida. Como consecuencia, el producto final contiene más TAG tri-insaturados y tri-saturados y menos TAG mixtos ampliando el intervalo de temperaturas de fusión. Lógicamente, la reacción es más lenta pudiendo requerir hasta 24 h.

1.4 Lipasas

Las lipasas o triacilglicerol acilhidrolasas (E.C. 3.1.1.3) son enzimas de gran importancia que catalizan la hidrólisis de TAG produciendo DAG, MAG, glicerol y AGL en la interfase entre fases acuosas y orgánicas. La reacción es reversible y algunas lipasas pueden catalizar la esterificación y transesterificación bajo condiciones de baja concentración de agua. La síntesis de ésteres mediada por lipasas se ha discutido en numerosas investigaciones en los últimos años reconociendo a las mismas como una alternativa valiosa para la modificación y posterior incorporación de compuestos lipídicos a los diferentes productos industriales mencionados en secciones anteriores (Sección 1.2).

Las lipasas poseen la capacidad de hidrolizar TAG de cadena larga a pesar de que estos son insolubles en agua. Esta reacción ocurre en sistemas que presentan al sustrato en forma de micelas o emulsiones lo que las distingue frente a otras esterasas que catalizan solo la hidrólisis de ésteres solubles. A su vez, algunas lipasas pueden catalizar la hidrólisis enantio- y regio-selectiva así como la síntesis de ésteres naturales y sintéticos. Las mismas pueden esterificar/interesterificar de forma aleatoria pero también existen lipasas que presentan especificidad de posición o de sustrato. Las lipasas regiospecíficas, como por ejemplo las lipasas que reaccionan con la posición 1 y 3 de los TAG, ofrecen un gran potencial en aplicaciones industriales, como la producción de lípidos estructurados con propiedades funcionales únicas.

En la naturaleza, las lipasas se encuentran en todos los organismos vivos y son indispensables para la descomposición biológica de los lípidos por lo que las mismas pueden tener

origen animal, microbiano o vegetal. Se requieren como enzimas digestivas en la transferencia de lípidos de un organismo a otro, de planta a animal y de animal a animal. Dentro de cada organismo, son fundamentales en la deposición y movilización de la grasa como reserva de energía, en el metabolismo de los lípidos intracelulares y, por lo tanto, en el funcionamiento de las membranas biológicas. En eucariotas, las lipasas están involucradas en diversas etapas del metabolismo lipídico, incluyendo la digestión de grasa, absorción, reconstitución y el metabolismo de las lipoproteínas. A menudo las enzimas se encuentran en lugares inesperados como en el veneno de reptiles e invertebrados o enzimas microbianas que son producidas de forma extracelular

El libro *New Lipases and Proteases* publicado por Salleh et al. (2006) fue la referencia principal para desarrollar la información pertinente al origen y aplicaciones de las lipasas, salvo que se indique lo contrario.

1.4.1 Fuentes de lipasas

Dado que las lipasas son fisiológicamente necesarias para los organismos vivos, pueden encontrarse en diversas fuentes, como plantas, animales y microorganismos.

Si bien las lipasas más abundantes y estudiadas provienen de bacterias, hongos y levaduras, también están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. La información disponible sobre las mismas aún es limitada en comparación con las lipasas de animales y microorganismos. Muchas de las lipasas estudiadas en las plantas se han encontrado en las membranas biológicas. Las mismas han sido analizadas desde el aspecto funcional dentro de los tejidos vegetales (estudios "in situ") pero algunas, como es el caso de las lipasas de maíz, colza y ricino, se han solubilizado y purificado, ya sea parcialmente o hasta homogeneidad.

En los mamíferos se pueden distinguir tres grupos principales de lipasas: las del aparato digestivo, las tisulares y las lipasas de la leche. Las mismas se encuentran en varios tejidos y órganos de mamíferos, tales como el corazón, cerebro, músculo, arterias, riñón, bazo, pulmón, hígado, tejido adiposo y suero.

Las lipasas extracelulares microbianas suelen ser más termoestables que las animales y vegetales. En particular, las lipasas de los microorganismos termófilos podrían ser de gran ayuda en los procesos industriales ya que son termoestables y resistentes a la desnaturalización química. A pesar de esto, la mayoría de las lipasas actualmente disponibles se obtienen de fuentes mesófilas y exhiben una actividad óptima a 35-40 °C.

1.4.2 Aplicaciones de las lipasas

Las lipasas constituyen un grupo de enzimas importantes para el desarrollo biotecnológico debido a la versatilidad de sus aplicaciones, su fácil producción en grandes cantidades y su especificidad.

Al mismo tiempo, estos valiosos biocatalizadores actúan en condiciones generalmente más suaves en comparación con los tratamientos químicos equivalentes, son altamente estables en diversos solventes orgánicos y reducen los desechos industriales. Muchas de las aplicaciones mencionadas a continuación involucran aplicaciones/productos ya mencionados anteriormente (Sección 1.2) ya que, como es de esperar, las aplicaciones de las lipasas se encuentran íntimamente relacionadas con el procesamiento de los lípidos o cualquier formulación que los contengan.

Detergentes: La aplicación comercial principal para las lipasas hidrolíticas es su uso en detergentes para ropa. Para que esto sea posible, las lipasas deben ser termoestables y capaces de permanecer activas en medio alcalino. Existen aplicaciones prometedoras como aditivos en la lavandería industrial y detergentes domésticos debido a su capacidad para hidrolizar las grasas.

Alimentos: Debido a la especificidad de las lipasas, a partir de ellas se pueden obtener ésteres que desempeñan papeles importantes en la industria alimentaria como constituyentes del sabor y aroma. La posición del ácido graso en el esqueleto de glicerol, la longitud de cadena del ácido graso y su grado de insaturación son importantes para determinar las propiedades físicas de un triglicérido con los valores nutritivos y sensoriales deseados. Las lipasas permiten transformar las grasas más baratas y menos atractivas en sustitutos de la manteca de cacao. En la industria láctea y de confitería, las lipasas se utilizan para hidrolizar la grasa de la leche aportando los sabores específicos de los productos lácteos, particularmente en la producción de quesos. Además, estos biocatalizadores también se utilizan para el desarrollo de sabores particulares en productos de panadería y bebidas.

Papel: Las lipasas se usan junto con celulasas y ligninasas durante la fabricación del papel. El tratamiento de la pulpa de papel con lipasas conduce a una mejora considerable de la productividad y a una calidad sostenida permitiendo una menor frecuencia de limpieza en algunos equipos. Las lipasas se utilizan para modificar el tono (color) de la pulpa durante la fabricación del papel debido a la naturaleza hidrófoba de algunos componentes de la madera. Incluso una empresa japonesa desarrolló un método de control de color que utiliza una lipasa de *Candida rugosa* para hidrolizar hasta el 90 % de los triglicéridos.

Biodiesel: el biodiesel se produce a partir de triglicéridos mediante la transesterificación con metanol/etanol. La transesterificación enzimática con lipasas se ha vuelto más atractiva para la producción de biodiesel, ya que el glicerol producido como subproducto puede recuperarse más fácilmente y la purificación de ésteres metílicos es relativamente sencilla. A su vez, el costo de producción se reduce significativamente si se utilizan lipasas inmovilizadas ya que no es necesario un proceso de purificación.

Petróleo: La fosfolipasa A2 se ha utilizado en petróleo crudo con óptimos resultados a 95 °C y pH 7,0. Esta fosfolipasa es excelente para el desgomado necesario en las refinerías, reduciendo problemas de aguas residuales y costos de explotación. Se espera que las lipasas de los termófilos desempeñen papeles cada vez más importantes en los procesos industriales, debido a su termoestabilidad y resistencia a la desnaturalización química.

Otras aplicaciones: Las lipasas se han utilizado para hidrolizar lípidos obteniendo ácidos grasos y glicerol en la producción del jabón. Durante el procesamiento de cueros y pieles, se utilizan métodos enzimáticos para la eliminación de las grasas residuales y restos de proteínas residuales de la piel y el pelo, debido a la baja eficiencia y problemas ambientales asociados a los procesos químicos. Además, las lipasas se utilizan en lodos activados y otros tratamientos aeróbicos de efluentes para eliminar capas finas de grasas de la superficie de tanques aireados y así permitir el flujo de oxígeno. También se están utilizando para sintetizar ésteres de glucósidos, los cuales son difíciles de producir con los medios químicos tradicionales. Las lipasas también se emplean en la producción de productos farmacéuticos, cosméticos, agroquímicos y para diagnósticos médicos.

Una de las ventajas de las enzimas es que el proceso enzimático no implica el uso o producción de productos químicos altamente tóxicos. Los productos son seguros para el usuario, y ambientalmente más aceptables debido a su rápida biodegradación y baja toxicidad (Björkling et al. 1991).

1.4.3 Ventajas potenciales de las lipasas provenientes de fuentes vegetales

Actualmente, las fuentes de lipasas vegetales y sus posibles aplicaciones no se encuentran lo suficientemente desarrolladas para competir con las lipasas de origen microbiano. De todas formas, la información disponible hasta el momento ha permitido evaluar las ventajas que potencialmente podrían presentar estos biocatalizadores.

Las lipasas microbianas son en su mayoría producidas de forma extracelular durante el tiempo de vida del microorganismo y, como es de esperar, su producción está muy influenciada

por la composición del medio, como la fuente de carbono, además de factores fisicoquímicos tales como temperatura, pH y oxígeno disuelto (Treichel et al. 2010). Por este motivo, su producción requiere una comprensión profunda de estos mecanismos, así como el conocimiento de las características del soporte utilizado para la inmovilización (de ser necesaria), es decir, su superficie específica, capacidad de adsorción, interacciones químicas favorables para la enzima, disponibilidad, costo, etc. Es por este motivo que actualmente se están realizando estudios para tratar de identificar nuevas fuentes de lipasas que podrían ser más fáciles de utilizar (Moussavou MOUNGUENGUI et al. 2013). Las lipasas vegetales, debido a su facilidad de preparación y uso, son potenciales candidatas para la producción de biodiesel. En relación con las lipasas microbianas, las lipasas vegetales presentan la ventaja de encontrarse ampliamente disponibles y extraíbles en la biomasa vegetal a bajo costo, y sin necesidad de utilizar tecnologías genéticas para producirlas. Según Moussavou y col., (Moussavou MOUNGUENGUI et al. 2013) las lipasas microbianas genéticamente modificadas son muy caras (300 euros/kg). Si bien actualmente las lipasas vegetales no se encuentran ampliamente difundidas en la industria, el sector alimentario estima que los catalizadores de origen vegetal serían aproximadamente 20 veces más baratos que los de origen microbiano para aplicaciones equivalentes. Un ejemplo de ello es el látex exudado del fruto verde de la papaya que, además de otras enzimas, contiene lipasas activas. Este latex es utilizado en varias aplicaciones industriales como por ejemplo ablandar la carne, clarificar la cerveza y el jugo, coagular leche y producir alimentos para mascotas entre otros. Su precio estimado a granel es de aproximadamente 30 euros/kg (Moussavou MOUNGUENGUI et al. 2013; Saran et al. 2013; Alibaba 2017).

Sin embargo, el hecho de que en general las lipasas de plantas de semillas oleaginosas están usualmente presentes en niveles muy bajos en su fuente nativa presenta un inconveniente para su uso extensivo en aplicaciones a escala piloto o mayor. Hasta ahora, sólo se han descrito ejemplos de sus aplicaciones potenciales a escala de laboratorio. A pesar de esto, otras fuentes diferentes a las semillas oleaginosas, como la papaya y el ananá podrían ser buenas alternativas (Villeneuve 2003).

1.4.4 Producción industrial de lipasas en el mercado

La producción de enzimas comerciales ha crecido durante las últimas décadas no solo para responder a la expansión de los mercados que las utilizan, sino también por la creciente demanda de biocatalizadores novedosos, particularmente por los posibles beneficios medioambientales. Entre los principales productores de enzimas industriales se encuentran las empresas Novozymes con el 47 % del mercado, seguido por DuPont 21 % y DSM 6 %. A medida

que se incrementa la competencia internacional, las compañías principales compran a las empresas más pequeñas para incrementar su eficiencia y competitividad. En mayo de 2011, DuPont adquirió una participación mayoritaria en Danisco, incluyendo su división Genencor, otorgando a DuPont una fuerte posición en el mercado de las enzimas, especialmente para la producción de etanol a partir de celulosa. Hasta el 2014 la producción de enzimas comerciales se concentró principalmente en unos pocos países desarrollados como Dinamarca, Suiza, Alemania, Holanda y Estados Unidos. Novozymes y Danisco en Dinamarca comprenden aproximadamente el 70 % del mercado total de enzimas (Kumar et al. 2014).

El valor comercial y los aspectos reguladores de la aplicación de enzimas son controlados por patentes y derechos. Novozymes es la empresa líder con un número máximo de patentes obtenidas, lo que resulta razonable en relación a su posición en el mercado. La demanda mundial de lipasas fue de \$ 255 millones de dólares en 2012. Sin embargo, se espera que esta demanda sufra un incremento anual de 6,2 % hasta alcanzar los \$ 460 millones en 2022 (Honda 2017).

Hasta el 2014 el mercado global de enzimas estuvo dominado por la industria de alimentos y bebidas, que se vio beneficiado con la rápida tasa de crecimiento de los países en desarrollo, donde el nivel de vida de las personas pobres mejoró significativamente y se comenzó a otorgar una mayor importancia a aspectos de nutrición y salud (Kumar et al. 2014).

Actualmente la producción de lipasas comerciales está centrada principalmente en productos obtenidos de fuentes microbianas y, en menor medida, animales. La empresa Novozymes comercializa lipasas en su forma líquida e inmovilizada, pero ninguna de ellas comprende fuentes de origen vegetal (Novozymes 2017b, 2017a). En el caso de DuPont, existen diversos productos relacionados con la biocatálisis, pero ninguno de ellos se comercializa bajo la denominación de "lipasa" (Du-Pont 2017). Por el contrario, la empresa Sigma-Aldrich ofrece una amplia variedad de lipasas comerciales provenientes de fuentes microbianas y animales, mientras que solo existe una única opción de lipasa obtenida a partir de fuentes vegetales bajo el nombre de "Lipase from Wheat germ" (Sigma-Aldrich, 2018).

A nivel nacional, la producción de enzimas es mucho más limitada y existen unas pocas empresas dedicadas al rubro. Inpack Alimenticia S.A. (2017) es una empresa argentina fundada en 1995 dedicada a la distribución de insumos para la industria alimentaria así como también la provisión de equipamientos, herramientas y servicios de consultoría. Entre los diferentes productos que ofrecen, se encuentran un grupo de enzimas coagulantes líquidas y en polvo para el procesamiento específico de lácteos. Por otro lado, también existe una empresa argentina bajo

el nombre Keclon, fue fundada en el 2012 y dedicada al desarrollo biotecnológico de enzimas para la producción de aceites y biodiesel (Keclon 2017). Particularmente, se focalizan en la producción de enzimas diseñadas para eliminar las impurezas mayoritarias presentes en aceites y biodiesel de origen vegetal. En cuanto a los aceites, la empresa desarrolló fosfolipasas destinadas a la eliminación de fosfolípidos presentes en el aceite crudo durante una de las etapas del proceso de refinación conocida como desgomado.

En base a lo mencionado anteriormente, se puede concluir que el campo de la investigación y producción de nuevas fuentes de lipasas presenta un interés justificado debido a la oferta limitada de estos productos tanto a nivel nacional como internacional.

1.5 Problemática

Como ya se ha mencionado anteriormente los productos obtenidos por la vía enzimática poseen propiedades y características distintivas frente a aquellos obtenidos por reacciones químicas tradicionales, los que los hacen principalmente adecuados para su uso en la industria alimentaria. Esto es debido a la utilización de reactivos menos agresivos que aquellos utilizados en las reacciones químicas y al uso de condiciones de reacción más suaves. Particularmente, con la utilización de lipasas en la modificación de aceites y grasas se evita el deterioro de los ácidos grasos insaturados y sus grupos funcionales, logrando así mayor pureza y valor nutricional de los productos. Además de algunos problemas operativos, el principal inconveniente de la tecnología enzimática es el alto costo de las enzimas, por lo cual su uso a escala comercial es todavía limitado con respecto a todas las aplicaciones posibles. La posibilidad de encontrar fuentes de lipasas más económicas las cuales, a su vez, puedan ser fácilmente reutilizadas o colocadas en reactores de lecho fijo, se ha convertido en un aspecto esencial para considerar esta tecnología como viable técnica y económicamente. Otro aspecto a considerar en la viabilidad de esta tecnología a nivel industrial, es la baja disponibilidad de enzimas comerciales producidas en el país. Con el fin de que la tecnología enzimática sea competitiva a nivel local y no tenga insumos críticos, se hace necesario tanto el desarrollo propio de catalizadores enzimáticos como el estudio y optimización de cada uno de los procesos de producción.

1.6 Objetivos

El uso de enzimas se hace cada vez más importante en un gran número de aplicaciones industriales ya mencionadas en la Sección 1.2 como lo son la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, entre otras.

En el grupo de investigación en donde se ejecutó el presente trabajo se han estudiado previamente algunas de las reacciones de mayor interés para la modificación de lípidos: acidólisis enzimática e interesterificación enzimática (Carrín et al. 2008; Palla 2012; Pacheco 2012). También se han obtenido biocatalizadores por inmovilización de lipasas comerciales en soportes de biopolímeros (quitosano), los cuales han sido ensayados en reacciones de acidólisis (Palla 2012). La totalidad de estas investigaciones se han llevado a cabo utilizando lipasas de origen microbiano, ya sea en su forma libre o inmovilizada.

Si bien las lipasas producidas por plantas no han sido investigadas tanto como las microbianas o las animales, existen evidencias que indicarían ciertas ventajas tales como su disponibilidad, aparentemente fácil purificación y su promisoría selectividad particular. En la bibliografía científica internacional se encuentran algunos trabajos de obtención de polvos y extractos con actividad lipásica a partir de distintas plantas o frutos (Barros et al. 2010), como papaya, girasol, lino, ricino, arroz y laurel, entre otros. Estos trabajos son un disparador hacia la búsqueda de nuevas fuentes de lipasas, especialmente en plantas de fácil producción en Argentina.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el proceso de obtención de lipasas de diferentes plantas de fácil disponibilidad y caracterizar las mismas a través de su actividad en reacciones de interés científico e industrial, como lo son la hidrólisis y acidólisis de aceites vegetales.

En base a lo discutido anteriormente, los objetivos específicos propuestos fueron:

1. Implementar un proceso para la obtención de polvos con potencial actividad lipásica utilizando diversas fuentes: diferentes variedades de semilla de girasol (aceiteras y de cultivo, variedad común y alto oleico) y semillas de ricino silvestre.
2. Evaluar la actividad de dichos polvos/extractos en reacciones de hidrólisis de aceites vegetales. En la medida de lo posible, también evaluar su actividad en reacciones de esterificación y acidólisis. Además de los polvos producidos localmente, evaluar la actividad en una lipasa comercial de germen de trigo.
3. Evaluar la metodología aplicada para la cuantificación de la actividad lipásica basada en técnicas de titulación y cromatografía gaseosa.
4. Evaluar los efectos de diferentes procesamientos de las semillas sobre la actividad lipásica: germinada/sin germinar, desgrasada/sin desgrasar, procesarlas en frío o a temperatura ambiente.

5. Considerar el extracto de mayor actividad y estudiarlo en mayor profundidad:
 - Modificar las condiciones de reacción: composición del medio (concentración de surfactante y aceite), temperatura, tiempo de reacción y concentración de extracto.
 - Optimizar la actividad lipásica empleando metodologías de diseño y optimización de experimentos.
 - Evaluar el posible reuso del extracto y el deterioro/inactivación durante el almacenamiento bajo diferentes condiciones (heladera y freezer).
 - Evaluar la cinética de reacción a diferentes temperaturas y encontrar modelos matemáticos que la describan.

1.7 Referencias

Alibaba. (2017). Proveedores de extracto de látex. 31 de agosto de 2017, <https://www.alibaba.com/showroom/price-papain.html>

Alm, M. (2013). Animal Fats. AOCS Lipid Library. 30 de agosto de 2017, <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40320>

Barros, M., Fleuri, L.F. & Macedo, G. a. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties - a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 27: 15-29.

Björkling, F., Godtfredsen, S.E. & Kirk, O. (1991). The future impact of industrial lipases. *Trends in Biotechnology* 9(1): 360-363.

Carrín, M.E. & Crapiste, G.H. (2008). Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture. *Journal of Food Engineering* 87: 243-249.

Código Alimentario Argentino. (2017). Capítulo vii CAA.

Du-Pont. (2017). Enzyme products. http://duponttools.force.com/ppf?lang=EN_US&country=USA&level0=Categories&level1=Industrial+Bio+technology&level2=

FAO/WHO. (2008). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO Food and nutrition paper* (Vol. 91).

Fediol. (2018). 7 de marzo del 2018, <http://www.fediol.be/web/linseed/1011306087/list1187970112/f1.html>

Gunstone, F. (1996). *Fatty Acid and Lipid Chemistry* (1.a ed.). Fife: Springer Science+Business Media, B.V.

Gunstone, F. (2008). *Oils and Fats in the Food Industry* (1.a ed.). Dundee: Wiley-Blackwell.

Holm, H.C. & Cowan, D. (2008). The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(8): 679-691.

Inpack. (2017). Enzimas para lácteos. <http://www.inpack.com.ar/index.php>

Kanes, R., Sato, K., Ueno, S., Wassell, P., Ranjith, P., Dijkstra, A., Talbot, G., Young N., Wijewardene, U., Ranjith, P., Farmer, M. (2014). *Fats in Food Technology* (2nd ed.). Cirencester, Gloucestershire, UK: Wiley Blackwell.

Keclon. (2017). Enzimas para la producción de aceite y biodiesel. <http://www.keclon.com/>

Kumar, V., Singh, D., Sangwan, P. & Gill, P. K. (2014). *Industrial enzymes: trends, scope and relevance*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Moussavou Mounquengui, R.W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P. & Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in Energy and Combustion Science* 39(5): 441-456.

Novozymes. (2017). Lipasas inmovilizadas. <https://translate.google.com/?hl=es#auto/es/Immobilized>

O'Brien, R. (2014). *Fats and oils: Formulating and Processing for Applications* (3rd ed.). New York: CRC Press.

Pacheco, C. (2012). *Cinética de la Interesterificación Enzimática de Aceites Vegetales*. Universidad Nacional del Sur.

Palla, C.A. (2012). *Estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores enzimáticos batch y de lecho empacado*. Universidad Nacional del Sur.

Salimon, J., Salih, N. & Yousif, E. (2012). Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. *Arabian Journal of Chemistry* 5(2): 135-145.

Salleh, A., Rahman, R. & Basri, M. (2006). *New Lipases and Proteases*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Saran, P.L. & Choudhary, R. (2013). Drug bioavailability and traditional medicaments of commercially available papaya: a review. *African Journal of Agricultural Research* 8(25): 3216-3223.

Sigma-Aldrich. (2018). <https://www.sigmaaldrich.com/argentina.html>

Sikorski, Z. & Kalakowska, A. (2003). Chemical and Functional of Food Lipids. CRC Press.

Statista. (2017). Producción mundial de aceite. <https://www.statista.com/statistics/263978/global-vegetable-oil-production-since-2000-2001/>

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M.A., Di Luccio, M. & Oliveira, J.V. (2010). A review on microbial lipases production. Food and Bioprocess Technology 3(2): 182-196.

Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. European Journal of Lipid Science and Technology 105: 308-317

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo

2

En este capítulo se describen todos los materiales y métodos empleados a lo largo de la tesis. Incluye desde los métodos menos relevantes, denominados “Métodos auxiliares” (normas de referencia o kits comerciales que permitieron realizar una caracterización parcial de los materiales empleados), hasta las metodologías más importantes asociadas a procedimientos experimentales desarrollados en la tesis a partir de referencias bibliográficas, los cuales se encuentran estrictamente relacionados con el proceso de obtención de los catalizadores de origen vegetal y la detección de la actividad lipásica de los mismos.

2.1 Materiales

Si bien en cada capítulo se presenta un resumen de los materiales utilizados, en esta sección se realiza una descripción más profunda de los mismos. Las sales y sustancias necesarias para preparar buffers y soluciones de titulación ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, CaCl_2 , KH_2PO_4 , KOH , $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, NaOH , Na_2SO_4 , fenolftaleína, y ácido acético) junto con los solventes empleados (etanol, éter etílico, hexano, acetona, cloroformo y metanol) fueron de grado analítico. El aceite utilizado como sustrato fue aceite de girasol alto oleico (elaborado por Ecoop) adquirido en un comercio local. La goma arábiga, marca Anedra, fue de grado extra puro. Los estándares, solventes y otros productos utilizados en las técnicas cromatográficas (glicerol, piridina, N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida, tetradecano, tricaprina y tripalmitoleína) fueron de grado cromatográfico (pureza 99 %). Las diferentes lipasas microbianas comerciales utilizadas ocasionalmente fueron *Lipase from Rizomucor miehei* (Sigma) y *Lipozyme RM IM* (Novozymes).

2.2 Métodos auxiliares

2.2.1 Caracterización de aceite alto oleico

Debido a que el aceite de girasol alto oleico fue el sustrato principal empleado en las reacciones enzimáticas del presente trabajo, su caracterización se realizó mediante las siguientes determinaciones y los resultados se muestran en el Anexo A.

2.2.1.1 Índice de acidez: método del indicador

El método oficial (IUPAC 1992) se utilizó para evaluar el índice de acidez del aceite comercial alto oleico empleado en las reacciones enzimáticas como sustrato. Aproximadamente 5 g de la muestra fueron pesados y disueltos en aproximadamente 100 mL de una mezcla de etanol:éter dietílico 1:1 (v/v). Unas gotas de fenolftaleína se adicionaron como indicador colorimétrico. Luego, mediante el uso de una bureta, se tituló la muestra agregando gotas de una solución estandarizada de KOH 0,1 N en etanol hasta que se observó un color rosado que persistió al menos durante 10 segundos. Se reportó tanto el porcentaje de ácidos grasos libres (%AGL m/m), como el índice de acidez ($\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{AGL}}$). La determinación se realizó por triplicado.

2.2.1.2 Ácidos grasos en aceite

La composición de ácidos grasos en el aceite de girasol alto oleico fue determinada mediante la derivatización de la muestra obteniéndose ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de acuerdo al método oficial AOCS Ce 2-66 (2009). Luego, los FAME fueron analizados mediante cromatografía gas-líquido (CGL) con un cromatógrafo serie 4890D (Agilent, Hewlett-Packard). Su identificación se realizó comparando los tiempos de retención de las especies de la muestra respecto de los estándares Supelco (Supelco 37 Component FAME mix, Supelco Inc) y la cuantificación se expresó como porcentaje (área) respecto del total de ácidos grasos (AOCS Ce 1e-91). Para la separación mediante CGL se empleó una columna capilar de sílice fundida (SP-2380, 30 m × 0,25 mm I.d., espesor 0,2 μm ; Supelco Co., Bellefonte, PA). El programa de temperatura se mantuvo a 170 °C durante 15 min, luego aumentó a 210 °C (4 °C/min) y se mantuvo a 210 °C 10 min más. El gas carrier fue hidrógeno a una velocidad de 23 m/s. El inyector se utilizó en modo split con una relación de 1:50. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama (denominado FID) fueron ambas de 220 °C mientras que la adquisición de datos e integración de picos se realizaron utilizando el programa EZ Chrom Elite 332 (Agilent). La determinación se realizó por duplicado.

2.2.1.3 Valor peróxido

Para la determinación del índice de peróxidos se utilizaron los métodos IUPAC 2.501 (1992) y AOCS CD 8-53 (2009). Esta metodología permitió determinar todas las sustancias que

oxidan al yoduro de potasio bajo las condiciones del test, en términos de miliequivalentes de peróxidos contenidos en un kg de muestra ensayada. Para ello se realizó una titulación con tiosulfato de sodio en agua, empleando una solución de almidón como indicador. Las sustancias determinadas corresponden a los peróxidos u otros productos similares provenientes de la oxidación de las grasas. La determinación se realizó por triplicado.

2.2.2 Contenido de aceite

El contenido de aceite de los sustratos vegetales empleados como materia prima se determinó según el método 1.122 de IUPAC (1992), empleando un equipo Soxhlet. Para cada extracción se utilizaron aproximadamente 1,8 g de muestra libre de humedad. El solvente empleado fue n-hexano. Una vez finalizada la extracción (4 h, aproximadamente 15 ciclos), el solvente se evaporó en un roto-evaporador a presión reducida y a una temperatura máxima de 60 °C. El aceite obtenido se colocó bajo corriente de nitrógeno hasta lograr eliminar todo el hexano residual. La técnica se realizó por duplicado.

2.2.3 Contenido de humedad

Esta determinación se llevó a cabo utilizando el método oficial Ca 2d-25 (AOCS 2009) con aproximadamente 3 g de muestra. La muestra se colocó en una estufa a 60 °C y 35 kPa hasta que alcanzó un peso constante. La técnica se realizó por duplicado.

2.2.4 Contenido de proteínas:

Se utilizó un kit comercial (Proti II, Wiener Lab, Argentina) compuesto de una solución de EDTA/Cu. El mismo permitió determinar la concentración de proteínas disueltas mediante espectrofotometría (Equipo Shimadzu UV 160 A, software PC 160 Plus). Se empleó albúmina de suero (47 g_{Proteína}/L) como estándar de calibración.

Procedimiento experimental:

- 1- Curva de calibrado:
 - a. Colocar diferentes volúmenes de suero en cantidades conocidas dentro de tubos de ensayo (ej. 10, 20, 40 y 50 µL) preparando cada solución por triplicado. Agregar 3,5 mL de la solución de EDTA/Cu y agitar.
 - b. Realizar un blanco de reacción agregando agua destilada en lugar de albúmina de suero.
 - c. Mantener los tubos a 37 °C durante 15 minutos. Luego, dejar que los tubos alcancen temperatura ambiente. Las mediciones de absorbancia deben realizarse antes de pasadas las 12 h.

- d. Medir la absorbancia de las muestras y del blanco en un espectrofotómetro UV/vis a 540 nm.
 - e. Calcular los gramos de proteína presentes en cada solución del patrón y realizar una curva que relacione la absorbancia con el contenido de proteína. Obtener la regresión lineal.
- 2- Medición de las muestras de interés
- a. Colocar 50 μL de la solución incógnita en un tubo y adicionar 3,5 mL del preparado de EDTA/Cu.
 - b. Seguir los pasos b-d de la enumeración anterior
 - c. Utilizar la curva de calibrado para evaluar qué contenido de proteína corresponde al valor de absorbancia obtenido.

2.3 Preparación de biocatalizadores de origen vegetal

2.3.1 Introducción

Las semillas empleadas para las diferentes reacciones enzimáticas fueron girasol y ricino pero también se analizó una lipasa comercial de germen de trigo. Tres semillas diferentes de girasol fueron utilizadas, por un lado el genotipo PAN7076 (semillas para cultivo) suministradas gentilmente por un colega mientras que las otras dos fueron proporcionadas por Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. (semillas para extracción de aceite) en variedad común (2013 y 2015) y alto oleico (2014). Por otro lado, las semillas de ricino de una planta ornamental fueron amablemente provistas por Federico Delucchi. La lipasa de germen de trigo (WGL) fue adquirida de Sigma-Aldrich bajo el nombre de lipase from wheat germ, type I.

A lo largo de diferentes trabajos publicados se identificó un patrón general en el procesamiento de las semillas con el fin de obtener un producto que sirva como biocatalizador (Prabhu et al. 1999; Sagioglu et al. 2005; Isbilir et al. 2008; Santos et al. 2013). La Figura 2.1 presenta un resumen de todas las vías de procesamiento que fueron eventualmente aplicadas, independientemente de la semilla empleada (girasol o ricino). Vale aclarar que no todas las vías fueron aplicadas a todas las semillas. A modo general, la preparación del catalizador comenzó con el descascarado de la semilla, con o sin germinación previa. El desaceitado con solventes luego de la molienda de las semillas sin cáscara fue el primer paso del procesamiento, obteniéndose un polvo comúnmente llamado “polvo de acetona”, aunque denominaciones como polvo enzimático o lipásico también fueron utilizadas como sinónimos a lo largo de la tesis. En el girasol existe evidencia que indica que la actividad lipásica se incrementa luego de la germinación (Gupta et al. 2003; Sadeghipour et al. 2003; Furse et al. 2013) aunque también se ha reportado

actividad en la semilla sin germinar (Sagiroglu et al. 2005). Por otro lado, diferentes trabajos en donde se utilizó ricino como materia prima, muestran que la germinación no es necesaria para obtener polvos enzimáticos con elevada actividad (Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013).

Si bien los polvos de acetona fueron una posibilidad viable, en algunos casos fue necesario evaluar la actividad de las semillas molidas sin desgrasar (germinadas o no), para evaluar el comportamiento de las lipasas con el aceite endógeno de la semilla (Jachmanián et al. 1996). En otros casos, fue empleado el aceite residual luego del desgrasado para analizar la posible pérdida de catalizador en la fase apolar. Se debe aclarar que la palabra “**Extracto**” fue comúnmente utilizada a lo largo del capítulo para referenciar de forma genérica a cualquiera de los productos (Figura 2.1) utilizados como catalizador. Otros autores mencionaron una posible extracción proteica empleando buffer como solvente. El objetivo en este caso fue generar la disolución de las proteínas en el buffer y luego emplear dicho buffer como una solución de catalizador libre (en solución) (Jachmanián, 1995).

2.3.2 Procesos involucrados en la preparación de los biocatalizadores

A continuación, se detallan los procedimientos experimentales utilizados durante la preparación de los catalizadores (Figura 2.1).

2.3.2.1 Germinación

Una vez que las semillas visiblemente sanas fueron seleccionadas manualmente, las mismas fueron enjuagadas varias veces con agua potable hasta no observar residuos en el agua de lavado. Luego, fueron sumergidas en agua destilada y lavandina (62,5 mL hipoclorito de sodio al 10 % en 100 mL totales) durante 30 minutos con una agitación magnética suave. Después de realizar 5 enjuagues con agua destilada, las semillas se secaron levemente con papel absorbente y fueron colocadas en una bandeja de germinación tapada con papel aluminio. La bandeja estaba compuesta por una base de algodón saturado en agua. Sobre el algodón se colocó una grilla plástica con orificios de aproximadamente 1 cm x 1 cm. A su vez, sobre la grilla se colocó papel de filtro humedecido por el propio algodón saturado. Las semillas fueron colocadas de forma tal que no exista superposición de las mismas. La germinación se realizó a 25 °C en una cámara con temperatura controlada durante 90 h. Las semillas con raíces primarias inferiores a 1,5 cm de longitud o superiores a 3,5 cm fueron descartadas. Este criterio se tomó como referencia interna de forma de poder comparar distintas tandas de germinación en un estado relativamente similar.

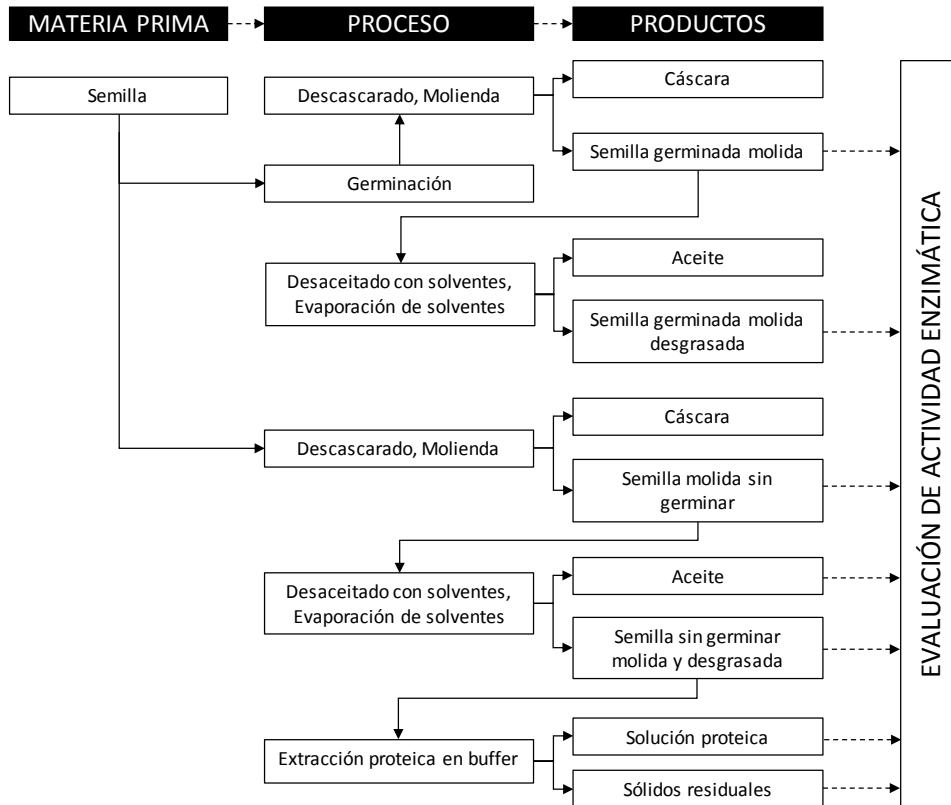


Figura 2.1 Esquema simplificado de los tratamientos realizados a las semillas para la obtención de extractos con potencial uso como biocatalizador.

2.3.2.2 Descascarado, molienda y tamizado

El descascarado fue manual utilizando un cutter para acceder más fácilmente al interior de la semilla. Se utilizaron dos tipos de molienda, según si la muestra fue procesada sumergida en solvente o no:

- **Molienda A:** se utilizó un molinillo de café (con cuchillas metálicas y motor en la base). Las semillas peladas fueron colocadas dentro del mismo y se realizaron aproximadamente 6 moliendas de 2 segundos cada una, mezclando con una varilla metálica antes de comenzar cada molienda de forma de despegar el material de las paredes del molinillo.
- **Molienda B:** se utilizó una procesadora con cuchillas metálicas y motor en la parte superior (minipimer). La muestra se colocó en un vaso de precipitado de 500 mL en presencia de 100 mL de acetona helada. A su vez, se utilizó un baño de hielo donde se colocó la base del recipiente. La molienda se realizó durante 5 min, verificando la homogeneidad del material al final de la misma.

En algunos casos (Sección 4.2.2) se realizó un tamizado luego de emplear la molienda A para evaluar si el tamaño de partícula durante el desgrasado tenía influencia sobre la actividad enzimática. Para dicho tamizado se emplearon tamices de 1410, 1000, 840, 590 micrones y el ciego, obteniéndose fracciones retenidas para 1000 micrones, 590 micrones y ciego. Por esta razón, las partículas analizadas presentaron diámetros promedios (d) entre $1000 \leq d_{1000} < 1410$ micrones, $590 \leq d_{590} < 840$ micrones y $\text{ciego} < d_0 < 590$ micrones.

En otros casos simplemente se colocó todo el material molido sin tamizar en el recipiente de vidrio para su posterior desaceitado.

2.3.2.3 *Desaceitado con solventes*

Luego de la molienda se colocó el material dentro de un erlenmeyer y se incorporó la cantidad de solvente necesaria para alcanzar una proporción de 5 mL de solvente por cada 1 g de semilla molida (Santos et al. 2013). Tres metodologías diferentes se emplearon a lo largo del trabajo, siendo la metodología "Acetona-16h" la más utilizada.

- Acetona-16h: el material se colocó dentro de una cámara refrigeradora (2-4 °C) y se dejó con agitación magnética hasta el día siguiente (aproximadamente 16 h de extracción) (Santos et al. 2013).
- Acetona-3x30min: este desaceitado se realizó utilizando acetona a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados consecutivos de 30 minutos cada uno con agitación magnética (Sagiroglu et al. 2005). El material fue filtrado con papel de filtro entre cada lavado y solvente nuevo fue colocado nuevamente en contacto con la muestra.
- Hexano-3x30min: este desaceitado se realizó utilizando hexano a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados consecutivos de 30 minutos cada uno con agitación magnética (Sagiroglu et al. 2005). El material fue filtrado con papel de filtro entre cada lavado y solvente nuevo fue colocado nuevamente en contacto con la muestra.

Estos métodos fueron estudiados debido a que el tiempo de contacto con el solvente podría tener efectos sobre la actividad lipásica al igual que la naturaleza del mismo (acetona o hexano) (Sagiroglu et al. 2005).

Independientemente del método de desaceitado y luego del mismo, el material fue filtrado y lavado con más solvente (aproximadamente 4 lavados utilizando 20 mL de solvente cada vez). Por un lado, la fase del solvente fue evaporada recuperando el aceite extraído para su posterior cuantificación gravimétrica. Por otro lado, la técnica para evaporar el solvente residual contenido en la fase sólida fue diferente dependiendo del tipo de molienda utilizada:

- Para la molienda A se emplearon frascos color caramelo que fueron colocados bajo una suave corriente de nitrógeno hasta obtener un peso constante y no sentir residuos de solvente al olfato. El material fue removido ocasionalmente con una espátula metálica para facilitar la evaporación del solvente.
- Para la molienda B se empleó un cristizador de base muy amplia. El material fue ubicado de forma disgregada sobre la base del cristizador y se colocó al descubierto hasta el día siguiente dentro de una heladera apta para solventes (Santos *et al.* 2013).

Una vez eliminado el solvente de los sólidos, los mismos fueron procesados en un mortero para obtener partículas más finas y homogéneas. Finalmente fueron tamizados a través de un colador metálico y colocado dentro de un frasco color caramelo para ser almacenados en el freezer hasta su uso.

Es importante resaltar que debido a que este proceso solo involucró la eliminación del aceite de las semillas, el polvo obtenido no fue una lipasa pura. Dentro de su estructura, dicho polvo contuvo a las lipasas pero también muchos otros componentes de origen vegetal que no fueron eliminados en el proceso. Si bien en un principio la lipasa podría haber estado inmovilizada sobre el material vegetal, esto no implica que una vez incorporada al medio de reacción, esta no fuera parcialmente solubilizada. A su vez, lo mismo podría haber ocurrido con cualquiera de los componentes restantes del polvo. Por esta razón fue necesario realizar blancos apropiados que permitieron identificar este efecto sobre los resultados.

2.3.2.4 Extracción proteica

En algunos casos se analizó la actividad lipásica de soluciones proteicas provenientes de los polvos enzimáticos obtenidos en el punto anterior, así como también del residuo sólido luego de la extracción proteica (Tabla 2.1). La metodología de la extracción consistió en colocar una cantidad conocida del polvo enzimático en contacto con buffer de fosfato (50 mM, pH 7 en presencia de CaCl_2 0,5 mM como activador de la lipasa) con una relación de 2,5 g de polvo en 10 mL de buffer (Sagiroglu *et al.* 2005). Esto se mantuvo en la cámara refrigeradora (2-4 °C) con agitación magnética por aproximadamente 16 h. Luego, todo el material se colocó en un tubo de centrífuga y se centrifugó por 15 minutos hasta observar nítidamente la separación de fases. El sobrenadante fue separado del residuo sólido utilizando una pipeta Pasteur e inmediatamente fueron evaluados en su actividad lipásica en reacciones de hidrólisis.

2.3.3 Catalizadores

A modo general, la Tabla 2.1 resume todos los productos que se emplearon como catalizador para las reacciones enzimáticas. Los detalles sobre el procedimiento experimental correspondiente a cada columna se detallaron en la sección anterior (Sección 2.3.2).

Tabla 2.1 Catalizadores empleados en las reacciones enzimáticas junto con una descripción general del procesamiento de obtención de cada uno.

Fuente ¹	Germinación	Molienda	Desaceitado	Procesamiento adicional	Producto analizado
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	no	Aceite
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	Extracción proteica	Solución proteica
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	Extracción proteica	Sólidos residuales
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	Tamizado, 1000 micrones ²	Polvo enzimático
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	Tamizado, 590 micrones ²	Polvo enzimático
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	Tamizado, ciego ²	Polvo enzimático
Girasol OM	no	Molinillo de café	Hexano, 3 lavados 30 min c/u	no	Polvo enzimático
Girasol OM	no	Molinillo de café	Acetona, 3 lavados 30 min c/u	no	Polvo enzimático
Girasol OM	si	Molinillo de café	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
Girasol OM	si	Molinillo de café	no	no	Polvo enzimático
Girasol OM	si	Molinillo de café	Soxhlet	no	Polvo enzimático
Girasol PAN7076	no	Molinillo de café	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
Girasol PAN7076	si	Molinillo de café	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
Girasol PAN7076	no	Minipimer con acetona	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
Ricino	no	Minipimer con acetona	Acetona, 16h	no	Polvo enzimático
WGL	---	---	---	---	Polvo enzimático comercial

¹Girasol OM: Semillas de girasol provistas por Oleaginosa Moreno Hermanos S.A., Girasol PAN7076: semillas de girasol genotipo PAN7076 y WGL: lipasa comercial de germen de trigo. ²Partículas con diámetros promedios (d) entre $1000 \leq d_{1000} < 1410$ micrones, $590 \leq d_{590} < 840$ micrones y $\text{ciego} < d_0 < 590$ micrones (Sección 2.3.2.2). OM: Oleaginosa Moreno Hermanos S.A.

2.4 Reacción de hidrólisis

2.4.1 Introducción

Como se mencionó anteriormente el objetivo principal de esta tesis fue evaluar la posibilidad de producir una lipasa de origen vegetal que pueda ser empleada en la modificación de grasas y aceites. La reacción principal del estudio fue la hidrólisis de aceite vegetal (Figura 2.2) pero también se hicieron algunos ensayos con reacciones de acidólisis y esterificación, los cuales fueron detallados en diferentes capítulos para cada caso particular. Para evaluar estas reacciones se debieron investigar, desarrollar y definir diferentes variables y técnicas del proceso general (Figura 2.3).

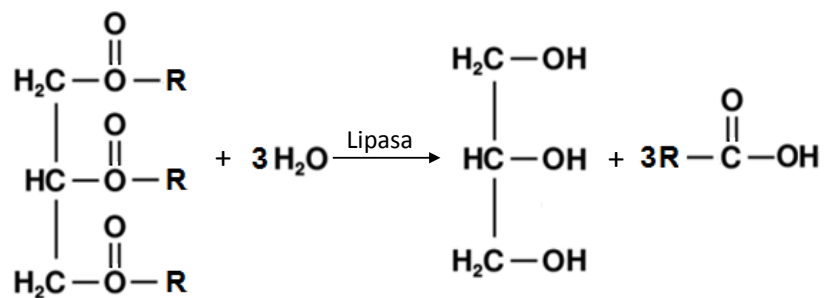


Figura 2.2 Ejemplo de reacción completa de hidrólisis.

En esta sección se describe la composición de los diferentes medios de reacción ensayados (Recuadro 1, Figura 2.3) usados a lo largo de la tesis junto con las referencias bibliográficas en las cuales se fundamentan. Por otro lado, la determinación de los subproductos (Recuadro 3, Figura 2.3), junto con los blancos de reacción utilizados y el cálculo de la actividad lipásica (Recuadro 4, Figura 2.3) se describen en las siguientes secciones (Secciones 2.4 y 2.5).

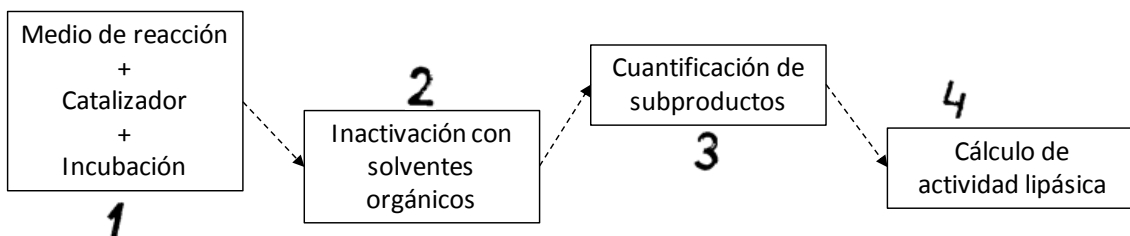


Figura 2.3 Esquema general del procedimiento experimental. El paso 2 debe ser omitido si la cuantificación del paso 3 se realiza mediante titulación en continuo (Sección 2.5.2.2).

Como se mencionó en la introducción del Capítulo 1, la hidrólisis de triglicéridos es una reacción en la cual los ácidos grasos son separados de la estructura de glicerol para formar ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, consumiendo agua (hidrólisis total, Figura 2.2). Cuando la hidrólisis no es completa, los subproductos finales serán AGL, mono-, di- y tri-acilgliceroles (MAG, DAG y TAG, respetivamente). Para que la reacción ocurra es necesaria la presencia de un catalizador ya sea un ácido, una base o una enzima. Las lipasas de origen vegetal son, en este caso, los catalizadores empleados en las diferentes reacciones de hidrólisis realizadas en esta tesis. Para ello, se utilizaron diferentes medios de reacción, los cuales se detallan a continuación. En todos los casos, la reacción de hidrólisis fue iniciada agregando el catalizador al medio de reacción y el sustrato utilizado fue aceite de girasol alto oleico. Se debe mencionar que la mayoría de los medios empleados fueron elegidos en base a diferentes métodos o referencias bibliográficas por lo que algunos parámetros, como por ejemplo la relación entre la cantidad de sustrato y fase acuosa, varían considerablemente de un medio a otro. De todas formas, la mayoría de los análisis llevados a cabo en la presente tesis se realizaron comparando resultados obtenidos bajo igualdad de condiciones, mientras que la comparación entre diferentes condiciones solo se realizó para casos particulares de interés.

2.4.2 Medio Šinkūnienė

Este medio es similar al reportado por Šinkūnienė et al. (2011) en la hidrólisis de trioleína, aunque los volúmenes fueron adaptados. El volumen total de reacción utilizado en esta tesis fue de 990 μL empleando 90 μL de aceite (aproximadamente 0,07 g), 600-800 μL de hexano y 100-300 μL de buffer de fosfato (pH 7, 100 mM). Se adicionó 1 mL de éter etílico para finalizar la reacción y se procedió inmediatamente con la cuantificación de los productos de reacción. Para este medio, la relación entre la masa de sustrato con respecto a la fase acuosa se mantuvo aproximadamente entre 1,43 y 4,29 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$.

2.4.3 Medio AOCS

Este medio fue adaptado de un método oficial de la AOCS (2009). En dicho método se emplea una lipasa pancreática para hidrolizar los ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéricos, por lo que se estima podría llegar a ser un medio de reacción adecuado para otro tipo de lipasas. El medio se conformó por 90 μL de aceite (aproximadamente 0,07 g), 0,80 mL de hexano, 0,25 mL de una solución acuosa de colato de sodio (1 g/L) y 0,1 mL de una solución acuosa de cloruro de calcio (220 g/L). Se adicionó 1 mL de éter etílico para finalizar la reacción y se procedió con la cuantificación de los productos de reacción. Para este medio, la relación entre la masa de fase acuosa con respecto a la de sustrato fue aproximadamente 5 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$.

2.4.4 Medio Novozymes

Este medio de reacción consistió en 60 mL totales compuestos por NaCl (17,9 g/L), KH_2PO_4 (0,41 g/L), goma arábica (6 g/L), glicerol (54 % v/v) y 1 g aceite (Novozymes, 2002), el cual fue sugerido por Novozymes para evaluar la actividad hidrolítica de sus lipasas. Antes de comenzar la reacción, el medio fue homogeneizado durante 6 minutos en un homogeneizador Pro Scientific (velocidad 26000 rpm). Este medio fue probado anteriormente en el grupo de investigación de Alimentos (PLAPIQUI) por Palla (2012) en reacciones de hidrólisis empleando lipasas de origen microbiano. La actividad lipásica en este medio fue determinada mediante titulación en continuo (Sección 2.5.2.2) por lo que no fue necesario el frenado de la reacción.

2.4.5 Medio Santos-60

Para este medio se empleó una composición similar a la reportada por Santos et al. (2013) con ciertas modificaciones. Para cada experiencia se usaron 60 mL de una mezcla de goma arábica y agua destilada (3 % m/m) junto con 1 g de sustrato (aceite). Antes de comenzar la reacción, el medio fue homogeneizado durante 10 minutos en un homogeneizador Pro Scientific (velocidad 26000 rpm). La actividad lipásica en este medio fue determinada mediante titulación en continuo (Sección 2.5.2.2) por lo que no fue necesario el frenado de la reacción. Para este medio, la relación entre la masa de fase acuosa con respecto a la de sustrato fue aproximadamente $60 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$.

2.4.6 Medio Santos-10

Para este medio se empleó la misma composición reportada por Santos et al. (2013). Para cada experiencia se usaron 10 mL totales conformados por 5 mL de buffer (100 mM fosfato de sodio pH 7 o 100 mM acetato de sodio pH 4,4) y 5 mL de una emulsión de aceite, goma arábica y agua destilada. La emulsión se preparó a partir de 45 g de una solución de goma arábica en agua al 3 % y 15 g de aceite y se homogeneizó durante 10 minutos en un homogeneizador Pro Scientific (velocidad 26000 rpm). Se emplearon 10 mL de etanol para frenar la reacción. Para este medio, la relación entre la masa de fase acuosa con respecto a la de sustrato fue aproximadamente $7,26 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$.

2.4.7 Medio Sigma

Como su nombre lo indica, este medio de reacción fue proporcionado por Sigma-Aldrich (1999) y se compone de 1 mL de buffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5), 2,5 mL de agua destilada y 3 mL de sustrato. Para catalizadores solubles, la reacción comenzó al adicionar 1 mL de una solución con la concentración deseada del catalizador en agua. Para catalizadores sólidos, se adicionó 1 mL de agua al medio y luego se incorporó el catalizador. El volumen final de reacción fue de

aproximadamente 8,5 mL. Para este medio, la relación entre la masa de fase acuosa con respecto a la de sustrato fue aproximadamente $1 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$. Se emplearon 3 mL de etanol para frenar la reacción.

2.4.8 Medio 1:1

Este medio se obtuvo empleando una relación 1:1 (v/v) buffer:aceite por lo que la relación másica entre la fase acuosa y el sustrato fue aproximadamente $1 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$. Dependiendo del pH deseado se utilizó buffer de acetato de sodio (100 mM, pH 4,4) o fosfato de sodio (100 mM, pH 7). Para este medio de reacción no se utilizó homogeneizador sino que se colocó el frasco de reacción bajo agitación vigorosa durante 5 minutos a la temperatura de reacción deseada. Se adicionaron 5 mL de etanol para frenar la reacción. Se utilizaron volúmenes de reacción de 5 mL ya que asegura un mejor vórtice de mezclado durante la incubación de la reacción. Al reducir el volumen de reacción se consideró que, si bien el %AGL calculado para este medio fue directamente comparable con las reacciones en otros medios en donde se utilizó un volumen de 10 mL, esto no fue así para el valor de actividad específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{Extracto}}$) o la cantidad de AGL absolutos (g) producidos. En el caso de la actividad específica, se empleó una conversión de acuerdo a las Ecuaciones 2.1 y 2.2:

$$\text{Actividad}_{10 \text{ mL}} = \text{Actividad}_{5 \text{ mL}} \times \frac{1}{2} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

$$\text{AGL}_{10 \text{ mL}} = \text{AGL}_{5 \text{ mL}} \times 2 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

La obtención de los factores de conversión se detalló en el Anexo B.

2.5 Cuantificación de la actividad lipásica

2.5.1 Introducción

En el presente trabajo la principal reacción estudiada fue la hidrólisis de aceite (Sección 1.3.1). Si bien la expresión más común para la actividad enzimática (o lipásica) corresponde a la cantidad de producto generado por unidad de tiempo, la misma no se encuentra estandarizada en la bibliografía disponible (Tipton 2014). En la presente tesis se utilizaron expresiones alternativas que, de forma indirecta, permitieron el estudio de la actividad lipásica. Las unidades más utilizadas fueron el **porcentaje de hidrólisis %AGL (m/m)** y la **actividad lipásica específica**, la cual fue definida como los milimoles de AGL liberados por unidad de tiempo (min u h), cantidad de catalizador (g o mg) y de sustrato (ej. $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{Extracto}}$). En otros casos (Capítulos 4 y 5), simplemente se evaluó la cantidad de producto generado ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}$) o la

productividad específica, expresada como la cantidad de producto en relación a la masa de extracto utilizada como catalizador ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$). Luego de frenar la reacción para detener la acción de la lipasa con la adición de un solvente (ej. éter etílico, etanol), los AGL fueron cuantificados. Para ello diferentes métodos de cuantificación fueron empleados a lo largo de este estudio. Los métodos descritos a continuación parten de la mezcla final del medio de reacción una vez inactivada la lipasa, a menos que se indique lo contrario.

Es importante aclarar que el uso de blancos de reacción fue necesario para permitir diferenciar correctamente la proporción real de los subproductos generada por la acción hidrolítica del biocatalizador de aquellos que fueron aportados por otros componentes del medio. Las diferentes técnicas para evaluar la actividad lipásica fueron acompañadas por diferentes blancos de reacción y se explican detalladamente en la descripción de cada método.

2.5.2 Titulación

Los métodos titriméticos aplicados involucran la adición de una solución de NaOH de molaridad conocida para neutralizar los AGL liberados en la reacción de hidrólisis. Para ello se consideró que los moles de NaOH empleados son equivalentes a los moles de AGL generados. Luego esta información se utilizó para el cálculo de la actividad lipásica.

2.5.2.1 Titulación empleando fenolftaleína como indicador

Este método ya ha sido aplicado por varios autores para la determinación de actividad lipásica (Prabhu et al. 1999; Weerasooriya et al. 2011; Avelar et al. 2013) utilizando como referencia la norma oficial IUPAC 2.201. En el presente trabajo se determinó el índice de acidez neutralizando los AGL absolutos presentes en la muestra incógnita con una solución etanólica de NaOH de normalidad conocida (ej. 0,02, 0,03, 1 N) en presencia de fenolftaleína como indicador de color. Se utilizó fenolftaleína 1 % (m/m) en una solución 1:1 de etanol:éter etílico. Los volúmenes fueron adaptados para poder aplicar la técnica a volúmenes más pequeños que los considerados en la norma.

Blanco de reacción: la composición de la mezcla a titular (blanco) fue idéntica a aquella en la que ocurrió reacción salvo que no se agregó enzima al medio y por lo tanto no hubo producción enzimática de AGL. El procedimiento experimental fue idéntico al mencionado en los pasos 1-3 descritos a continuación.

Procedimiento experimental

- 1- Colocar la muestra incógnita en un matraz de aproximadamente 25 mL.
- 2- Adicionar unas gotas de fenolftaleína

- 3- Titular con una solución etanólica de NaOH hasta observar que aparece un color rosado que persiste al menos por 10 segundos y registrar el consumo de NaOH.
- 4- Aplicar los pasos 1-3 al blanco de reacción y calcular la diferencia entre los micromoles consumidos por la muestra incógnita y el blanco.
- 5- Utilizar la cantidad de AGL cuantificada en el paso 4 para calcular las diferentes expresiones de interés: %AGL (m/m), actividad lipásica específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{Extracto}}$) o productividad específica ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$). Para el cálculo del %AGL (m/m) se consideró que todos los AGL corresponden al ácido oleico (peso molecular 282,47 g/mol) debido al alto contenido del mismo en el sustrato original ($85,25\pm 0,14\%$, Anexo A). Además, se consideró que el peso molecular del sustrato (aceite de girasol alto oleico) fue 885,43 g/mol, el cual corresponde al peso molecular de la trioleína.

Como ventaja se puede mencionar que fue un método muy rápido que permitió incubar varias muestras en simultáneo. La desventaja fue que la titulación por color podría tener mucho error, sobre todo cuando el medio de reacción a evaluar es complejo. A su vez, el pH podría llegar a variar a lo largo del tiempo si hay una elevada concentración de AGL.

2.5.2.2 *Titulación en continuo*

Este método se ha empleado a lo largo del tiempo como método de referencia en la detección de actividad lipásica (Lombard et al. 2001; Yeşiloğlu et al. 2008; Hasan et al. 2009) e implica el uso de un pH-metro como instrumento de medición. El mismo se basa en adicionar una solución de NaOH (molaridad conocida) de forma tal de mantener el pH constante en el tiempo a medida que la reacción de hidrólisis avanza. En otras palabras, los AGL son neutralizados con NaOH a medida que son hidrolizados. En este método no se adicionó ningún solvente apolar para inactivar a la enzima ya que la titulación se realizó durante el transcurso de la reacción.

Blanco de reacción: la única diferencia respecto de las muestras hidrolizadas fue que se incorporó el catalizador en ausencia de sustrato, respetando los volúmenes finales de la muestra que sí contuvo sustrato. Esto permitió evaluar el aporte de acidez generado por la composición intrínseca del catalizador y su posible solubilización parcial en el medio de reacción. En otras palabras: En la situación en la que el catalizador utilizado es un polvo de origen vegetal, y no una enzima totalmente purificada, podría ocurrir que parte de la acidez del medio luego de la reacción se incrementara por la solubilización de determinados componentes de su estructura y no por la reacción de hidrólisis.

Procedimiento experimental

- 1- Encender el pH-metro y calibrar el electrodo en pH 4 y pH 7.
- 2- Preparar el blanco de reacción.
- 3- Colocar en un vaso de precipitado y dentro de un baño termostático (ej. 37 °C) con agitación magnética.
- 4- Posicionar la boquilla de una bureta de 2 mL sobre el vaso de precipitado y llenarla con la solución de NaOH.
- 5- Colocar el electrodo de pH dentro del medio de reacción y ajustar el pH del medio a 7 utilizando la solución de NaOH.
- 6- Adicionar el catalizador. Si el pH se modifica a causa de la incorporación del catalizador, rápidamente volver a llevar a 7 con la solución de NaOH.
- 7- Inicio de la titulación: Agregar las gotas de la solución de NaOH que sean necesarias para mantener el pH en 7 al mismo tiempo que se registra el tiempo transcurrido y los mL de la solución consumidos.
- 8- Normalizar los micromoles de NaOH por la cantidad de catalizador utilizado. Realizar este cálculo para cada tiempo registrado.
- 9- Generar una regresión de los datos del blanco en función del tiempo ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ vs min).
- 10- A continuación, preparar el medio de reacción de la muestra incógnita que será hidrolizada y repetir pasos 3-8.
- 11- A los datos obtenidos en paso 10 (muestra hidrolizada) se les debe restar la contribución del blanco que corresponda a cada tiempo registrado (utilizar regresión de paso 9) obteniéndose los $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ generados exclusivamente por la reacción de hidrólisis.
- 12- Realizar un gráfico en función del tiempo.
- 13- Identificar la sección de comportamiento lineal y realizar una regresión.
- 14- Utilizar la pendiente de la regresión obtenida en el paso 13 (Ej. $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}$) para calcular las diferentes expresiones de interés: actividad lipásica específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{Extracto}}$) o productividad específica ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$).

Como ventaja, se puede mencionar que la reacción se mantendrá sin cambios de pH, lo cual puede llegar a ser beneficioso para la acción de la lipasa. La desventaja de este método es que no se pueden realizar muchas reacciones en simultáneo y tampoco se pueden emplear tiempos de reacción largos (ej. 24 h).

2.5.2.3 Titulación a punto final empleando pHmetro

Diferentes autores han aplicado la titulación a punto final para determinar la actividad enzimática en lipasas vegetales (de Sousa et al. 2010; Agueiras et al. 2014). Es de esperar que,

luego de la reacción de hidrólisis, el pH final del medio de reacción sea menor que el pH inicial. Por este motivo, este método se basó en llevar el pH de la mezcla final de reacción hasta un pH superior (ej. 11) elegido como punto final. Para ello se utilizó una solución de NaOH de molaridad conocida y un pH-metro como instrumento de medición.

Blanco de reacción: De todos los blancos empleados en las diferentes metodologías, los sistemas descritos a continuación fueron los de mayor complejidad. Dos sistemas de blancos diferentes se emplearon con el objetivo de encontrar aquel que fuera más representativo de la muestra a analizar. Una vez más, el objetivo fue encontrar el conjunto de blancos adecuados para diferenciar los AGL producidos en la hidrólisis catalítica de aquellos que generados por la degradación o solubilización natural de algún componente presente en el medio de reacción (ej. catalizador, sustrato). En cada sistema se emplearon tres blancos de reacción diferentes para cuantificar la acción lipásica de una única muestra hidrolizada. Los detalles se describen a continuación:

Sistema A: este sistema utilizó la ausencia de aceite en el medio para generar un blanco de reacción que consideró la incubación del polvo enzimático dentro del medio de reacción sin la disponibilidad de sustrato.

El diagrama de la Figura 2.4 permite apreciar de forma simplificada la metodología del blanco que se describe a continuación. Como se mencionó anteriormente, se utilizaron tres blancos para el análisis de cada muestra hidrolizada: un blanco “instantáneo” de la muestra (BM_{Ins}), un blanco sin sustrato incubado (BSS_{Inc}) y un blanco sin sustrato “instantáneo” (BI_{Ins}). El blanco BSS_{Inc} se realizó exactamente igual que la muestra hidrolizada con la diferencia de que no se adicionó sustrato y se incubó bajo las mismas condiciones que la muestra. Por esta razón el consumo de NaOH del BSS_{Inc} fue cuantificado mediante los pasos 2-6 del procedimiento experimental (al igual que la muestra hidrolizada). Esto permitió evaluar los cambios de pH generados por la solubilización de algún componente del catalizador y/o por la hidrólisis del aceite endógeno del mismo (que pudo haber persistido en el polvo luego del proceso de extracción).

Por otro lado, se utilizó la palabra “instantáneo” para denominar a aquellos blancos en donde el solvente orgánico (Figura 2.3) fue adicionado antes que el catalizador para evitar que pueda desarrollarse la reacción de hidrólisis (equivalente a tiempo de reacción cero). En primer lugar, BM_{Ins} fue el blanco que permitió definir el pH final hasta el cual se tituló a la muestra hidrolizada (paso 4 del procedimiento experimental). En segundo

lugar, el blanco BSS_{Ins} fue idéntico al BM_{Ins} con la diferencia de que no se adicionó sustrato en el medio de reacción. Éste último blanco es el que se utilizó para definir el pH final empleado en el paso 4 del procedimiento experimental al titular el BSS_{Inc} (paso 6).

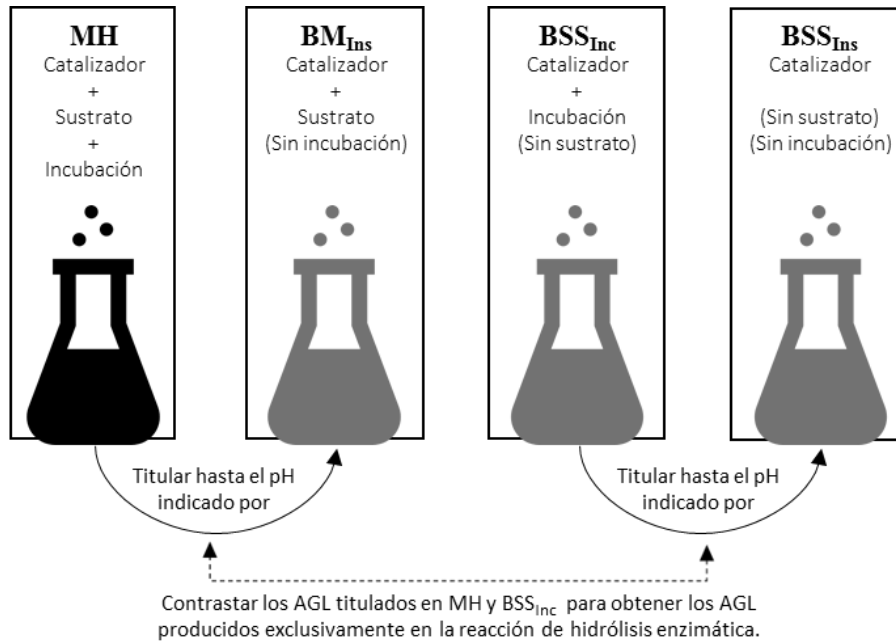


Figura 2.4 Representación gráfica del sistema A de blancos de reacción utilizado en el método de titulación a punto final empleando pH metro. MH: muestra hidrolizada, BM_{Ins}: blanco de muestra "instantáneo", BSS_{Inc}: blanco sin sustrato incubado, BSS_{Ins}: blanco sin sustrato "instantáneo". Los componentes mencionados en cada rectángulo son ilustrativos; la composición completa de los diferentes medios de reacción fue detallada para cada caso particular.

La ventaja que presenta este sistema es que permite diferenciar el aporte de acidez de la reacción de hidrólisis respecto de la producida por otros efectos (solubilización de componentes del catalizador o hidrólisis de aceite endógeno a lo largo de la incubación). También permite realizar varias reacciones en simultáneo y se pueden emplear tiempos de reacción largos (ej. 24 h). Como desventaja se puede mencionar que no permite identificar si existe deterioro del aceite en el sistema de reacción a lo largo de la incubación. Tampoco admite control de pH, el cual podría llegar a variar a lo largo del tiempo si hay una elevada concentración de AGL.

Sistema B: este sistema utilizó la inactivación del catalizador mediante temperatura. Existe bibliografía que indica que las lipasas vegetales presentan su temperatura óptima entre 30 y 55 °C, presentando mayor resistencia a la inactivación térmica cuando no disponen de agua (Moussavou MOUNGUENGUI et al. 2013), mientras que otros autores han

reportado que algunas de ellas alcanzan la inactivación completa a los 55 °C (Cavalcanti et al. 2007; Pierozan et al. 2011). Por esta razón se eligió una temperatura de 100 °C que se mantuvo durante 1 h para inactivar algunos de los catalizadores empleados.

El diagrama de la Figura 2.5 permite simplificar la metodología del blanco que se describe a continuación. Nuevamente se utilizaron tres blancos para evaluar cada muestra hidrolizada: un blanco “instantáneo” de la muestra (BM_{Ins}), un blanco inactivado incubado (BI_{Inc}) y un blanco inactivado “instantáneo” (BI_{Ins}). El blanco BI_{Inc} fue realizado exactamente igual que la muestra hidrolizada salvo que se usó catalizador inactivado, siendo éste incubado bajo las mismas condiciones que la muestra. Por esta razón el consumo de NaOH del BI_{Inc} se cuantificó mediante los pasos 2-6 del procedimiento experimental (al igual que la muestra hidrolizada). El objetivo principal fue obtener un blanco que contemple la posible degradación del aceite y/o la solubilización de componentes (y aceite endógeno) del catalizador, así como también la posible interacción entre ambos fenómenos o la hidrólisis de aceite endógeno del propio catalizador, particularmente en el caso de los extractos no desgrasados.

Por otro lado, se utilizó la palabra “instantáneo” bajo el mismo concepto que en el sistema A. En primer lugar, BM_{Ins} fue el blanco que permitió obtener el pH final hasta el cual se tituló a la muestra hidrolizada (paso 4 del procedimiento experimental). En segundo lugar, el blanco BI_{Ins} fue idéntico al BM_{Ins} con la diferencia de que se utilizó el catalizador inactivado y se utilizó para definir el pH final empleado en el paso 4 del procedimiento experimental cuando al titular el BI_{Inc} (paso 6).

La ventaja de esta metodología es que permite un blanco incubado que incorpora sustrato y catalizador al mismo tiempo. También permite realizar varias reacciones en simultáneo y se pueden emplear tiempos de reacción largos (ej. 24 h). La desventaja es que no se puede asegurar una inactivación total de catalizador y que se desconocen los efectos físicos o químicos del proceso de inactivación sobre el catalizador pudiendo no ser comparable con el extracto sin inactivar. Tampoco admite control de pH, el cual puede variar a lo largo del tiempo si hay una elevada concentración de AGL.

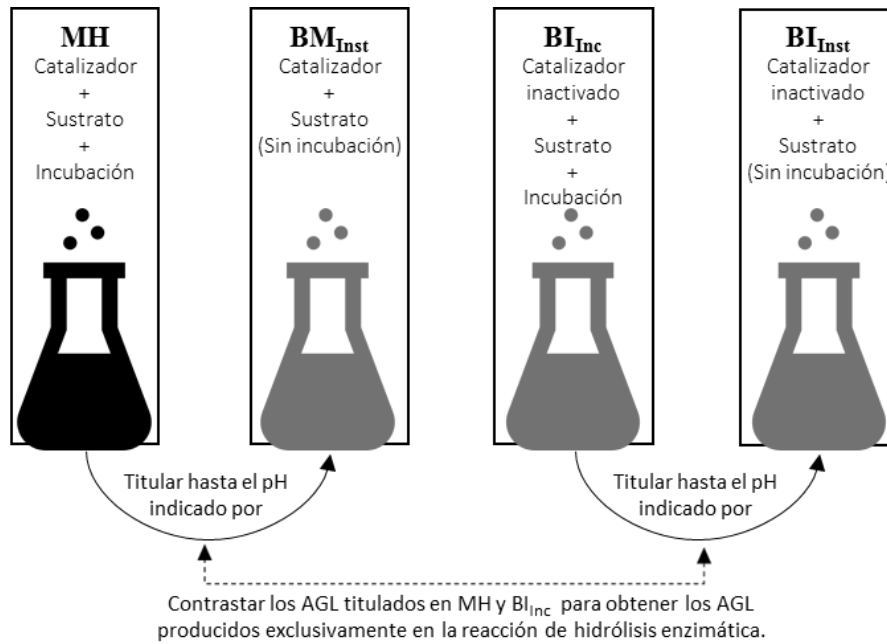


Figura 2.5 Representación gráfica del sistema B de blancos de reacción utilizado en el método de titulación a punto final empleando pH metro. MH: muestra hidrolizada, BM_{Inst}: blanco de muestra "instantáneo", BI_{Inc}: blanco inactivado incubado, BI_{Inst}: blanco inactivado "instantáneo". Los componentes mencionados en cada rectángulo son ilustrativos; la composición completa de los diferentes medios de reacción fue detallada para cada caso particular.

Procedimiento experimental

- 1- Encender el pH-metro y calibrar el electrodo en pH 4 y pH 7.
- 2- Colocar la mezcla incógnita en un vaso de precipitado de 25 mL.
- 3- Colocar el electrodo de pH, medir el pH y registrar.
- 4- Utilizar una bureta para adicionar y cuantificar la solución de NaOH hasta alcanzar el pH determinado por el blanco de reacción correspondiente (sistema A o sistema B) y registrar.
- 5- Calcular los micromoles de NaOH consumidos.
- 6- Repetir pasos 2-5 para blanco sin aceite (sistema A) o blanco inactivado (sistema B).
- 7- Restar los micromoles de NaOH del blanco a aquella de la muestra hidrolizada.
- 8- Utilizar los micromoles de NaOH obtenidos en el paso 7 para calcular las diferentes expresiones de interés (Ej. $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Aceite}}\text{g}_{\text{Extracto}}$ o $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$).

2.5.2.4 Curvas de titulación

Este método consistió en titular gradualmente la muestra incógnita con una la solución acuosa de NaOH de molaridad conocida al mismo tiempo que se registró el volumen acumulado y el pH. Con esta información se obtuvo una curva de titulación (variación del pH en función del

volumen) que presentó una forma sigmoidea. El punto de inflexión de esta curva representó el punto de equivalencia el cual indica el momento en el que todos los moles de NaOH reaccionaron con los AGL.

Blanco de reacción: se utilizó un blanco incubado sin catalizador, siendo el mismo adicionado luego de inactivar la reacción con etanol y se determinó el punto de equivalencia.

Procedimiento experimental

- 1- Encender el pH-metro y calibrar en pH 4 y pH 7.
- 2- Colocar la mezcla incógnita en un vaso de precipitado de 25 mL.
- 3- Colocar el electrodo de pH, medir el pH y registrar.
- 4- Colocar la bureta con solución de NaOH sobre la muestra y comenzar a adicionar de a poco, registrando el pH y el volumen de la solución hasta alcanzar un pH de 11.
- 5- Realizar un gráfico de pH en función del volumen incorporado.
- 6- Realizar el mismo procedimiento con el blanco (pasos 2-5).
- 7- Utilizar el gráfico del blanco para evaluar el pH correspondiente al punto de inflexión.
- 8- Trazar una regresión lineal en la región de pH correspondiente al punto de inflexión de la muestra y del blanco (ej. pH 9-11).
- 9- Emplear la regresión para calcular el volumen necesario de la solución para alcanzar el valor de pH obtenido en el paso 7 (calcularlo para la muestra y para el blanco) y convertir a micromoles de NaOH.
- 10- Hacer la diferencia entre los micromoles de NaOH consumidos por la muestra y los del blanco.
- 11- Utilizar los micromoles de NaOH obtenidos en el paso 10 para obtener las diferentes expresiones de interés como %AGL (m/m) o productividad específica ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$). Para el cálculo del %AGL (m/m) se consideró que todos los AGL corresponden al ácido oleico (peso molecular 282,47 g/mol) debido al alto contenido del mismo en el sustrato original ($85,25 \pm 0,14$ %, Anexo A). Además, se consideró que el peso molecular del sustrato (aceite de girasol alto oleico) fue 885,43 g/mol, el cual corresponde al peso molecular de la trioleína. La actividad enzimática se obtiene dividiendo dicho valor por la cantidad de enzima, sustrato y tiempo de reacción.

Como ventaja de este método se puede mencionar que permite evaluar con exactitud y precisión la medida de pH a medida que se agrega la solución básica (NaOH). En otras palabras, permite evaluar en qué regiones el pH cambia bruscamente con pequeñas cantidades de la solución de NaOH permitiendo detectar con exactitud el punto de equivalencia. Como desventaja

se puede mencionar que conlleva más dedicación y esfuerzo ya que hay que controlar el sistema continuamente y no se pueden realizar muchas reacciones en simultáneo.

2.5.3 Determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CGL

El %AGL de la fase lipídica luego de las reacciones enzimáticas fue determinado mediante cromatografía gas-líquido (CGL) (Pacheco *et al.* 2014). Cabe destacar que, si bien el método permitió cuantificar AGL, MAG, DAG y TAG, los picos correspondientes a los TAG no fueron integrados ya que el producto de mayor interés fueron principalmente los AGL. Los picos asociados a MAG y DAG sí fueron integrados permitiendo, en caso de ser necesario, calcular los TAG por diferencia de masas. Se debe considerar que, al haber utilizado un aceite refinado como sustrato, los componentes minoritarios como ceras y tocoferoles representan un porcentaje muy pequeño (inferior al 2%, según O'Brien, 2014) por lo que se consideraron despreciables.

2.5.3.1 Recuperación de subproductos luego de reacción: extracción por solventes

Al emplear una técnica cromatográfica, fue necesaria la recuperación de los subproductos de reacción (fase lipídica del medio de reacción) para su posterior análisis mediante cromatografía. Para ello se evaluaron dos métodos posibles.

2.5.3.1.1 Extracción A: metanol y cloroformo

En este método se empleó metanol y cloroformo en cantidades suficientes para asegurar la miscibilidad del agua de la muestra de interés (Bligh *et al.* 1959). En esta técnica se empleó cloroformo, metanol y agua destilada para recuperar la fase oleosa.

Procedimiento experimental:

- 1- Colocar 10 mL de la muestra a extraer en una ampolla de decantación junto con 6,25 mL de cloroformo y 7,5 mL de metanol. Agitar 30 segundos. Toda la mezcla formará una única fase.
- 2- Agregar 6,25 mL de cloroformo y 6,25 mL de agua destilada. Agitar 30 segundos. La mezcla se dividirá en dos fases.
- 3- Recolectar fase inferior (cloroformo).
- 4- Adicionar 12,5 mL de cloroformo a la ampolla y agitar 30 segundos.
- 5- Recolectar nuevamente la fase inferior en el mismo recipiente que en paso 3.
- 6- El cloroformo recolectado contiene los subproductos de reacción por lo que los mismos pueden ser recuperados luego de evaporar el solvente hasta alcanzar un peso constante.

2.5.3.1.2 Extracción B: hexano y éter etílico

En esta técnica se basó en el procedimiento del método oficial AOCS Ch 3-91 (2009) con modificaciones. Se utilizó hexano y éter etílico para recuperar la fase oleosa.

Procedimiento experimental:

- 1- Colocar 10 mL de la muestra en un tubo de centrifuga de plástico con tapa roscada.
- 2- Adicionar 5 mL de hexano y 5 mL de éter etílico. Agitar 1 minuto.
- 3- Colocar el tubo en la centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos.
- 4- Recolectar la fase superior (apolar) en un recipiente de aproximadamente 20 mL.
- 5- Repetir el procedimiento de los pasos 1-4 una vez más.
- 6- Colocar la fase apolar recuperada bajo una corriente de nitrógeno y evaporar el solvente hasta obtener un peso constante.

2.5.3.2 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se basó en la técnica empleada por (Pacheco et al. 2014). Una vez recuperada la fase lipídica luego de la reacción enzimática (Figura 2.3), la muestra se derivatizó antes de ser analizada por CGL para permitir la volatilización de los compuestos correspondientes dentro de la columna. A su vez, se incorporaron los estándares para la posterior identificación y cuantificación de los componentes. Se utilizó piridina como solvente y catalizador de la reacción de silanización, N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, como silanizante) y soluciones de estándares en piridina (tetradecano, tricaprina y tripalmitoleína).

Procedimiento experimental:

- 1- Pesar entre 0,0040-0,0100 g de muestra en un tubo de microcentrifuga.
- 2- Agregar piridina de manera de obtener una concentración final de 0,04 g de muestra en 1 mL de piridina. Agitar en vórtex.
- 3- Colocar 15 μ l de la solución anterior en un nuevo tubo de microcentrifuga y agregar 4,5 μ l, 4,5 μ l y 5,2 μ l de las soluciones de tetradecano, tricaprina y tripalmitoleína, respectivamente.
- 4- Agregar 30 μ l de MSTFA (derivatizante) y agitar en vórtex durante 1 minuto. Luego de 15 minutos a temperatura ambiente la muestra puede ser analizada por CGL.

2.5.3.3 Condiciones cromatográficas

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo gaseoso serie 4890D (Agilent, Hewlett-Packard) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar metálica (MXT-65TG, 30 m \times 0,25 mm \times 0,1 μ m de espesor de film; Restek, Bellefonte, USA). El inyector se utilizó en

modo split (relación 1:15) y se mantuvo a 360 °C. La temperatura del detector fue constante e igual a 380 °C. La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 4 min, luego aumentó a 350 °C (15 °C/min) y finalmente alcanzó los 360 °C (0,2 °C/min). Se empleó hidrógeno como gas carrier a una velocidad lineal de 33,6 cm/s. El método del estándar interno se utilizó para cuantificar los subproductos, siendo el tetradecano el compuesto de referencia para la cuantificación de AGL. La adquisición de datos e integración de picos se llevaron a cabo utilizando el programa HP 3398A GC ChemStation (Agilent).

2.5.3.4 *Blanco de reacción*

Los blancos de reacción para esta metodología se realizaron de forma idéntica que la muestra, pero sin la presencia de sustrato en el medio de reacción. El sustrato (puro o en forma de emulsión) fue adicionado luego de inactivar la enzima. Esto permitió identificar aportes de acidez generados por la propia composición del biocatalizador empleado.

2.5.3.5 *Cuantificación de acción lipásica*

Luego de la integración de las áreas correspondientes a los AGL (ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico y linoleico) y de los mono- y di-glicéridos, se utilizó el método del estándar interno (Anexo C) para calcular el %AGL_{Base productos} (m/m) de la muestra. Las masas de TAG se estimaron en conjunto por diferencia. Se debe aclarar que el proceso de recuperación de productos con solvente (Sección 2.5.3.1) produce la pérdida del glicerol de la muestra original, ya que el mismo es soluble en la fracción acuosa, y no en la fase apolar. Por este motivo, el %AGL_{Base productos} (m/m) obtenido directamente de la integración corresponde a unidades de g_{AGL}/100 g_{Productos libres de glicerol}. Debido a que se decidieron utilizar expresiones en base al sustrato inicial, y no al producto recuperado, se determinó un factor de corrección obteniendo la siguiente Ecuación (Ec. 2.3):

$$\%AGL_{Base\ sustrato} = 0,9636 \times \%AGL_{Base\ productos\ (libres\ de\ glicerol)} \quad (Ec. 2.3)$$

Este factor se obtuvo realizando una estimación “teórica” de la evolución de la reacción de hidrólisis junto con los balances másicos y pesos moleculares apropiados. El Anexo D describe los cálculos con mayor detalle. Una vez obtenido el %AGL_{Base sustrato}, fue posible calcular la cantidad absoluta de AGL presentes en la muestra (ej. mmol_{AGL}). El mismo procedimiento se realizó para el blanco de reacción, lo que permitió calcular la diferencia entre ambos. Para obtener la actividad lipásica específica, esta diferencia se normalizó por la cantidad de aceite (ej. g_{Aceite}), la cantidad

de enzima (ej. $g_{\text{Catalizador}}$) y el tiempo de reacción (ej. h), aunque también se reportan valores de %AGL m/m.

Como ventajas de este método se puede destacar que es una técnica que permite medir exclusivamente el compuesto de interés (a diferencia de la titulación), siendo en este caso los AGL. Al mismo tiempo esto permite realizar blancos de reacción más apropiados. La desventaja que presenta es que es una técnica más costosa y compleja además de que el análisis de la muestra no es instantáneo y deben purificarse los subproductos antes del análisis.

2.6 Referencias

Agueiras, E.C.G., Cavalcanti-Oliveira, E.D., de Castro, A.M., Langone, M.A.P. & Freire, D.M.G. (2014). Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel* 135: 315-321.

AOCS. (2009). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. Champaign: The American Oil Chemist's Society.

Avelar, M.H.M., Cassimiro, D.M.J., Santos, K.C., Domingues, R.C.C., De Castro, H.F. & Mendes, A. a. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products* 44: 452-458.

Bligh, E. & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(8): 911-917.

Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007). Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 07(136-140): 57-66.

de Sousa, J.S., Cavalcanti-Oliveira, E., Aranda, D.A.G. & Freire, D.M.G. (2010). Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65: 133-137.

Furse, S., Liddell, S., Ortori, C., Williams, H., Neylon, D.C., Scott, D.J., Barrett, D. & Gray, D. (2013). The lipidome and proteome of oil bodies from *Helianthus annuus* (common sunflower). *Journal of chemical biology* 6: 63-76.

Gupta, A., Sadeghipour, H.R. & Bhatla, S.C. (2003). Subcellular detection of lipase activity in plant protoplasts using fluorescence microscopy. *Plant Growth Regulation* 41(3): 259-264.

Hasan, F., Shah, A.A. & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 27: 782-798.

Isbilir, S.S., Ozcan, H.M. & Yagar, H. (2008). Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis L.*) seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85: 227-233.

IUPAC. (1992). International Union of Pure Applied Chemistry (7th ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Jachmanián, I. & Mukherjee, K (1995). Germinating rapeseed as biocatalyst: hydrolysis of oils containing common and unusual fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2997-3000.

Jachmanián, I. & Mukherjee, K. (1996). Esterification and interesterification reactions catalyzed by acetone powder from germinating rapeseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(11): 1527-1532.

Lombard, S., Helmy, M.E. & Piéroni, G. (2001). Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *The Biochemical Journal* 358: 773-781.

Moussavou Mounquengui, R.W., Brunschwig, C., Baréa, B., Villeneuve, P. & Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in Energy and Combustion Science* 39(5): 441-456.

Novozymes. (2002). Determination of lipase activity. Analytical Method Doc No 2001-07792-01, Oils&Fats.

O'Brien, R. (2014). *Fats and oils: Formulating and Processing for Applications* (3rd ed.). New York: CRC Press.

Pacheco, C., Palla, C.A., Crapiste, G.H. & Carrín, M.E. (2014). Simultaneous quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in enzymatically modified vegetable oils and fats. *Food Analytical Methods* 7(10): 2013-2022.

Palla, C.A. (2012). Estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores enzimáticos batch y de lecho empacado. Universidad Nacional del Sur.

Pierozan, M.K., Oestreicher, E.G., Oliveira, J.V., Oliveira, D., Treichel, H. & Cansian, R.L. (2011). Studies on immobilization and partial characterization of lipases from wheat seeds (*Triticum aestivum*). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165(1): 75-86.

Prabhu, A., Tambe, S., Gandhi, N., Sawant, S. & Joshi, J. (1999). Rice bran lipase: extraction, activity and stability. *Biotechnology Progress* 15: 1083-1089.

Sadeghipour, H.R. & Bhatla, S.C. (2003). Light-enhanced oil body mobilization in sunflower seedlings accompanies faster protease action on oleosins. *Plant Physiology and Biochemistry* 41(4): 309-316.

Sagiroglu, A. & Arabaci, N. (2005). Sunflower seed lipase, extraction, purification and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 35: 37-51.

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R. & Mendes, A. a. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products* 49: 462-470.

Sigma-Aldrich. (1999). Enzymatic assay of lipase, olive oil as substrate, Doc code VELIPA02 (método interno).

Šinkuniene, D., Bendikiene, V. & Juodka, B. (2011). Response surface methodology-based optimization of lipase-catalyzed triolein hydrolysis in hexane. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1): 5891-5901.

Tipton, K. F., Armstrong, R. N., Bakker, B. M., Bairoch, A., Cornish-Bowden, A., Halling, P. J., Hofmeyr, J., Leyh, T. S., Kettner, C., Raushel, F. M., Rohwer, J., Schomburg, D. y Steinbeck, C. (2014). Standards for Reporting Enzyme Data: The STREND Consortium: What It Aims to Do and Why It Should Be Helpful. *Perspectives in Science* 1(1-6):131-37.

Weerasooriya, M.K.B. & Gunasekara, O.S.W. (2011). Partially purified rubber seed lipase for efficient removal of fatty soil. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 39(1): 69-76.

Yeşiloğlu, Y. & Başkurt, L. (2008). Partial purification and characterization of almond seed lipase. *Preparative biochemistry & biotechnology* 38(4): 397-410.

EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS ELEGIDOS

Capítulo

3

3.1 Introducción

En este capítulo se presentan diferentes experimentos realizados específicamente para corroborar que la metodología empleada sea apropiada para su posible aplicación en el análisis de catalizadores de origen vegetal. Es importante destacar que no es de particular interés realizar comparaciones entre los resultados obtenidos para diferentes secciones del capítulo, salvo que así se especifique. Cada experimento se describe de forma breve, utilizando como referencia la metodología especificada en el Capítulo 2 y el análisis de resultados y sus respectivas conclusiones se detallan en cada sección. Una vez más, la nomenclatura utilizada es: AGL, G, MAG, DAG y TAG para representar los ácidos grasos libres, glicerol, mono-, di- y tri-acilgliceroles. El término CGL hace referencia a la técnica de cromatografía gas-líquido.

3.2 Desaceitado de semillas para la preparación de biocatalizadores de origen vegetal

El desaceitado empleando acetona durante 16 h (Sección 2.3.2.3) fue el método de desgrasado más frecuentemente empleado a lo largo de la tesis. Por esta razón fue de importancia determinar el grado de desaceitado alcanzado con esta técnica. Para ello, se utilizó como referencia el método de determinación del contenido de aceite descrito en la Sección 2.2.2.

3.2.1 Metodología

Método de referencia: En esta experiencia se emplearon las semillas de girasol proporcionadas por la empresa Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. ya que fueron las primeras semillas utilizadas para comenzar las investigaciones de actividad lipásica. En primer lugar se aplicó la metodología descrita en la Sección 2.2.2, "Contenido de aceite" y se emplearon aproximadamente 10 g de semilla de girasol descascarada y molida. La molienda de las semillas

peladas se realizó con un molinillo de café. La extracción se realizó por duplicado y el resultado se expresó como % (m/m).

Método “Acetona 16h”: Por otro lado, se aplicó la molienda tipo A (Sección 2.3.2.2) y el desaceitado “Acetona 16h” descrito en la Sección 2.3.2.3. Se partió de aproximadamente 10 g de semilla descascarada y molida. El material inicial y el aceite final obtenido fueron pesados y se calculó el porcentaje de aceite (m/m). Esta experiencia se realizó por duplicado.

Se empleó la prueba t para la comparación estadística de medias.

3.2.2 Discusión de resultados

El contenido de aceite obtenido mediante el método de referencia fue de $56,13 \pm 0,63$ % mientras que el método alternativo empleado resultó en $61,73 \pm 1,26$ %, alcanzando un valor significativamente más elevado que el método de referencia ($p=0,0304$). Este resultado podría atribuirse a una extracción de aceite eficiente, pero se debe considerar que la acetona pudo haber extraído, no solo aceite, sino también agua así como compuestos solubles en ella como lo son los azúcares. A diferencia del agua, que no afectó los cálculos ya que fue eliminada junto con la evaporación de acetona, los azúcares sí fueron considerados. Balasaraswathi et al. (1997) reportó un contenido de $7,08 \pm 0,11$ g de azúcares totales en 100 gramos de semilla pelada y desgrasada. Si se considera, según estos valores, la cantidad de azúcares correspondiente a la muestra analizada por Soxhlet, el contenido de material extraído se elevaría a 59 % ($\frac{g_{\text{Aceite} + \text{Azúcares}}}{100 g_{\text{Semilla}}}$). Este valor es más parecido al obtenido mediante “Acetona-16h”.

Cómo conclusión se puede mencionar que el método alternativo fue efectivo para el desaceitado de las semillas y, a pesar de que este análisis fue aplicado a semillas de girasol, los resultados obtenidos también fueron considerados extrapolables a otras semillas.

3.3 Titulación empleando fenolftaleína como indicador

Diferentes medios de reacción fueron implementados y evaluados utilizando la técnica de titulación empleando fenolftaleína como indicador (Sección 2.5.2). A continuación, se describen las pruebas realizadas para la evaluación del método y del medio de reacción en conjunto.

3.3.1 Medio Šinkūnienė y AOCS

3.3.1.1 Metodología

Medio Šinkūnienė: La composición de este medio fue detallada en la Sección 2.4.2. En primer lugar, se determinó la acidez del medio mediante el método de índice de acidez

(Sección 2.2.1.1) en ausencia de la lipasa (sin reacción). Luego, se realizaron pruebas de reacción utilizando una lipasa microbiana comercial libre (lipase from *Rhizomucor miehei*, Sigma-Aldrich) y otra inmovilizada (Lipozyme RM IM, Novozymes) cuyos valores de acidez fueron evaluados con el mismo método. En el caso de la lipasa libre, ésta fue diluida en el buffer en una concentración de 0,21 mL solución comercial de lipasa/L buffer (100 mM fosfato de sodio, pH 7) mientras que para la inmovilizada se adicionaron de forma directa 0,0038 g de catalizador (soporte+lipasa). La temperatura se fijó en 40 °C y el tiempo de reacción entre 2 y 30 minutos. La reacción se frenó con la adición de 1 mL de éter etílico al medio. Para ambas enzimas la relación entre la masa de sustrato con respecto a la fase acuosa se mantuvo aproximadamente entre 1,43 y 4,29 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$ mientras que la relación catalizador/sustrato fue $2 \cdot 10^{-4}$ - $7 \cdot 10^{-4}$ (v/v) y $5,410^{-2}$ (m/m) para la lipasa libre e inmovilizada, respectivamente.

Medio AOCS: La composición de este medio fue detallada en la Sección 2.4.3. Una vez más, se determinó la acidez del medio mediante el método de índice de acidez (Sección 2.2.1.1) en ausencia de la lipasa (sin reacción). Luego, se realizaron pruebas de reacción utilizando una lipasa microbiana comercial libre (lipase from *Rhizomucor miehei*, Sigma-Aldrich) y otra inmovilizada (Lipozyme RM IM, Novozymes) cuyos valores de acidez fueron evaluados con el mismo método. En el caso de la lipasa libre, ésta fue diluida en el buffer en una concentración de 0,21 mL lipasa/L buffer (100 mM fosfato de sodio, pH 7) utilizando 100 μL de esta solución en cada reacción. La lipasa inmovilizada se adicionó directamente (0,0038 g). La temperatura se fijó en 40 °C y el tiempo de reacción entre 2 y 30 minutos. Las reacciones se frenaron con la adición de 1 mL de éter etílico. Para ambas enzimas la relación entre la masa de sustrato con respecto a la fase acuosa se mantuvo aproximadamente igual a 5 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$ mientras que la relación catalizador/sustrato fue $2,3 \cdot 10^{-4}$ (v/v) y $5,4 \cdot 10^{-2}$ (m/m) para la lipasa libre e inmovilizada, respectivamente.

Para ambos medios la masa o volumen de catalizador se reporta haciendo referencia a la cantidad del producto comercial, en volumen para la solución de lipasa libre y en masa para la lipasa inmovilizada.

3.3.1.2 *Discusión de resultados*

Las reacciones con lipasas comerciales (lipase from *Rhizomucor miehei* y Lipozyme RM IM) junto con el medio Šinkūnienė fueron las primeras pruebas que se realizaron para comenzar a evaluar qué medio de reacción podría ser apropiado para las reacciones y a su vez para ayudar a elegir una metodología apropiada para cuantificar los productos de reacción. La acidez de este medio en ausencia de la lipasa presentó un valor de $3,03 \pm 0,12 \text{ mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{AGL}}$. Por otro lado, la acidez

del medio AOCs en ausencia de la lipasa presentó un valor de $10,60 \pm 0,58 \text{ mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{AGL}}$. Al incorporar la lipasa a los diferentes medios de reacción, los resultados no fueron consistentes. Si bien se obtuvieron valores de acidez superiores al del medio de reacción, en la mayoría de los casos, las muestras con mayor tiempo de reacción presentaban valores de acidez inferiores a aquellas con menor tiempo de reacción. A su vez, la coloración rosada no fue fácil de identificar, lo que podría haber incrementado el error de las mediciones. Por estos motivos, se decidió discontinuar el uso de estos medios y proseguir con la evaluación de otras alternativas.

3.3.2 Medio Santos-10

3.3.2.1 Metodología

El objetivo general de esta experiencia fue titular muestras de aceite de acidez conocida y comparar la concentración de AGL obtenida con aquella esperada. Para ello se consideraron dos muestras de aceite hidrolizado (AH) cada una realizada por triplicado. El %AGL (m/m) de las mismas fue determinado mediante CGL (Sección 2.5.3) de forma de conocer con exactitud su concentración de AGL. Las condiciones mediante las cuales se obtuvieron las muestras de aceite hidrolizado no son relevantes y basta con conocer su masa y su concentración de AGL (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Cantidad de AH y %AGL de las muestras que fueron empleadas para las pruebas de titulación con fenolftaleína.

Muestra	AH (g)	%AGL _{Esp} (m/m)
A1	2,041	13,04
A2	2,049	12,58
A3	2,033	11,34
B1	2,046	6,24
B2	2,090	6,36
B3	2,074	7,46

AH: aceite hidrolizado, AGL_{Esp}: Valores de acidez esperados obtenidos mediante cromatografía gaseosa.

Como se puede observar en la Tabla 3.1, se eligieron muestras de AH con bajo contenido de AGL ya que se consideró una condición crítica en la cual la determinación mediante titulación podría presentar problemas en la cuantificación de estos compuestos. A partir de estas muestras, se procedió a incorporar el resto de los componentes (buffer, solución de goma arábiga y etanol) necesarios para alcanzar una composición equivalente a la del medio Santos-10 (Sección 2.4.6). El procedimiento para su obtención se describe a continuación:

1. Tomar una de las muestras mencionadas en la Tabla 3.1

2. Adicionar 5 mL de buffer de acetato (100 mM, pH 4,4)
3. Adicionar 3,8 mL de solución de goma arábica en agua (3 % m/m)
4. Adicionar 10 mL de etanol
5. Adicionar 3 gotas de solución de fenolftaleína
6. Agitar vigorosamente la mezcla empleando agitadores magnéticos
7. Titular con una solución acuosa de NaOH hasta observar un color rosado que perdure al menos por 10 segundos.
8. Repetir los pasos 1-6 para todas las muestras.

Se utilizó una solución de NaOH 0,6 M y una microbureta de 2 mL. El %AGL obtenido por titulación (%AGL_T) se obtuvo utilizando la Ecuación 3.1:

$$\%AGL_T = \frac{[(V \times M)_m - (V \times M)_b] \times PM_{AO}}{1000 \times APH} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde V es el volumen (mL) de la solución de NaOH, M es la molaridad de la solución (mol_{NaOH}/L), PM_{AO} es el peso molecular del ácido oleico (g/mol) y APH es la cantidad de aceite inicial (g). El subíndice *m* indica cantidades asociadas a las muestras mientras que el subíndice *b* indica cantidades asociadas al blanco. Este blanco se obtuvo siguiendo los pasos 2-7 mencionados anteriormente con la diferencia de que se partió de 2 g de aceite de girasol alto oleico sin hidrolizar en lugar de APH.

A diferencia de lo descrito para el medio Santos-10 en la Sección 2.4.6, en donde se utilizó una emulsión de sustrato, agua y goma arábica, en los pasos 1-8 mencionados anteriormente en esta sección no se utilizó ninguna emulsión (homogeneización específica) sino que simplemente se mezclaron los componentes con agitación magnética vigorosa. A pesar de esto, y teniendo en cuenta los objetivos del experimento, se consideró que ambos procedimientos alcanzaron una composición y homogeneidad equivalentes.

Se empleó la prueba t para la comparación estadística de medias.

3.3.2.2 Análisis de resultados

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar una gran similitud al comparar los resultados obtenidos mediante cromatografía y aquellos determinados mediante titulación. No solo no se encontraron diferencias significativas sino que la probabilidad de cometer el error de tipo II (no rechazar la hipótesis nula cuando es falsa) se vio reducida ya que el valor de alpha es muy elevado.

Tabla 3.2 Porcentaje de AGL determinados en las pruebas preliminares utilizando el método de titulación empleando fenolftaleína y el medio Santos-10.

Muestra	AGL _{Tit} (% m/m)	AGL _{Esp} (% m/m)	Valor p
A	12,62±0,60	12,32±0,88	0,6475
B	6,66±1,24	6,69±0,67	0,9749

AGL_{Tit}: obtenido mediante titulación, AGL_{Esp}: valor esperado obtenido mediante cromatografía gaseosa. Medio de reacción evaluado: Santos-10 pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).

El problema principal que presenta esta metodología es que al momento de titular muestras incógnitas, se desconoce la normalidad de la solución de NaOH que debe emplearse para la titulación, ya que si se utilizan volúmenes muy pequeños o muy elevados (ej. más de una bureta), el error de la valoración puede ser elevado. Esto implica que es necesario realizar al menos 4 réplicas (o más) para determinar el %AGL. De todas formas, existen procedimientos alternativos que podrían implementarse para sobrellevar esta dificultad (ej. titular alícuotas de una misma reacción), lo cual introduciría el error de la toma de muestras.

En base a estos resultados se puede concluir que esta metodología podría ser utilizada para evaluar la acción lipásica de los catalizadores vegetales, al menos a bajas concentraciones de AGL.

3.4 Titulación en continuo

La determinación de la acción lipásica mediante el método de titulación en continuo fue detallada en la Sección 2.5.2.2. Dos medios de reacción fueron utilizados para evaluar esta metodología. Los ensayos preliminares se describen a continuación.

3.4.1 Medio Novozymes

3.4.1.1 Metodología

La composición del medio se fue detallada en la Sección 2.4.4. Se utilizaron aproximadamente 0,05 g de lipasa microbiana comercial inmovilizada (Lipozyme RM IM, Novozymes), lo que equivale a una relación 0,05 g_{Catalizador}/g_{Sustrato}. La temperatura de reacción fue de 55 °C y el tiempo de reacción de 30 minutos.

3.4.1.2 Discusión de resultados

La curva de titulación en continuo del blanco (●), la muestra (○) y la diferencia entre ambas (□) se muestra en la Figura 3.1. Como se puede observar, en este caso la enzima mostró un tiempo de incubación de aproximadamente 5 minutos antes de desarrollar actividad lipásica.

Tal como se describió en la Sección 2.5.2.2 la actividad específica se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal, la cual fue dividida por la cantidad de sustrato y catalizador, obteniendo un valor de $23,19 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{Lipasa}}$.

Estos resultados prueban que, tanto el medio como el método, podrían utilizarse en conjunto para evaluar la lipólisis enzimática generada por la acción de las lipasas vegetales. Como ventaja, se puede mencionar que la reacción se mantiene sin cambios de pH, lo cual puede ser beneficioso para la acción de la lipasa. La desventaja de este método es que no se pueden realizar muchas reacciones en simultáneo y tampoco emplear tiempos de reacción largos (ej. 24 h).

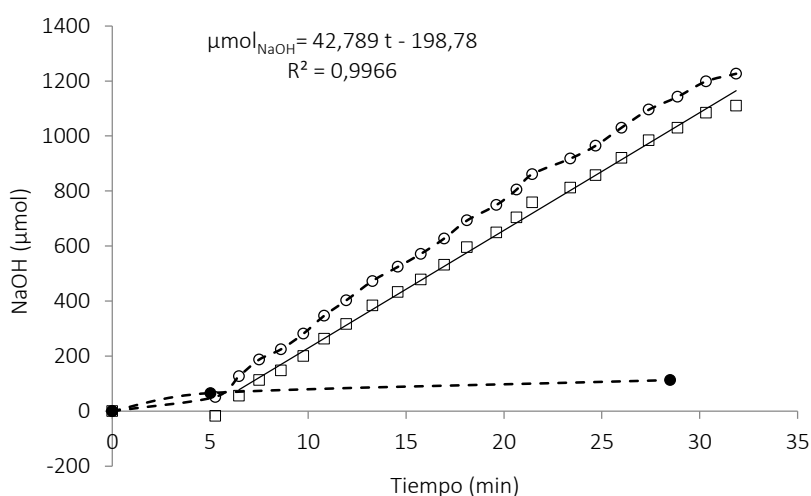


Figura 3.1 Consumo de NaOH en función del tiempo de reacción durante la titulación en continuo del medio de reacción Novozymes utilizando lipasa microbiana comercial. Las curvas corresponden al blanco (---●---), la muestra (---○---) y la diferencia entre ambas (□), indicando con una línea continua la regresión lineal de ésta última. Condiciones de reacción: 0,05 g Lipozyme RM IM (Novozymes), el tiempo de reacción fue 30 minutos a 55 °C y pH 7.

3.4.2 Medio Santos-60

3.4.2.1 Metodología

La composición del medio se detalló en la Sección 2.4.5. Al igual que en el medio de reacción anterior, también se realizó un ensayo con una lipasa microbiana comercial (Lipozyme RM IM, Novozymes). Se utilizaron aproximadamente 0,05 g de catalizador (lo que corresponde a $0,05 \text{ g}_{\text{Catalizador}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$), la temperatura de reacción fue de 55 °C y el tiempo de reacción fue de 60 minutos.

3.4.2.2 Discusión de resultados

La curva de titulación en continuo del blanco (●), la muestra (○) y la diferencia entre ambas (□) se muestra en la Figura 3.2. Como se puede observar, en este caso la enzima mostró un tiempo de incubación de aproximadamente 20 minutos antes de comenzar la hidrólisis. Tal como se describió en la Sección 2.5.2.2, la actividad específica se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal, la cual fue dividida por la cantidad de sustrato y catalizador, obteniendo un valor de $1,80 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{Lipasa}}$.

Si bien la actividad específica fue inferior a la obtenida para el medio Novozymes, tanto el medio como el método podrían ser utilizados en conjunto para evaluar la acción lipolítica de las lipasas vegetales.

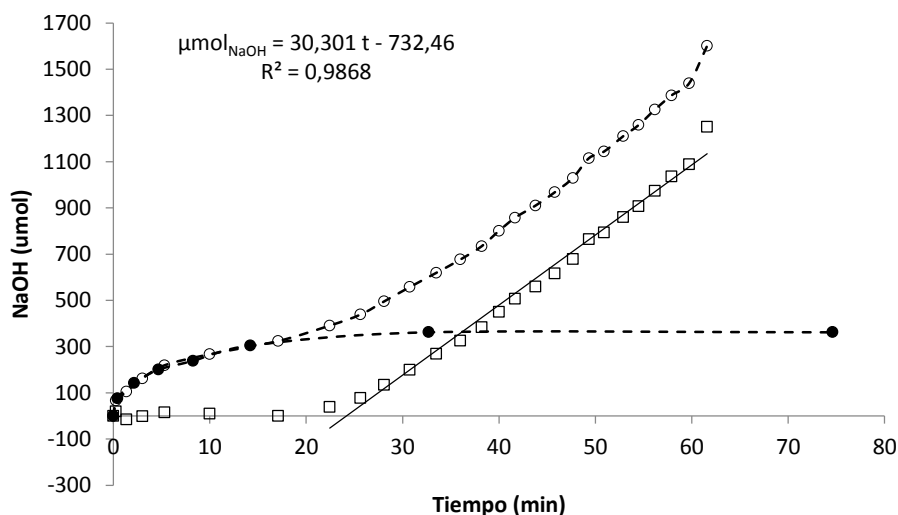


Figura 3.2 Consumo de NaOH en función del tiempo de reacción durante la titulación en continuo del medio de reacción Santos-60 utilizando lipasa microbiana comercial. Las curvas corresponden al blanco (---●---), la muestra (---○---) y la diferencia entre ambas (□), indicando con una línea continua la regresión lineal de ésta última. Condiciones de reacción: 0,05 Lipozyme RM IM, (Novozymes), el tiempo de reacción fue de 60 minutos a 55 °C y pH 7.

3.5 Titulación a punto final empleando pH-metro

La determinación de la acción lipásica mediante el método de titulación a punto final empleando pHmetro se detalló en la Sección 2.5.2.3. Dos medios de reacción fueron utilizados al emplear esta metodología. Los ensayos preliminares se describen a continuación.

3.5.1 Medio Sigma

3.5.1.1 Metodología

Se utilizó la composición del medio descrito en la Sección 2.4.7 junto con el sistema B de blancos de reacción (Sección 2.5.2.3), duplicando el volumen de reacción. La reacción se realizó utilizando una enzima microbiana comercial (Lipozyme RM IM, Novozymes) para evaluar la viabilidad del medio y del método. Se emplearon 0,01 g de catalizador inmovilizado (aproximadamente $2 \cdot 10^{-3} \text{ g}_{\text{Catalizador}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$), la temperatura de reacción fue de 37 °C y el tiempo de reacción de 24 h. Se utilizó una solución de NaOH 0,15 M para realizar la titulación. La relación entre la masa de fase acuosa con respecto a la de sustrato fue aproximadamente $1 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$.

3.5.1.2 Discusión de resultados

La productividad específica que presentó la lipasa fue de $9,39 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{Lipasa}}$ por lo que se decidió proseguir con la hidrólisis empleando extractos de origen vegetal. Esta expresión no fue dividida por el tiempo de reacción ya que probablemente la misma no sea constante en el tiempo. Incluso la lipasa podría haberse inactivado por completo mucho tiempo antes de alcanzar las 24 h. Si bien los resultados anteriores de este capítulo indicaron que esta lipasa microbiana presenta tiempos de adaptación más cortos, de todas formas, se utilizaron 24 h de reacción para luego comparar con experimentos similares empleando lipasas de origen vegetal. En general, los tiempos largos de reacción son útiles cuando no se obtiene lipólisis a tiempos cortos. Se debe considerar que algunas enzimas pueden tener tiempos de adaptación al medio de reacción muy largos.

La ventaja de esta metodología (válido también para la Sección 3.5.2) es que permite realizar varias reacciones en simultáneo y se pueden emplear tiempos de reacción largos (ej. 24 h).

3.5.2 Medio Santos-10

3.5.2.1 Metodología

La composición del medio fue detallada en la Sección 2.4.6. Para evaluar este medio no se realizó ninguna reacción utilizando enzima comercial. En su lugar, se decidió incorporar ácido oleico (90 %, grado técnico, Sigma-Aldrich) en cantidades conocidas con el objetivo de simular una reacción de hidrólisis. El ácido oleico en diferentes cantidades (0-0,0714 g) fue incorporado en la emulsión (30,6 mL) a partir de la cual se tomaron 3 alícuotas de 5 mL cada una. Luego se adicionaron 5 mL de buffer de fosfato (pH 7, 100 mM). Finalmente se incorporaron 10 mL de etanol. La cantidad teórica de ácido oleico en cada alícuota se calculó en base a la proporción presente en la emulsión madre por lo que se mantuvo constante para todas las réplicas de una

misma muestra. La “actividad enzimática” se cuantificó mediante el método de titulación a punto final (Sección 2.5.2.3). En este caso el catalizador no fue considerado y tampoco se incubó el medio de reacción por lo que el sistema de blancos fue más simple que el que se describe en dicha sección. Como blanco simplemente se consideró el medio de reacción sin ácido oleico agregado. Luego de medir el pH de dicho blanco, se utilizó una solución de NaOH 0,15 M para incrementar el pH de la muestra hasta alcanzar el pH del blanco.

3.5.2.2 *Discusión de resultados*

Los resultados se muestran en la Figura 3.3. La relación ideal en la que 1 μmol de ácido oleico agregado equivale a 1 μmol de ácido oleico detectado por el método de titulación se representó mediante una línea punteada. Por el contrario, la línea continua se utilizó para representar la regresión lineal obtenida con las mediciones experimentales. Se observó que la separación entre ambas líneas se incrementó al aumentar la cantidad de ácido oleico (AO) en la muestra. A pesar de esto, se consideró que dicha separación fue cualitativamente aceptable lo que indicaría que esta metodología podría ser aplicada para la evaluación de la lipólisis enzimática luego de la reacción de hidrólisis, al menos para porcentajes bajos de hidrólisis (1 % aproximadamente). Si bien este porcentaje parecería demasiado bajo, la experiencia mostró que esta técnica fue lo suficientemente sensible como para detectar actividades realmente bajas, permitiendo diferenciarlas de sus blancos. Por el contrario, también se observó que la misma no resultó apropiada para cantidades muy pequeñas de ácido oleico, ya que las pruebas ensayadas para dichos valores (puntos vacíos, Figura 3.3) se distanciaron en gran medida de la línea punteada. Esto estableció un límite inferior de detección de aproximadamente 20 μmol , equivalente a un 0,2 %AGL (m/m), para el sistema analizado.

Vale aclarar que esta prueba preliminar no consideró la presencia de compuestos como MAG y DAG, que sí estarían presentes en la muestra hidrolizada. Tampoco consideró que la cantidad teórica de ácido oleico no se conoce con exactitud, ya que en su cálculo no se evidencia el error humano ni cualquier falta de homogeneización en la emulsión que fuera imperceptible a la vista, lo que podría haber ocasionado diferencias en las cantidades de ácido oleico teórico de las réplicas de una misma muestra.

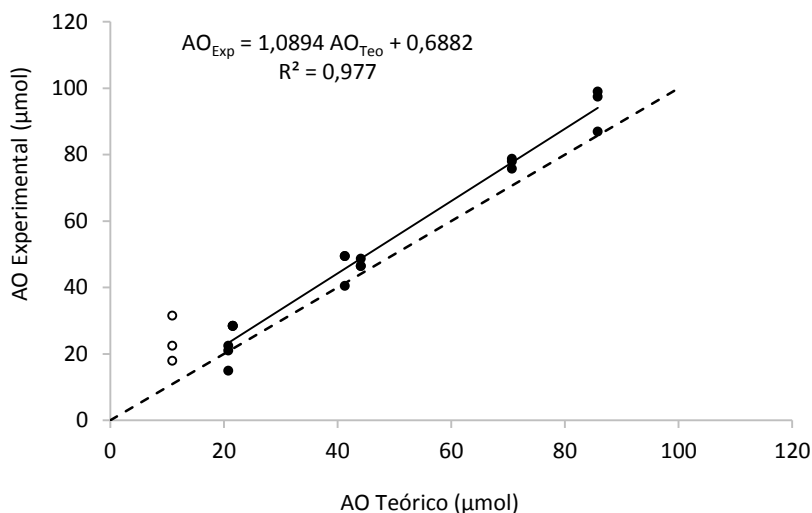


Figura 3.3 Relación entre la cantidad de ácido oleico (AO) teórico y AO experimental en las pruebas preliminares utilizando el método de titulación a punto final empleando pH metro y el medio Santos-10. Línea punteada: relación ideal; línea continua: regresión experimental (los puntos vacíos no fueron incluidos en la regresión).

3.6 Curvas de titulación

La determinación de la acción lipásica empleando curvas de titulación se detalló en la Sección 2.5.2.4. Dos medios de reacción fueron utilizados al emplear esta metodología y los ensayos preliminares se describen a continuación.

3.6.1 Medio Santos-10

3.6.1.1 Metodología

La composición del medio se detalló en la Sección 2.4.6 pero en lugar de usar una concentración de 3 % (m/m) en la solución de goma arábica y agua, se utilizó una solución al 12 % (m/m). El utilizó buffer de fosfato (100 mM, pH 7). Esta experiencia preliminar tuvo como objetivo obtener las curvas de titulación del medio de reacción sin enzima agregada. En su lugar se adicionaron cantidades conocidas de ácido oleico simulando diferentes porcentajes de hidrólisis (0, 3,5 y 9 %H $m_{\text{Ácido Oleico}}/m_{\text{Aceite}}$). Esto permitió observar los cambios en la curva a concentraciones crecientes de ácido oleico (AO) para así determinar el punto de equivalencia. Cada curva se realizó por duplicado y se utilizó una solución de NaOH 0,15 M para la titulación.

3.6.1.2 Discusión de resultados

Las curvas de titulación obtenidas se muestran en la Figura 3.4. Si bien cada curva se realizó por duplicado, las réplicas fueron idénticas entre sí por lo que sólo una de ellas se dibujó en la figura.

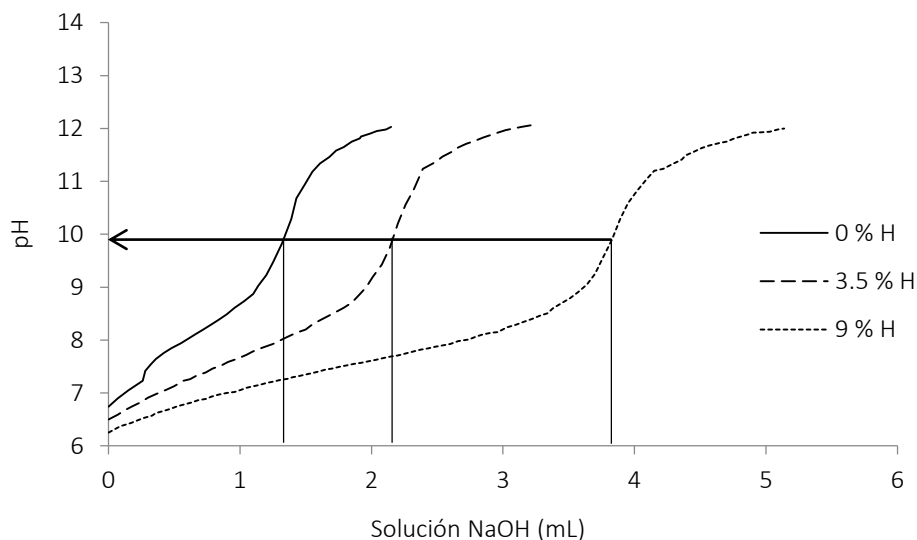


Figura 3.4 Curvas de titulación para el medio Santos-10 (buffer de fosfato, 100 mM, pH 7) simulando 0, 3,5 y 9 % de hidrólisis (%H, $m_{\text{Ácido Oleico}}/m_{\text{Aceite}}$).

Como era de esperar, cada curva presentó una forma sigmoidea con un punto de inflexión bien definido. Dicho punto de inflexión corresponde al punto de equivalencia, es decir, a la condición en la cual la cantidad de NaOH agregada es estequiométricamente equivalente a la cantidad de AGL. Los resultados obtenidos fueron coherentes ya que a mayor porcentaje de hidrólisis se requirió mayor cantidad de NaOH para alcanzar este punto. Además, se pudo observar que las curvas se diferenciaron ampliamente entre ellas, incluso mostrando diferencias desde el comienzo de la titulación.

Por otro lado, al calcular las cantidades teóricas de AO adicionado a las muestras de 3,5 y 9 % hidrólisis, se obtuvo 144 y 363 μmoles de AO, respectivamente. Luego de titular las muestras y restar el blanco (0 % hidrólisis), la cantidad de AO experimental obtenida fue 142 ± 5 y 383 ± 8 μmoles de AO, respectivamente. Al comparar cualitativamente las cantidades teóricas con las experimentales, se observó que en ambos casos estos valores son muy similares. Además, si se considerara un coeficiente de variación del 10 % para los dos valores experimentales, entonces ambos rangos obtenidos incluirían a su respectivo valor teórico.

En base a estos resultados, se puede decir que este medio de reacción junto con el presente método, serían apropiados para la evaluación de la lipólisis enzimática. Como ventaja específica del método (válido también para la Sección 3.6.2) se puede mencionar que permite evaluar en qué regiones el pH cambia bruscamente con pequeñas cantidades de la solución de

NaOH, permitiendo detectar con exactitud el punto de equivalencia. Como desventaja se puede mencionar que conlleva más dedicación y esfuerzo ya que hay que controlar el sistema continuamente y no se pueden realizar muchas reacciones en simultáneo.

3.6.2 Medio Sigma

3.6.2.1 Metodología

La composición del medio se detalló en la Sección 2.4.7. Se realizó la curva de titulación del medio con enzima luego de ser incubado a 37 °C y pH 7,5 (buffer Tris-HCl, 200 mM) durante 24 h de forma de representar el blanco sugerido por la técnica propuesta por Sigma-Aldrich (1999). La enzima se agregó luego de la incubación y después de adicionar el etanol. La titulación se realizó con una solución de NaOH 0,05 M.

3.6.2.2 Discusión de resultados

Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 3.5 y corresponden a 2 muestras independientes (duplicado). Como se puede observar, en este caso el pH de equivalencia se encuentra cercano a 9. Una vez más, el medio de reacción junto con el presente método, parecerían ser apropiados para la evaluación de la lipólisis enzimática.

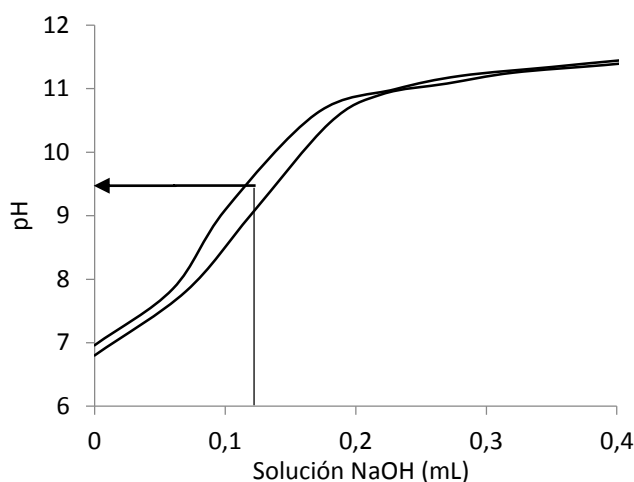


Figura 3.5 Curvas de titulación del medio Sigma y determinación del punto de equivalencia.

3.7 Determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CGL

Si bien el método completo se detalló en la Sección 2.5.3, en esta sección se evaluó principalmente la técnica de recuperación de subproductos de reacción, ya que este método de cuantificación fue considerado de referencia en esta tesis. En primer lugar, se analizaron comparativamente los métodos de extracción A y B detallados en las Secciones 2.5.3.1.1 y

2.5.3.1.2, respectivamente. Una vez elegido el método, se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de AGL para simular diferentes grados de hidrólisis y verificar que el producto final recuperado, que fue luego analizado mediante CGL, es realmente representativo de la muestra para un amplio rango de acidez.

Por último, también se evaluó parcialmente la estabilidad del medio Sigma y Santos-10 durante la incubación con temperatura controlada. Para la cuantificación de los resultados se utilizó el método de CGL propuesto en la Sección 2.5.3.

3.7.1 Recuperación de subproductos

3.7.1.1 Materiales

En las siguientes experiencias fue necesario el uso de ácido oleico (90 % pureza, grado técnico, Sigma-Aldrich). La composición de este producto luego de ser analizado mediante el método de cuantificación simultánea mediante CGL (Sección 2.5.3) resultó ser de 100 %AGL (m/m), sin presencia detectable de G, MAG, DAG o TAG.

También se utilizó aceite de girasol alto oleico, marca Ecoop, elaborado por Cooperativa Obrera. Su composición se evaluó mediante la misma metodología, encontrando $97,88 \pm 0,23$ %TAG, $0,86 \pm 0,04$ %DAG, $0,67 \pm 0,08$ %AGL, $0,40 \pm 0,23$ %G y $0,19 \pm 0,03$ %MAG.

3.7.1.2 Metodología

Obtención de aceite parcialmente hidrolizado (APH): en varias ocasiones se utilizó la enzima microbiana inmovilizada Lipozyme RM IM (Novozymes) para hidrolizar aceite de girasol alto oleico. El APH así obtenido se utilizó luego de acuerdo a las necesidades de cada experiencia. La Tabla 3.3 muestra las distintas reacciones (medios de reacción y condiciones) que se realizaron para obtener el APH. Todas las reacciones se incubaron a 60 °C. Para finalizar la reacción y para reducir la viscosidad de la mezcla se agregaron 50 mL de acetona. Luego se volcó sobre un embudo con papel de filtro para retener las partículas de catalizador, el cual fue lavado varias veces con hexano. El producto fue recolectado en un erlenmeyer y se colocó bajo una corriente de nitrógeno hasta evaporar todo el hexano y la acetona, eliminando al mismo tiempo el agua residual presente en el medio de reacción.

Tabla 3.3 Cantidades aproximadas empleadas en las reacciones enzimáticas para la producción de APH y composición másica de cada APH obtenido.

	APH1	APH2	APH3
Lipozyme RM IM (g)	1,2	5	3
Aceite(g)	12	50	30
Agua (g)	0,6	2,5	1,5
Tiempo de reacción (h)	3	3	5
AGL (% m/m) ^a	38,61±1,13	46,69±0,40	53,85±2,89
MAG (% m/m) ^a	2,66±0,12	0,58±0,04	1,97±0,17
DAG (% m/m) ^a	5,60±0,04	10,80±0,58	7,05±0,49
TAG (% m/m) ^a	52,89±1,22	43,39±3,28	39,14±5,22
G (% m/m) ^a	0,24±0,00	0,20±0,02	0,10±0,01

^aEl APH obtenido se analizó en su composición de subproductos mediante el método de CGL (Sección 2.5.3, pero sin blancos de reacción).

Comparación entre método A y B

Simulación de reacciones de hidrólisis: para lograr simular la reacción de hidrólisis se utilizó el medio Santos-10 (pH 4,4, buffer de acetato 100 mM) con modificaciones. En primer lugar, el volumen se redujo a 5 mL, manteniendo todas las proporciones entre componentes. En segundo lugar, la emulsión de sustrato se realizó a partir del APH1 (en lugar de utilizar aceite de girasol alto oleico). De esta forma se aseguró que la muestra fuera realmente representativa de los posibles productos que podrían obtenerse al utilizar enzimas vegetales (incluyendo MAG, DAG, TAG, G y AGL). Las muestras a analizar contenían 2.5 g de emulsión, 2,5 mL buffer de acetato (100 mM, pH 4,4) y 5 mL de etanol. Finalmente se prosiguió con la implementación de ambos métodos de extracción (Sección 2.5.3.1.1 y 2.5.3.1.2), cada uno por duplicado. Se empleó la prueba t para la comparación estadística de medias.

Simulación de reacciones de hidrólisis con diferente concentración de AGL

El método de extracción elegido se evaluó utilizando mezclas de aceite de girasol alto oleico sin hidrolizar y APH para simular diferentes grados de hidrólisis. Esta técnica se desarrolló utilizando dos medios de reacción diferentes: medio Santos-10 y medio Sigma con algunas modificaciones.

- Medio Santos-10: se utilizó buffer de fosfato (100 mM, pH 7) y una solución de goma al 12 % en lugar del 3 %. La emulsión (EM) se formuló empleando las cantidades reportadas en la Tabla 3.4. De cada fórmula se tomaron 3 alícuotas de 5 g (en lugar de 5 mL) para mezclar luego con los 5 mL de buffer del medio de reacción (Sección 2.4.6).

Tabla 3.4 Emulsiones empleadas (EM) en la simulación de reacciones de hidrólisis para el medio de reacción Santos-10 y su posterior cuantificación mediante CGL.

Componentes (g)	Emulsiones		
	EM1 (Concentración baja de AGL)	EM2 (Concentración intermedia de AGL)	EM3 (Concentración alta de AGL)
Sol. Goma 12 %	25	25	25
Aceite sin hidrolizar	6,4967	3,8713	0
APH2	0,1468	2,8266	6,6304

- Medio Sigma: La fase oleosa (FO) del mismo se formuló empleando las cantidades reportadas en la Tabla 3.5. De cada fórmula se tomaron 3 alícuotas de 3 g (en lugar de 3 mL) para mezclar luego con la fase acuosa del medio compuesta por agua y buffer Tris-HCl 200 mM, pH 7,5 (Sección 2.4.7).

Tabla 3.5 Fases oleosas empleadas en la simulación de reacciones de hidrólisis para el medio de reacción Sigma y su posterior cuantificación mediante CGL.

Componentes (g)	Fase oleosa			
	FO1 (Concentración muy baja de AGL)	FO2 (Concentración baja de AGL)	FO3 (Concentración moderada de AGL)	FO4 (Concentración muy alta de AGL)
Aceite sin hidrolizar	12	9	0	0
APH	0,27 ^a	3,8 ^a	12 ^a	0,5 ^b
Ácido Oleico	0	0	0	1,8

^aAPH2, ^bAPH3.

Una vez preparados los medios de reacción, se realizó la extracción con solventes de acuerdo al método elegido y se prosiguió con el análisis de subproductos mediante CGL de acuerdo a la Sección 2.5.3.

En todos los casos se empleó la prueba t para la comparación estadística de medias.

3.7.1.3 Discusión de resultados

En la Tabla 3.6 se muestran los resultados de la comparación entre los métodos A y B. Como se puede observar, ambos métodos permitieron obtener extractos de composición similar a la composición real del APH1, el cual no sufrió ningún proceso de extracción. Al realizar la comparación de medias de cada método respecto al APH1, todos los resultados fueron alentadores. Se pudo observar que el punto más desfavorable lo presentó el método A, mostrando diferencias significativas en el %AGL al compararlo con el APH1.

Tabla 3.6 Composición de subproductos (% m/m) en el APH1 y en las muestras obtenidas luego de la extracción con solventes de acuerdo a los métodos A y B.

Producto (% m/m)	APH1	Método A	Método B	Valor p Método A	Valor p Método B
G	0,24±0,00	0,13±0,00	0,09±0,02	0,0003	0,0108
AGL	38,61±1,13	32,76±1,53	36,27±0,18	0,0491	0,1025
MAG	2,54±0,11	2,54±0,12	2,52±0,07	0,9823	0,8391
DAG	5,60±0,04	5,47±0,23	6,05±0,51	0,5253	0,3377
TAG	53,01±1,21	59,10±1,88	55,07±0,42	0,0614	0,1512

El valor p obtenido en la comparación de medias entre el APH1 y cada método por separado (n=3, p crítico 0,05). Los valores están expresados como el valor promedio ± el desvío estándar.

Si bien la determinación de %AGL es la de mayor interés, también se pudo verificar que la cantidad de los subproductos restantes (MAG, DAG, TAG) luego de las extracciones se obtuvieron en cantidades consistentes en comparación con los resultados del APH1. En cuanto al G, en ambos métodos se pudo observar que los subproductos de reacción luego de la extracción presentaron una cantidad significativamente inferior al APH1. Esto es así debido a que este componente fue arrastrado por la fase acuosa durante el proceso de extracción. Por esta razón, en los casos necesarios, el G fue determinado por balances de masa.

A pesar de que existan o no diferencias, la importancia de este experimento fue que, indiferentemente del método elegido, se pudo conocer con qué posible error se realizaron las determinaciones y decidir si dicho error fue o no aceptable para los fines de las mismas. En base a los resultados obtenidos, se decidió elegir el método B para todas las investigaciones ya que, además de haber presentado mejor performance, también resultó más simple y fácil de aplicar.

Una vez elegido el método de extracción, se evaluó la calidad de la extracción para diferentes niveles de AGL. En la Tabla 3.7 se muestran el %AGL experimental (AGL_E) obtenido para los diferentes medios de reacción ensayados. A su vez, se incluye el %AGL teórico (AGL_T), el cual corresponde a la cantidad esperada de AGL que debería contener la muestra. En el caso de los medios M_{EM3} y M_{FO3} la cantidad teórica reportada fue igual al %AGL del APH2 ya que los medios de reacción (tanto Santos-10 como Sigma) se formularon a partir de APH2 puro. En el resto de los medios, la cantidad teórica de AGL se determinó con balances máxicos a partir de la composición de los componentes empleados (Tablas 3.4 y 3.5).

Tabla 3.7 Porcentajes de AGL en la fracción lipídica de los medios de reacción ensayados (M_{EM} y M_{FO}).

Medio	AGL _E (%, m/m)	AGL _T (%,m/m)	valor P
M_{EM1}	1,78±0,12	1,63	---
M_{EM2}	19,27±19,27	20,05	---
M_{EM3}	44,48±0,59	46,69±0,40	0,0060
M_{FO1}	1,83±0,04	1,62	---
M_{FO2}	13,76±0,32	14,34	---
M_{FO3}	45,03±2,67	46,69±0,40	0,3480
M_{FO4}	92,96±1,36	89,61±0,65	0,0070

Los valores se expresan como el valor promedio ± el desvío estándar; aquellos valores obtenidos por balance de masa no presentan desvío estándar. AGL_E: %AGL experimental, AGL_T: %AGL teórico. Valores de p menores a 0,05 indican diferencias significativas entre muestras (n=3).

El valor p de la Tabla 3.7 corresponde a la comparación de medias entre el APH puro y los subproductos recuperado de M_{EM3} y M_{FO3} . Si bien en el mejor caso lo esperado es que no existan diferencias, se puede observar que en algunos casos esto no fue así. De todas formas, en todos los casos las diferencias de medias resultaron ser inferiores a 3,3 %AGL, lo que se considera un error aceptable para los objetivos de la presente tesis. Si bien la determinación más importante corresponde al %AGL, la Figura 3.6 muestra la composición de MAG y DAG, tanto de las muestras luego de la extracción con solventes, como de los valores teóricos esperados para las mismas. El análisis cualitativo de estas figuras mostró que, en general, las composiciones obtenidas fueron representativas de las muestras antes de la extracción para un rango de niveles de hidrólisis muy amplio.

Como conclusión general se puede mencionar que los resultados obtenidos fueron alentadores para todas las condiciones estudiadas, por lo que la metodología se consideró apropiada para la evaluación de la lipólisis enzimática. Esto fue positivo ya que el método cromatográfico permite medir exclusivamente el compuesto de interés (a diferencia de la titulación), siendo en este caso los AGL. Además, esto permite realizar blancos de reacción más apropiados. La desventaja que presenta es que es una técnica más costosa y compleja que requiere la purificación de los productos y el análisis de la muestra no es instantáneo.

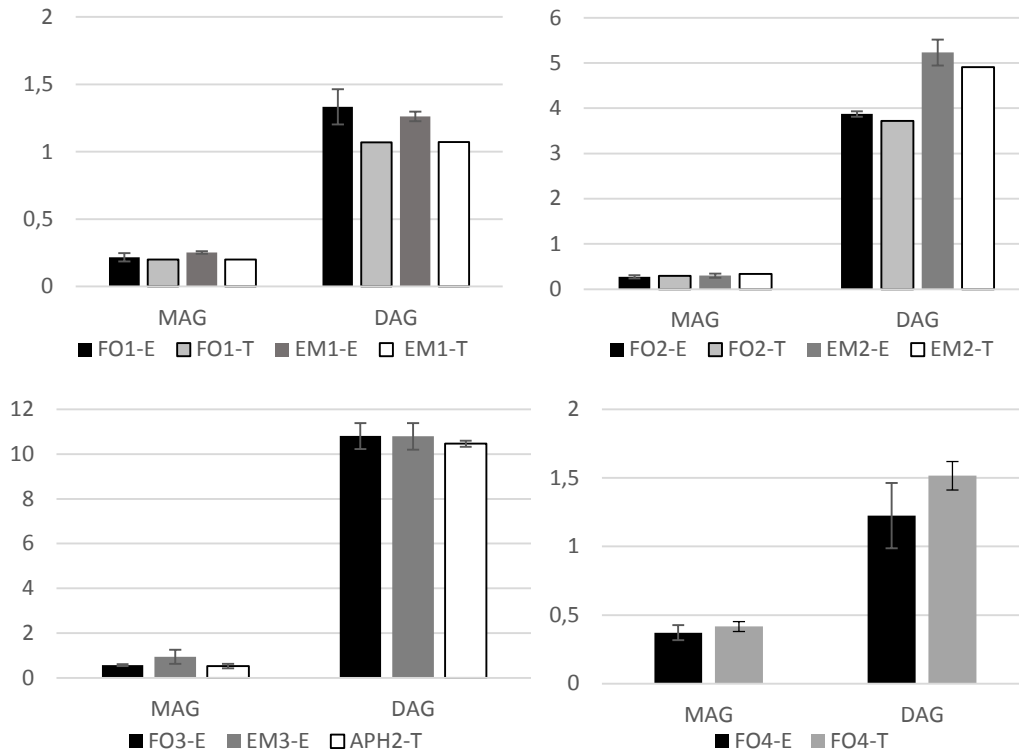


Figura 3.6 Comparación entre valores experimentales (-E) y teóricos esperados (-T) de MAG y DAG en la fracción lipídica luego de realizar la extracción con solvente de los medios Sigma (FO, Tabla 3.4) y Santos-10 (EM, Tabla 3.5). Determinación mediante CGL.

3.8 Caracterización de algunos medios de reacción y otros estudios complementarios

El medio Santos-10 detallado en la Sección 2.4.6 fue muy usado a lo largo de toda la tesis (Capítulos 4, 5, 6 y 7). Es por esto que, a medida que se fueron desarrollando los experimentos, fue necesario investigar algunas propiedades o comportamientos que ayudaron posteriormente a dar explicaciones de los resultados obtenidos. En esta sección se determina la densidad de la emulsión, la estabilidad y tamaño de gota de la fase dispersa (aceite) y el análisis del pH del medio de reacción bajo diferentes condiciones. También se discuten algunos estudios complementarios empleando el medio Sigma (Sección 2.4.7) y el medio 1:1 (Sección 2.4.8). A continuación, se detalla la metodología de cada ensayo junto con el análisis de resultados de cada uno.

3.8.1 Estabilidad del medio Santos-10 y Sigma luego de 24 h de incubación

3.8.1.1 Metodología

Se prepararon los medios Santos-10 (buffer de fosfato, 100 mM, pH 7) y Sigma de acuerdo a las Secciones 2.4.6 y 2.4.7, respectivamente, y se los colocó a 37 °C bajo agitación magnética vigorosa durante 24 h. Luego se analizaron los subproductos mediante el método de

CGL (Sección 2.5.3) empleando la extracción B (en este caso los blancos de reacción no fueron necesarios). Cada incubación se realizó por triplicado.

El aceite comercial de girasol alto oleico también se evaluó con la técnica CGL (Sección 2.5.3) sin previa incubación. Se realizaron 4 inyecciones de 4 muestras independientes de dicho aceite comercial.

Estas experiencias permitieron determinar si la incubación del medio modificó la composición de AGL del sistema. Se empleó la prueba t para la comparación estadística de medias.

3.8.1.2 Discusión de resultados

No se identificaron diferencias entre los aceites obtenidos luego de la incubación y extracción de los medios Santos-10 y Sigma ($p=0,80$), obteniendo un valor promedio de $0,5630 \pm 0,0670$ g_{AGL}/100 g_{Aceite}. Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas ($p>0,12$) al comparar cada medio con el aceite puro sin incubar ($0,6760 \pm 0,0856$ g_{AGL}/100 g_{Aceite}), indicando que el %AGL no se ve afectado significativamente por las condiciones de incubación.

3.8.2 Densidad

3.8.2.1 Metodología

Si bien en muchas de las reacciones de hidrólisis, el volumen de la emulsión adicionada (5 mL) al medio de reacción también fue pesado en la balanza, en otros casos esto no fue así. Con el objetivo de estimar el peso correspondiente a cada componente de la emulsión (principalmente del aceite) se realizó el pesaje de los 5 mL de emulsión utilizando una pipeta graduada. El pesaje se realizó 10 veces consecutivas y la densidad se determinó como el peso (g) dividido el volumen (mL). Los resultados se reportaron como el valor promedio \pm desvío estándar.

3.8.2.2 Discusión de resultados

El promedio de los pesajes fue $4,68 \pm 0,06$ g, conteniendo $1,17 \pm 0,02$ g de sustrato (aceite). La densidad fue $0,94 \pm 0,01$ g/mL.

3.8.3 Tamaño de gota de medios de reacción

3.8.3.1 Metodología general

La distribución de tamaño de las gotas se determinó utilizando un equipo de difracción de rayos láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Kioto, Japón). El índice de refracción empleado fue de 1,3370 (medido con un refractómetro digital). El tamaño promedio de las gotas se expresó como el diámetro volumétrico medio. Este diámetro es conocido como $D[4,3]$ y es calculado de forma automática por el software del equipo mediante la Ecuación 3.2 (Horiba Scientific, 2010),

donde n representa el número de gotas de diferente diámetro, D_i el diámetro geométrico y v_i el porcentaje volumétrico de cada una. En algunos casos también, se reportó el valor $D[v, 0,90]$, como $D_{90\%}$, referido como el tamaño por debajo del cual se encuentra el 90 % de la población de gotas.

$$D[4,3] = \frac{\sum_1^n D_i^4 v_i}{\sum_1^n D_i^3 v_i} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

El tamaño de gota se determinó en diferentes muestras: emulsión utilizada en medio Santos-10 (buffer de acetato, 100 mM, pH 4,4, Sección 2.4.6), medio Santos-10 con goma y sin goma, medio 1:1 (Sección 2.4.8) y medio 1:1 hidrolizado. Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A continuación, se detalla el procedimiento utilizado para cada muestra.

La **emulsión** utilizada en el medio Santos-10 se obtuvo utilizando 45 g de una solución de goma arábica en agua al 3 % y 15 g de aceite. Se homogeneizó durante 10 minutos en un homogeneizador Pro Scientific (26000 rpm) e inmediatamente se midió por duplicado la distribución del tamaño de gota (EM_{0h}). Luego se incubó la emulsión bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 horas y se realizaron dos mediciones más (EM_{2h}).

El medio **Santos-10 con goma** se preparó de acuerdo a la Sección 2.4.6 (buffer de acetato, 100 mM, pH 4,4), mientras que el medio **Santos-10 sin goma** se preparó de forma idéntica con la excepción de que la solución de goma arábica en agua fue reemplazada por agua destilada pura para analizar el efecto de este componente sobre el tamaño de gota. Antes de la medición se tomaron 5 mL de ambas muestras y se las colocó a temperatura ambiente con agitación vigorosa durante 5 minutos. El **medio 1:1** se preparó de acuerdo a la Sección 2.4.8 (2,5 mL de aceite alto oleico junto con 2,5 mL de buffer de acetato 100mM pH 4,4), mientras que en el **medio 1:1 hidrolizado** se reemplazó el aceite comercial por aceite parcialmente hidrolizado (APH1, Sección 3.7.1.2) para evaluar si los productos de reacción (AGL, MAG, DAG) influyen en el tamaño de gota.

3.8.3.2 *Discusión de resultados*

La Figura 3.7 muestra la distribución de tamaño de gota de la **emulsión** en función del diámetro de partícula para ambas muestras. Como se puede observar, se obtuvieron distribuciones bimodales con dos picos bien diferenciados. El primer pico se observó a

aproximadamente 0,765 μm en ambas curvas, mientras que el segundo pico se identificó a los 10,404 μm y 9,496 μm para $\text{EM}_{0\text{h}}$ y $\text{EM}_{2\text{h}}$, respectivamente.

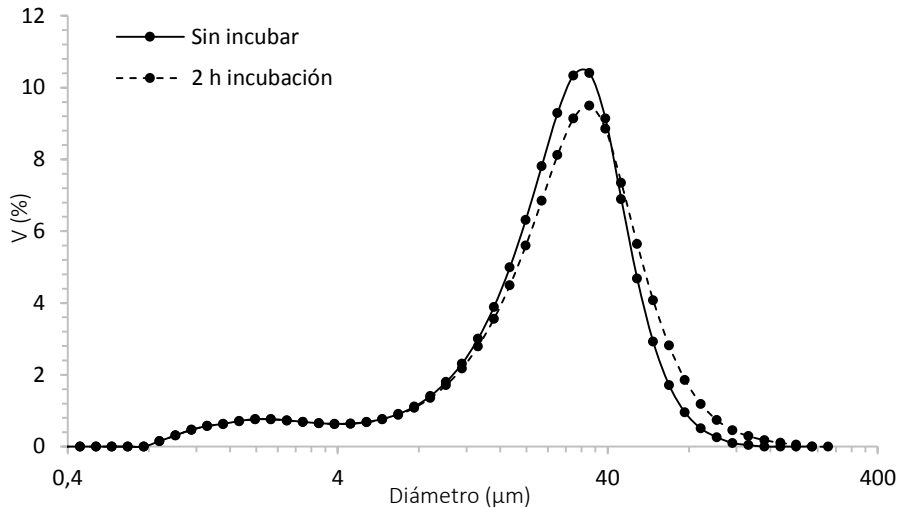


Figura 3.7 Distribución del tamaño de gota de la emulsión, para $\text{EM}_{0\text{h}}$ (sin incubar) y $\text{EM}_{2\text{h}}$ (2h incubación). V (%): porcentaje volumétrico.

Los valores característicos del tamaño de partícula se muestran en la Tabla 3.8. Si bien el diámetro promedio de las partículas fue $26,689 \pm 0,600 \mu\text{m}$ y $30,025 \pm 0,785 \mu\text{m}$ para $\text{EM}_{0\text{h}}$ y $\text{EM}_{2\text{h}}$, respectivamente, se detectaron partículas con diámetros entre 0,766 y 200 μm para ambos casos. El valor $D_{90\%}$ indica que el 90 % de las partículas posee un diámetro inferior a $46,517 \pm 2,346 \mu\text{m}$ y $54,582 \pm 1,603 \mu\text{m}$ para $\text{EM}_{0\text{h}}$ y $\text{EM}_{2\text{h}}$, respectivamente.

Tabla 3.8 Diámetro medio de gota y $D_{90\%}$ de la emulsión inmediatamente luego de ser preparada ($\text{EM}_{0\text{h}}$) y después de 2 h con agitación ($\text{EM}_{2\text{h}}$).

	$\text{EM}_{0\text{h}}$	$\text{EM}_{2\text{h}}$	valor p
Diámetro medio (μm)	$26,689 \pm 0,600$	$30,025 \pm 0,785$	0,0412
$D_{90\%}$ (μm)	$46,517 \pm 2,346$	$54,582 \pm 1,603$	0,0568

Los valores se reportan como la media \pm el desvío estándar. El valor p corresponde a la comparación de medias de las muestras $\text{EM}_{0\text{h}}$ y $\text{EM}_{2\text{h}}$ ($n=3$).

Para determinar si la diferencia encontrada entre los diámetros promedios de las muestras ($p < 0,05$) tuvo algún efecto significativo sobre la actividad enzimática bajo las condiciones evaluadas, se requerirían mayores investigaciones. Si bien estas diferencias no son

cualitativamente importantes, los resultados quedan a disposición para el posterior análisis de resultados en otras secciones de la tesis.

La Tabla 3.9 muestra el diámetro promedio para las muestras de medio Santos-10 (con y sin goma) y el medio 1:1 y el medio 1:1 hidrolizado. Como se puede observar, al comparar el efecto de la goma arábica, se comprobó que su presencia reduce en gran medida el diámetro medio de la gota, lo que implica un incremento en el área interfacial del medio de reacción.

Tabla 3.9 Diámetro promedio (μm) y relación aceite:agua (v/v) de las muestras analizadas: Medio Santos-10 s/goma, Medio Santos-10 c/goma, Medio 1:1 y Medio 1:1 hidrolizado.

Muestra	Diámetro promedio (μm)	Relación aceite:agua (v/v)
Medio Santos-10 s/goma	99,22 \pm 10,10 ^a	0,17:1
Medio Santos-10 c/goma	15,04 \pm 0,41 ^b	0,17:1
Medio 1:1	151,06 \pm 0,59 ^c	1:1
Medio 1:1 hidrolizado	49,60 \pm 0,43 ^d	1:1

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre muestras (n=2, p<0,02).

Por otro lado, al comparar las muestras Santos-10 s/goma con el medio 1:1, se pudo observar que la proporción de aceite también afectó significativamente el diámetro medio. Se identificó un incremento de aproximadamente el 50 % en el diámetro medio de gota al utilizar el Medio 1:1, el cual contaba con aproximadamente 6 veces el volumen de aceite contenido en el medio Santos-10 s/goma. Estos resultados sugerirían una disminución considerable del área interfacial aceite-agua.

Por otro lado, el APH1 utilizado en el medio 1:1 hidrolizado contuvo 0,58 \pm 0,04 y 10,80 \pm 0,58 % (m/m) de MAG y DAG, respectivamente. Estos compuestos son conocidos por sus propiedades emulsificantes (Sección 1.2.1.9), por lo que su presencia podría explicar la reducción del tamaño de gota observado entre el medio 1:1 y 1:1 hidrolizado (p<0,01). Esta hipótesis sugeriría que a medida que avanza la hidrólisis, la mezcla de reacción podría incrementar el área interfacial debido a la formación de subproductos. Si bien el medio Santos-10 c/goma presentó un diámetro medio menor que el 1:1 hidrolizado, la ausencia o adición de goma arábica debe ser evaluada de acuerdo a las condiciones de reacción particulares de cada caso, considerando que la mera existencia de productos de reacción podría ser suficiente para prescindir de la misma.

Por otro lado, en la Figura 3.8 se muestran las distribuciones de tamaño de gota para cada una de las muestras de la Tabla 3.9.

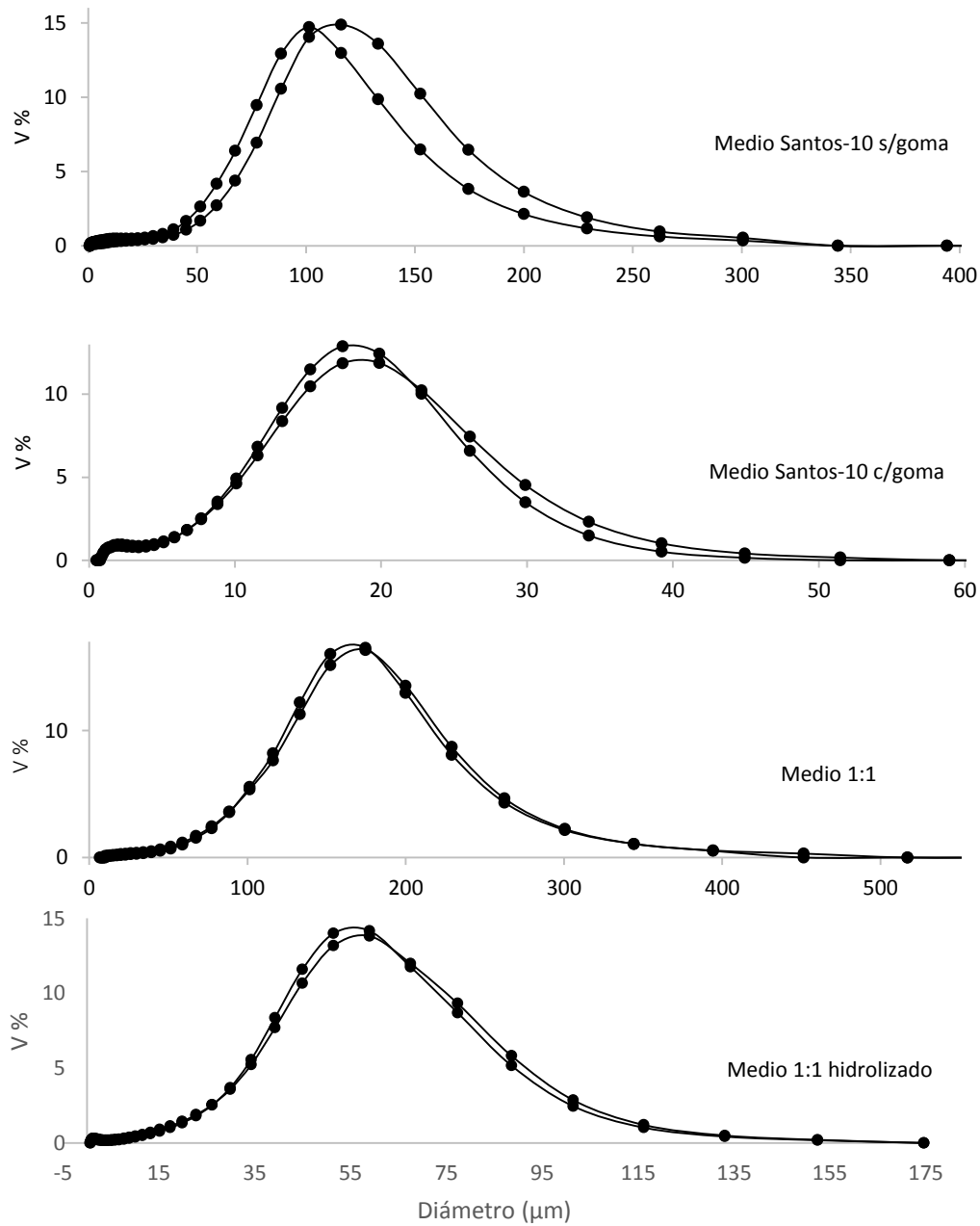


Figura 3.8 Distribución del diámetro promedio de gota de las diferentes muestras analizadas (cada una por duplicado): Medio Santos-10 s/goma, Medio Santos-10 c/goma, Medio 1:1 y Medio 1:1 hidrolizado. V (%): porcentaje volumétrico.

Como se observó en la Figura 3.8, la muestra Santos-10 s/goma presentó una dispersión entre aproximadamente 10 y 400 μm mientras que al incorporar goma se obtuvo un rango entre 0,8-50 μm . La diferencia observada entre las curvas del duplicado se debe a que para preparar el medio se deben tomar 2,5 mL de una emulsión de agua y aceite creada empleando un

homogeneizador. Al no existir surfactante, la emulsión es muy inestable y por lo tanto más difícil de manipular. Por último, para las muestras del medio 1:1 sin hidrolizar e hidrolizado, los rangos fueron 11-151 y 0,9-152 μm , respectivamente.

3.8.4 Efecto del etanol y el catalizador sobre el pH del medio de reacción

En esta experiencia se realizaron únicamente mediciones de pH para evaluar el comportamiento del pH del medio al incorporar el etanol y el polvo de acetona. Esta información se utilizó para verificar el pH real del medio durante la reacción y a su vez fue útil al momento de explicar resultados inesperados al emplear técnicas potenciométricas en la determinación de actividad lipásica.

3.8.4.1 Metodología

En primer lugar, se preparó el medio Santos-10 empleando buffer de fosfato 100 mM pH 7 (Sección 2.4.6). Luego de mezclar 10 mL de buffer y 10 mL de emulsión, se realizó la primera medición de pH (pH_1). En segundo lugar, se simuló la detención de la reacción incorporando 20 mL de etanol y se midió el pH nuevamente (pH_2). Luego se incorporaron 0,2 g de polvo lipásico vegetal y por última vez se volvió a medir el pH (pH_3). La Figura 3.9 muestra un esquema de esta experiencia, la cual se realizó por triplicado.

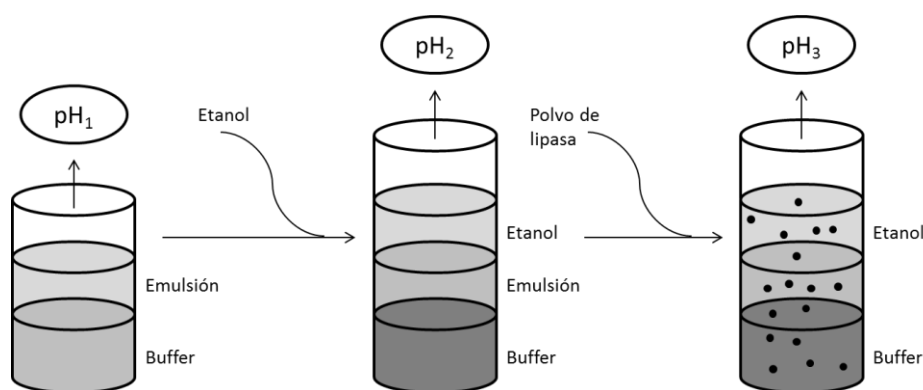


Figura 3.9 Esquema general de la metodología experimental para evaluar efecto del etanol y el catalizador sobre el pH del medio de reacción.

3.8.4.2 Análisis de resultados

Los diferentes pH fueron $\text{pH}_1 = 6,93 \pm 0,01$, $\text{pH}_2 = 8,05 \pm 0,01$ y $\text{pH}_3 = 8,00 \pm 0,01$. En primer lugar, se puede mencionar que el pH del medio antes de incorporar el etanol fue muy cercano a 7, lo que indicaría que el efecto buffer fue adecuado. Luego de agregar el etanol, se observó un incremento importante de pH ($p < 0,01$) lo que podría haber estado asociado a la ruptura del efecto del buffer. Finalmente, se agregó el polvo de lipasa vegetal para evaluar los cambios

instantáneos que podría llegar a generar en la muestra (la mezcla no se dejó incubando). Si bien estadísticamente se encontraron diferencias significativas, se consideró que la diferencia entre pH_2 y pH_3 fue pequeña.

3.8.5 Estabilidad del pH del medio luego de 24 horas de incubación

Si bien la estabilidad de este medio ya fue evaluada en la Sección 3.8.1 empleando técnicas cromatográficas, también fue necesario conocer su comportamiento al utilizar métodos de titulación.

3.8.5.1 Metodología

Se utilizó el medio Santos-10 con buffer de fosfato (100 mM, pH 7) para preparar diferentes blancos de reacción. El término “blanco” fue utilizado para muestras que, si bien contienen todos los componentes que están presentes en las muestras de hidrólisis enzimática, los mismos se combinaron de forma tal de evitar que se desarrolle la reacción de hidrólisis entre el polvo de lipasa y el sustrato adicionado. En este caso se analizaron dos sistemas:

- Blanco A: se colocaron 5 mL de buffer de fosfato (100 mM, pH 7) junto con 5 mL de emulsión en un frasco de vidrio. Se incubó a 37 °C bajo agitación magnética vigorosa durante 24 h. Luego se adicionaron 10 mL de etanol y se midió el pH (pH_A).
- Blanco B: se colocaron 5 mL de buffer de fosfato (100 mM, pH 7) junto con 5 mL de emulsión en un frasco de vidrio. Luego se adicionaron 10 mL de etanol (sin incubación) y se midió el pH (pH_B).

3.8.5.2 Discusión de resultados

El pH resultó ser $8,13 \pm 0,01$ para el blanco A y $8,10 \pm 0,02$ para el blanco B. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) indicando que el medio mantiene su integridad a lo largo de las 24 horas de incubación. Esto fue positivo ya que permitió eliminar posibles sospechas de deterioro del sustrato ocasionadas por alguna interacción entre componentes bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados fueron consistentes con aquellos obtenidos en la Sección 3.8.1.

3.9 Conclusiones

Como conclusión general se puede mencionar que la aceptabilidad de los resultados depende del medio de reacción elegido para la hidrólisis y de la metodología empleada en la cuantificación de AGL. En cuanto a la titulación con fenolftaleína, se encontraron ciertas inconsistencias al utilizar los medios Šinkūnienė y AOCS por lo que se decidió descartar ambas

opciones. Por lo contrario, determinación resultó confiable cuando se trabajó con el medio Santos-10, al menos para porcentajes bajos de AGL (aproximadamente 12 %).

Al utilizar la metodología de titulación en continuo con los medios Novozymes y Santos-60 tampoco se encontraron evidencias para descartar estas metodologías como alternativas para determinar la acción lipásica, pero se debe tener en cuenta que esta técnica no permite procesar más de una muestra a la vez y no es adecuada para tiempos largos de reacción ya que se debe estar presente durante todo el proceso.

En cuanto al método de titulación a punto final, se determinó que el mismo también podría ser aplicado para cuantificar la acción lipásica utilizando el medio Santos-10 y que permitiría detectar actividades realmente bajas (aproximadamente 1 % AGL m/m), permitiendo diferenciar muestras de blancos. También se obtuvieron resultados alentadores al aplicar esta técnica junto con el medio de reacción Sigma.

En cuanto a las curvas de titulación para el medio Santos-10 obtenidas a partir de diferentes concentraciones de ácido oleico, las mismas se diferenciaron ampliamente entre ellas, indicando que este medio de reacción junto con el presente método, serían apropiados para la determinación de la acción lipásica.

Se evaluó también la eficiencia de recuperación de subproductos mediante los métodos A y B, permitiendo conocer el grado de error en las determinaciones de actividad empleando técnicas cromatográficas. En base a los resultados obtenidos, se decidió elegir el método B (éter etílico y hexano) ya que, además de alcanzar mejores resultados, también resultó más simple y fácil de aplicar. A continuación, se analizó la calidad de esta extracción para diferentes niveles de hidrólisis (2-90 %AGL). Se encontró una diferencia máxima de 3,3 %AGL entre el valor teórico y el obtenido luego de la extracción, considerándose aceptable para los objetivos de la presente tesis.

Finalmente, los estudios complementarios para evaluar las posibles modificaciones en el %AGL de los medios de reacción (Santos-10 y Sigma) incubados bajo las condiciones deseadas sin utilizar lipasa, indicaron que no se encontraron diferencias entre los medios antes y después de 24 h de incubación (determinación mediante CGL), lo que indicaría la estabilidad del sustrato. Debido a que el medio Santos-10 fue ampliamente utilizado a lo largo de la tesis, el mismo se estudió en mayor profundidad. En cuanto al tamaño de partícula de la emulsión, si bien se encontraron diferencias significativas entre el diámetro promedio antes y después de 2 h de agitación magnética vigorosa, dicha diferencia fue cualitativamente baja. Al analizar el tamaño de gota de los diferentes medios evaluados (Santos-10 c/goma, Santos-10 s/goma, medio 1:1 y medio 1:1 hidrolizado), se encontraron diferencias significativas para todos los casos: La

presencia de goma disminuyó el diámetro promedio mientras que un incremento en la concentración de aceite (en ausencia de goma), generó un aumento del diámetro de gota. Además, la presencia de subproductos de hidrólisis como mono- y di-glicéridos, también contribuyeron a la reducción dicha variable, incrementando el área interfacial aceite-agua en ausencia de surfactante. En cuanto al efecto del etanol sobre el medio de reacción antes de la titulación, se encontró que el pH del medio antes de incorporar este solvente fue muy cercano a 7, lo que indicaría que el efecto buffer fue adecuado. Luego de agregar el etanol, se observó un incremento importante del pH ($p < 0,01$) el cual podría estar asociado a la ruptura del efecto del buffer, permitiendo así la correcta titulación de la muestra. Por último, se verificó que el pH antes y después de la incubación del medio Santos-10, durante 24 h a 37 °C y sin lipasa, se mantuvo estable.

3.10 Referencias

Balasaraswathi, R., & Sadasivam, S. (1997). Changes in oil, sugars and nitrogenous components during germination of sunflower seeds, *Helianthus annuus*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51(1): 71–77.

Horiba Scientific. (2010). *Guidebook to Particle Size Analysis*.

Sigma-Aldrich. (1999). Enzymatic assay of lipase, olive oil as substrate, Doc code VELIPA02 (método interno).

Las referencias empleadas para definir los diferentes métodos utilizados ya fueron consideradas en el Capítulo 2 “Materiales y métodos”.

ACTIVIDAD LIPÁSICA EN SEMILLAS DE GIRASOL

Capítulo

4

4.1 Introducción

Como se ha mencionado anteriormente, las lipasas son aquellas proteínas funcionales que hidrolizan los ácidos grasos unidos a los triacilgliceroles (TAG) produciendo ácidos grasos libres (AGL) y glicerol (cuando la reacción es completa). Dentro del reino vegetal, las mismas se encuentran presentes en las semillas oleaginosas, entre otras. Durante el período de germinación de estas semillas, la reserva de lípidos se consume rápidamente para generar la energía necesaria para el crecimiento embrionario de la planta. Durante este período, la actividad lipolítica es muy alta y, dependiendo de las especies vegetales, la lipasa puede estar localizada en la membrana de los cuerpos lipídicos o en otros compartimentos celulares (Barros et al. 2010).

Los granos de semillas oleaginosas más estudiados con respecto a la extracción y caracterización de lipasas son los frijoles, semillas de girasol, semillas de lino, maní y semillas de algodón (Barros et al. 2010), aunque actualmente se están investigando lipasas de muchas otras fuentes de semillas oleaginosas.

Existen diversas fuentes bibliográficas que reportan actividad hidrolítica en semillas de girasol (Mierzejewska et al. 2003; Sadeghipour et al. 2003; Sagioglu et al. 2005; Bahri et al. 2012). Sagioglu et al. (2005) estudiaron las propiedades físico-químicas de la lipasa purificada de semilla de girasol (*Heliantus annuus L*) y observaron que la lipasa monomérica presentó un peso molecular de 22 kDa y un punto isoelectrico de 8,0, mostrando un comportamiento similar al de una lipasa típica y una velocidad máxima de $555 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{Proteína}}$. La lipasa mostró preferencia por hidrolizar los TAG con ácidos grasos monoinsaturados, a pH 7,5 y una temperatura de 50 °C (rango estudiado entre 20 y 70 °C). Otros autores (Mierzejewska et al. 2003) evaluaron la estabilidad enzimática durante el almacenamiento de las semillas y reportaron que la actividad de la lipasa de girasol varió de 28,4 a 37,5 U/mg_{Proteína} y de 24,5 a 31,4 U/mg_{Proteína} durante el almacenamiento de semillas con un contenido de humedad ajustado al 6 % y 18 %,

después de 42 y 14 días, respectivamente (U=unidad de actividad lipásica, determinada por el método de difusión en agar solidificado). Otros autores encontraron que la actividad lipolítica se conservaba en un rango de temperatura de 35 a 50 °C con un pH alcalino durante un período de aproximadamente cuatro meses (Barros et al. 2010).

En base a lo expuesto y debido a la fácil disponibilidad del cultivo de girasol en el país, se decidió tomar esta semilla como punto de partida para comenzar el estudio de las lipasas de origen vegetal. En este capítulo se describen todos los ensayos preliminares realizados en semillas de girasol manteniendo como objetivo principal la detección de actividad lipásica proveniente de las mismas luego de diferentes procesamientos. Se aplicaron una amplia variedad de tratamientos cuyas metodologías ya fueron detalladas en el Capítulo 2. Dentro de las diferentes variables estudiadas se encuentran: el origen de las semillas (Oleaginosa Moreno Hermanos S.A./PAN7076), el efecto de la germinación (germinada/no germinada), la molienda (con solvente/sin solvente), el tamaño de partícula antes del desaceitado (1000µm/590µm/ciego), el tipo de desaceitado (Acetona-16h/Acetona 3x30min/Hexano 3x30min) y la evaluación de la actividad en los diferentes subproductos que pueden obtenerse a lo largo del proceso de obtención del catalizador (polvo enzimático/aceite/solución, solución proteica/sólidos residuales (Sección 2.3.1), entre otros.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

Se utilizaron dos semillas de girasol diferentes: genotipo PAN7076 (destinadas para cultivo y capaces de germinar) y las proporcionadas por Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. (semillas para la producción de aceite). Estas últimas fueron suministradas en diferentes años (2013, 2014 y 2015). El sustrato empleado fue aceite de girasol alto oleico elaborado por Ecoop. Todos los reactivos fueron de grado cromatográfico o de proanálisis, de acuerdo a las necesidades de cada determinación.

4.2.2 Metodología

4.2.2.1 Descripción global de las experiencias realizadas

Las semillas de girasol fueron la primera fuente de lipasas estudiada en esta tesis y la metodología aplicada fue muy amplia debido al elevado número de variables que fueron modificadas continuamente con el objetivo de detectar actividad lipásica. La Tabla 4.1 presenta un resumen en donde se incluyen todas las experiencias junto con las variables que fueron modificadas de acuerdo a un orden cronológico. En todos los casos, la reacción elegida para la evaluación de la lipólisis enzimática fue la hidrólisis de aceite de girasol alto oleico, siendo ésta

expresada como $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$. La palabra “extracto” hace referencia al material utilizado como biocatalizador, el cual puede presentarse en diversos formatos (pasta, líquido, polvo) dependiendo del procesamiento aplicado a las semillas.

En primer lugar se realizó un estudio exploratorio utilizando las semillas de girasol de la industria aceitera y de las diferentes fracciones luego del tamizado propuesto en la Sección 2.3.2.2 (R1-R3). Luego se evaluó la actividad de diferentes productos como lo son el **polvo enzimático** (R4) luego del desgrasado, la **solución proteica** (R6, R7) luego de la extracción con buffer, los **sólidos residuales** (R5) asociados a la misma y eventualmente el **aceite** obtenido luego del desgrasado (R21).

A partir de la Tabla 4.1 se puede observar que la metodología más aplicada para la evaluación de la acción lipásica fueron las técnicas de titulación (en continuo y a punto final, Sección 2.5.2) debido a su fácil y rápida aplicación. De todas formas, también se utilizaron técnicas cromatográficas (determinación simultánea de subproductos, Sección 2.5.3) para disponer de resultados más confiables.

El tiempo de reacción fue variable dependiendo de la experiencia y del método para evaluar la lipólisis enzimática; abarcó desde aproximadamente 15-150 minutos hasta 24 horas. Se emplearon dos temperaturas de reacción (30 y 37 °C) y 4 medios de reacción diferentes (Novozymes, Santos-60, Santos-10 con buffer de fosfato y Sigma, Sección 2.4). En la Tabla 4.1 también se especifica el tipo de blanco de reacción empleado, siendo el mismo un factor importante discutido en profundidad dentro del presente capítulo. Por este motivo, y para facilitar la discusión de resultados, también se incorporó el resultado de la comparación entre las muestras y sus blancos de reacción correspondientes. En los casos en que fue posible, se realizó el análisis estadístico empleando la prueba t para la comparación de medias. El valor p obtenido fue incluido en la Tabla 4.1 permitiendo identificar fácilmente las diferencias significativas entre muestras y blancos de reacción ($p < 0,05$).

Tabla 4.1 Tabla global de experiencias realizadas con extractos obtenidos a partir de semilla de girasol.

R	Procesamiento de semilla ^a	Desaceitado ^a	Semilla	Método de cuantificación*	Medio reacción	Extracto (g)	gExtracto/gMedio	gAceite/gMedio	T (°C)	Tiempo de reacción	Tipo de blanco	AxB	Valor p M-B
R1	Molienda A, Tamizada 1000, Desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0067	0,0017	30	24 min	Sin aceite	2x1	>0,88
R2	Molienda A, Tamizada 590, Desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0067	0,0017	30	23 min	Sin aceite	2x1	>0,79
R3	Molienda A, Tamizada ciego, Desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0067	0,0017	30	24 min	Sin aceite	2x1	>0,42
R4	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0067	0,0017	30	20 min	Sin aceite	2x1	>0,20
R5	Molienda A, desaceitada, residuo sólido	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,80 g	---	0,0017	30	18 min	Sin aceite	1x1	no
R6	Molienda A, desaceitada, solución proteica	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	1,20 mL	---	0,0017	30	21 min	Sin aceite	1x1	no
R7	Molienda A, desaceitada, solución proteica	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	2,50 mL	---	0,0017	30	15 min	Sin aceite	1x1	no
R8	Molienda A, desaceitada	Hexano-3x30min	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0058	0,0215	30	24 min	sin aceite	1x1	no
R9	Molienda A, desaceitada	Acetona-3x30min	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Novozymes	0,40 g	0,0058	0,0167	30	24 min	sin aceite	1x1	no
R10	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Santos-60	0,40 g	0,0067	0,0171	30	30 min	Sin aceite	1x1	no
R11	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2014	Continuo	Santos-60	0,40 g	0,0067	0,0169	30	188 min	Sin aceite	1x1	no
R12	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	Continuo	Santos-60	0,40 g	0,0067	0,0171	30	142 min	Sin aceite	1x1	no
R13	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Continuo	Santos-60	0,40 g	0,0067	0,0168	37	163 min	Sin aceite	1x1	no
R14	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	48 h	Sin aceite	1x3	<0,05
R15	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	24 h	Sin aceite	1x3	<0,05
R16	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	24 h	Sin aceite	1x3	<0,05
R17	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	24 h	Sin aceite	1x3	>0,18
R18	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	24 h	Sin aceite	2x3	>0,67

Tabla 4.1 Continuación.

R ^a	Procesamiento de semilla ^b	Desaceitado ^b	Semilla	Método de cuantificación ^b	Medio reacción ^{b,c}	Extracto (g)	gExtracto/gMedio	gAceite/gMedio	T (°C)	Tiempo de reacción	Tipo de blanco	AxB ^d	Valor p M-B ^e
R19	Germinado, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2014 Alto Oleico	Punto final	Santos-10	0,10 g	0,01	0,117	37	24 h	Sin aceite	2x3	>0,14
R20	Germinación, molienda A	Sin desaceitar	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,80 g	0,08	0,117	37	24 h	Inactivación con T	3x3	<0,05
R21	Aceite de Germinación	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,20 g	0,020	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x3	>0,99
R22	Germinación, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	Punto final	Santos-10	0,35 g	0,035	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x3	<0,05
R23	Germinación, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	Punto final	Santos-10	0,35 g	0,035	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x3	<0,03
R24	Germinación, molienda A	Sin desaceitar	Oleaginoso Moreno 2015	Punto final	Santos-10	0,80 g	0,08	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x3	>0,20
R25	Germinación, molienda A	Sin desaceitar	Oleag. Moreno 2013	CGL	Santos-10	0,8 g	0,08	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x2	<0,02
R26	Germinación, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Oleag. Moreno 2013	CGL	Santos-10	0,35 g	0,035	0,117	37	24 h	Inactivación con T	1x3	>0,90
R27	Germinación, molienda A	Sin desaceitar	Agronomía PAN7076	CGL	Sigma	0,35 g	0,0480	0,667	37	24 h	Sin aceite	1x3	>0,22
R28	Germinación, molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	CGL	Sigma	0,25 g	0,0333	0,667	37	24 h	Sin aceite	1x3	>0,46
R29	Molienda A (sin germinar)	Sin desaceitar	Agronomía PAN7076	CGL	Sigma	0,40 g	0,0533	0,667	37	24 h	Sin aceite	1x3	<0,01
R30	Molienda A, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	CGL	Sigma	0,30 g	0,0400	0,667	37	24 h	Sin aceite	1x3	<0,03
R31	Molienda B, desaceitada	Acetona-16h	Agronomía PAN7076	CGL	Sigma	0,30 g	0,0400	0,667	37	24 h	Sin aceite	1x3	<0,03

^a Número de referencia.

^b Los métodos de procesamiento, medios de reacción y cuantificación se describen en las Secciones 2.3.2, 2.4 y 2.5.

^c Para los medios Novozymes y Santos-60 el pH se mantuvo en 7 sin uso de buffers (método en continuo). Para el medio Santos-10 y Sigma se utilizó buffer de fosfato (100 mM, pH 7) y Tris-HCl (200 mM, pH 7,5), respectivamente.

^d A representa el número de ensayos independientes y B representa el número de réplicas por ensayo.

^e Valor p: Indica si la muestra dio mayor que el blanco de reacción (p crítico 0,05). En la mayoría de los casos se reporta el valor p de la comparación estadística (valores de p inferiores a 0,05 indica diferencias significativas entre muestra y blanco); en aquellos casos donde el número de réplicas no era suficiente para realizar la comparación estadística se indican con "no" las muestras con valores numéricos menores o iguales al blanco y con "si" las muestras con valores mayores al blanco. Las líneas punteadas (-----) indican un cambio importante en la metodología respecto a lo que se desarrolló en las filas anteriores.

En la Tabla 4.1 también se especificó la semilla empleada y una breve descripción del procesamiento aplicado sobre la misma (germinada/sin germinar, desgrasada/sin desgrasar). También se indicó el método de desgrasado utilizado, siendo el método Acetona-16h el más frecuente (Sección 2.3.2.3), aunque en algunos casos también se analizó la semilla molida sin desgrasar (R20, R24, R25, R27 y R29).

En algunas muestras, el contenido de aceite y humedad se evaluaron mediante los métodos de las Secciones 2.2.2 y 2.2.3, respectivamente.

4.2.2.2 Blancos de reacción

En la titulación en continuo el blanco de reacción presentó el mismo medio de reacción, volumen, cantidad de extracto y condiciones que la muestra, con la excepción de que no se adicionó el sustrato de la reacción (Sección 2.5.2.2). El mismo tipo de blanco (sin aceite) fue utilizado en las determinaciones mediante cromatografía (Sección 2.5.3.4). Por otro lado, los blancos asociados con la titulación a punto final presentaron una mayor complejidad (Sección 2.5.2.3) debido a que surgió la necesidad de identificar qué proporción de los μmoles de NaOH consumidos al tiempo final de reacción correspondían verdaderamente a los productos de hidrólisis (ácidos grasos libres) y no fueron generados por otro tipo de fenómeno (aceite residual en semilla, solubilización parcial de los extractos en el medio, entre otros). Es por esto que se crearon los sistemas A y B de blancos de reacción (Sección 2.5.2.3) cuyo objetivo fue imitar las condiciones de una reacción de hidrólisis convencional e impedir la liberación de ácidos grasos por efecto de dicha reacción. Estos blancos se utilizaron como una medida de los otros fenómenos posibles que puedan afectar el consumo de NaOH.

4.3 Discusión de resultados

En esta sección se explica la cronología de las diferentes experiencias que se realizaron, de forma de justificar los cambios graduales en la metodología aplicada. Para ello, las experiencias se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo al método de determinación de la actividad:

- R1-R13: experiencias determinadas mediante titulación a punto final.
- R14-R24: experiencias determinadas mediante titulación en continuo.
- R25-R31: experiencias determinadas mediante cromatografía gaseosa.

4.3.1.1 Experiencias determinadas mediante titulación en continuo (R1-R13)

Diversos autores reportaron actividad lipásica en semilla de girasol sin germinar (Mierzejewska et al. 2003; Sagiroglu et al. 2005; Avelar et al. 2013). Por este motivo las primeras experiencias se realizaron a partir de la semilla de girasol no germinada. En la Tabla 4.2 se

muestran las primeras experiencias en las que se implementó el método de titulación en continuo para la determinación de la actividad lipásica. En las mismas se realizó un tamizado previo al desaceitado para evaluar si el tamaño de partícula influye en el desaceitado tal como lo mencionó Pierozan et al. (2009), en relación a la actividad de un biocatalizador obtenido a partir de trigo. El medio de reacción utilizado se eligió en base a las experiencias previas realizadas en las Sección 3.4.1, cuyos resultados indicaron que esta metodología podría ser aplicada a lipasas de origen vegetal.

Tabla 4.2 Experiencias pertinentes a las reacciones en las que se utilizó el método de titulación en continuo.

R ^a	Procesamiento	μmol _{NaOH} Consumido		Valor p ^b
		Media Muestra	Media Blanco	
R1	Tamizada 1000, desgrasada	32,9±3,8	33,7±5,3	0,8836
R2	Tamizada 590, desgrasada	36,2±6,3	38,1±6,4	0,7929
R3	Tamizada ciego, desgrasada	49,1±1,5	48,0±0,0	0,4226
R4	Desgrasada	47,5±9,7	35,4±0,7	0,2200

^a Número de referencia de experiencias de Tabla 4.1. ^b Prueba t entre muestra y blanco.

Se reporta el consumo de NaOH a los 20 minutos de reacción utilizando 0,04 g extracto vegetal (catalizador), a 30 °C y pH 7 (buffer fosfato 100 mM).

Como puede observarse en la Tabla 4.2, si bien existió acidez titulable en todos los sistemas de reacción, en ninguna de ellas se pudo distinguir diferencias significativas cuando se las comparó con el blanco de reacción correspondiente ($p > 0,22$). En la bibliografía se encuentran diversos trabajos en donde se estudia la actividad lipásica de diversos catalizadores de origen vegetal (ricino, canola, trigo) denominados comúnmente “polvos de acetona” y que reportan actividad lipásica utilizando métodos de titulación (Jachmanián et al. 1996; Cavalcanti et al. 2007; Pierozan et al. 2009). Estos resultados exigen una reflexión sobre la información disponible en algunas publicaciones (Jachmanián et al. 1996; Cavalcanti et al. 2007; Pierozan et al. 2009; Santos et al. 2013) ya que las mismas fueron el punto de partida para la elección de las condiciones experimentales planteadas en esta tesis. Sería posible que en dichos trabajos los blancos de reacción no hubieran sido llevados a cabo bajo las mismas condiciones de la reacción de interés, especialmente en lo referente al tiempo de contacto entre el polvo enzimático y el medio de reacción durante la incubación de la misma. En el blanco reportado por dichos autores el polvo se adicionó luego de incorporar el etanol (frenado de reacción), realizando la cuantificación de los AGL inmediatamente, sin considerar un tiempo de contacto representativo entre el polvo y el medio (como ocurre verdaderamente en la reacción). Esto es de gran importancia para detectar la actividad lipásica verdadera, ya que el medio de reacción puede haber extraído otros

compuestos del preparado sólido que no hayan sido eliminados durante el desaceitado y que, a su vez, puedan dar falsas señales positivas en lo referente a la actividad lipásica. Es importante destacar que si el consumo de NaOH de las muestras de la Tabla 4.2 se contrastaran con un blanco que no incluye el polvo incubado junto con el medio (similar a los que realizan otros autores), los resultados indicarían la existencia de actividad lipásica llevando a resultados “falsos-positivos” (ya que el pH del medio de reacción sin polvo enzimático no se modificó a lo largo del tiempo, Sección 3.8.5).

En un trabajo previo (Sagioglu et al. 2005) los autores estudiaron la purificación de la lipasa mediante sucesivas metodologías. Para ello, luego de obtener el polvo de acetona, realizaron una extracción colocando el polvo en buffer de fosfato (50 mM, pH 7) durante largos periodos de tiempo. El resultado final fue una solución con un contenido de proteína de $44 \text{ mg}_{\text{Proteína}}/\text{mL}$. Dicha solución presentó una actividad específica de $0,92 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{Proteína}}$ en una reacción de 5 minutos, lo que equivale a una productividad específica de $817 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Polvo de acetona}}$, aunque se debe recordar que la lipasa se encontraba parcialmente purificada. En base a esto, la ausencia de actividad en las experiencias de la Tabla 4.2 podría explicarse debido a la falta de purificación de la fracción proteica, por lo que se prosiguió con las experiencias R4, R5, R6 y R7 (Tabla 4.1). Para realizar estos experimentos se produjo un nuevo lote de polvo que fue fraccionado. Una parte fue empleada en R4 mientras que el polvo restante fue sometido al proceso de extracción con buffer de fosfato (50 mM, pH 7 en presencia de CaCl_2 0,5 mM) (Sección 2.3.2.4, Sagioglu et al 2005) para evaluar las diferentes fracciones obtenidas: los sólidos residuales depositados luego de la centrifugación (R5) y el líquido sobrenadante en diferentes concentraciones (R6 y R7). Si bien en R4 no se encontraron diferencias con el blanco (Tabla 4.2), tanto en muestra como en blanco se encontraron cambios de pH que conllevaron a la titulación de las muestras. En el caso de R5, R6 y R7, no se detectaron cambios de pH, por lo que la actividad también fue nula. Para verificar la extracción con buffer, las soluciones proteicas utilizadas en R6 y R7 fueron testeadas en su contenido de proteínas de acuerdo al método de la Sección 2.2.4 obteniendo un promedio de $71,79 \pm 3,18 \text{ mg}_{\text{Proteína}}/\text{mL}_{\text{Solución}}$ (promedio de dos experiencias totalmente independientes). Esto verificó la existencia de proteínas pero, a pesar de esto, en las reacciones de hidrólisis no se identificó actividad catalítica en ninguna de ellas, bajo las condiciones estudiadas. Esto podría deberse a una extracción deficiente de las lipasas, o la inactivación total de las mismas durante el proceso.

Desde R8 a R13 se efectuaron diferentes cambios en la metodología para descartar otras posibles razones por las cuales no se pudo detectar actividad lipásica. En primer lugar, se cuestionó el método de extracción del aceite, por lo que se realizaron extracciones con

hexano (R8) y acetona (R9) a tiempos más cortos, al mismo tiempo que se incrementó la concentración de aceite en el medio de reacción. Luego, se optó por modificar el medio de reacción (Santos-60, R10) e incrementar el tiempo de reacción (R11). Finalmente, se utilizó una semilla diferente (R12) y se aumentó la temperatura de 30 a 37 °C (R13).

Todos estos resultados evidencian la falta de actividad de la semilla en las condiciones estudiadas (medio de reacción, temperatura, métodos, etc.) o quizás un tiempo de reacción demasiado corto, ya que algunas enzimas requieren un tiempo de incubación determinado para adaptarse a las condiciones de reacción (Camacho Paez *et al.* 2002; Palla, 2012). En cuanto al método de cuantificación de la lipólisis enzimática, su eficacia para la determinación de la misma ya fue verificada en la Sección 3.4 por lo que no debería ser un punto crítico que impida su cálculo. Otras explicaciones podrían ser el deterioro de las semillas durante el almacenamiento o simplemente la ausencia de actividad de la misma independientemente de las condiciones de reacción empleadas.

4.3.1.2 Experiencias determinadas mediante titulación a punto final (R14-R24)

Debido a que no se detectó actividad lipásica en las experiencias R1-R13 (Tabla 4.2), se comenzaron a evaluar los extractos de semilla de girasol germinada, empleando el método de titulación a punto final para la evaluación de la lipólisis enzimática con el objetivo de emplear tiempos de reacción más prolongados (de 24 h) y de esta forma dejar a la lipasa el tiempo suficiente para que se acostumbre a su entorno. Si bien todas las experiencias de este conjunto se realizaron con semilla germinada, algunas fueron desaceitadas y otras no.

A fin de chequear la estabilidad del medio de reacción en todo el tiempo de reacción (sin el agregado del preparado enzimático), se realizaron evaluaciones de los blancos de reacción correspondientes (Sección 3.8.4), sin observar evidencias significativas de cambios en el pH del medio de reacción ($p=0,45$). Por lo tanto, se concluyó que las condiciones de reacción (temperatura y tiempo) no afectaron el pH del sistema. También se evaluó el efecto del etanol sobre el medio de reacción para verificar que efectivamente el agregado de etanol destruye el efecto del buffer permitiendo desenmascarar los cambios de pH en el medio producidos por la liberación de ácidos grasos libres (Sección 3.8.4).

Como se mencionó anteriormente, todas las condiciones y métodos aplicados en estas experiencias (R14-R24) fueron reportadas en la Tabla 4.1. La primera reacción de este conjunto (R14) se realizó durante 48 h, encontrando diferencias significativas con el blanco y una productividad específica de $224 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ (el extracto fue almacenado 27 días en el freezer antes de su uso). Las mismas condiciones de esta experiencia se repitieron empleando un tiempo

de reacción de 24 h (R15-R17) y los resultados se muestran en la Tabla 4.3. Como puede apreciarse, se encontraron diferencias significativas entre las muestras y sus respectivos blancos al emplear tiempos de reacción largos. Sin embargo, se detectó que el tiempo transcurrido entre la obtención del preparado enzimático y la ocurrencia de la reacción podría tener algún efecto importante sobre la lipólisis enzimática, ya que la misma no fue detectable luego de 30 días de almacenamiento. De todas formas, al comparar la reacción de 48 h (R14) con su equivalente a 24 h (R16), se encontró que la productividad de ésta última fue inferior a la de 48 h ($p=0,0243$), pudiendo significar que la reacción de hidrólisis en estos extractos fue muy lenta.

Tabla 4.3 Experiencias pertinentes a las reacciones en las que se utilizó el método de titulación a punto final para la determinación de la productividad específica.

R ^a	Días ^b	Productividad específica $\mu\text{molAGL/gExtracto}$						Valor p ^c
		Media Muestra	Desvío	Media Blanco	Desvío	Media M-B	Desvío	
R15	8	2250	469	1090	130	1160	469	0,0144
R16	24	1350	65	1010	164	262	65	0,0281
R17	30	918	210	718	53	---	---	0,1858

^aReferencia de Tabla 4.1. ^bTiempo transcurrido (almacenado a 6 °C) desde que se obtuvo el extracto de interés hasta que se utilizó en reacción. ^cPrueba t entre muestra y blanco. Se reporta el consumo de NaOH luego de 24 h de reacción, 0,1 g extracto, a 37 °C y pH 7 (buffer fosfato 100 mM).

Como la productividad determinada bajo estas condiciones fue baja, en R18 y R19 se utilizaron dos semillas de girasol de diferente origen: Agronomía PAN7076 y Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. variedad alto oleico. En estos casos, no se detectaron diferencias significativas con respecto al blanco de reacción (Tabla 4.1).

En R20 se comenzó a investigar la actividad de las semillas germinadas sin desgrasar con el objetivo de evaluar el efecto del desgrasado. Esta condición conllevó a la modificación del blanco de reacción, debido a que el sistema A de blancos (Sección 2.5.2.3) podría conducir a la hidrólisis del aceite endógeno. Por este motivo, se decidió implementar el sistema B de blancos (Sección 2.5.2.3) que contempla la incubación del extracto previamente inactivado con temperatura. A su vez, parte del lote germinado utilizado en R20 fue desgrasado con Acetona-16h (Sección 2.3.2.3) obteniendo por un lado el polvo desgrasado y por otro el aceite de semilla germinada. Ambos productos fueron evaluados en reacciones de hidrólisis en R21 y R22, respectivamente.

Para R20 se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las reacciones de 24 h y sus blancos correspondientes en tres experiencias totalmente independientes obteniendo un promedio de $95,39 \pm 12,06 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$. Esto indicaría que la inactivación térmica del preparado enzimático sería un método sencillo y adecuado para contrastar y que el germinado sin desgrasar presentaría lipólisis enzimática antes del tratamiento de extracción de aceite. Dado que la humedad del extracto germinado sin desgrasar fue de $42,33 \pm 0,11 \%$ (m/m) agua:semilla germinada y el contenido de aceite fue de $23,91 \pm 1,91 \%$ (m/m) aceite:semilla germinada, se calculó la productividad específica en base de extracto libre de agua obteniendo $254,29 \pm 95,48 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}$ "Extracto libre de agua y de aceite".

Como se mencionó anteriormente, en R21 se evaluó la actividad del aceite endógeno extraído de las semillas germinadas para determinar si parte de la lipasa se perdía en la fase oleosa durante la extracción. En este caso no se observaron cambios de pH tanto en la muestra como en el blanco luego de 24 h de reacción lo que significa que no existió actividad en dicho extracto, a diferencia de los resultados obtenidos por Arribére et al. (1994). Esto indicaría que la metodología aplicada concentró toda la actividad lipásica en el extracto sólido, evitando pérdidas indeseadas de lipasas en el aceite. Por otro lado, en R22 se observaron diferencias significativas con su blanco correspondiente, obteniendo una productividad específica de $403 \pm 149 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$. Este valor resultó ser significativamente mayor al valor reportado para R20 en base libre de agua y aceite ($p=0,0353$). Esto indicaría que el proceso de desaceitado podría mejorar la interacción de la lipasa con el sustrato. Si se analiza desde una perspectiva conservadora, podría decirse que el desaceitado al menos no empeora la actividad del catalizador.

Las últimas experiencias fueron realizadas empleando el método de titulación a punto final corresponden a R23 y R24. Estas experiencias son equivalentes a R22 y R20, respectivamente, pero empleando diferentes semillas. En el caso de R23 se emplearon semillas de girasol PAN7076 y en R24 semillas de Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. provistas en el año 2015. R23 resultó en una productividad específica de $128,03 \pm 39,10 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ mientras que para R24 no se encontraron diferencias con respecto al blanco.

La productividad máxima encontrada en este grupo de experiencias en las que se utilizó el método de titulación a punto final se obtuvo para R16, alcanzando un valor de $1162 \pm 468 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ equivalente a un grado de hidrólisis de aproximadamente 30 %AGL (m/m) con respecto a la masa inicial de aceite. Se considera que este grado de hidrólisis es bajo ya que se obtuvo luego de 24 h de reacción, lo que no lo haría apropiado para su uso

industrial. En un trabajo previo, Avelar et al. (2013) reportaron una productividad de $300 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ para semillas de girasol empleando el mismo medio y temperatura de reacción luego de 5 minutos de incubación. En su caso, la mayor productividad fue localizada en las semillas sin germinar ($375 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$) y contrastando contra un blanco de reacción que no contempló la incubación del polvo en el medio de reacción, como se mencionó anteriormente. En la presente tesis ya se demostró que no fue posible identificar actividad lipásica antes de 2 h de reacción (R11-13, Tabla 4.1) bajo las condiciones estudiadas. Esto podría explicarse debido a que el catalizador no pudo adaptarse al medio de forma inmediata, por lo que transcurrieron algunas horas hasta observar un grado de hidrólisis cuantificable.

4.3.1.3 *Experiencias determinadas mediante cromatografía gaseosa (R25-R31)*

Debido a la gran variabilidad de los resultados obtenidos mediante titulación, se realizaron algunas pruebas utilizando métodos cromatográficos para analizar si los mismos son consistentes con los resultados obtenidos mediante titulación. En primer lugar se evaluaron R25 y R26 (Tabla 4.1) las cuales son equivalentes a R20 y R23, respectivamente, con la diferencia de que en las primeras se utilizó un método cromatográfico y en las últimas se utilizó la titulación a punto final. Si bien se utilizó el método cromatográfico de la Sección 2.5.3 (CGL) para determinar la acción lipásica, el blanco no se realizó como se describe en dicha sección, sino que se adoptó el sistema B propuesto en la Sección 2.5.2.3 que también fue empleado en R20 y R23. Luego, a cada muestra (Capítulo 2, Figura 2.5) se le realizó la extracción con solventes para ser analizado por cromatografía. Además, se evaluó la composición de AGL en el aceite extraído de semilla sin germinar y germinada de la variedad PAN7076. Para estos aceites se obtuvieron valores de 1,21 y 8,29 $\text{g}_{\text{AGL}}/100 \text{ g}_{\text{Aceite}}$, respectivamente, lo que demuestra que las lipasas se activaron e hidrolizaron el aceite de reserva durante la germinación, por lo cual se podría decir que las semillas se encontraban en un estado aceptable.

En el caso de R25 se encontraron diferencias significativas con respecto al blanco ($p=0,0116$) pero la productividad específica neta determinada mediante cromatografía gaseosa fue $1,24 \pm 0,63 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$, valor muy inferior al determinado mediante titulación (R20 vs. R25). La masa de AGL producida equivaldría a 280 μg , por lo que se puede considerar despreciable, indicando que no existió actividad lipásica bajo dichas condiciones. Tampoco se detectó actividad en R26 con respecto a su blanco ($p=0,9068$), contradiciendo una vez más los resultados obtenidos mediante titulación (R23 vs. R26). Si bien se podría sospechar que la inactivación del blanco tal vez no fue efectiva (lo que subestimaría la actividad lipásica de R25 y R26), la masa de AGL obtenida sin restar el blanco de reacción en R25 correspondería aproximadamente a menos del 0,3 % del aceite inicial, indicando que no hubo actividad

considerable. Se debe considerar que en la Sección 3.7.1 ya se demostró que la técnica de recuperación con solventes (Extracción B, Sección 2.5.3.1.2) fue efectiva para niveles de hidrólisis bajos (1,7 %AGL). Estos resultados ameritan una reflexión respecto a todos los valores de actividad obtenidos mediante técnicas de titulación dentro del presente capítulo.

Beisson et al. (2000) mencionaron que particularmente el método de titulación en continuo se utiliza como método de referencia y que ya se ha utilizado para determinar actividad lipásica en catalizadores de origen vegetal. Este método es sensible a menos de 1 μmol de ácido graso liberado por minuto y cuando se usa NaOH 0,1M como solución titulante, no es un medio fiable para detectar niveles de actividad inferiores a 0,1 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}$. A su vez, Al-Zuhair et al. (2003) utilizó el método de titulación a punto final junto con un método cromatográfico para determinar la producción de AGL luego de la reacción de hidrólisis con una lipasa bacteriana. En dicho trabajo se reportó que, si bien la actividad lipásica obtenida a partir de ambos métodos resultó similar en el primer tramo analizado, estos valores comenzaron a diferenciarse a partir de una producción de 0,5 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{mL}$. Luego de 600 minutos de reacción bajo las condiciones estudiadas, los valores obtenidos mediante titulación subestimaron en un 25 % a los de cromatografía, indicando que la diferencia entre ambas técnicas debe ser considerada. Lógicamente, la elección de la técnica depende de los experimentos a realizar, conociendo las limitaciones de cada una de ellas.

Para dar por finalizado el estudio de la actividad lipásica en semillas de girasol, se realizaron las últimas experiencias empleando la semilla PAN7076, al mismo tiempo que se modificó el medio de reacción (Sigma) y el tipo de blanco, respetando en su totalidad la técnica descrita en la Sección 2.5.3 (cuantificación por CGL). La Tabla 4.4 resume los resultados de estas experiencias.

Como se puede observar, en ninguna de las muestras de semillas germinadas (R27 y R28) se encontraron diferencias en el %AGL respecto de su blanco. Esto indicó que no hubo producción de AGL asociada a la reacción de hidrólisis con el aceite exógeno y, por lo tanto, no se calculó la actividad lipásica. En R27, la experiencia no permitió identificar la existencia de hidrólisis entre la lipasa y el aceite endógeno, ya que tanto el blanco como la muestra se realizaron con semilla germinada sin desgrasar y por lo tanto ambas contenían aceite endógeno durante la incubación. A pesar de esto, el blanco de reacción presentó un contenido de AGL un 22 % mayor que aquel del aceite puro sin hidrolizar. Esto podría indicar diferentes fenómenos de acuerdo al blanco en cuestión: (a) Liberación de AGL presentes en el aceite endógeno, (b) hidrólisis del aceite endógeno o (c) una combinación de ambos. Como se mencionó inicialmente, el aceite de semilla

germinada contuvo 8,23 %AGL (m/m) y dado que la semilla sin desgrasar presentó aproximadamente $24,28 \pm 1,11 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{Semilla germinada}}$, fue posible calcular el aporte de los AGL ya presentes en la semilla antes de la incubación en el medio Sigma. A su vez también se estimó la cantidad de AGL aportados por el sustrato puro por lo que fue posible calcular un %AGL teórico para el blanco equivalente a 0,93 %AGL (m/m). Este valor se comparó con aquel experimental obtenido para dichas muestras, siendo el mismo 0,859 %AGL (m/m), resultando en valores cualitativamente similares. Si bien se debe contemplar que al obtener porcentajes tan bajos el error en las mediciones se incrementa, se consideró que estos resultados fueron suficientes para considerar que no existe reacción de hidrólisis entre la lipasa y el aceite endógeno bajo las condiciones estudiadas y que las diferencias entre el blanco de R27 y el aceite puro fueron causadas por a los AGL contenidos en el aceite endógeno del extracto. Por otro lado, el blanco de R28 no presentó diferencias respecto del aceite puro, indicando nuevamente que los ácidos grasos encontrados en el blanco de R27 provenían del aceite de la semilla germinada, y no de la hidrólisis de aceite endógeno.

Tabla 4.4 Experiencias pertinentes utilizando extractos de girasol y evaluadas mediante CGL: Comparación de medias del %AGL en muestras, blancos y aceite puro y %AGL neto de los experimentos realizados.

Referencia	Proceso ^a	valor p ^b M vs Bco	valor p ^c Bco vs Aceite	AGL ^d (%, m/m)
R27	Ge, M _A	0,2261	0,0179	---
R28	Ge, M _A , D	0,4621	0,9877	---
R29	M _A	0,0105	0,0011	0,54±0,02
R30	M _A , D	0,0243	0,0054	0,53±0,04
R31	M _B , D	0,0359	0,0037	0,40±0,13

^a Ge: germinación, D: desgrasado, M_A: molienda A, M_B: molienda B. La ausencia de cualquiera de las letras implica que no se aplicó el tratamiento en dicha muestra. ^b Comparación estadística entre los valores promedios de las muestras y sus blancos respectivos. ^c Comparación estadística entre los valores promedios de los blancos de cada muestra y el sustrato de reacción puro (aceite). ^d Masa de AGL con respecto a la masa inicial de sustrato, porcentual.

Condiciones de reacción: 24 h de reacción, 37 °C y medio Sigma pH 7,5 (buffer Tris-HCl 200 mM).

Al analizar los resultados de la semilla sin germinar (R29-R31), tanto en desgrasada como no desgrasada, se observaron diferencias significativas entre las muestras y sus respectivos blancos. A pesar de esto, los valores de %AGL (m/m) fueron extremadamente bajos, por lo tanto la actividad lipásica de estos extractos fue despreciable, al menos para su potencial uso a escala industrial. Por último, aquellos blancos que mostraron diferencias significativas con respecto al aceite puro (Tabla 4.4) presentaron valores de acidez entre 22 y 80 % mayores con respecto a este último, el cual contiene $0,67 \pm 0,08 \text{ %AGL}$. Esto sugeriría que la presencia del polvo durante la incubación del medio sin sustrato (blancos) contribuyó a la liberación de AGL al medio, ya sea

por la presencia de AGL en el polvo, o por la hidrólisis de aceite endógeno residual o cualquier otro fenómeno.

Si bien estos resultados podrían discutirse en mayor profundidad, no se consideró necesario ya que los valores obtenidos de %AGL en las muestras resultaron ser extremadamente bajos por lo que se concluyó que la semilla de girasol PAN7076 y aquellas provistas por Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. (al menos Tanda 2013) no son aptas para la obtención de biocatalizadores bajo las condiciones de procesamiento y de reacción propuestas.

4.4 Conclusiones

En general, los resultados obtenidos para semillas de girasol de Oleaginosa Moreno Hermanos S.A. mostraron que al evaluar la semilla sin germinar en tiempos de reacción cortos (20 min) empleando el método de titulación en continuo, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados de reacción y los blancos correspondientes. Por el contrario, si bien se encontró actividad en extractos provenientes de semilla germinada desgrasada y sin desgrasar para tiempos de reacción mayores (24 h) y empleando el método de titulación a punto final, existieron evidencias de que estas mediciones podrían no estar cuantificando adecuadamente los AGL. Al evaluar la semilla de girasol PAN7076 empleando métodos cromatográficos, se encontró acción lipásica en extractos provenientes de semilla sin germinar (desgrasada y sin desgrasar), pero no se detectó actividad al utilizar semilla germinada (desgrasada y sin desgrasar). Con la técnica cromatográfica se identificó un pequeño incremento en la concentración de AGL de los blancos con respecto al aceite puro sin hidrolizar, lo que sugiere que la presencia del polvo durante la incubación del medio sin sustrato (blancos) contribuyó a la liberación de AGL al medio, ya sea por la presencia de AGL en el polvo, o por la hidrólisis de aceite endógeno residual u otro posible fenómeno.

De todas formas, todos los resultados evaluados mostraron una actividad extremadamente baja (%AGL inferiores a 1) lo que limitaría su aplicación a procesos de modificación de grasas y aceites con potencial uso industrial. Por este motivo, se concluye que ninguna de las semillas de girasol evaluadas fue aptas para la obtención de biocatalizadores bajo las condiciones de procesamiento y de reacción propuestas.

Con los resultados de este capítulo se publicó en trabajo completo "Determinación de actividad lipásica en semillas de girasol" en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología

de los Alimentos realizado en la ciudad Córdoba (17 al 19 de noviembre de 2014). ISBN 978-987-45738-5-8.

4.5 Referencias

Al-Zuhair, S., Hasan, M. & Ramachandran, K.B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry* 38(8): 1155-1163.

Arribére, M., Priolo, N. & Caffini, N. (1994). Properties of the lipolytic system responsible for the mobilization of storage lipids in *Helianthus annuus L.* seeds. *International Journal of Experimental Botany* 56: 17-26.

Avelar, M.H.M., Cassimiro, D.M.J., Santos, K.C., Domingues, R.C.C., De Castro, H.F. & Mendes, A. a. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products* 44: 452-458.

Bahri, S., Marrakchi, R., Benammar-Elgaaied, A. & Hamida, J. B. (2012). Capture of sunflower seedlings lipase using polyclonal antibodies. *Natural Product Research* 26(4): 298-306

Barros, M., Fleuri, L.F. & Macedo, G. a. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties - a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 27: 15-29.

Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 133-153.

Camacho Paez, B., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., González Moreno, P. & Molina Grima, E. (2002). Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: Equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Science* 57: 1237-1249.

Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007). Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis L.*: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 7: 57-66.

Jachmanián, I., Schulte, E. & Mukherjee, K.D. (1996). Substrate selectivity in esterification of less common fatty acids catalysed by lipases from different sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 563-567.

Mierzejewska, D., Kubicka, E. & Jêdrychowski, L. (2003). The activity and immunoreactivity of lipase in stored sunflower seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 12/53: 57-59.

Palla, C.A. (2012). Estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores enzimáticos batch y de lecho empacado. Universidad Nacional del Sur.

Pierozan, M.K., da Costa, R.J., Antunes, O.A.C., Obstreicher, E.G., Oliveira, J.V., Cansian, R.L., Treichel, H. & De Oliveira, D. (2009). Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9716-9721.

Sadeghipour, H.R. & Bhatla, S.C. (2003). Light-enhanced oil body mobilization in sunflower seedlings accompanies faster protease action on oleosins. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 309-316.

Sagiroglu, A. & Arabaci, N. (2005). Sunflower seed lipase, extraction, purification and characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 35: 37-51.

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R. & Mendes, A. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products* 49: 462-470.

ACTIVIDAD LIPÁSICA DE LIPASA COMERCIAL DE GERMEN DE TRIGO

Capítulo

5

5.1 Introducción

La lipasa de germen de trigo, caracterizada originalmente por Singer et al. (1948), se encuentra comercialmente disponible a través de la empresa Sigma-Aldrich. Existen algunos artículos que la describen como una lipasa capaz de realizar tanto la hidrólisis de triglicéridos, como la esterificación entre ácidos grasos libres (AGL) y alcoholes (Pierozan et al. 2009, 2011). A su vez, estos autores determinaron que las lipasas obtenidas a partir de la semilla entera de trigo presentaron mayor actividad que aquellas obtenidas del germen. Otros autores han realizado experimentos utilizando trioleína como sustrato, obteniendo buenos niveles de actividad (Jing et al. 2003; Kapranchikov et al. 2004; Korneeva et al. 2008).

Rose et al. (2006) determinaron las actividades lipolíticas tanto de trigo como del salvado de trigo. La actividad específica de la lipasa en el salvado de trigo varió de 2,17 a 9,42 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Catalizador}}$, y en el grano de 1,05 a 3,54 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Catalizador}}$. Las concentraciones óptimas de aceite de oliva y agua fueron de 0,4 a 0,8 mL y de 0,15 a 0,20 mL por gramo del preparado lipásico, respectivamente. La temperatura óptima de incubación fue 40 °C, obteniendo una producción lineal de AGL hasta las primeras 8 h de reacción. Los autores observaron que la actividad lipolítica estaba altamente relacionada con la reserva de ácidos grasos libres en el trigo almacenado. La lipasa de trigo purificada mostró actividad óptima a valores de pH alcalinos cercanos a 8,0 y a 37 °C. La enzima mantuvo el 20 % de su actividad después de la incubación a temperaturas entre 60-90 °C durante una hora, a pH 8,0 (Kapranchikov et al. 2004).

Jing et al. (2003) reportaron resultados similares en su estudio usando microemulsiones con trioleína como sustrato. Al evaluar la cinética de reacción, obtuvieron valores para la constante aparente de Michaelis-Menten (K_M) de $76\pm 4 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{L}$ y para la velocidad máxima (V_{Max}) de $59\pm 2 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{mL}$. El sitio activo de la enzima fue estudiado por Korneeva et al. (2008). En dicho trabajo la lipasa fue inactivada con dietilpirocarbonato y dicitohexilcarbodiimida,

sugiriendo que el sitio de la enzima activa contenía un grupo aspartato, ácido carboxílico o ácido glutámico y un grupo histidina imidazol. Otras pruebas demostraron que aparentemente el grupo OH de la serina tendría una función importante en la acción catalítica de la enzima.

Debido a la actividad extremadamente baja encontrada en las semillas de girasol (Capítulo 4), se decidió cambiar la fuente de lipasa. Se consideró entonces, adquirir la lipasa comercial de trigo con el objetivo de disponer de una lipasa de origen vegetal previamente testeada, de forma de asegurar la detección de actividad lipásica y estudiarla en mayor profundidad.

En el presente capítulo se muestran los resultados que se utilizaron para evaluar la actividad lipásica de la lipasa comercial de germen de trigo empleando diferentes metodologías para su determinación y abarcando tiempos de reacción de hasta 48 h en reacciones de hidrólisis. También se discute la evaluación de algunas condiciones de acidólisis y esterificación de lípidos.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

La lipasa comercial utilizada fue adquirida de Sigma-Aldrich bajo la denominación de *Lipase from wheat germ-Type I, Lyophilized powder*, aunque las siglas WGL fueron utilizadas para hacer referencia a este catalizador. La información reportada en el certificado de análisis se muestra en la Tabla 5.1. El sustrato empleado en las reacciones de este capítulo fue aceite de girasol alto oleico elaborado por Ecoop (Cooperativa Obrera, Bahía Blanca).

Tabla 5.1 Especificaciones comerciales de la lipasa de germen de trigo.

Número del producto	L3001
Número de lote	SLBG5523V
Marca	Sigma
Número CAS	9001-62-1
Número MDL	MFC00131509
Temperatura de almacenamiento	2-8 °C
% Proteína (Biuret)	75
$\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{mg}_{\text{Proteína}}$ (pH 7,4, 37 °C)	7

El método de análisis con el que fue evaluada la lipasa (valores reportados en Tabla 5.1) corresponde a un método de titulación con timolftaleína como indicador y fue provisto por la empresa (Sigma-Aldrich, 1997). El medio de reacción contiene 3 mL de una solución 330 mM de triacetina (sustrato) en buffer Tris-HCl (200 mM, pH 7,4) a una temperatura de 37 °C. La lipasa se adiciona diluída en agua (1 mL de una solución equivalente a 150-300 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{mg}_{\text{Proteína}}$). El

blanco de reacción contiene la solución de sustrato pero no la solución de lipasa. El tiempo de reacción es de 1 h.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Hidrólisis: Método Sigma empleando aceite vegetal como sustrato

Método Sigma original: Este método dio origen al medio Sigma descrito en la Sección 2.4.7 (200 mM buffer Tris-HCl, pH 7,5) y también fue provisto por la empresa Sigma-Aldrich (1999). El mismo consistió de 5 mL agua destilada, 2 mL buffer Tris (200 mM, pH 7,5) y 6 mL de aceite de oliva. Se debe realizar la agitación y pre-incubación del medio a 37 °C. La reacción comienza al adicionar 2 mL de una solución de lipasa con la concentración deseada. Luego de 1 h se utilizan 6 mL de etanol para frenar la reacción. Se adiciona el indicador (timolftaleína) y se titula la muestra hasta observar un color azul pálido. El blanco es idéntico a la muestra con la diferencia de que la solución de lipasa se adiciona luego del etanol, por lo que la misma no está presente durante la incubación a 37 °C.

Método Sigma con modificaciones: El método aplicado en los experimentos realizados presenta algunas modificaciones con respecto al original. En primer lugar, el sustrato utilizado fue aceite de girasol alto oleico. En la mayoría de los casos se realizó el blanco de reacción propuesto en el método original, el cual equivaldría a una reacción de tiempo cero (“blanco instantáneo”, Sistema A, Sección 2.5.2.3), pero también se hicieron algunas experiencias utilizando un blanco en donde la lipasa se colocó en una estufa a 100 °C durante 2 h antes de la reacción (“blanco inactivado”, Sistema B, Sección 2.5.2.3). Para ello, se colocó el medio de reacción junto con la solución de lipasa “inactivada” y el etanol fue agregado luego de la incubación a 37 °C.

Cuantificación de la lipólisis enzimática: Si bien el *método Sigma original* utiliza un indicador de color para determinar los AGL producidos, en las experiencias realizadas a continuación no se utilizó ningún indicador de color. En su lugar, se utilizó el pH-metro para disponer de medidas más exactas, a diferencia del cambio de color que depende altamente del entrenamiento y la percepción personal del operador. La productividad específica se calculó como $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ utilizando diferentes métodos de determinación:

- 1- *Titulación hasta pH de blanco:* en primer lugar, se registró el pH del blanco. Luego se evaluó el pH de la muestra. Es de esperar que al ocurrir la hidrólisis del aceite, el pH de la mezcla sea menor al del blanco debido a la presencia de AGL. Para determinar los ácidos grasos liberados se tituló la muestra con una solución de NaOH hasta igualar el pH del blanco.

- 2- *Curvas de titulación*: la metodología aplicada se detalló en la Sección 2.5.2.4.
 3- *Cromatografía gaseosa (CGL)*: la metodología aplicada se detalló en la Sección 2.5.3.

Las diferentes condiciones de reacción ensayadas se muestran en la Tabla 5.2. En todas las experiencias de esta sección, la productividad se calculó realizando la resta entre la cantidad de $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ presentes en la muestra y la cantidad presente en el blanco. Este cálculo se respetó independientemente del método de determinación o blanco de reacción empleado (titulación a punto final con blanco instantáneo, curvas de titulación con blanco instantáneo/inactivado o cromatografía con blancos instantáneos).

Tabla 5.2 Condiciones de reacción ensayadas utilizando lipasa comercial de germen de trigo.

R ^a	Método de determinación	Medio de reacción	g _{Lipasa} /mL Medio	Tiempo de reacción (h)	Tipo de blanco	Catalizador/aceite (m/m) × 1000	Agua/aceite (m/m)
R1	Titulación hasta pH de blanco	Santos-10	0,0004	1	Instantáneo	3.42	7.26
R2	Titulación hasta pH de blanco	Santos-10	0,0004	3	Instantáneo	3.42	7.26
R3	Titulación hasta pH de blanco	Santos-10	0,0004	4	Instantáneo	3.42	7.26
R4	Titulación hasta pH de blanco	Santos-10	0,0004	8	Instantáneo	3.42	7.26
R5	Curvas titulación	Santos-10	0,0004	24	Inactivado	3.42	7.26
R6	Curvas titulación	Sigma	0,0013	48	Inactivado	3.86	0.96
R7	Curvas titulación	Santos-10	0,0004	24	Instantáneo	3.42	7.26
R8	Cromatografía	Santos-10	0,0004	24	Instantáneo	3.42	7.26
R9	Cromatografía	Sigma	0,0004	4	Instantáneo	1.14	0.96
R10	Cromatografía	Sigma	0,0004	24	Instantáneo	1.14	0.96

Condiciones de reacción: 37 °C, para el medio Santos-10 se utilizó pH 7 (buffer de fosfato 100 mM) y para el medio Sigma se utilizó pH 7,5 (buffer Tris-HCl 200 mM).

^a Nombre de referencia.

5.2.2.2 Acidólisis

Como se mencionó en la Sección 1.3.2.2, la acidólisis es una reacción que involucra un intercambio entre diferentes grupos moleculares entre un éster y un ácido. En este capítulo, las reacciones de acidólisis se realizaron empleando aceite de girasol común (0,4 g) y una mezcla de ácidos grasos palmítico y esteárico (0,75 g) en una relación molar aproximada de 1:6 aceite:ácidos grasos (Palla, 2012). A su vez, se adicionaron al medio 5 mL de hexano (para solubilizar los ácidos grasos) y el catalizador de interés (80-160 μL de una solución de WGL) para comenzar la reacción (0,025 $\text{g}_{\text{WGL}}/0,7$ mL de buffer de fosfato 200 mM, pH 7). Los sistemas de reacción se mantuvieron a 37 °C durante 24-48 h, momento en el cual las reacciones fueron detenidas mediante la adición de 2 mL de acetona. A continuación, las muestras se filtraron para eliminar la enzima del medio. Finalmente, las mezclas fueron colocadas bajo corriente de nitrógeno hasta alcanzar un peso

constante para eliminar el solvente. Los subproductos fueron determinados mediante CGL (Sección 2.5.3).

5.2.2.3 Esterificación

Como se mencionó en la introducción (Sección 5.1), la esterificación es una reacción que permite la formación de triglicéridos a partir de glicerol y ácidos grasos y que puede ser mediada por una lipasa. En este estudio se realizaron dos ensayos de esterificación:

Ensayo A: El medio estuvo compuesto por 0,8-1,2 g de ácido caprílico y 0,07-0,5 g de glicerol, en presencia y en ausencia de hexano (5 mL). La reacción comenzó al agregar 80 μL de una solución de 0,156 g de catalizador disueltos en 600 μL de agua. El tiempo de reacción fue de 72 h y la temperatura 37 °C.

Ensayo B: El medio estuvo compuesto por 0,14-0,64 g de ácido butírico ($1,16-7,26 \cdot 10^{-3}$ moles) y 0,12-0,67 g de glicerol ($1,3-7,27 \cdot 10^{-3}$ moles), en presencia y en ausencia de hexano (5 mL). La reacción comenzó al agregar 80 μL de una solución de 0,156 g de catalizador disueltos en 600 μL de agua. El tiempo de reacción fue 72 h y la temperatura 37 °C.

Las relaciones molares glicerol:ácido utilizadas fueron 1 y 8, de acuerdo a Palla (2012) y Liaquat (2000), respectivamente, aunque también se evaluó la relación 0,1.

Se utilizaron 6 mL de una solución 1:1,4 hexano:isobutanol (v/v) para frenar cada reacción y se adicionaron 2 mL de acetona para eliminar el agua residual. Finalmente las muestras fueron filtradas a través de un papel de filtro para retener al catalizador realizando lavados con la solución de hexano:isobutanol. Luego de evaporar los solventes residuales bajo una corriente de nitrógeno, las muestras estuvieron listas para ser analizadas por CGL (Sección 2.5.3).

5.3 Discusión de resultados

Todas las reacciones propuestas en la Tabla 5.2 se realizaron con fines exploratorios ya que no se contaba con ninguna experiencia previa del uso de esta lipasa. En las primeras reacciones que se realizaron (R1-R4) se aplicó la determinación de “titulación hasta pH de blanco”. En ninguna de ellas se observaron diferencias de pH luego de la incubación a 37 °C. Esto podría indicar la ausencia de actividad detectable al menos hasta 8 h de reacción (solo se efectuó una réplica por reacción). Por otro lado, también podría significar que el método de detección o el medio de reacción (Santos-10) son inapropiados para esta lipasa. Por este motivo se decidió utilizar tiempos de reacción más largos (24 y 48 h), incluir otro medio de reacción adicional (Sigma) y modificar el tipo de blanco. Estas reacciones corresponden a R5 y R6, realizadas cada una por triplicado (tanto muestra como blanco). Los resultados obtenidos fueron inesperados:

por un lado, la producción de R5 fue $107,20 \pm 5,79$ y $106,64 \pm 7,75$ $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ para la muestra y el blanco, respectivamente, con coeficientes de variación inferiores a 7 %. Por otro lado, en R6, cuyo tiempo de reacción fue el doble que R5, y con una concentración de aceite y WGL mucho mayor, se obtuvo un valor de $14,25 \pm 1,20$ y $15,44 \pm 2,1$ $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ para la muestra y el blanco respectivamente. Como se puede observar, los resultados de las muestras y sus respectivos blancos fueron muy similares, no existiendo evidencias estadísticas suficientes para indicar que son diferentes ($p > 0,50$ en ambos casos). En primer lugar se debe mencionar que si estos valores fueran verdaderamente el producto de la hidrólisis de aceite, indicaría que la inactivación térmica del blanco podría no haber sido efectiva. De ser así, significaría que esta lipasa podría presentar una alta resistencia a las temperaturas elevadas, lo que sería beneficioso permitiendo expandir las posibilidades del uso de este catalizador. De todas formas, existe evidencia que indica que la/s lipasa/s de trigo se inactiva/n por completo a los 55 °C (Pierozan et al. 2011), pero también existe evidencia de lo contrario. Rose et al. (2006) evaluaron su actividad utilizando temperaturas entre 25 y 55 °C sin encontrar señales de inactivación. De acuerdo a O'Connor et al. (1992), en la harina de trigo existe actividad lipásica residual incluso luego de un tratamiento durante 1 h a 90 °C, alcanzando aproximadamente el 30 % de la actividad de las reacciones equivalentes que no tuvieron tratamiento térmico. Esta amplia variabilidad de los resultados no permitió construir hipótesis generales firmes, sugiriendo el análisis particular caso a caso.

De todas formas, cuando se analizó el %AGL (m/m) en las muestras (sin restar el blanco), se obtuvo un valor aproximado de 10 y 1,5 %AGL para el medio Santos-10 y Sigma, respectivamente, con masas absolutas de 0,12 y 0,08 g de AGL en cada uno. Se debe considerar que, si se resta el blanco correcto, el %AGL sería incluso menor, correspondiéndose con una actividad extremadamente baja que indica que las condiciones evaluadas no favorecieron la reacción de hidrólisis.

Ante la posibilidad de que las mediciones obtenidas mediante titulación no fueran representativas, se realizó una prueba final para descartar de forma definitiva las condiciones estudiadas ya analizadas. Para ello se realizaron las experiencias R7-R10, cuyo objetivo principal fue evaluar las cantidades de AGL con una técnica más confiable. Por un lado, R7 y R8 (medio Santos-10) fueron experiencias idénticas salvo por la técnica de determinación de AGL (curvas de titulación y cromatografía, respectivamente). Para las mismas, se encontró una productividad de $15,10 \pm 5,97$ y $3,92 \pm 0,53$ $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$, respectivamente, lo que demostró una sobre-estimación de la misma al emplear la técnica de titulación bajo las condiciones ensayadas (Tabla 5.2). En segundo lugar, se realizaron los experimentos R9 y R10 con diferentes tiempos de reacción (4 y 24 h) utilizando el medio Sigma. La productividad determinada mediante cromatografía para

Capítulo 5: Actividad Lipásica de Lipasa Comercial de Germen de Trigo

el medio Sigma fue de $4,97 \pm 2,08$ y $10,36 \pm 1,34$ $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ luego de 4 y 24 h de reacción pH 7,5 (200 mM Tris-HCl), respectivamente. Este resultado indicaría que existe cierta actividad luego de 4 h de reacción, incrementándose aproximadamente al doble de este valor luego de 24 h. De todas formas, la producción de AGL fue extremadamente baja, alcanzando 0,04 y 0,09 %AGL luego de 4 y 24 h, respectivamente, confirmando que la hidrólisis no fue favorecida en las experiencias realizadas. La productividad reportada por Sigma-Aldrich (Tabla 5.1) luego de 60 minutos de reacción es $5,25$ $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$, empleando técnicas de titulación para su cuantificación. Se observó que este valor se ubicó dentro del rango encontrado para 4 y 24 h de reacción, pero fue alcanzado en un tiempo mucho menor. Esto podría indicar que la lipasa presentaría mayor afinidad por compuestos de cadena corta como la triacetina (sustrato de la técnica original utilizada por el proveedor), aunque existe bibliografía que indica lo contrario (Jing et al. 2003; Pierozan et al. 2011).

Pierozan et al. (2011) estudiaron la hidrólisis de sustratos con diferente largo de cadena carbonada (tributirina, aceite de coco y aceite de oliva, compuestos principalmente por ácidos grasos con longitudes de cadena carbonada C4:0, C12:0 y C18:1, respectivamente) empleando goma arábica como surfactante junto con sustrato y buffer de fosfato (100 mM, pH 7). El extracto crudo empleado en las reacciones lo obtuvieron mezclando el material vegetal con buffer durante un tiempo determinado. Luego la mezcla se centrifugó de forma de utilizar el sobrenadante como solución lipásica. Después de la reacción, la actividad fue determinada mediante titulación, obteniendo mayor productividad al emplear tributirina como sustrato (117 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$, 15 min de reacción), sugiriendo una preferencia por los ácidos grasos de cadena más corta. De todas formas, este comportamiento ya no fue observado al emplear el extracto purificado, encontrando preferencias por los ácidos de cadena media y larga y alcanzando aproximadamente 195 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$ para el aceite de coco y de oliva. Si bien los resultados de Pierozan et al. (2011) no fueron efectuados con lipasa de trigo comercial, Jing et al. (2003) realizaron reacciones de hidrólisis empleando WGL y trioleína como sustrato, entre otros componentes y obtuvieron una productividad de 1550 $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{WGL}}$ (determinación espectrofotométrica).

Luego de identificar la baja actividad hidrolítica bajo las condiciones estudiadas, se decidieron investigar algunas reacciones de esterificación. Se eligieron sustratos de cadena más corta (ácido butírico y caprílico), contemplando la posibilidad de que la lipasa podría presentar mayor afinidad por estos compuestos. La temperatura de reacción se fijó en 37 °C considerando que ya se ha utilizado previamente en otros trabajos (Liaquat et al. 2000) así como también los tiempos largos de reacción (hasta 72 h).

Existen trabajos que sugieren que el producto obtenido luego del desgrasado de las semillas de trigo sería capaz de catalizar la reacción de esterificación con mayor facilidad que la hidrólisis, reportando un máximo de aproximadamente 0,870 (incorporación de AGL) y 0,089 (liberación de AGL) $\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{mg}_{\text{Extracto}}$, respectivamente, luego de 15 minutos de reacción (Pierozan et al. 2009). En cuanto a las reacciones de esterificación obtenidas en esta tesis empleando glicerol, ácido caprílico y butírico en presencia y ausencia de hexano, no se obtuvieron diferencias significativas con sus blancos respectivos bajo las condiciones ensayadas. Tampoco se detectaron signos de acidólisis entre aceite de girasol y ácidos palmítico y esteárico.

5.4 Conclusiones

En este capítulo se evaluó principalmente la posibilidad de utilizar WGL en reacciones de hidrólisis de aceite de girasol alto oleico. A pesar de considerar diferentes condiciones (concentración de sustrato, tiempo de reacción, método de determinación), no fue posible detectar actividad hidrolítica lo suficientemente alta como para impulsar la continuación de su estudio con vistas a realizarla a una mayor escala. Además, la determinación cromatográfica de la actividad permitió identificar una posible sobre-estimación de la misma al emplear las técnicas de titulación. Tampoco se observaron niveles apreciables de esterificación o acidólisis bajo las condiciones estudiadas.

Como trabajo a futuro se considera explorar diferentes condiciones de acidólisis y esterificación, así como también el análisis de lipasa de germen de trigo obtenida a partir del desgrasado de germen disponible comercialmente para uso doméstico.

Con los resultados de este capítulo se publicó el trabajo completo "Enzymatic activity of a commercial lipase from wheat germ under different reaction conditions" en el 16th Latin American Congress on Fats and Oils, realizado en la ciudad de Rosario, Santa Fe (31 de octubre al 4 de noviembre de 2015). ISBN 978-987-22799-2-9.

5.5 Referencias

Jing, F., An, X. & Shen, W. (2003). The characteristics of hydrolysis of triolein catalyzed by wheat germ lipase in water-in-oil microemulsions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 24-25: 53-60.

Kapranichikov, V.S., Zherebtsov, N.A. & Popova, T.N. (2004). Purification and

Characterization of Lipase from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germ 40(1): 98-103.

Korneeva, O.S., Popova, T.N., Kapranchikov, V.S. & Motina, E.A. (2008). Identification of catalytically active groups of wheat (*Triticum aestivum* L.) germ lipase. Applied Biochemistry and Microbiology 44(4): 387-393.

Liaquat, M. & Apenten, R.K.O. (2000). Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. Journal of Food Science 65(2): 295-299.

O'Connor, J. & Harwood, J.L. (1992). Solubilization and purification of membrane-bound lipases from wheat flour. Journal of Cereal Science 16: 141-152.

Palla, C.A. (2012). Estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores enzimáticos batch y de lecho empacado. Universidad Nacional del Sur.

Pierozan, M.K., da Costa, R.J., Antunes, O.A.C., Obstreicher, E.G., Oliveira, J.V., Cansian, R.L., Treichel, H. & De Oliveira, D. (2009). Optimization of extraction of lipase from wheat seeds (*Triticum aestivum*) by response surface methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 9716-9721.

Pierozan, M.K., Obstreicher, E.G., Oliveira, J.V., Oliveira, D., Treichel, H. & Cansian, R.L. (2011). Studies on immobilization and partial characterization of lipases from wheat Seeds (*Triticum aestivum*). Applied Biochemistry and Biotechnology 165: 75-86.

Rose, D.J. & Pike, O.A. (2006). A simple method to measure lipase activity in wheat and wheat bran as an estimation of storage quality. Journal of the American Oil Chemists' Society 83(5): 415-419.

Sigma-Aldrich. (1997). Enzymatic assay of lipase (Triacetin as substrate), Doc code VETRIA01 (método interno).

Sigma-Aldrich. (1999). Enzymatic assay of lipase, olive oil as substrate, Doc code VELIPA02 (método interno).

Singer, T. & Hofstee, B. (1948). Studies on wheat germ lipase; methods of estimation, purification, and general properties of the enzyme. Archives of biochemistry 18(2): 229.

ACTIVIDAD LIPÁSICA EN SEMILLAS DE RICINO

Capítulo

6

6.1 Introducción

La capacidad hidrolítica existente en las semillas de ricino se ha reportado desde hace ya más de un siglo (Dunlap et al. 1905). En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos describiendo las propiedades y características de las lipasas presentes en estas semillas. Muto et al. (1974) descubrieron la presencia de dos lipasas en la semilla de ricino, una "ácida" y una "alcalina", e intentaron describir la función fisiológica de las mismas. Luego de un fraccionamiento, la lipasa ácida fue recolectada junto con la fracción oleosa, presentando mayor actividad a pH 5 y sin germinación previa. Por el contrario, la lipasa alcalina fue encontrada en el material particulado, sugiriendo que la misma se encontraba adherida a la pared de los glioxisomas. La actividad de esta lipasa se incrementó durante la etapa de movilización interna de lípidos (luego de germinar la semilla) presentando mayor actividad a pH básico. En un segundo trabajo (Maeshima et al. 1985), mencionaron que esta lipasa podría estar involucrada en la movilización de lípidos durante la germinación. Por el contrario, Hills et al. (1987b) identificaron la existencia de una tercera lipasa que actúa a pH neutro, lo que resultaría más razonable al momento de hidrolizar las grasas almacenadas en la semilla. También mencionaron que el pH que favorece la acción de la lipasa ácida no suele ser comúnmente encontrado en el citoplasma de las células vegetales, lo que genera sospechas sobre su función biológica en la semilla. Como éstos, existen muchos otros trabajos destinados específicamente a determinar otros factores como anticuerpos, pesos moleculares, sitios activos y secuencia de aminoácidos (Hills et al. 1987a; Morlon-Guyot et al. 2003; Eastmond 2004; Schieltz et al. 2015). Otro aspecto ampliamente discutido en la literatura es la elevada toxicidad que presenta la semilla al ser ingerida. Morlon-Guyot et al. (2003) mencionaron que la ricina aislada de las semillas de ricino corresponde al prototipo de proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II y representa una de las toxinas más poderosas capaces de destruir las células animales. También determinaron que la actividad lipásica se relaciona con dicha toxicidad. De todas formas, Cavalcanti et al. (2007)

menciona que más estudios son necesarios para determinar si la toxicidad de la proteína se mantiene activa luego de realizar el desgrasado con acetona.

Por otro lado, existen sólo unas pocas referencias en donde se investiga su reactividad con los lípidos (acidólisis, hidrólisis o esterificación) desde un punto de vista más ingenieril (Tüter 1998; Cavalcanti et al. 2007; Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013). Por este motivo, se consideró que eran necesarios más estudios para evaluar si las semillas de ricino podrían o no ser consideradas una alternativa viable para la producción de lipasa comercial, junto con su posible aplicación en procesos industriales como la modificación de grasas y aceites.

Cavalcanti et al. (2007) evaluaron la reacción de hidrólisis de trioleína empleando polvo de ricino y estudiaron el uso de Triton X-100 como emulsionante así como también la temperatura (25-50 °C) y pH (4 y 7,5), encontrando mayor actividad hidrolítica en el rango de 25-35 °C utilizando pH 4. También evaluaron la toxicidad de diferentes genotipos de ricino. Por otro lado, Santos et al. (2013) también evaluaron la actividad hidrolítica de polvos de extracto de ricino y otras plantas, en reacciones en las que se emulsionaron diferentes sustratos (aceites) usando goma arábica como surfactante. Estos autores determinaron las condiciones óptimas para la reacción con respecto a la temperatura de reacción (50 °C), pH (4,5) y proporción de buffer de acetato (100 mM, pH 4,5). También evaluaron la reacción sin utilizar goma arábica, concluyendo que la disminución medida en la actividad en comparación con las experiencias con goma, podría atribuirse a los efectos de la ausencia del emulsionante. Avelar et al. (2013) realizaron la hidrólisis de aceite con el mismo polvo de ricino que Santos et al. (2013), empleando un volumen de reacción mayor (aproximadamente 50 mL de medio) y sin utilizar goma arábica. Optimizaron la relación aceite:buffer (acetato 100 mM, pH 4,5), temperatura y concentración de cloruro de calcio (con el objetivo de evitar la inhibición por sustrato) encontrando las condiciones óptimas sin adición de CaCl_2 , a 37,5 °C y utilizando una relación aceite:buffer 30 % (m/m), alcanzando la hidrólisis total de aceite de canola luego de 2 h de reacción. Al buscar información sobre otras reacciones diferentes a la hidrólisis, se puede mencionar el trabajo de Tüter (1998), quien realizó una extracción con buffer de citrato a diferentes pH, obteniendo un residuo sólido luego de evaporar la fase líquida del sobrenadante, el cual usó posteriormente como catalizador en reacciones de esterificación entre ácidos grasos libres (AGL) y glicerol alcanzando composiciones finales de aproximadamente 50 % triglicéridos (m/m). También investigó los efectos de los parámetros del proceso, como la relación molar de los reactivos, temperatura y concentración de catalizador, entre otros, sugiriendo temperaturas entre 40-50 °C y relaciones molares estequiométricas.

En el presente trabajo se desarrollaron diferentes ensayos utilizando semillas de ricino provenientes de una planta ornamental. Una vez identificada la existencia de actividad lipásica fueron necesarias algunas experiencias exploratorias para determinar el efecto de diferentes variables como la repetitividad de los sistemas de reacción empleados, concentración del biocatalizador, efecto del almacenamiento del biocatalizador en freezer y heladera, la posibilidad de su reuso, la concentración de goma arábica en el sistema de reacción y ensayos preliminares de esterificación. Si bien algunos temas no han sido encontrados en la bibliografía mencionada (repetitividad, almacenamiento, reuso), la misma fue utilizada para elegir algunas de las condiciones del sistema de reacción, caracterizar el material que utilizado en otros capítulos y disponer de un punto de referencia para diseñar estudios más específicos.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Materiales

Las semillas de ricino fueron obtenidas de una planta ornamental (*Ricinus communis*). El aceite utilizado como sustrato fue aceite de girasol alto oleico elaborado por Ecoop (Cooperativa Obrera). Todos los reactivos fueron de grado cromatográfico o proanálisis, de acuerdo a las necesidades de cada determinación.

6.2.2 Métodos generales

Los polvos enzimáticos de semillas de ricino fueron obtenidos a partir del descascarado y molienda (molienda B, sección 2.3.2.2) de las semillas (Figura 6.1a), que luego fueron desaceitadas empleando el método Acetona-16h (Sección 2.3.2.3). El polvo lipásico (PL) que obtenido fue blanquecino, fino y visualmente homogéneo (Figura 6.1b).

En este proceso se utilizaron solo dos medios de reacción: el medio Santos-10 (Sección 2.4.6) y el medio 1:1 (Sección 2.4.8), ambos preparados con buffer de acetato (100 mM, pH 4,4). Las diferencias principales entre ambos medios fueron la concentración de aceite respecto de la fase acuosa, (0,17:1 y 1:1 v/v, respectivamente) y el uso de goma arábica como surfactante empleada en el medio Santos-10, componente que no fue utilizado en el medio 1:1.

El %AGL (m/m) y la actividad lipásica específica (Ej. $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{LP}}$ o $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{LP}}$) fueron calculados empleando la determinación simultánea mediante CLG (Sección 2.5.3) utilizando la extracción B (Sección 2.5.3.1.2) que emplea éter etílico y hexano como solventes para la recuperación de los subproductos luego de la reacción.



Figura 6.1 Semillas de ricino (a) y polvo lipásico (b) obtenido luego del desaceitado con Acetona-16h.

6.2.3 Caracterización del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de las partículas se determinó utilizando un equipo de difracción de rayos láser Horiba LA - 950 V2 (Horiba Ltd., Kioto, Japón). El tamaño promedio de las partículas se expresó como el diámetro volumétrico medio. Este diámetro es conocido como $D[4,3]$ y es calculado de forma automática por el software del equipo mediante la Ecuación 6.1 (Horiba Scientific, 2010), donde n representa el número de partículas de diferente diámetro, D_i el diámetro geométrico y v_i el porcentaje volumétrico de cada una .

$$D[4,3] = \frac{\sum_1^n D_i^4 v_i}{\sum_1^n D_i^3 v_i} \quad (\text{Ec. 6.1})$$

La muestra se preparó colocando aproximadamente 0,1 g de polvo lipásico en 10 mL de agua destilada y se analizó por duplicado. El índice de refracción empleado fue de 1,331 (medido con un refractómetro digital). Además, se utilizó un microscopio óptico Primo Star (Zeiss)

montado con una cámara digital *Axiocam 105 color*, la cual permite el procesamiento de las imágenes mediante el software *Axiocam 105 color ZEN 2 lite*.

6.2.4 Repetitividad

El objetivo de este análisis fue, en primer lugar, evaluar la existencia de actividad en el polvo de ricino. Una vez detectada dicha actividad, se realizaron diferentes experiencias para evaluar la repetitividad de los resultados obtenidos en los sistemas de reacción empleando el medio Santos-10 (con buffer de acetato, 100 mM, pH 4,4) y 1:1 (Sección 2.4). La temperatura de reacción fue de 37 °C en todos los casos, el tiempo de reacción fue 0,5 y 2 h, y la cantidad de polvo enzimático fue 0,0137 y 0,1 g para el medio 1:1 y Santos-10, respectivamente.

En el caso del medio Santos-10 se realizaron 4 experiencias independientes con diferente número de réplicas: un duplicado, un cuadruplicado y dos triplicados. Para el medio 1:1 se consideraron 3 experiencias independientes, las tres por triplicado. Para todas las experiencias mencionadas se utilizó polvo enzimático proveniente del mismo lote (lote A). Por último, se produjo un nuevo lote de polvo enzimático (lote B) y se realizó la misma reacción por triplicado para cada medio ensayado. Cada lote hace referencia al polvo enzimático que se produjo en una fecha determinada.

Se utilizó el paquete de datos estadísticos de Excel para realizar las comparaciones de medias y se consideró un valor p menor o igual a 0,05 como nivel significativo.

6.2.5 Impacto del almacenamiento sobre la capacidad hidrolítica del polvo enzimático

El objetivo de este estudio fue evaluar la acción lipásica del extracto luego de diferentes períodos de almacenamiento, en dos condiciones: almacenamiento en freezer (aproximadamente -23 °C) y en heladera (aproximadamente 7 °C). También se realizaron ensayos de pre-acondicionamiento dejando el polvo a 25 °C durante 24 h para evaluar el efecto sobre la actividad. El polvo evaluado al día cero se consideró como el punto de referencia y el mismo se utilizó inmediatamente luego de ser producido. En todos los casos se calculó el %AGL relativo (%AGL*) al día cero de acuerdo a la Ecuación 6.2, donde el subíndice *i* representa el día de almacenamiento.

$$\%AGL^* = \frac{\%AGL_i}{\%AGL_0} \times 100 \quad (Ec. 6.2)$$

El estudio se realizó en dos etapas:

- Etapa I: se evaluó el almacenamiento a 7 °C (1, 2, 5, 10 y 50 días de almacenamiento) y a -23 °C (2, 5, 8 y 50 días de almacenamiento). El polvo enzimático se conservó en un frasco caramelo el cual fue templado hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de ser utilizado en cada reacción. En el día 7 de almacenamiento, una fracción del polvo conservado a -23 °C fue colocado en un frasco de vidrio, almacenado durante 24 h a 25 °C y utilizado en reacciones de hidrólisis (día 8). El mismo procedimiento se realizó en el día 9 con el polvo proveniente de la heladera, que posteriormente fue utilizado en reacciones de hidrólisis el día 10 de almacenamiento. Todas las experiencias de la etapa I se realizaron con polvo proveniente del mismo lote. El tiempo de reacción fue de 2 h empleando el medio Santos-10 (10 mL, 7,3 g_{Agua}/g_{Sustrato}), la cantidad de polvo lipásico fue 0,1 g (0,085 g_{PL}/g_{Sustrato}), la temperatura de reacción 37 °C y el pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).
- Etapa II: en base a los resultados obtenidos en la etapa I se decidió evaluar el efecto del almacenamiento por segunda vez. En esta ocasión, solo se consideró el almacenamiento a -23 °C y el %AGL* fue evaluado luego de 0, 1, 2, 3, 6, 8, 13, 21, 29 y 41 días de almacenamiento. El tiempo de reacción fue de 0,5 h empleando el medio 1:1 (5 mL, 1,1 g_{Agua}/g_{Sustrato}), la cantidad de polvo utilizado fue 0,0137 g (0,0060 g_{PL}/g_{Sustrato}), temperatura de reacción 37 °C y pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).

La evaluación del %AGL*, no solo permitió evaluar fácilmente la proporción de los cambios ocurridos respecto del día inicial, sino que también permitió comparar aquellas experiencias que se realizaron bajo diferentes condiciones (Etapa I y II).

6.2.6 Titulación vs cromatografía

Como se discutió en capítulos anteriores (Sección 4.4), la titulación es una técnica muy simple, rápida y económica, pero podría llevar a falsos positivos si no se considera el blanco de reacción apropiado. El hecho de que, durante la evaluación de la actividad lipásica en semillas de girasol, todas las muestras analizadas presentaron cantidades muy pequeñas de AGL (menores 1 %AGL), podría explicar la magnitud de los errores encontrados al utilizar las técnicas de titulación. A pesar de esto, estos métodos son ampliamente utilizados para la detección de la actividad lipásica de catalizadores de origen vegetal. Por este motivo, y habiendo detectado una mayor actividad lipásica utilizando los polvos de ricino y técnicas cromatográficas, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar si al emplear polvos de ricino existe una diferencia sustancial utilizando los blancos de reacción frecuentes en la bibliografía (Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013) en comparación con el blanco propuesto en esta tesis. La diferencia entre ambos blancos fue que aquel referenciado en bibliografía se realizó adicionando etanol en el medio de reacción (para finalizar la reacción) seguido por la adición del polvo y la titulación de la muestra. Este blanco no consideró la posible solubilización parcial de los componentes del polvo hacia el medio de reacción. Por el contrario, el sistema A de blanco de reacción propuesto en la Sección 2.5.2.3, sí considera esta posibilidad.
- Comparar los resultados obtenidos mediante titulación y cromatografía considerando ésta última técnica como la más exacta y precisa.

Para ello, se consideraron 4 experimentos (M_{TIT} , B_{INC} , $B_{S/INC}$ y M_{CROM}), cada uno por triplicado. El medio empleado en todas ellas fue Santos-10 (volumen 10 mL, 7,3 $g_{Agua}/g_{Sustrato}$) a pH 4,4 (buffer de acetato, 100 mM), la incubación fue realizada durante 1 h a 37 °C bajo agitación vigorosa y la cantidad de polvo enzimático fue 0,05 g (0,043 $g_{PL}/g_{Sustrato}$). A continuación, se detallan los diferentes experimentos, en donde las letras B hacen referencia a “Blanco” y las letras M hacen referencia a “Muestra”:

- M_{TIT} : adición de polvo al medio de reacción, incubación, adición de etanol para frenar la reacción, titulación hasta punto de viraje de color rosado utilizando una solución acuosa de NaOH 0,06 M.
- B_{INC} : adición de polvo al medio de reacción sin emulsión (solo buffer), incubación, adición de etanol para frenar reacción, adición de emulsión, titulación hasta punto de viraje de color rosado utilizando una solución acuosa de NaOH 0,03 M.
- $B_{S/INC}$: adición de etanol al medio de reacción, adición de polvo, titulación hasta punto de viraje de color rosado utilizando una solución acuosa de NaOH 0,03 M. En este experimento no se realizó incubación en ningún momento.
- M_{CROM} : adición de polvo al medio de reacción, incubación, adición de etanol para frenar la reacción, determinación del %AGL mediante cromatografía.

El método cromatográfico se detalló en la Sección 2.5.3. Se empleó la extracción B para la recuperación de los subproductos de reacción. Para el método de titulación se utilizó una solución acuosa de NaOH y se registró el consumo de la misma hasta observar color rosado durante aproximadamente 15 segundos.

6.2.7 Masa de polvo enzimático

Si se considera que las lipasas actúan en la interfase agua-aceite (Verger, 1997), el objetivo principal de este estudio fue determinar el grado de saturación de la interfase disponible para la reacción al utilizar diferentes cantidades de polvo lipásico. En otras palabras, evaluar si dentro del rango de concentraciones propuesto, el área interfacial se encuentra saturada de polvo o si admite una mayor concentración. Si bien se reporta la masa de catalizador, las conclusiones obtenidas también son válidas para la concentración de catalizador debido a que el volumen total fue constante en todas las experiencias.

En las experiencias se consideró el medio 1:1 (5 mL totaltes, 1,1 g_{Agua}/g_{Sustrato}) con buffer de acetato (100 mM, pH 4,4). Se evaluaron tres condiciones diferentes que, a modo general, abarcaron diferente temperatura de reacción, concentración de polvo y tiempo de reacción. En primer lugar, se realizaron reacciones a 37 °C durante 0,5 h empleando 0,0137, 0,0274 y 0,05 g de polvo (0,0060, 0,012 y 0,022 g_{PL}/g_{Sustrato}). Luego se evaluó la actividad a 50 °C utilizando 0,0137 y 0,0274 g polvo, luego de 0,5 y 24 h de reacción.

6.2.8 Reuso

Desde el punto de vista industrial, sería de particular interés reutilizar el catalizador en más de un ciclo de reacción. Las experiencias ensayadas se realizaron con el medio 1:1 (volumen 5 mL, 1,1 g_{Agua}/g_{Sustrato}), una temperatura de 37 °C, 0,0137 g de PL (0,0060 g_{PL}/g_{Sustrato}), 0,5 h de reacción y pH 4,5, (buffer de acetato 100 mM). Para evaluar el reuso del polvo de ricino se modificó levemente el procedimiento de reacción convencional de acuerdo a lo siguiente:

- 1- Colocar 5 mL del medio de reacción en un frasco de aproximadamente 10 mL, cuyo tamaño admita la centrifugación directa de la muestra al finalizar la reacción.
- 2- Agregar el polvo de ricino e incubar por 0,5 h a 37 °C utilizando agitación magnética vigorosa.
- 3- Centrifugar los frascos de reacción aproximadamente 5 minutos a 3000 rpm.
- 4- Retirar sobrenadante (aceite) y colocarlo en un tubo Falcon para centrífuga.
- 5- Colocar 2,5 mL de aceite nuevo en el frasco de reacción.
- 6- Realizar la incubación por segunda vez.
- 7- Frenar la reacción con etanol.
- 8- Proseguir con la recuperación de subproductos (extracción B) y posterior análisis por cromatografía de acuerdo a la Sección 2.5.3.1. Este paso se aplica tanto a los tubos de centrífuga del paso 4 (que contienen el aceite sobrenadante), como a los tubos de reacción frenados con etanol (paso 7).

6.2.9 Concentración de goma arábica en medio Santos-10

Finalmente se decidió avanzar con el diseño de un experimento para optimizar la actividad lipásica específica, tema que es tratado en el siguiente capítulo. Debido a que la concentración de goma arábica se consideró como una de las variables a analizar, fue necesario realizar ensayos exploratorios para determinar el rango de dicha variable. El medio utilizado fue Santos-10 (volumen 10 mL, $\frac{g_{\text{Agua}}}{g_{\text{Sustrato}}}$), el tiempo de reacción fue 2 h, la temperatura 37 °C, el pH 4,4 (buffer de acetato, 100 mM) y se utilizó 0,1 g de polvo (0,086 $\frac{g_{\text{PL}}}{g_{\text{Sustrato}}}$). La concentración original de goma arábica en la solución acuosa que se utilizó para producir la emulsión de aceite fue 3 % (Santos et al. 2013) por lo que se propuso evaluar el efecto generado al utilizar 10 % de dicho surfactante.

6.2.10 Esterificación

El medio estuvo compuesto por 2,4 g de ácido oleico y 0,27 g de glicerol, lo que se corresponde con la relación molar estequiométrica 3:1 oleico:glicerol (Tüter, 1998). La reacción comenzó al agregar 0,1 g de polvo de ricino. El tiempo de reacción fue de 24 h y la temperatura 37 °C (Liaquat et al. 2000; Tüter 1998). Se utilizaron 6 mL de una solución 1:1,4 hexano:isobutanol (v/v) para permitir solubilizar correctamente todos los componentes de la mezcla final (Palla et al. 2014). Para frenar la reacción, las muestras fueron filtradas a través de un papel de filtro para retener al catalizador, realizando varios lavados sucesivos con la solución de hexano:isobutanol. Luego de evaporar los solventes residuales bajo una corriente de nitrógeno, las muestras se analizaron por CGL (Sección 2.5.3).

6.3 Discusión de resultados

6.3.1 Rendimiento de polvo y caracterización del tamaño de partícula

Luego del desaceitado de la semilla y la evaporación del solvente, el rendimiento del polvo en relación a la masa inicial de semillas fue de $30,7 \pm 2,8\%$.

Las Figuras 6.2 y 6.3 muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía con las lentes de 10X y 40X. Como se puede observar, las partículas del polvo presentaron forma esférica.

Las distribuciones de tamaño de las partículas de las imágenes microscópicas se muestran en la Figura 6.4. El rango total de tamaños fue 1,1-1167,7 μm con un diámetro promedio de $112,5 \pm 7,7 \mu\text{m}$. Al comparar el tamaño de partícula del polvo, con el tamaño de gota de los medios de reacción evaluados en la Sección 3.8.3 se observó que el medio Santos-10 sin goma presentó un tamaño de gota similar al del polvo ($p > 0,27$). Por el contrario, el medio 1:1 presentó un tamaño

de gota superior ($p < 0,04$) mientras que el medio Santos-10 con goma, un tamaño inferior ($p < 0,01$).

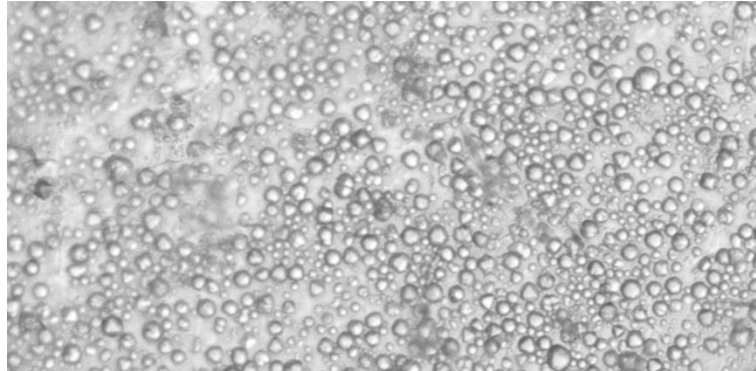


Figura 6.2 Imagen microscópica (10X) de las partículas del polvo de ricino suspendidas en agua destilada.

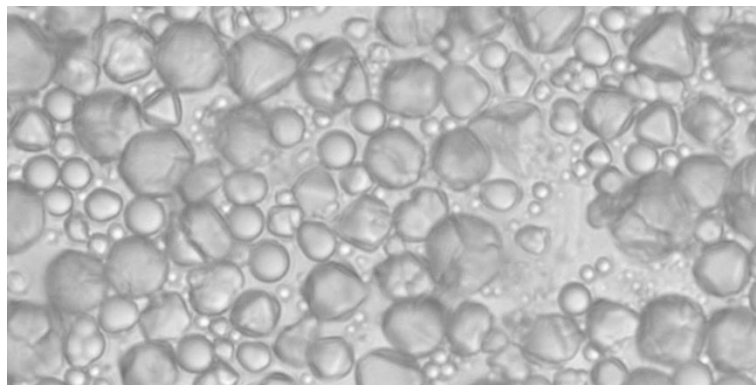


Figura 6.3 Imagen microscópica (40X) de las partículas del polvo de ricino suspendidas en agua destilada.

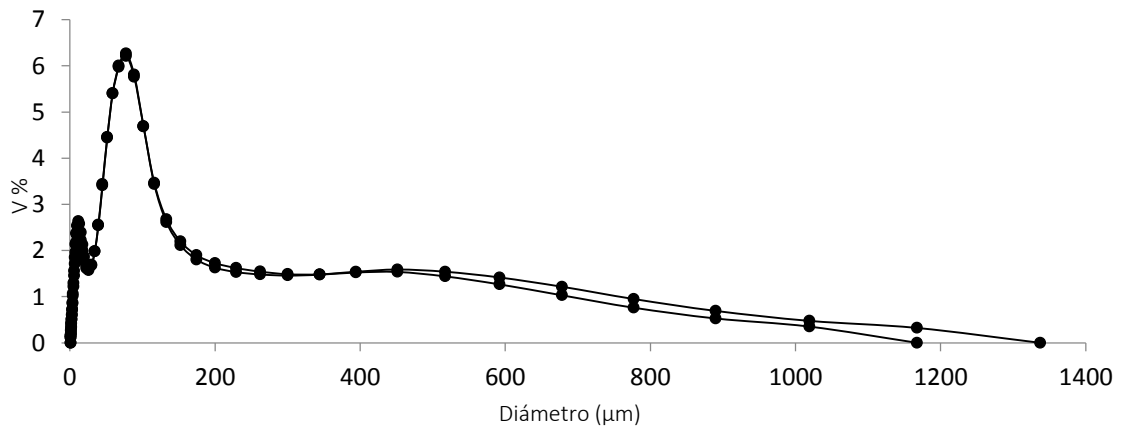


Figura 6.4 Distribución de tamaño de partícula del polvo de ricino suspendido en agua (duplicado).

6.3.2 Repetitividad

Para evaluar la repetitividad de todo el sistema de reacción se estudiaron los resultados obtenidos con diferentes medios de reacción y concentración de enzima. En primer lugar, se utilizó el medio de reacción y la concentración de polvo lipásico reportados por Santos et al. (2013). En esta condición la concentración de enzima fue relativamente alta mientras que la concentración de aceite es baja. Como se mencionó anteriormente, la lipasa actúa sobre la interfase aceite-agua (Verger, 1997) y, si bien en esta sección no se evaluó la saturación de dicha interfase, se podría sospechar que las condiciones propuestas favorecieron este fenómeno. Por otro lado, también se evaluó la repetitividad de las reacciones empleando un medio de reacción con una proporción de aceite mucho mayor (1:1 v/v aceite:agua), pero en este caso se redujo considerablemente la concentración de enzima. A diferencia de la anterior, esta condición podría haber favorecido las condiciones de insaturación de la interfase.

En la Tabla 6.1 se muestran los resultados obtenidos para ambos medios de reacción. Al observar los coeficientes de variación de cada experiencia se identificaron coeficientes de variación máximos de hasta 19 % (medio Santos-10) y 24 % (medio 1:1). Esto indica que la variabilidad dentro de un conjunto de réplicas alcanzó valores elevados en ambos medios de reacción. Si bien no es deseable obtener coeficientes de variación superiores a 10 %, los sistemas biológicos suelen presentar una variación superior, y se optó por disminuir al mínimo cualquier fuente de variación que admitiese ser controlada (temperatura, masa de catalizador y sustrato, tiempos de reacción) relegando aquellas que no. En bibliografía (Santos *et al.* 2013) se reportan experimentos cuyos coeficientes de variación superan el 40 %, lo que indica que la fuente de variación aleatoria no controlada asociada a este tipo de sistemas puede alcanzar valores elevados. Lógicamente, no sería aceptable realizar experimentos en donde dicho coeficiente tome siempre valores elevados ya que los resultados no serían confiables. En la presente tesis y considerando un espacio muestral de 78 experimentos (cada uno realizado por triplicado) se determinó que aproximadamente el 50 % de los mismos mantuvo un coeficiente de variación menor o cercano a 10, mientras que aproximadamente el 30 % se mantuvo entre 10 y 15 % y solo el 20 % restante superó dicho valor.

Al comparar aquellas experiencias independientes que utilizaron polvo del mismo lote, se observó que a pesar de que existieron ciertas diferencias en los valores de %AGL, en promedio el orden de magnitud se mantuvo y a los efectos prácticos se consideraron similares y repetitivos (considerando la elevada variabilidad dentro de un conjunto independiente de réplicas). Al

analizar el promedio general intra-lote, el coeficiente de variación resultó 15 % y 20 % para el medio Santos-10 y 1:1, respectivamente. A su vez, para evaluar la repetitividad inter-lote, se compararon las últimas filas de la Tabla 6.1, donde se observó que los coeficientes de variación presentaron modificaciones pequeñas.

Tabla 6.1 Análisis de los coeficientes de variación de diferentes ensayos independientes para los medios de reacción ensayados utilizando PL.

Santos-10					1:1				
Lote	Réplicas	%AGL	Desvío	CV%	Lote	Réplicas	%AGL	Desvío	CV%
A	2	21,56	1,21	5,61	A	3	12,62	1,36	10,77
A	4	17,72	3,47	19,57	A	3	10,99	1,02	9,25
A	3	20,81	2,54	12,20	A	3	14,62	3,52	24,06
A	3	23,42	1,08	4,62	B	3	15,69	1,69	10,76
B	4	24,72	1,53	6,21					
Intra-lote	12	21,65	3,19	14,72	Intra-lote	9	12,74	2,51	19,70
Inter-lote	16	20,56	3,37	16,41	Inter-lote	12	13,48	2,62	19,45

Condiciones de reacción: 37 °C, pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM) y el tiempo de reacción fue 0,5 y 2 h y la masa de catalizador 0,1 y 0,0137 para los medios Santos-10 y 1:1, respectivamente.

En base a lo expresado anteriormente, se consideró que la repetitividad de la reacción enzimática fue aceptable bajo ambas condiciones estudiadas tanto para polvos del mismo lote como para aquellos de diferente lote (diferente fecha de obtención).

6.3.3 Impacto del almacenamiento sobre la capacidad hidrolítica del polvo lipásico

En las primeras experiencias realizadas para evaluar el deterioro debido al almacenamiento, se decidió fraccionar el polvo en dos frascos color caramelo para luego almacenarlos bajo diferentes condiciones: 7 °C y -23 °C (● y ▲, Figura 6.5). La Figura 6.5 muestra el porcentaje de AGL producidos con polvo almacenado, relativo al día 0 de almacenamiento, abarcando un rango total de 460 días. Al analizar los resultados entre 0-50 días de almacenamiento se observó que el %AGL* (m/m) fue mayor durante la primera semana de almacenamiento. Si bien en la etapa I (● y ▲, Figura 6.5), tanto a 7 °C como a -23 °C, existieron puntos con desvío estándar elevado, de todas formas se pudo identificar una marcada tendencia ascendente y descendente en el %AGL* (m/m) de las muestras durante los primeros días.

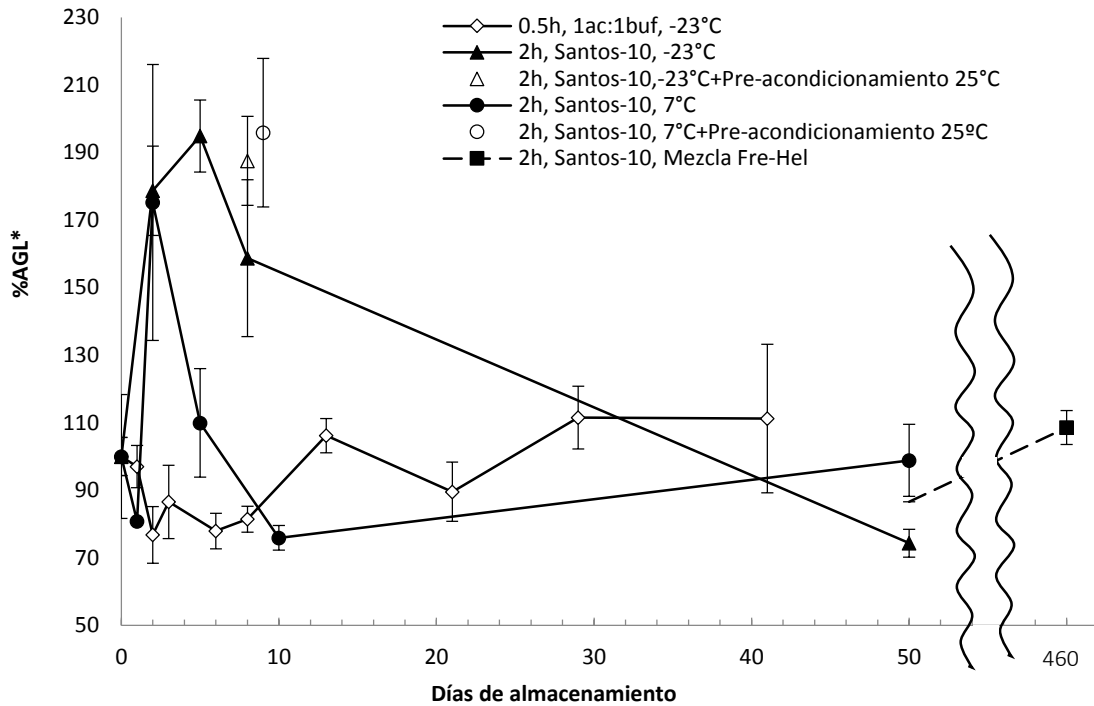


Figura 6.5 Evolución del %AGL (m/m) relativo al día de obtención (%AGL*) del polvo durante el tiempo de almacenamiento (días). El texto de la imagen describe la fecha de obtención del polvo, el tiempo de reacción, el medio de reacción y el tipo de almacenamiento de cada conjunto experimental (mezcla Fre-Hel corresponde al almacenamiento a -23°C de la mezcla de ambos polvos (-23 y 7°C) del día 50). Condiciones de reacción: se utilizaron relaciones 7,3 y 1,1 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$ y 0.085 y 0.006 $\text{g}_{\text{PL}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$ para el medio Santos-10 y 1:1, respectivamente. La temperatura fue 37°C y el pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).

Por un lado, la acción de la lipasa con el almacenamiento a 7°C tuvo su pico máximo aproximadamente al día 2 mientras que el almacenamiento a -23°C lo presentó alrededor del día 5. Si bien la Figura 6.5 sugiere que la actividad hidrolítica del polvo almacenado a 7°C se estabilizó entre el día 10 y 50, no se puede asegurar lo mismo para la condición a -23°C ya que sería necesario disponer de algún otro punto experimental dentro de dicho periodo de tiempo. A su vez, estos resultados indicarían que el %AGL* (m/m) del polvo almacenado a -23°C se mantuvo elevado durante más tiempo, en esta primera etapa, que las muestras a 7°C .

Por otro lado, se realizaron experiencias luego de dejar ambos polvos a 25°C durante 1 día y los resultados fueron inesperados. Se esperaba que una mayor temperatura afectara negativamente al polvo ya que, en general, los materiales de origen biológico suelen conservarse mejor a menores temperaturas. Para las muestras a -23°C no se encontraron diferencias significativas entre la muestra conservada en frío y aquella que se mantuvo a 25°C . En el caso de

las muestras a 7 °C, el %AGL* (m/m) correspondiente al polvo luego de almacenarse a 25 °C se midió al día 8 de almacenamiento mientras que el tratamiento convencional a 7 °C se midió al día 9 por lo que no sería correcto realizar la comparación directa entre ambas muestras. De todas formas, se observó que el %AGL* (m/m) de los polvos almacenados a 7 °C (sin tratamiento a 25 °C) entre el día 5 y 8 fue muy inferior a la obtenida para 25 °C, indicando que probablemente la actividad del polvo fue mayor luego de almacenarse a 25 °C. Esto verifica que las condiciones de almacenamiento sin refrigeración por periodos de 24 h no deterioraron la actividad del polvo, lo cual es importante al contemplar posibles interrupciones en el sistema de refrigeración, por ejemplo, por cortes en la provisión del sistema eléctrico a las instalaciones. Incluso se podría decir que, al menos para los polvos almacenados a 7 °C, el templado a 25 °C por 24 horas podría ser beneficioso. Estos resultados sugieren que el almacenamiento del polvo a temperatura ambiente en lugar de utilizar refrigeración podría ser una opción viable, al menos por tiempos cortos, lo que representaría una ventaja con respecto a otros catalizadores (por ejemplo, "Lipase from *Rhizomucor miehei*", Sigma-Aldrich) que necesitan del frío para su conservación. Por cuestiones de tiempo, este estudio no fue realizado pero quedó registrado como una alternativa interesante a realizar a futuro.

Como conclusión general, dentro del período de almacenamiento de 0-50 días, se puede mencionar que existió una marcada inestabilidad en el %AGL* (m/m) del polvo la cual se cree que estuvo altamente influenciada por la temperatura y el proceso de templado. El frasco caramelo en el que se almacenó el polvo fue colocado y retirado del freezer/heladera tantas veces como fue necesario (una vez por cada experiencia realizada). En algunos casos el polvo se templó empleando una temperatura suave durante 20 minutos mientras que en otros casos se lo retiró de la heladera 1 o 2 horas antes de su uso. En otras palabras, el proceso de templado no fue controlado debido a que se subestimó el efecto del mismo. Este efecto no fue detectado a tiempo debido a que al emplear una técnica cromatográfica para determinar el %AGL, se decidió analizar las muestras en conjunto luego de finalizar el primer periodo de 10 días.

En base a estos resultados, y considerando que no se encontraron diferencias muy marcadas en las tendencias de ambos tratamientos (-23 °C y 7 °C), en la etapa II se decidió repetir el experimento de almacenamiento a -23 °, rediseñando el proceso de templado (◊, Figura 6.5). En esta ocasión, el polvo fue fraccionado en pequeñas cantidades en eppendorfs, lo que permitió templar y utilizar solo la cantidad de polvo necesaria para cada experiencia (y no todo el polvo, como sucedió en las experiencias anteriores). A su vez, al utilizar el fraccionamiento en recipientes pequeños individuales, el templado se volvió mucho más rápido permitiendo utilizar

el calor de la mano para alcanzar la temperatura ambiente en muy poco tiempo. Se observó que la tendencia de la curva resultó opuesta a las anteriores y que existió una pequeña disminución en el %AGL* (m/m) en los primeros días de almacenamiento. A su vez, en esta experiencia se incorporaron puntos experimentales intermedios dentro del periodo de 10-50 días, ya que no se disponía de dicha información para las condiciones anteriores. Se observó que, en todo el rango estudiado, el %AGL* (m/m) no se alejó demasiado del 100 % y que el comportamiento de la etapa II (◇, Figura 6.5) fue más estable que el observado en la etapa I (● y ▲, Figura 6.5), lo que confirma que las condiciones bajo las cuales se realiza el templado tienen un efecto importante sobre la actividad del polvo.

Los polvos empleados en la etapa I (-23 °C y 7 °C) se mantuvieron almacenados por un tiempo prolongado hasta que eventualmente fueron utilizados nuevamente. A los 175 días de almacenamiento, los mismos se emplearon en una reacción de hidrólisis cuyas condiciones no fueron las mismas que las que se muestran en la Figura 6.5 y por este motivo no fueron incluidas en la misma. De todas formas, el valor de actividad específica obtenido fue $51,48 \pm 4,54$ y $58,91 \pm 6,97$ $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{LP}}$ para -23 °C y 7 °C, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre estas muestras ($p=0,1969$) por lo que podría considerarse que a los 175 días la actividad del polvo almacenado a 7 °C fue similar al almacenado a -23 °C. Esto también sugiere que, a pesar de las diferencias encontradas durante los primeros días entre las curvas de almacenamiento a -23 °C y 7 °C (● y ▲, Figura 6.5), ambas muestras alcanzaron valores similares de %AGL absoluto (para este caso no se puede calcular el %AGL*). Por este motivo, se decidió mezclar ambos polvos y almacenar la mezcla a -23 °C. El %AGL* (m/m) se midió nuevamente a los 460 días, obteniendo un valor de $108,63 \pm 5,02$, lo que demostró que con el paso del tiempo la acción hidrolítica del polvo se estabilizó en un valor muy cercano al del día cero. En la bibliografía (Cavalcanti *et al.* 2007), se menciona que luego de almacenar los polvos de acetona de diferentes genotipos de ricino durante 7 meses (210 días) a 4 °C (equivalente a heladera), la actividad residual fue entre 80 y 90 % con respecto a la inicial. Si bien en esta tesis no se dispone del dato exacto para 210 días, al mirar la Figura 6.5 podría estimarse que el %AGL* equivalente a dicho tiempo parecería estar de acuerdo con los resultados de estos autores. Estos resultados fueron considerados al momento de analizar la repetitividad de las experiencias (Sección 6.3.2), evaluando aquellas muestras analizadas en períodos de tiempo comparables.

En resumen, si bien el %AGL* (m/m) durante los primeros 10 días resultó inestable y difícil de predecir, al menos durante la etapa I, podría considerarse que entre 50 y 460 días de almacenamiento, el polvo presentó un el %AGL* (m/m) relativamente estable y similar al del día

0 de almacenamiento. Al mismo tiempo, los resultados a 460 días indicarían que el polvo perdió actividad, lo que es importante desde dos aspectos: (a) el catalizador tiene larga durabilidad y (b) los resultados de reacciones realizadas entre el día 50-460, pueden compararse entre sí, sin necesidad de hacer correcciones estimativas. En base a (b) y a las reacciones del día 175 mencionadas previamente, también se consideró que probablemente la situación no hubiera cambiado si se hubiera almacenado el polvo en la heladera (al menos hasta los 175 días de almacenamiento).

6.3.4 Titulación vs cromatografía

En cuanto a la técnica de titulación a punto final, se verificó que no existió una diferencia significativa entre los resultados obtenidos al utilizar el blanco empleado por Santos et al. (2013) y el de esta tesis. La hipótesis inicial surgió de la suposición de que existen componentes residuales ácidos presentes en el polvo que son solubilizados al medio durante la incubación y que solo pueden ser detectados si se incuba el medio de reacción junto con el polvo durante el tiempo de reacción deseado. Si no se adiciona aceite al medio, entonces la mezcla de buffer y polvo enzimático permitiría obtener el blanco de reacción apropiado. Otros autores (Sigma-Aldrich 1997; Cavalcanti et al. 2007; Santos et al. 2013) no consideraron la incubación del polvo sino que utilizaron la mezcla total (buffer + sustrato + polvo), adicionando el etanol antes que el polvo para impedir la actividad catalítica, prosiguiendo con la titulación inmediata de la muestra. Por lo tanto, en esta sección se evaluó si la técnica de titulación permitía identificar esta diferencia sutil entre blancos de reacción. Es importante aclarar que previamente ya se verificó mediante técnicas cromatográficas que la presencia de polvos similares durante la incubación modificó significativamente el %AGL resultante con respecto a la ausencia de la misma (Sección 4.3.1.3). La importancia de esta diferencia a la hora de analizar los resultados depende del %AGL obtenido, y si el nivel de hidrólisis es muy bajo (cercano a 2 %AGL, como lo evaluado anteriormente en la Sección 4.3.1.3) debería considerarse. En cuanto a la técnica de titulación, se obtuvo un valor de $7,64 \pm 0,28$ y $7,45 \pm 0,23$ %AGL (m/m) para el blanco B_{INC} y $B_{S/INC}$, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas entre ambos ($p=0,4311$). Esto significa que aplicando esta técnica y empleando polvo de ricino de acuerdo a lo descrito en la metodología, sería indiferente realizar cualquiera de los dos blancos.

Por otro lado, también se prosiguió con la determinación completa del %AGL mediante titulación de M_{TIT} y se la comparó con la misma reacción analizada mediante cromatografía (M_{CROM}). Los valores obtenidos luego de restar los blancos correspondientes fueron $16,75 \pm 1,29$ y $26,01 \pm 1,42$ %AGL para titulación y cromatografía, respectivamente, con coeficientes de variación

de 7,7 y 5,5. Estos resultados demostraron que al utilizar titulación se obtuvo una subestimación de aproximadamente 35 % con respecto a la obtenida mediante cromatografía ($p=0,0036$). Además, el valor bajo de los coeficientes de variación demostró que ambas técnicas poseen buena precisión, pero considerando que el método cromatográfico es más confiable, se concluyó que la titulación es menos exacta y que puede resultar en valores absolutos erróneos. De todas formas, debido a la fácil y económica aplicabilidad de este método, podría admitirse su uso en caso de necesitar resultados rápidos, aunque solo permitiría comparar efectos de tratamientos evaluados con la misma metodología.

Como ya se mencionó anteriormente en la Sección 4.3.1.3, Al-Zuhair et al. (2003) encontraron hasta una subestimación de hasta 25 % al aplicar titulación con respecto a cromatografía para niveles de hidrólisis de aproximadamente 30 %AGL, indicando que la diferencia entre ambas técnicas debe ser considerada a medida que la hidrólisis avanza. Lógicamente, la elección de la técnica depende de los experimentos a realizar, conociendo las ventajas y limitaciones de cada una de ellas.

6.3.5 Masa de polvo enzimático

Al incrementar la concentración de polvo en el medio de reacción se esperaría que: (a) la actividad específica se mantenga constante indicando que la interfase no está saturada de polvo y que dicho polvo es el factor limitante de la reacción, o (b) que la actividad específica disminuya debido a que la interfase ya se encuentre saturada y como la cantidad de polvo actúa como divisor en el cálculo de la actividad específica, ésta disminuiría. En este caso, el área interfacial sería el factor limitante mientras que el polvo se encontraría en exceso. Siguiendo el mismo razonamiento, en el caso (a) el %AGL debería aumentar si la interfase no está saturada, mientras que en (b) el %AGL debería mantenerse si la interfase está saturada. Los resultados obtenidos a 37 °C se muestran en la Figura 6.6. Como se puede observar, a 37 °C y 0,5 h de reacción, no se encontraron diferencias en la actividad ($p=0,5114$) al emplear 0,0137 y 0,0274 g de polvo, lo que indicaría que el polvo enzimático es el factor limitante. Al duplicar la concentración de enzima, también se duplicó el %AGL ($p<<0,01$). Por el contrario, cuando se incrementó nuevamente la cantidad de polvo enzimático (0,05 g), estos efectos ya no se observaron, obteniendo porcentajes de AGL similares que para 0,0274 g ($p=0,5910$). Como se mencionó al comienzo de esta sección, debido a que la masa de catalizador actúa como divisor en el cálculo de la actividad específica, la misma se redujo considerablemente ($p=0,0195$) indicando que el catalizador utilizó toda el área interfacial disponible.

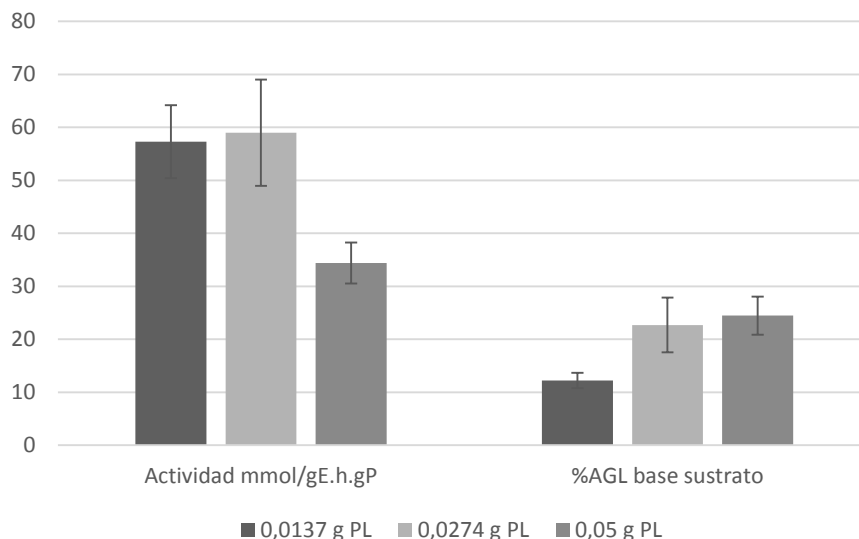


Figura 6.6 Efecto de la masa de polvo enzimático en la actividad lipásica específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) y el %AGL (m/m). Condiciones de reacción: medio 1:1 ($1,1 \text{ g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$), el tiempo de reacción fue 0,5 h, a 37 °C y pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM) con una relación enzima/sustrato igual a 0,0060 0,012 y 0,022, respectivamente.

De todas formas, con la información disponible no se pudo identificar a qué concentración exacta se produjo este fenómeno, pero se puede decir que el mismo ocurrió al emplear cantidades de PL mayores a 0,0274 g ($0,012 \text{ g}_{\text{PL}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$) y menores o iguales a 0,05 g ($0,022 \text{ g}_{\text{PL}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$), bajo las condiciones estudiadas. Esto permitió calcular un valor referencial de aproximadamente $18 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}}\cdot\text{g}_{\text{Agua}}$ por debajo del cual podría considerarse la saturación de la interfase para diferentes composiciones del medio de reacción. De todas formas, este parámetro referencial también podría mostrar valores altos al emplear cantidades de aceite muy elevadas en comparación con la fase acuosa. En este caso se deberían realizar más experimentos para evaluar si la actividad específica se mantiene, ya que la misma podría llegar a disminuir si existiese algún efecto de aglomeración del polvo (dependiendo de las concentraciones utilizadas). A pesar de esto, el valor referencial encontrado debería ser aplicable si las condiciones de reacción no se alejan excesivamente de las planteadas en esta sección. Así como fue definido el valor de $18 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}}\cdot\text{g}_{\text{Agua}}$ para identificar condiciones de saturación de la interfase, también se determinó un valor de $29 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}}\cdot\text{g}_{\text{Agua}}$ por encima del cual el polvo lipásico sería el factor limitante (área interfacial en exceso).

En la Tabla 6.2 se muestran los resultados de las reacciones a 50 °C. Al emplear 0,0137 g_{PL} no fue posible detectar actividad, independientemente del tiempo de reacción por lo que se cree que la enzima se inactivó/desnaturalizó al alcanzar esta temperatura. Al agregar el

doble de catalizador sí fue posible detectar actividad, aunque esta fue muy baja. Esto posiblemente sea debido a que la inactivación no sucedió de forma instantánea y la lipasa llega a hidrolizar una pequeña parte del aceite antes de inactivarse. De todas formas, incluso después de utilizar tiempos largos de reacción y la concentración más alta de PL, la productividad ($6,31 \pm 0,55 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{PL}}$) fue muy inferior a la obtenida empleando la menor concentración a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y en media hora de reacción (aproximadamente $55 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{PL}}$), sugiriendo que las temperaturas altas están lejos de ser una condición favorable para la lipasa.

Tabla 6.2 Porcentaje de AGL obtenido para las reacciones a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ empleando el medio 1:1 y diferente masa de PL y tiempo de reacción a pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).

PL (g)	%AGL	
	0,5 h	24 h
0,0137	$0,18 \pm 0,19$	$0,64 \pm 0,31$
0,0274	$2,39 \pm 0,53$	$4,81 \pm 0,43$

6.3.6 Reuso

En la experiencia para evaluar el posible reuso del catalizador luego de la centrifugación y la eliminación del aceite sobrenadante del primer uso, se observó que la actividad específica se mantuvo constante. No se encontraron diferencias significativas entre el primer y segundo ciclo de reacción del polvo, y se obtuvo un valor de actividad específica de $77,31 \pm 18,60$ y $75,53 \pm 6,57 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{Aceite}} \cdot \text{g}_{\text{PL}}$, respectivamente ($p=0,8832$). Estos resultados son alentadores desde el punto de vista industrial ya que la lipasa se encuentra naturalmente inmovilizada, facilitando así su recuperación, al mismo tiempo que admite su reuso en una nueva reacción. También, estos resultados permiten inferir que con el proceso de separación utilizado para recuperar el aceite, no se estaría perdiendo lipasa activa. La similaridad encontrada en los valores de actividad específica también podría señalar que la curva de cinética bajo estas condiciones fue lineal hasta al menos 1 h de reacción, lo que a su vez indicaría que la misma no presentó fase lag (dado que la primera media hora dio igual que la segunda media hora). La ausencia de fase lag demostraría que el polvo comenzó la hidrólisis de forma inmediata y que no necesitó un periodo de "adaptación" al medio de reacción como se ha observado en otras reacciones y lipasas (Wickham et al. 1998; Camacho Paez et al. 2002; Palla 2012).

Otra posible explicación a la igualdad de actividad en ambos usos sucesivos, podría ser la existencia de una fase lag en simultáneo con una pérdida parcial de lipasa durante el recambio de la fase oleosa, lo que compensaría ambas actividades.

6.3.7 Concentración de goma arábica

Esta experiencia fue evaluada para determinar los rangos de concentración de goma arábica que posteriormente fueron empleados en la optimización de la actividad lipásica específica y se analizan en un capítulo posterior. Luego de 2 h de reacción y bajo igualdad de condiciones, se obtuvieron $17,42 \pm 0,06$ y $8,10 \pm 1,14$ %AGL (m/m) para el caso con 3 y 10 % de goma arábica en la solución empleada para generar la emulsión. Estos resultados mostraron una disminución altamente significativa en el %AGL obtenido al incrementar la concentración de goma ($p < 0,0020$), sugiriendo que emplear un límite superior por debajo de 10 % favorecería la reacción enzimática y que existiría un efecto negativo de la goma en el sistema de reacción. De todas formas, es importante evaluar si dicho efecto se mantiene a concentraciones menores considerando también reacciones en ausencia de goma arábica. Por este motivo, el rango elegido para la concentración de este surfactante en la optimización de la actividad lipásica específica (analizado en el capítulo siguiente) se eligió entre 0-6 % (m/m).

6.3.8 Esterificación

Cómo se mencionó previamente en la introducción, Tüter (1998) realizó una purificación parcial de la lipasa presente en las semillas de ricino utilizando una extracción con buffer de citrato a diferentes pH. En ese trabajo se reportó la obtención de aproximadamente 30 %TAG (m/m) en reacciones de esterificación entre glicerol y una mezcla de AGL (80 % ácido oleico) luego de 24 h de reacción a 35 °C. Como se puede observar, las condiciones fueron muy similares a las utilizadas en la presente sección, salvo por el estado físico del biocatalizador. A pesar de esto, no se encontró evidencia de actividad de esterificación en las muestras analizadas por lo que más pruebas deberían ser realizadas.

6.3.9 Conclusiones

En cuanto a la repetitividad de las experiencias se determinó que aproximadamente el 50 % de los triplicados mantuvieron un coeficiente de variación menor o cercano a 10 %, mientras que el 30 % se mantuvo por debajo de 15 % y solo el 20 % restante superó dicho valor. En base a esto, se consideró que la repetitividad en la preparación del polvo y su uso en el sistema de reacción propuesto fue aceptable bajo las condiciones estudiadas tanto para polvos del mismo lote como para aquellos de diferente fecha de obtención.

Al evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento (a -23 °C y heladera) del polvo sobre la acción lipásica, se detectó una marcada inestabilidad en la actividad relativa del polvo durante los primeros 10 días, la cual se estimó que estuvo altamente influenciada por el proceso de templado (temperatura, duración) oportunamente utilizado. Este concepto fue parcialmente

confirmado al realizar un segundo experimento considerando el fraccionamiento del polvo y la estandarización del templado, en el que los valores de actividad relativa oscilaron entre 80 y 100 % durante 40 días de almacenamiento a -23 °C. Por otro lado, podría considerarse que, entre 50 y 460 días de almacenamiento, el polvo presentó una actividad relativamente estable y similar a la del día 0 de almacenamiento. Este resultado fue importante ya que indicó que el catalizador mantuvo una larga durabilidad y, a su vez, que los resultados de reacciones realizadas entre el día 50-460 pueden compararse entre sí, sin necesidad de hacer correcciones estimativas.

Luego de comparar las técnicas de cromatografía con las de titulación se observó que los coeficientes de variación resultaron bajos para ambas técnicas lo que significó una buena precisión. Por otro lado, el valor de titulación resultó un 35 % menor que el valor obtenido mediante cromatografía. Debido a que se consideró que el método cromatográfico es más confiable, se concluye que la titulación es menos exacta y que puede resultar en valores absolutos erróneos.

Al realizar reacciones con diferente concentración de PL se estimaron valores referenciales para determinar si la superficie interfacial se encontraba saturada de PL o no. Luego del análisis se propuso un valor de aproximadamente $18 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$ por debajo del cual se asumió la saturación de la interfase para diferentes composiciones del medio de reacción. Por el contrario, se determinó un valor de $29 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$ por encima del cual se asumió que el PL fue el factor limitante (área interfacial en exceso). Estas conclusiones podrían ser aplicadas a otras condiciones, siempre y cuando las condiciones de reacción no se alejen excesivamente de las planteadas en esta sección.

También se determinó que: el PL admitió un segundo uso, sucesivo al primero, implementando un recambio de sustrato luego de media hora de reacción, manteniendo la misma fase acuosa y PL. La acción enzimática en ambas reacciones fue similar y la curva cinética resultante mantuvo la linealidad hasta al menos 1 h de reacción. Además, se determinó que no existiría una fase lag para la reacción de hidrólisis en las condiciones de reacción evaluadas.

Por último, en las experiencias exploratorias con goma arábiga se detectó un efecto negativo sobre la reacción de hidrólisis al utilizar la mayor concentración de este componente. En cuanto a la reacción de esterificación realizada bajo condiciones similares a la hidrólisis (medio, temperatura), no se encontró actividad de esterificación, indicando que la reacción de hidrólisis se encontraría ampliamente favorecida. De todas formas, más pruebas deberían ser realizadas

para corroborar que la lipasa presente en el LP obtenido en esta tesis no es capaz de esterificar o si lo haría en otras condiciones.

6.4 Referencias

Al-Zuhair, S., Hasan, M. & Ramachandran, K.B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry* 38: 1155-1163.

Avelar, M.H.M., Cassimiro, D.M.J., Santos, K.C., Domingues, R.C.C., De Castro, H.F. & Mendes, A. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products* 44: 452-458.

Camacho Paez, B., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., González Moreno, P. & Molina Grima, E. (2002). Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: Equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Science* 57: 1237-1249.

Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007). Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 7: 57-66.

Dunlap, F. & Seymour, W. (1905). The Hydrolytic enzyme-lipase. *Journal of the American Oil Chemist' Society* 27: 935-946.

Eastmond, P.J. (2004). Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45540-45545.

Hills, M.J. & Beevers, H. (1987a). An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62 kD) also binds to a 62 kD protein in extracts from many young oilseed plants. *Plant Physiology* 85: 1084-1088.

Hills, M.J. & Beevers, H. (1987b). Ca²⁺ stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiology* 84: 272-6.

Horiba Scientific. (2010). Guidebook to particle size analysis.

Liaquat, M. & Apenten, R.K.O. (2000). Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of Food Science* 65(2): 295-299.

Maeshima, M. & Beevers, H. (1985). Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant Physiology* 79: 489-493.

Morlon-Guyot, J., Helmy, M., Lombard-Frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G. & Beaumelle, B. (2003). Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 278(19): 17006-11.

Muto, S. & Beevers, H. (1974). Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiology* 54: 23-28.

Palla, C.A. (2012). Estudio de la producción de lípidos estructurados en reactores enzimáticos batch y de lecho empacado. Universidad Nacional del Sur.

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

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R. & Mendes, A (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products* 49: 462-470.

Schieltz, D.M., McWilliams, L.G., Kuklennyik, Z., Prezioso, S.M., Carter, A.J., Williamson, Y.M., McGrath S.C, Morse, S. A. & Barr, J.R. (2015). Quantification of ricin, RCA and comparison of enzymatic activity in 18 *Ricinus communis* cultivars by isotope dilution mass spectrometry. *Toxicon* 95: 72-83.

Sigma-Aldrich. (1997). Enzimatic assay of lipase (Triacetin as substrate).

Tüter, M. (1998). Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(3): 417-420.

Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15: 32-38.

Wickham, M., Garrood, M., Leney, J., Wilson, P.D.G. & Fillery-Travis, A. (1998). Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity. *Journal of Lipid Research* 39: 623-632.

OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA DE POLVOS DE RICINO

Capítulo

7

7.1 Introducción

Como ya se mencionó anteriormente, existen varios trabajos en los que se han utilizado semillas de ricino como fuente de lipasa. La mayoría de ellos investigan sus lipasas como una estructura biológica y funcional (Lombard et al. 2001; Morlon-Guyot et al. 2003; Eastmond 2004; Schieltz et al. 2015), pero sólo unas pocas referencias presentan un enfoque biotecnológico (Tüter 1998; Cavalcanti et al. 2007; Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013). Desde este punto de vista, la compleja y costosa purificación de lipasas mediante precipitación, filtración en gel, intercambio iónico o cromatografía de adsorción podrían ser evitadas (Palekar et al. 2000), ya que es posible obtener polvo lipásico (PL) perfectamente funcional luego de eliminar el aceite de la semilla (Santos et al. 2013). Esto también sería una característica notable de las lipasas vegetales a tener en cuenta. Por otra parte, existen aún menos artículos en donde se utilizan diseños experimentales y optimización para analizar el comportamiento del polvo lipásico de ricino en diferentes condiciones (Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013). Estos diseños experimentales son útiles ya que presentan varias ventajas en comparación con el método en el que se varía de a un parámetro a la vez, ya que admiten un menor número de experimentos y permiten identificar fácilmente la existencia de interacciones entre variables. En otras palabras, los diseños de experimentos permiten analizar si el efecto de cada variable de interés, depende (o no) de los diferentes valores fijados para el resto de las variables analizadas.

En este capítulo se describe el uso de la lipasa de semilla de ricino como biocatalizador en reacciones de hidrólisis utilizando aceite de girasol alto oleico como sustrato. La reacción de hidrólisis se eligió debido a su simplicidad y debido al alto valor industrial de los productos (Moya-Ramírez et al. 2016). Las variables elegidas para incluir en el diseño experimental fueron la cantidad de PL, sustrato (aceite) y surfactante. Diferentes surfactantes han sido utilizados por

otros autores para mejorar las condiciones en la interfase hidrofóbica con el fin de mejorar la actividad de la lipasa (Tiss et al. 2002), particularmente cuando la lipasa está en solución. Hasta el momento, la optimización de la concentración de surfactante y PL considerando su posible interacción nunca fue estudiada en polvos de ricino. En este capítulo la goma arábica fue elegida como surfactante ya que la misma ha sido utilizada con polvos de ricino y otras enzimas en otros trabajos publicados (Cavalcanti et al. 2007; Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013; Moya-Ramírez et al. 2016).

En cuanto al método de detección de actividad lipásica, los métodos de la titulación se han utilizado extensamente debido a su simplicidad y a que se reconoce como ensayo de referencia (Beisson et al. 2000). A pesar de esto, en experimentos previos usando este tipo de catalizadores, se encontró que, en algunos casos, puede haber dificultades para encontrar un blanco de reacción apropiado generando falsos positivos de reacción (Sección 4.3.1) o subestimaciones de la actividad (Sección 6.3.4). Por esta razón, y luego de algunos ensayos experimentales, se eligió nuevamente la técnica cromatográfica para evaluar la composición de los productos obtenidos a partir de la reacción de hidrólisis.

7.2 Materiales y métodos

7.2.1 Materiales

Se utilizaron semillas de ricino (*Ricinus communis*) de una planta ornamental. El aceite de girasol alto oleico se compró en un supermercado local. La goma arábica fue de grado extra puro (Anedra) y todos los reactivos, gases y disolventes utilizados fueron de grado cromatográfico o pro-análisis.

7.2.2 Preparación del polvo

Las semillas de ricino sin germinar fueron descascaradas y la cubierta marrón fue eliminada. Luego se procedió con la “molienda B” descrita en la Sección 2.3.2.2, seguido por un desaceitado utilizando acetona durante 16 h (Sección 2.3.2.3).

7.2.3 Reacciones de hidrólisis

En este capítulo se describe la realización de un total de 78 reacciones de hidrólisis (incluyendo blancos y réplicas) las cuales corresponden a dos diseños experimentales diferentes (Sección 7.2.4). A modo general, los medios de reacción a partir de los cuales se diseñaron los experimentos fueron los siguientes:

- 5 mL de buffer de acetato (pH 4,4, 100 mM) con 5 mL de una emulsión de aceite de girasol alto oleico y una solución de agua y goma arábica.
- 5 mL de buffer de acetato (pH 4,4, 100 mM) con 5 mL de una emulsión de aceite de girasol alto oleico y agua (sin goma arábica).

Todas las reacciones se realizaron a 37 °C en frascos de aproximadamente 160 mm de diámetro con agitación magnética vigorosa durante 1,5 h. Las emulsiones se prepararon utilizando un homogeneizador PRO250 a 26000 rpm durante 10 minutos. Para finalizar la reacción se adicionaron 10 mL de etanol y se procedió con la cuantificación de la actividad lipásica de acuerdo a la Sección 7.2.5. Las condiciones de reacción se eligieron a partir del trabajo publicado por Santos et al. (2013).

7.2.4 Diseño experimental

7.2.4.1 Introducción al diseño experimental

Actualmente existe una creciente necesidad de optimizar los procesos y productos, minimizar los costos y el tiempo y maximizar la eficiencia, productividad y calidad del producto. Es por esto que existen técnicas sistemáticas basadas en la teoría estadística que permiten diseñar los experimentos de interés, proporcionando información confiable sobre el proceso. Sin embargo, para obtener los objetivos deseados al implementar esta metodología, se deben considerar de forma integrada tanto el proceso, como la estadística y el sentido común. A continuación, para desarrollar el fundamento teórico necesario referido a los diseños experimentales se citará el libro "*Experimental Design Process and Optimization*" publicado por Rodrigues et al. 2015.

En la práctica, si se desea conocer el efecto de una o más variables independientes sobre una variable dependiente (ej. efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática), existen tres enfoques diferentes para abordar el problema. El **primer método** es el procedimiento experimental más utilizado conocido como "una variable a la vez", donde una de las variables estudiadas toma diferentes valores, mientras que las otras se mantienen constantes. Después de haber encontrado el mejor valor para dicha variable, la misma se fija y se repite el procedimiento con las variables restantes. Este método es muy usado, pero puede ser muy ineficiente y es incapaz de detectar interacciones entre variables (efectos sinérgicos o antagonistas), ya que no permite explorar a fondo el espacio experimental donde podría encontrarse la mejor solución (Figura 7.1a). El **segundo método** se basa en buscar el resultado deseado usando una matriz, donde todas las combinaciones se investigan para obtener una solución final. Este método tiene la ventaja de explorar todo el espacio experimental, pero tiene la gran desventaja de requerir un

gran número de mediciones (Figura 7.1b). El **tercer método** se basa en un diseño estadístico conocido como *diseño experimental*, el cual permite trabajar con un número menor de ensayos, explorando todo el espacio experimental (Figura 7.1c).

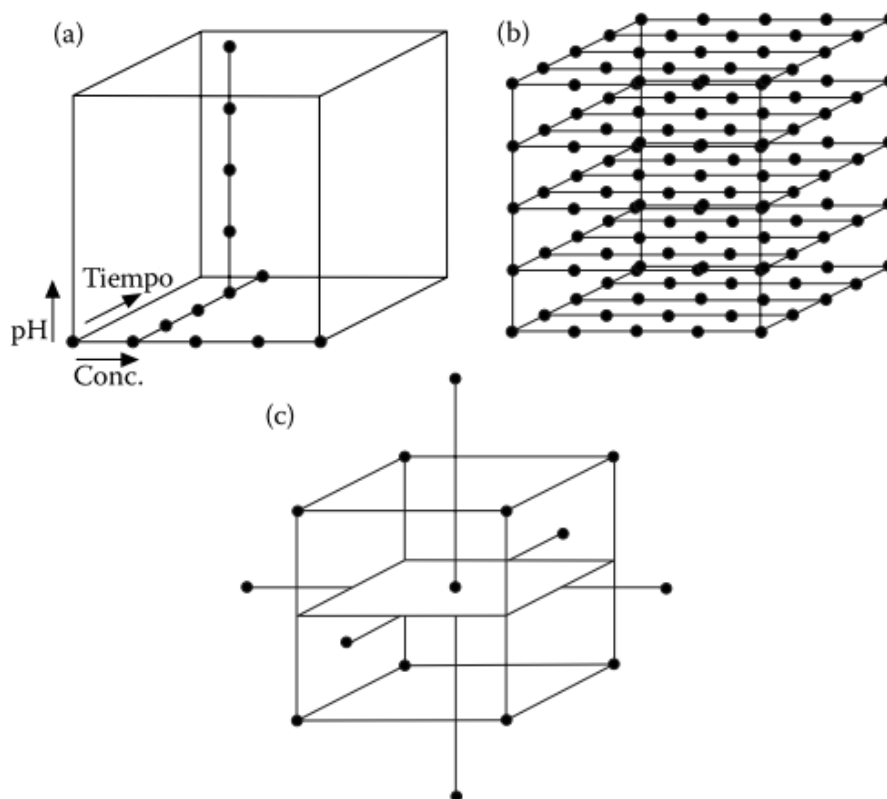


Figura 7.1 Posibilidades de realizar experimentos con tres variables: (a) análisis de una variable a la vez, (b) matriz con todas las combinaciones posibles, y (c) diseño experimental (Rodríguez et al. 2015).

Si se desean estudiar tres variables independientes, cada una en tres valores (o niveles) diferentes, el primer método requeriría al menos 13 ensayos para obtener la mejor respuesta. Sin embargo, como se muestra en la figura, las condiciones estudiadas se limitarían solo al espacio explorado, siendo incapaz de detectar los efectos de las interacciones entre variables. Por lo general, el resultado obtenido difiere en gran medida al valor optimizado.

El segundo caso requiere un gran número de pruebas, para explorar los cinco niveles de los tres factores ($5 \times 5 \times 5=125$). Este procedimiento requiere mucho tiempo, es muy costoso e innecesario (sin considerar la realización de duplicados). En el caso de los diseños experimentales, el número de pruebas se reduce a 17 y permite calcular el error experimental al incorporar

repeticiones en el punto central. Además, es posible desarrollar un modelo matemático que, si se valora estadísticamente, se puede utilizar para obtener la superficie de respuesta, y el cálculo numérico de la condición óptima.

Los experimentos establecidos en estructuras factoriales son aquellos que implican combinaciones entre niveles de dos o más factores. Los *factores* corresponden a las variables independientes o predictoras, cuyos niveles se determinan según los intereses del investigador. Si todas las combinaciones posibles entre todos los niveles de cada factor están presentes, se dice que el diseño factorial es *completo*. De lo contrario, se lo denomina diseño factorial incompleto.

En las siguientes secciones se discutirán y seleccionarán los factores y variables de respuesta que podrían estudiarse, así como también los diseños experimentales elegidos.

7.2.4.2 Factores y variable de respuesta

En la presente tesis, la variable de respuesta más directa para evaluar los resultados de la hidrólisis se encuentra inevitablemente asociada a la cuantificación de los ácidos grasos libres (AGL), siendo los mismos el producto principal de la reacción (aunque también podrían cuantificarse los subproductos de la reacción como MAG y DAG). La expresión de dicha cuantificación puede variar de acuerdo a la bibliografía (Cavalcanti et al. 2007; Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013), así como las conclusiones que pueden obtenerse de cada expresión. Algunas de ellas son:

- Porcentaje de ácidos grasos libres expresado como $\frac{[masa\ AGL]}{[masa\ inicial\ de\ sustrato]} \times 100$: si bien su optimización permitiría observar bajo qué condiciones se produce la mayor proporción de AGL, podría estar dejando de lado información útil. Por ejemplo, si dos muestras alcanzaran una cantidad similar %AGL en un determinado diseño, uno de ellos podría haberlo alcanzado utilizando una menor cantidad de catalizador, indicando que tal vez el catalizador se encuentra en exceso o bien que el sustrato es el factor limitante.
- Actividad específica expresada como $\frac{[moles\ de\ AGL]}{[tiempo][masa\ de\ catalizador]}$: en este caso, las unidades son más representativas ya que se incluye el tiempo de reacción y la masa de catalizador. De todas formas, podría ocurrir que a pesar de que dos experimentos presenten cantidades de AGL parecidas e igual cantidad de catalizador, podrían contener diferentes cantidades de sustrato, y esto no se vería reflejado en los valores numéricos de actividad. Al incluir el tiempo, se debe considerar que para tiempos largos de reacción (ej. 12 h), la actividad obtenida puede no ser representativa de la velocidad real de

producción de AGL ya que la curva de cinética podría no ser lineal en dicho rango de tiempo.

- Actividad específica expresada como $\frac{[\text{moles de AGL}]}{[\text{tiempo}][\text{masa de sustrato}][\text{masa de catalizador}]}$: esta expresión es la más completa y permite realizar comparaciones entre muestras que presenten grandes diferencias entre sí (tiempo de reacción, masa de catalizador y sustrato). Por esto mismo esta expresión fue elegida como variable de respuesta para este estudio.

Por otro lado, dentro de la hidrólisis enzimática, el número de variables que podrían tener una influencia sobre la respuesta elegida es muy amplio. Dentro de las mismas se pueden enumerar: pH, temperatura, concentración de sustrato/surfactante/catalizador/solvente, interfase hidrofóbica disponible, origen del sustrato y del catalizador, viscosidad del medio de reacción, tiempo de reacción, agitación, volumen de reacción, condiciones de almacenamiento de la semilla, etc. Al mismo tiempo, al implementar nuevas fuentes de lipasas en la modificación de grasas y aceites, como es el caso de las semillas de ricino, comienzan a surgir variables más complejas asociadas al proceso de producción de dicho biocatalizador. Algunas de ellas son variables no controladas en este estudio, como por ejemplo el origen de las semillas, su variedad, cosecha, el cultivo y desarrollo (aunque en general los resultados se compararon teniendo en cuenta condiciones similares para las tandas de polvo evaluadas). Otras están más íntimamente asociadas al procesamiento de las semillas en el laboratorio: días de germinación previo al procesamiento, temperatura, solvente y tiempo de contacto del proceso de desgrasado, mecanismo de evaporación del solvente residual, tamaño de partícula luego de la molienda, entre otros. Por último, la exactitud y precisión de la medición de la variable de respuesta también puede variar dependiendo del método seleccionado para su cuantificación o el blanco que se utiliza para contrastar los resultados.

Como ya se mencionó anteriormente, en este capítulo los factores elegidos fueron la concentración de sustrato, surfactante y catalizador.

Algunas de las variables restantes fueron fijadas (ej. pH, temperatura, blancos de reacción, metodología de cuantificación) y otras fueron analizadas parcialmente en diferentes secciones de la tesis (Capítulo 4 y 6) pero no fueron contempladas en este estudio (ej. tamaño de partícula, solvente y tiempo de desaceitado, condiciones de almacenamiento de la semilla).

En el presente trabajo se realizaron dos diseños experimentales diferentes. En primer lugar se empleó un diseño Box-Behnken (DBB). Luego se decidió ampliar el área experimental

evaluada en el DBB mediante un diseño factorial (DF). Los detalles de cada diseño se desarrollan a continuación.

7.2.4.3 Codificación de variables

Una vez elegidos los factores y las respuestas de interés, debe definirse el *rango* experimental (valores mínimos y máximos) de cada factor. En la práctica, es común analizar los resultados en su forma *codificada*, lo que implica asociar el límite inferior del rango de cada factor a un valor de -1 y el límite superior a un valor de +1, tal como se muestra en el ejemplo de la Figura 7.2.

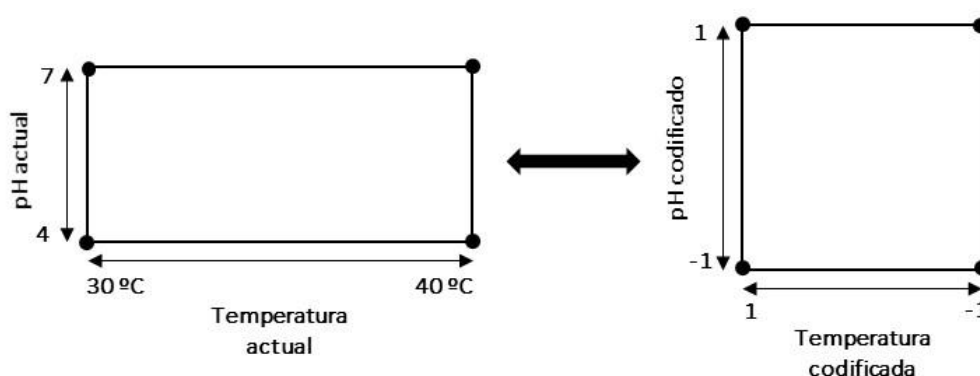


Figura 7.2 Esquema representativo de la codificación de factores.

Como es de esperar, tanto la variable de respuesta como los parámetros obtenidos en el modelo matemático final, pueden ser reportados en su forma “actual” (sin codificar) y/o en su forma “codificada”. Esta codificación permite, no solo simplificar la nomenclatura del diseño, sino también distinguir qué factor tiene el efecto más significativo sobre la variable de respuesta.

7.2.4.4 Box-Behnken

El diseño Box-Behnken es una clase de diseño experimental basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles. La geometría de este diseño (Figura 7.3) sugiere una esfera dentro del espacio experimental, tal que la superficie de la esfera se hace tangencial al punto medio de cada cara del espacio. Este diseño admite entre 3 y 10 factores, pero cuando se utilizan solo tres, resulta más eficiente que el diseño factorial compuesto central y admite un menor número de experimentos (Ferreira et al. 2007). Cuando se utilizan tres factores, permite obtener un modelo matemático con términos cuadráticos, lineales, y productos entre factores. La Ecuación 7.1 muestra el modelo completo donde R representa la variable de respuesta, x_i las diferentes

variables o factores elegidos. Con la letra a se representan las diferentes constantes asociadas a cada factor, cuyos subíndices indican la/s variable/s a las cuales están asociadas.

$$R = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2$$

(Ec. 7.1)

Para el presente estudio se realizaron dos bloques de 18 experimentos cada uno (en orden aleatorio) considerando 6 repeticiones en el punto central. Los niveles de cada variable independiente se eligieron sobre la base de experimentos anteriores y referencias bibliográficas (Cavalcanti 2007; Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013). Los factores y sus rangos correspondientes fueron:

- A, concentración de goma arábica en la fase acuosa de la emulsión de sustrato: 0-6 % (m/m).
- O_{DBB} , fracción de aceite en la emulsión: 0,16-0,5 aceite:fase acuosa (m/m).
- L_{DBB} , cantidad de PL: 0,05-0,15 g.

Si bien la variable elegida fue la masa de PL, los resultados obtenidos también son válidos para estudiar los efectos de la concentración de PL, ya que el volumen de reacción siempre se mantuvo constante e igual a 10 mL. La relación PL/sustrato se mantuvo entre 0,033-0,22 g_{PL}/g_{Aceite}, mientras que la relación agua/sustrato se mantuvo entre 5,2-13 g_{Agua}/g_{Aceite}.

En la Tabla 7.1 se detallan los experimentos realizados, y se puede observar que el punto central de este diseño corresponde una composición del medio idéntica a Santos-10 (Sección 2.4.6).

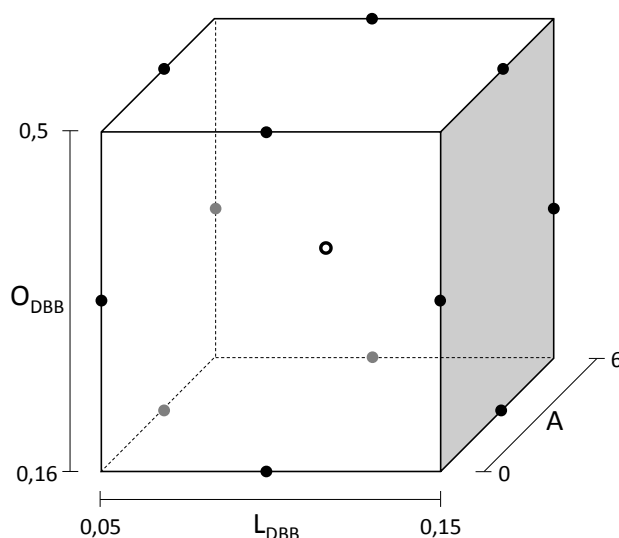


Figura 7.3 Esquema ilustrativo del DBB. Todos los puntos representan los experimentos realizados, el círculo vacío corresponde al punto central. Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción igual a 10 mL.

Tabla 7.1 Experimentos aplicados en el diseño experimental Box-Behnken.

n_E (#)	n_A Bloque I (#)	n_A Bloque II (#)	L_{DBB} (g)	A (%m/m)	O_{DBB} (m/m)
1	18	23	0,05	0	0,33
2	14	33	0,15	0	0,33
3	2	27	0,05	6	0,33
4	5	28	0,15	6	0,33
5	12	19	0,05	3	0,16
6	6	34	0,15	3	0,16
7	8	30	0,05	3	0,5
8	17	36	0,15	3	0,5
9	7	20	0,1	0	0,16
10	15	21	0,1	6	0,16
11	3	35	0,1	0	0,5
12	1	25	0,1	6	0,5
13	16	24	0,1	3	0,33
14	11	29	0,1	3	0,33
15	13	22	0,1	3	0,33
16	9	31	0,1	3	0,33
17	10	26	0,1	3	0,33
18	4	32	0,1	3	0,33

n_E : número estándar de experimentos, n_A : número aleatorio de experimento correspondiente al orden en que se realizó cada uno. Los factores L_{DBB} , A y O_{DBB} se describen en el texto.

Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (Buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen total de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,033-0,22 g_{PL}/g_{Aceite} . Relación agua/sustrato: entre 5,2-13 g_{Agua}/g_{Aceite} .

7.2.4.5 Diseño factorial

A partir de los resultados del DBB y con el fin de expandir las concentraciones de aceite y PL más allá de los rangos utilizados anteriormente, se utilizó un diseño factorial completo de tres niveles (Figura 7.4). Al utilizar solo dos factores, ya no fue posible aplicar un DBB debido a que el mismo no existe. Se realizaron dos bloques de 12 reacciones de hidrólisis con 4 repeticiones en el punto central. Al igual que en el DBB, el medio de reacción se compuso de 5 mL de buffer de acetato (pH 4,4, 100 mM) y 5 mL de una emulsión de aceite de girasol alto oleico y agua, en este caso no se utilizó goma arábica para preparar las emulsiones.

Los factores y sus rangos correspondientes fueron:

- O_{DF} , concentración de aceite en la emulsión de sustrato: 0,5-1 aceite:agua (m/m) en la emulsión sustrato;
- L_{DF} , cantidad de PL: 0,005-0,05 g.

Nuevamente, si bien la variable elegida fue la masa de PL, los resultados obtenidos también son válidos para estudiar el efecto de la concentración de PL, ya que el volumen de reacción siempre se mantuvo constante e igual a 10 mL. La relación PL/sustrato se mantuvo entre 0,0022-0,033 g_{PL}/g_{Aceite} , mientras que la relación agua/sustrato se mantuvo entre 3,2-5,2 g_{Agua}/g_{Aceite} .

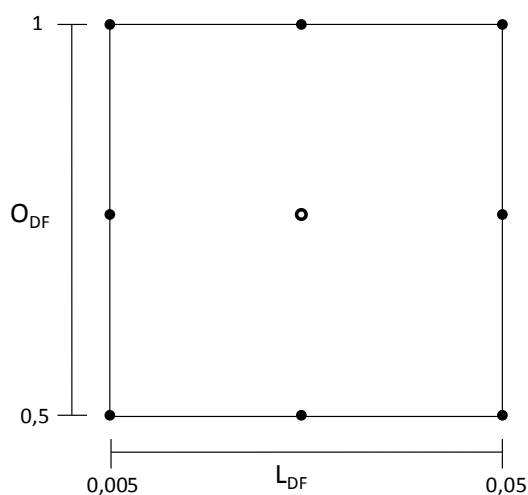


Figura 7.4 Esquema ilustrativo del DF. Todos los puntos representan los experimentos realizados; el círculo vacío corresponde al punto central. Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción igual a 10 mL.

Este diseño también permitió obtener un modelo matemático con términos cuadráticos, lineales, y productos entre factores tal como se muestra en la siguiente ecuación genérica:

$$R = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad (\text{Ec. 7.2})$$

Una vez más, R representa la variable de respuesta, x_i las diferentes variables o factores elegidos. Con la letra a se representan las diferentes constantes asociadas a cada factor, cuyos subíndices indican la/s variable/s a las cuales están asociadas.

En la Tabla 7.2 se detallan los experimentos realizados para los 2 bloques considerados.

Tabla 7.2 Experimentos realizados en el diseño experimental factorial.

n_E (#)	n_A Bloque I (#)	n_A Bloque II (#)	O_{DF} (g)	L_{DF} (g)
1	7	42	0,5	0,005
2	3	32	0,75	0,005
3	12	32	1	0,005
4	2	36	0,5	0,0275
5	10	23	0,75	0,0275
6	5	33	1	0,0275
7	8	28	0,5	0,05
8	1	23	0,75	0,05
9	9	23	1	0,05
10	6	38	0,75	0,0275
11	11	26	0,75	0,0275
12	4	27	0,75	0,0275
23	13	42	0,75	0,0275

n_E : número estándar de experimentos, n_A : número aleatorio de experimento correspondiente al orden en que se realizó cada uno. Los factores L_{DF} y O_{DF} se describen en el texto.

Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (Buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen total de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,0022-0,033 g_{PL}/g_{Aceite} . Relación agua/sustrato: entre 3,2-5,2 g_{Agua}/g_{Aceite} .

7.2.4.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a través de los diseños experimentales se analizaron utilizando el software Design-Expert 7.0.0 (Stat-Ease, Inc).

7.2.5 Cuantificación de la actividad lipásica

La actividad lipásica específica se calculó mediante la determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CGL utilizando el método de “Extracción B” con éter etílico y hexano como solventes para la recuperación de los subproductos luego de frenar las reacciones de hidrólisis. Los detalles de esta metodología se describieron en la Sección 2.5.3.

7.2.6 Blancos de reacción

Los blancos de reacción involucraron la incubación del PL junto con el buffer de acetato (100 mM, pH 4) durante 1,5 h. La emulsión del sustrato se adicionó luego de inactivar la enzima con etanol. Al evaluar de forma global el %AGL obtenido en los blancos de 50 reacciones previas (capítulo anterior), las cuales se realizaron bajo diferentes condiciones de reacción, cantidad de PL y aceite, entre otros, se obtuvo un rango entre 0,73 y 1,72 %AGL. Debido a esto, y por motivos prácticos, en los diseños experimentales no se realizaron blancos de cada reacción sino que se consideraron promedios representativos para cada diseño:

- DBB: se realizaron blancos para las reacciones con $n_E = 4, 6, 16, 17, 2$ y 8 (Tabla 7.1). El promedio de los seis blancos de reacción fue utilizado como blanco general para todas las corridas del DBB.
- DF: se realizaron blancos para las reacciones con $n_E = 6$ y 12 (Tabla 7.2). El promedio de ambos blancos de reacción fue utilizado como blanco general para todas las corridas del DF.

El coeficiente de variación para todos los blancos promediados fue inferior al 10 % y se verificó que todos los valores se encontraran dentro del rango reportado anteriormente.

7.2.7 Otros cálculos

En la discusión de resultados (Sección 7.3), además de la actividad lipásica específica, también se utilizaron otras expresiones ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) que permitieron comparar estos resultados con datos de la bibliografía. Con el mismo propósito, en algunos casos los porcentajes de hidrólisis también fueron calculados como la masa de AGL con respecto a la masa de aceite inicial, porciento.

7.3 Discusión de resultados

7.3.1 Diseño Box-Behnken

Los niveles de los factores no codificados obtenidos para el DBB se muestran en la Tabla 7.3 con su respectiva respuesta. Los valores de actividad específica obtenidos en todo el experimento se encontraron entre 0,37-23,90 $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ alcanzando porcentajes de hidrólisis cercanos al 60 % ($n_E=11$, Tabla 7.3).

Tabla 7.3 Respuestas sin codificar obtenidas para cada experimento del DBB.

n _E (#)	L _{DBB}	A	O _{DBB}	Actividad específica (R) mmol _{AGL} /h·g _{Aceite} ·g _{PL}
1	0,05	0	0,33	23,90 ± 0,59
2	0,15	0	0,33	5,83 ± 0,11
3	0,05	6	0,33	2,92 ± 0,18
4	0,15	6	0,33	0,97 ± 0,43
5	0,05	3	0,16	2,57 ± 0,45
6	0,15	3	0,16	0,54 ± 0,02
7	0,05	3	0,5	7,40 ± 0,64
8	0,15	3	0,5	1,79 ± 0,12
9	0,10	0	0,16	5,80 ± 0,52
10	0,10	6	0,16	0,37 ± 0,15
11	0,10	0	0,5	14,84 ± 2,63
12	0,10	6	0,5	2,27 ± 0,03
13	0,10	3	0,33	2,20 ± 0,88
14	0,10	3	0,33	2,23 ± 0,14
15	0,10	3	0,33	1,65 ± 0,28
16	0,10	3	0,33	2,52 ± 0,72
17	0,10	3	0,33	2,06 ± 0,35
18	0,10	3	0,33	2,16 ± 0,49

n_E: número estándar de experimentos.

Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (Buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen total de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,033-0,22 g_{PL}/g_{Aceite}. Relación agua/sustrato: entre 5,2-13 g_{Agua}/g_{Aceite}.

Para determinar si efectivamente los factores elegidos tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta, fue necesario realizar el análisis estadístico del modelo. En primer lugar, se observó el gráfico de Box y Cox. Este gráfico es una herramienta que permite determinar, de ser necesario, la transformación matemática más apropiada para aplicar a los valores de la respuesta. Dicha transformación tiene como objetivo mejorar el grado de homocedasticidad que demanda el modelo estadístico. Esta herramienta se encuentra incorporada en el programa estadístico utilizado que, de forma automática, calcula el parámetro λ , sugiriendo la transformación más apropiada. Las transformaciones más comunes corresponden a la inversa ($\lambda=-1$), logaritmo natural ($\lambda=0$), raíz cuadrada ($\lambda=0,5$), o $\lambda=1$ si no se requiere ninguna transformación. En el caso particular de DBB, se aplicó una transformación logarítmica de los datos. En segundo lugar, se analizaron los gráficos de probabilidad normal y de residuos (Figura 7.5), los cuales se utilizaron para evaluar la homocedasticidad y normalidad de los datos, respectivamente.

En el primer caso (Figura 7.5A), se observó una disposición relativamente lineal lo cual indica que los datos poseen una distribución normal. Se debe considerar que incluso los datos normales suelen mostrar cierta curvatura en forma de S alrededor de la línea de la figura. Por último, en el eje vertical de la Figura 7.5B se graficaron los residuos (diferencia entre los valores

experimentales y los valores predichos por el modelo) en función de los valores predichos ubicados en orden creciente. Como se puede observar, la dispersión de los puntos es aleatoria y no se observan curvaturas que puedan indicar la falta de homocedasticidad.

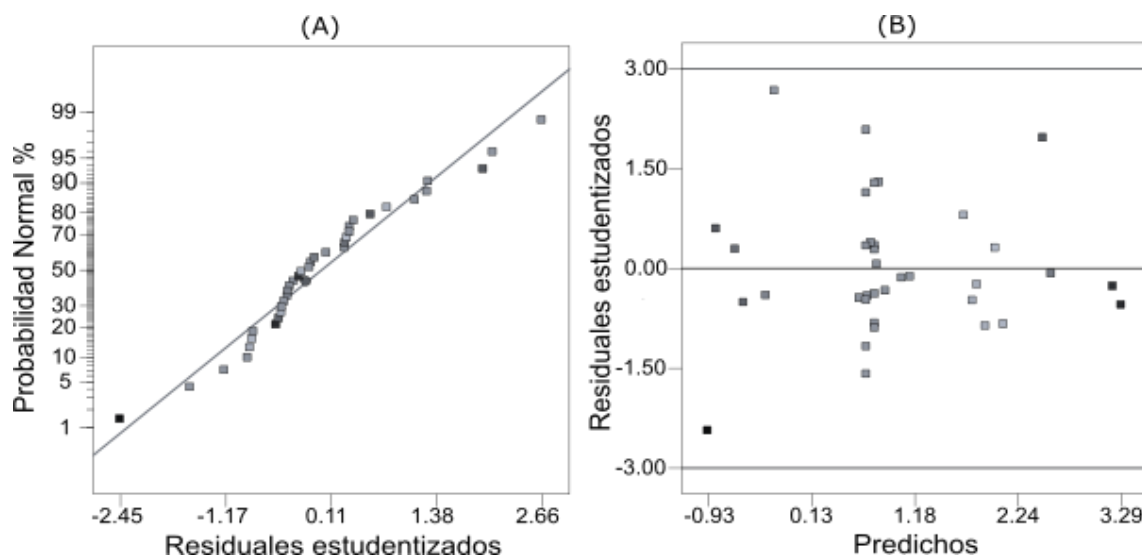


Figura 7.5 Gráficos estadísticos del DBB: (A) gráfico de probabilidad normal para análisis de normalidad de los datos, (B) gráfico de residuales para el análisis de homocedasticidad.

El modelo obtenido fue significativo ($p < 0,0001$) y no presentó evidencia de falta de ajuste ($p = 0,7037$) lo que significa que la superficie de respuesta descrita por el modelo fue representativa de los puntos experimentales. A su vez, el valor F de la fila bloque de la Tabla 7.4 (calculado a partir de los datos experimentales), resultó inferior al valor $F(35;35)=1,7571$ obtenido de las tablas de la distribución de probabilidad F de Snedecor, lo cual indica que no existieron evidencias estadísticas suficientes para identificar diferencias entre las muestras analizadas en los diferentes bloques. Por lo tanto, el mismo se puede utilizar para estudiar el comportamiento del sistema dentro de los rangos de las variables analizadas. Las variables L_{DBB} , A y O_{DBB} , la interacción $A \cdot O_{DBB}$, y los términos cuadráticos L_{DBB}^2 , A^2 y O_{DBB}^2 de la ecuación final fueron significativos ($p < 0,009$) mientras que el efecto de las interacciones $O_{DBB} \cdot L_{DBB}$ y $A \cdot L_{DBB}$ fueron estadísticamente insignificantes. Estos términos fueron eliminados del modelo ya que así mejoró el ajuste. Los parámetros codificados se presentan en la Tabla 7.4 donde se puede observar que el término lineal de la concentración de goma arábica (A) presentó el efecto más notable sobre la actividad lipásica específica, seguida por la cantidad de PL (término lineal de L_{DBB}), siendo ambos términos negativos. La Ecuación 7.3 muestra la ecuación final, con los términos significativos sin codificar. A continuación, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA),

cuyos resultados se muestran en la Tabla 7.4. Esta tabla permite identificar aquellas variables cuyos efectos e interacciones resultaron significativos.

Tabla 7.4 Tabla ANOVA para el diseño experimental Box-Behnken.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P	Parámetros codificados*
Bloque	0,0659	1	0,0659	1,4372	---	---
Modelo	36,3401	7	5,1914	113,3069	< 0,0001	---
L_{DBB}	7,6746	1	7,6746	167,5032	< 0,0001	-0,69
A	18,5448	1	18,5448	404,7536	< 0,0001	-1,08
O_{DBB}	6,4070	1	6,4070	139,8367	< 0,0001	0,63
$A \cdot O_{DBB}$	0,4258	1	0,4258	9,2938	0,0051	0,23
L_{DBB}^2	0,3676	1	0,3676	8,0238	0,0086	0,21
A^2	2,5354	1	2,5354	55,3370	< 0,0001	0,54
O_{DBB}^2	0,4154	1	0,4154	9,0665	0,0056	0,22
Residual	1,2371	27	0,0458	0,0000	0,0000	---
Falta de ajuste	0,6968	17	0,0410	0,7586	0,7037	---

Valores p inferiores a 0,05 corresponden a factores con efectos significativos sobre la variable de respuesta. (*) Coeficiente asociado a cada término del modelo matemático obtenido.

$$\begin{aligned} \ln(R) = & 2,96 - 30,27 L_{DBB} - 0,87 A + 7,35 O_{DBB} + 0,45 O_{DBB} \cdot A + \\ & 82,10 L_{DBB}^2 + 0,06 A^2 - 7,55 O_{DBB}^2 \end{aligned} \quad (Ec. 7.3)$$

En la Figura 7.6 puede observarse el comportamiento obtenido para los diferentes niveles de los factores O_{DBB} y A al utilizar 0,05, 0,1 y 0,15 g_{PL} , cuya interacción resultó significativa. Por otro lado, en la Figura 7.7 se muestran los resultados obtenidos al utilizar diferentes niveles de los factores L_{DBB} y A (Figura 7.7A), así como también L_{DBB} y O_{DBB} (Figura 7.7B), cuyas interacciones correspondientes no resultaron significativas.

Como puede observarse en las imágenes, la actividad específica del biocatalizador se incrementó al disminuir la cantidad de polvo e incrementar la cantidad de aceite. Estos resultados indicarían que el sustrato fue el reactivo limitante en la reacción de hidrólisis bajo las condiciones estudiadas. En otras palabras, la interfase aceite-agua podría estar saturada de PL. Al observar las cantidades de aceite en relación al agua y PL, se obtuvieron valores entre 1 y 10 $g_{Aceite}/g_{PL} \cdot g_{Agua}$ siendo inferiores al valor de referencia determinado en la Sección 6.3.5 (18 $g_{Aceite}/g_{PL} \cdot g_{Agua}$) por lo que la hipótesis de saturación de la interfase fue consistente con los resultados previos.

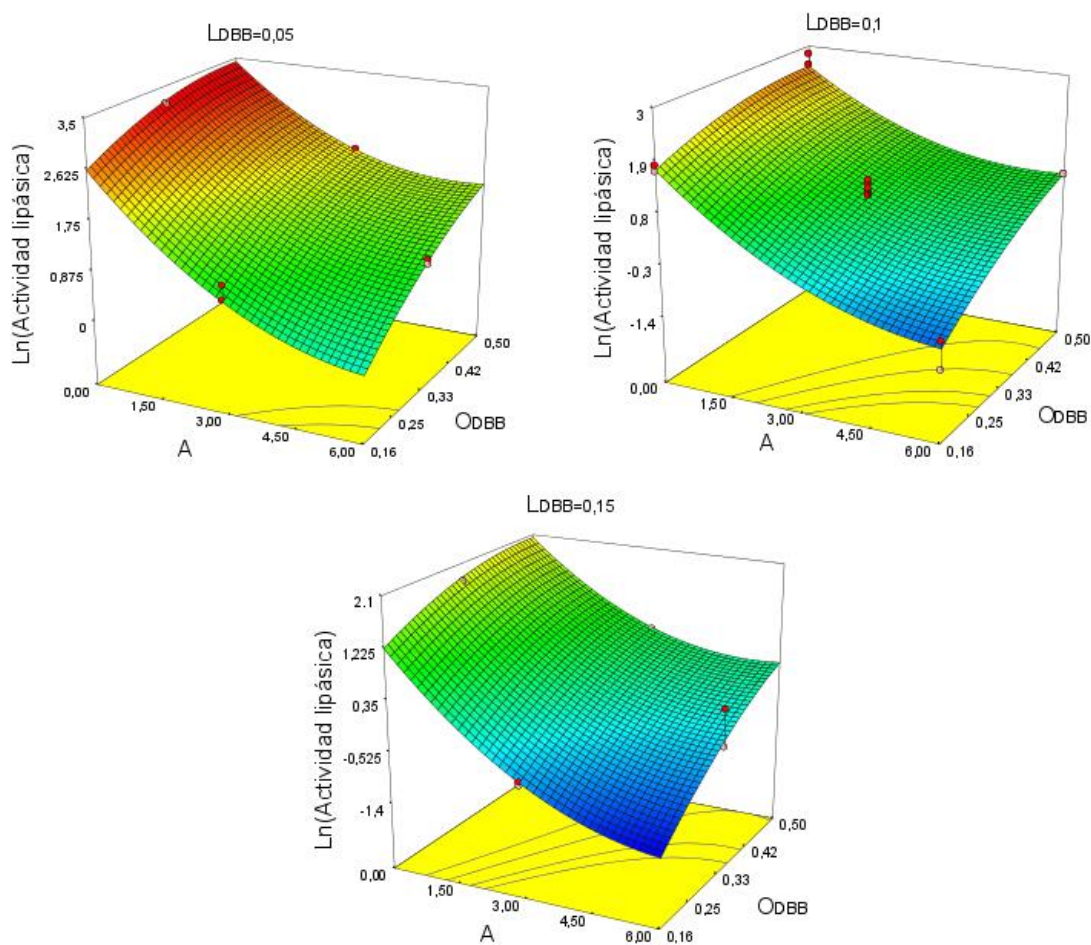


Figura 7.6 Resultados obtenidos para los diferentes niveles de los factores O_{DBB} y A. Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,033-0,22 g_{PL}/g_{Aceite}. Relación agua/sustrato: entre 5,2-13 g_{Agua}/g_{Aceite}.

Por otro lado, la Figura 7.6 permite apreciar fácilmente el efecto negativo de la goma en el medio de reacción. La concentración de surfactante mostró un efecto “anti-intuitivo”, ya que las emulsiones que serían más estables y presentarían gotas de aceite de menor tamaño no fueron suficientes para mejorar, ni siquiera para mantener, la actividad específica del biocatalizador. Como Morlon-Guyot et al. (2003) mencionaron en su trabajo, esto puede indicar que la goma arábiga podría tener al menos un componente que inhibe a la/s lipasa/s de la semilla de ricino. Esto significaría que el efecto inhibitorio fue más importante que los beneficios que pudiera tener el aumento de la superficie interfacial aceite-agua. Existen varias hipótesis que podrían explicar este comportamiento como, por ejemplo, la inactivación de PL y/o la adsorción de goma arábiga en la superficie de PL, dificultando parcialmente la interacción con el sustrato. También podría haber ocurrido una inhibición de PL debido a cualquier compuesto presente en

la goma (Cavalcanti et al. 2007) o bien que la goma hubiera presentado una mayor afinidad por la interfase agua-aceite, impidiendo el contacto entre el polvo y el aceite. Se esperaba que, al menos a altas concentraciones de aceite, este efecto negativo pudiera ser parcialmente compensado por una mayor disponibilidad de sustrato, pero esto no fue así. Se debe recordar que, en base a lo discutido anteriormente, la interfase probablemente estuviera saturada de PL. Esto significa que un incremento en el área interfacial debería haber incrementado la actividad lipásica específica si no existieran efectos negativos de este surfactante.

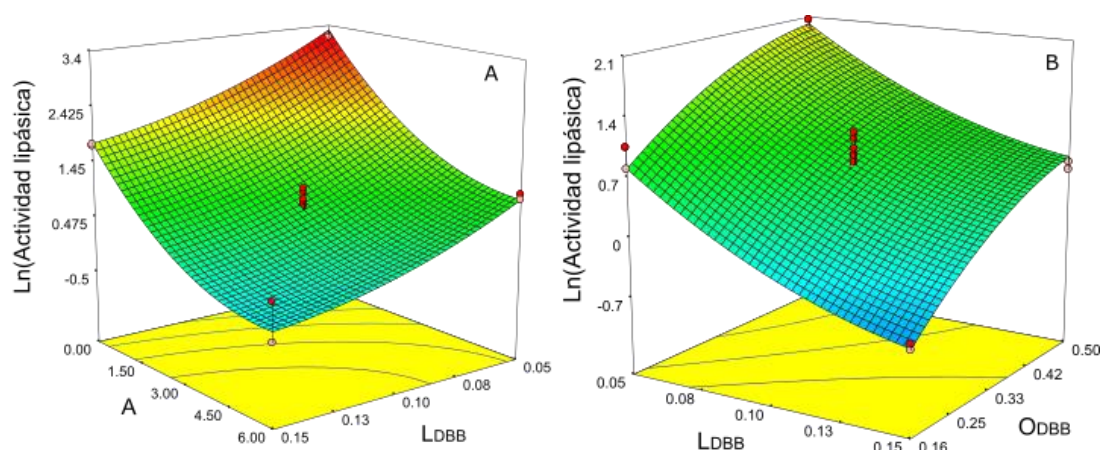


Figura 7.7 Resultados obtenidos al utilizar diferentes niveles de: (A) los factores A y L_{DBB} empleando O_{DBB}=0,33 (para O_{DBB}=0,16 y 0,50 se observó el mismo comportamiento) y (B) factores L_{DBB} y O_{DBB} empleando A=3 (para A=0 y 6 se observó el mismo comportamiento). Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,033-0,22 g_{PL}/g_{Aceite}. Relación agua/sustrato: entre 5,2-13 g_{Agua}/g_{Aceite}.

Por otra parte, estos resultados son complementarios a otros trabajos publicados (Avelar et al. 2013; Santos et al. 2013) donde se utilizó un reactor de tanque agitado en ausencia de goma arábica (condiciones de hidrólisis similares a las del presente estudio). Estos autores sugirieron que evitar la goma arábica sería conveniente ya que simplificaría los procesos industriales. Ahora, el presente estudio sugiere que la ausencia de goma arábica no sólo simplificaría los procesos industriales, sino que también mejoraría el rendimiento de la lipasa en las condiciones estudiadas. Sería posible pensar que los experimentos con L_{DBB} más bajo producirían R más alta sólo porque L_{DBB} es menor (ya que L se usa como denominador en el cálculo de R, mmol_{AGL}/h·g_{Aceite}·g_{PL}). Esto no es cierto ya que los experimentos que usan menores cantidades de PL sin goma arábica presentaron mayores porcentajes de hidrólisis (por ejemplo 50,63±1,24 % y 37,02±0,72 % a L_{DBB}=0,05 y 0,15 g, respectivamente, con O_{DBB}=0,33). Sin embargo, este efecto no pudo

observarse en los puntos de mayor concentración de goma arábica, probablemente debido a la influencia de los efectos negativos mencionados anteriormente.

Después de la optimización, la maximización de R dio como resultado un punto de actividad específica de $30,98 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ (valor predicho) utilizando $L_{\text{DBB}}=0,05 \text{ g}$, $A=0 \%$ y $O_{\text{DBB}}=0,5$. Este punto se encuentra en el borde de la superficie de respuesta y por lo tanto no se puede asegurar que corresponde a un máximo real ya que el modelo no predice lo que sucede más allá de este punto. Por este motivo, se realizaron más ensayos para obtener los valores de los factores que realmente maximizan R. De todas formas, la actividad específica máxima predicha dentro del DBB fue validada experimentalmente obteniendo un valor de $24,85\pm 4,11 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$. Basándose en los resultados de repetitividad analizados en la Sección 6.3.2, se puede decir que el modelo proporciona una predicción relativamente buena de la actividad lipásica específica.

7.3.2 Diseño factorial

En el DF, la concentración de aceite y enzima se expandieron más allá de los rangos utilizados en el DBB y no se añadió goma arábica al medio, ya que demostró tener un efecto negativo sobre R. Los resultados se muestran en la Tabla 7.5, obteniendo actividades específicas entre $22,11 \pm 6,24$ y $40,32 \pm 2,24 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$, presentando actividades mucho más altas que las alcanzadas en la DBB ($0,37 \pm 0,15$ y $23,90 \pm 0,59 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$). Para este último, sólo el 5 % de los experimentos superaron los $20,00 \text{ mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ mientras que dicho porcentaje alcanzó el 95 % para el DF.

Tabla 7.5 Respuestas obtenidas para cada experimento del DF.

nE (#)	nA (#)	L_{DBB}	O_{DBB}	Actividad específica (R) $\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$
1	7	0,0050	0,50	$40,32 \pm 2,24$
2	3	0,0050	0,75	$34,29 \pm 3,67$
3	12	0,0050	1,00	$34,51 \pm 3,09$
4	2	0,0275	0,50	$36,32 \pm 0,60$
5	10	0,0275	0,75	$29,94 \pm 10,41$
6	5	0,0275	1,00	$29,32 \pm 5,41$
7	8	0,0500	0,50	$24,86 \pm 4,12$
8	1	0,0500	0,75	$26,95 \pm 5,78$
9	9	0,0500	1,00	$25,46 \pm 3,47$
10	6	0,0275	0,75	$38,21 \pm 0,96$
11	11	0,0275	0,75	$34,40 \pm 12,47$
12	4	0,0275	0,75	$22,11 \pm 6,24$

nE: número estándar de experimentos, nA: número aleatorio de experimento correspondiente al orden en que se realizó cada uno.

Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (Buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen total de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,0022-0,033 $\text{g}_{\text{PL}}/\text{g}_{\text{Aceite}}$. Relación agua/sustrato: entre 3,2-5,2 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Aceite}}$.

El porcentaje máximo de hidrólisis alcanzado en el DF también fue cercano al 60 % ($n_E=8$, DF), pero en este caso se utilizó una mayor concentración de aceite y una menor cantidad de PL en comparación con el ensayo $n_E=11$ del DBB. Esta información indica una marcada mejora entre las condiciones del DF frente al DBB ya que se requiere menos PL para producir una mayor cantidad de AGL.

Nuevamente, se analizó el gráfico de Box y Cox, el cual no sugirió la necesidad de aplicar ninguna transformación de los datos. La Figura 7.8 muestra los gráficos de probabilidad normal y de residuos, los cuales sugieren que no existen problemas marcados de homocedasticidad y normalidad de los datos.

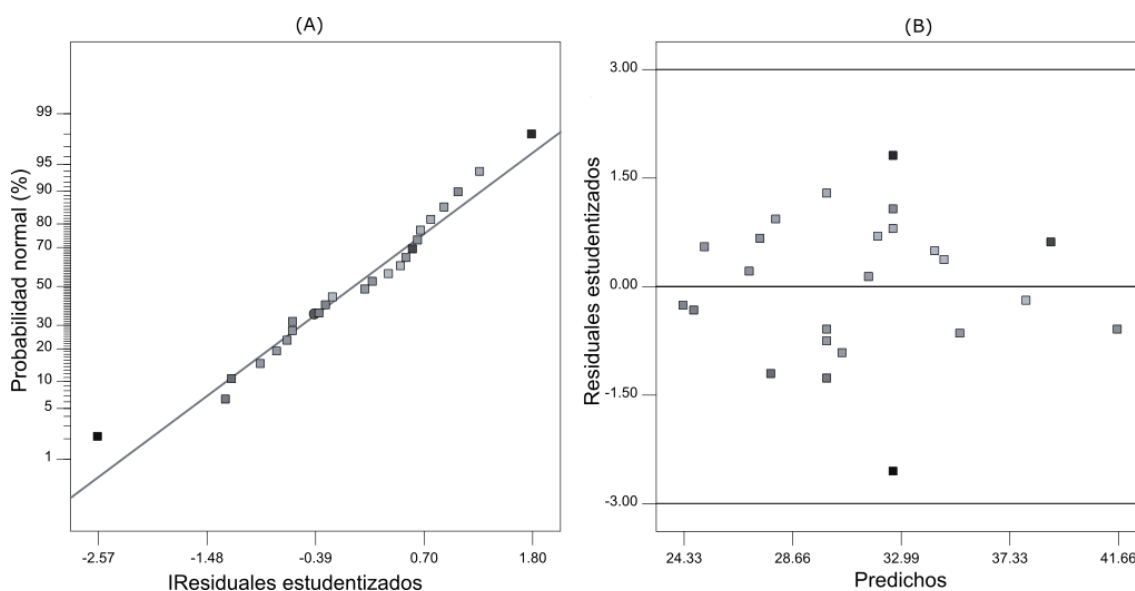


Figura 7.8 Gráficos estadísticos del DF: (A) gráfico de probabilidad normal para análisis de normalidad de los datos, (B) gráfico de residuales para el análisis de homocedasticidad.

En la Tabla 7.6 se muestran los resultados del ANOVA del DF. Al analizar el efecto de los bloques (Tabla 7.6), no se encontraron evidencias de que existieran diferencias entre los mismos ($F(23,23)=2,0144$). Por otro lado, la falta de ajuste no fue significativa ($p=0,9957$), lo que significa que el modelo propuesto se ajusta bien a los puntos experimentales. Si bien el modelo resultó significativo, solo el parámetro L_{DF} presentó evidencias estadísticas de un efecto sobre R

($p=0,0072$). La ecuación final del modelo, incluyendo todos los términos se representa en la Ecuación 7.4.

$$R = 49,87 - 449,89 L_{DF} - 15,98 O_{DF} + 285,21 O_{DF} \cdot L_{DF} \quad (\text{Ec. 7.4})$$

Los resultados muestran que R continúa incrementando a medida que se reduce L_{DF} , es decir, se mantuvo el mismo efecto observado en el DBB. En cuanto a O_{DF} , no se observó un efecto significativo sobre R, ni en la interacción $L_{DF} \cdot O_{DF}$. La superficie de respuesta obtenida se muestra en la Figura 7.9.

Tabla 7.6 Tabla ANOVA para el diseño experimental factorial.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Bloque	41,96	1	41,96	1,1239	---
Modelo	408,59	3	136,20	3,6479	0,0313
O_{DF}	49,70	1	49,70	1,3310	0,2629
L_{DF}	338,31	1	338,31	9,0612	0,0072
$O_{DF} \cdot L_{DF}$	20,59	1	20,59	0,5515	0,4668
Residual	709,38	19	37,34	---	---
Falta de ajuste	195,69	13	15,05	0,1758	0,9957

Valores de p inferiores a 0,05 corresponden a factores con efectos significativos sobre la variable de respuesta.

Al calcular las cantidades de aceite en relación al agua y PL, se obtuvieron valores entre 3 y 63 $\text{g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$. De acuerdo al valor de referencia establecido en la Sección 6.3.5 para determinar si la interfase se encuentra o no saturada con PL ($<18 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$ interfase saturada, $>30 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$ interfase insaturada), los valores del modelo parecerían indicar que dentro de los rangos analizados, el sistema cambió de la condición de saturación a la de insaturación de la interfase. Al realizar un análisis más detallado, se observó que todas las condiciones de insaturación correspondieron a aquellas reacciones en donde se utilizó $L_{DF}=0,005$, mientras que el resto se encontró por debajo de 18. Con estos resultados, se podría inferir que la interfase se saturó de PL en un punto intermedio entre 0,005 y 0,0275 g_{PL} para cualquier valor de O_{DF} . Por otro lado, la no significancia del factor O_{DF} fue inesperada debido a que en el primer y segundo diseño se utilizaron rangos consecutivos de esta variable. En otras palabras, las relaciones aceite:agua (v/v) empleadas en cada diseño fueron entre 0,08:1-0,21:1 y 0,20:1-0,35:1, respectivamente, abarcando una amplitud para dichos rangos de 0,13 (DBB) y 0,15 (DF),

lo que indica que la concentración de aceite cambia de significativa a no significativa en los rangos analizados. Podría ser que para obtener un efecto significativo de la concentración de aceite, fuera necesario utilizar un rango más amplio de dicho factor, ya que es de esperar que, en algún punto, el sistema se vea afectado por una concentración de aceite lo suficientemente elevada lo que podría generar (a) un incremento de la superficie interfacial conllevando un posible incremento de la actividad específica o (b) invertir la emulsión o generar problemas de mezclado y tamaño de gota grande que disminuya el área de la interfase disponible produciendo una posible disminución de la actividad específica.

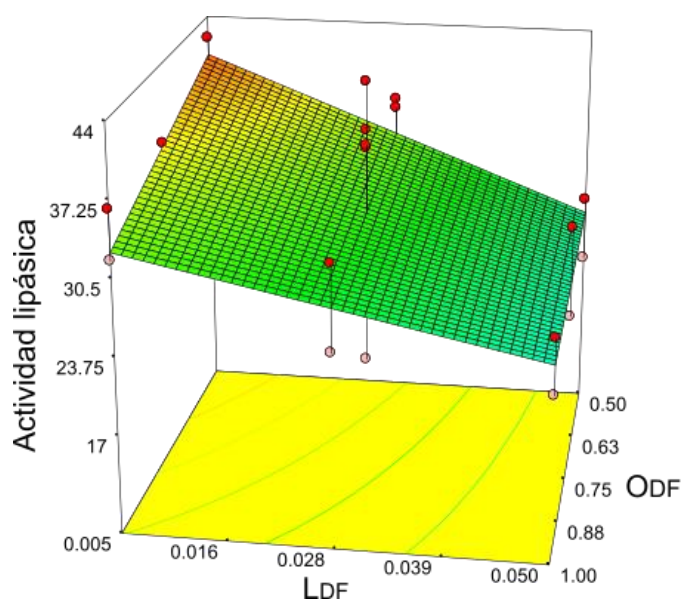


Figura 7.9 Superficie de respuesta para el diseño experimental factorial. Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción igual a 10 mL. Condiciones de reacción: 37 °C a pH 4 (buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,0022-0,033 g_{PL}/g_{Aceite}. Relación agua/sustrato: entre 3,2-5,2 g_{Agua}/g_{Aceite}.

A pesar de que, nuevamente, no hay suficiente información para demostrar un máximo local, el DF demostró que el PL puede hidrolizar eficientemente el sustrato en las condiciones ensayadas (37 °C, pH=4,4, 0,05-0,005 g_{PL} y 0,5-1 g_{Aceite}/g_{Agua} en emulsión de sustrato, en ausencia de surfactante).

Al comparar el PL obtenido en este estudio con otros polvos de ricino reportados en la literatura, se observa una alta variabilidad en los resultados. Santos et al. (2013) obtuvo

aproximadamente $524 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ bajo las mismas condiciones utilizadas en el punto central del DBB ($n_E=13-18$) y usando trioleína como sustrato, mientras que en el DBB se obtuvo un valor promedio de $46,55 \pm 11,9 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$. Incluso han reportado una actividad específica aún mayor, bajo las mismas condiciones, pero utilizando 50°C ($708 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) en lugar de 37°C . En la presente tesis, en todas las reacciones realizadas a 50°C (Sección 8.2.2.2), la actividad fue muy baja o nula. Por el contrario, Cavalcanti et al. (Cavalcanti et al. 2007) reportó la inactivación de la lipasa a 50°C y la temperatura de reacción óptima entre 25 y 35°C , asemejándose a los resultados de esta tesis. Estos autores obtuvieron un valor de $28 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ utilizando Triton X-100 como surfactante y aceite de oliva como sustrato a 37°C a pH 4 (buffer de acetato, 50 mM). Otro trabajo (Aguieiras et al. 2014) utilizó PL para hidrolizar aceite de macauba en un sistema buffer:aceite (1:1 v/v, buffer de acetato 100 mM , pH 4), con un grado de hidrólisis del $76,7\%$ equivalente a $905 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$. En resumen, la actividad específica más alta obtenida entre todas las condiciones estudiadas fue de $1308,09 \pm 66,12 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$ ($n_E=10$ de FD), similar a dicho valor y superior a los valores reportados por los otros autores. Estas diferencias en la actividad lipásica pueden deberse a las condiciones de optimización propuestas en este trabajo, pero también podrían atribuirse a otras variables como el genotipo (Cavalcanti et al. 2007), las condiciones de crecimiento de las plantas y algunas diferencias entre las condiciones de reacción o el método de cuantificación.

Como ya se ha mencionado anteriormente (Sección 1.2), los MAG, DAG y AGL obtenidos en la hidrólisis del aceite se utilizan en la formulación de varios productos industriales tales como detergentes, biodiesel, emulsionantes, etc. Moya-Ramírez et al. (2016) investigaron la hidrólisis de aceites utilizando diferentes lipasas microbianas para obtener productos de hidrólisis empleando goma arábica como surfactante. En dicho trabajo, los autores informaron relaciones de hidrólisis entre $0,4$ y $0,63$ aproximadamente, utilizando diferentes lipasas microbianas comerciales libres para hidrolizar aceites emulsionados (tiempo de reacción: 8 h). Esas relaciones son equivalentes a productividades promedio de 1540 y $2425 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{biocatalizador}}$, respectivamente. Para estos valores específicos, se encontró una relación de $1,0$ y $0,56$ moles de MAG y DAG por mol de glicerol en los productos. Por otra parte, en otro trabajo (Vescovi et al. 2016) se informó un nivel de hidrólisis del orden del 30% , equivalente a una actividad específica de $209 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{biocatalizador}}$, utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada ($1:100 \text{ m/v}$), sin surfactante y con una relación aceite:agua de $1:4$ (v/v) a 30°C . En esta tesis y como se mencionó anteriormente, se obtuvo la máxima actividad específica ($1308,09 \pm 66,12 \mu\text{mol}_{\text{AGL}}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$, $n_E=10$ del FD) sin utilizar goma arábica, lo que demuestra que, a pesar de que PL es una lipasa de origen vegetal, su actividad no está lejos de los valores de

productividad reportados para las lipasas microbianas y en algunos casos puede ser incluso mayor. Además, utilizando PL de ricino, se encontró la aparición de glicerol a niveles de hidrólisis bajos (Tabla 7.7), incrementando su concentración para mayores porcentajes de hidrólisis (relaciones molares de AGL/glicerol superiores a 3 en todos los experimentos).

Tabla 7.7 Porcentaje de hidrólisis (m/m) y composición de productos de reacción (AGL, MAG, DAG, TAG y G en μ moles) para los puntos experimentales del DF.

nE	AGL % m/m	AGL (μ mol)	MAG (μ mol)	DAG (μ mol)	TAG (μ mol)	G (μ mol)
1	9,67 \pm 0,49	376,37 \pm 115,65	27,00 \pm 6,44	93,06 \pm 29,56	1600,55 \pm 73,45	76,44 \pm 24,40
2	8,35 \pm 0,81	336,40 \pm 1,37	24,27 \pm 5,16	83,58 \pm 1,94	2140,85 \pm 2,58	68,10 \pm 4,54
3	8,39 \pm 0,68	468,27 \pm 30,39	34,85 \pm 1,33	123,19 \pm 16,56	2283,40 \pm 59,05	91,80 \pm 3,73
4	44,72 \pm 0,73	1698,66 \pm 107,47	49,97 \pm 1,36	101,75 \pm 7,12	1163,66 \pm 39,85	498,99 \pm 34,36
5	37,01 \pm 12,59	1778,82 \pm 80,20	67,04 \pm 25,30	151,03 \pm 68,87	1552,17 \pm 119,41	497,91 \pm 13,09
6	36,26 \pm 6,55	2103,20 \pm 293,12	79,46 \pm 3,04	199,05 \pm 12,13	1793,26 \pm 185,87	581,74 \pm 91,64
7	55,45 \pm 9,05	2255,16 \pm 841,67	44,47 \pm 9,75	81,86 \pm 13,65	890,29 \pm 250,32	694,79 \pm 269,50
8	60,05 \pm 12,71	2736,10 \pm 756,55	57,27 \pm 34,27	109,59 \pm 78,24	1277,27 \pm 370,87	837,32 \pm 203,26
9	56,78 \pm 7,64	3433,48 \pm 317,14	80,29 \pm 2,72	165,80 \pm 4,30	1234,50 \pm 257,08	1035,70 \pm 105,33
10	47,01 \pm 1,16	1643,81 \pm 3,50	47,09 \pm 1,56	94,45 \pm 3,76	1692,36 \pm 55,72	485,05 \pm 0,96
11	42,40 \pm 15,07	1937,75 \pm 590,93	69,83 \pm 48,05	150,93 \pm 127,42	1542,86 \pm 326,01	549,06 \pm 122,47
12	27,54 \pm 7,55	878,18 \pm 466,27	33,14 \pm 11,33	84,56 \pm 25,76	1961,97 \pm 164,40	242,45 \pm 139,28

nE: número estándar de experimento.

Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (Buffer de acetato 100 mM) durante 1,5 h. Volumen total de reacción: 10 mL. Relación PL/sustrato: entre 0,0022-0,033 g_{PL}/g_{Acéite}. Relación agua/sustrato: entre 3,2-5,2 g_{Agua}/g_{Acéite}.

Por lo tanto, se podría considerar que la lipasa no presentó especificidad de posición, en concordancia con lo sugerido por Noma et al. (1971). Estos autores estudiaron la especificidad posicional de la lipasa de ricino usando trioleína como sustrato y buffer de acetato (100 mM, pH 4,0) en el medio de reacción. También mencionaron que la reacción de acil-migración no ocurrió entre los isómeros de diacilglicerol. Con los resultados obtenidos en el presente capítulo, no se puede asegurar que la acil-migración no exista ya que algunas condiciones de reacción, tales como el polvo lipásico y temperatura de reacción, no son las mismas que las informadas por dichos autores.

7.4 Conclusión

En este capítulo se presentó una evaluación de la actividad lipásica específica de polvo de semilla de ricino en reacciones de hidrólisis utilizando modelos de superficie de respuesta

considerando diferentes variables de reacción (concentración de goma arábica, proporción de aceite de girasol alto oleico y cantidad de polvo de lipasa). En el diseño Box-Behnken, el modelo obtenido se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales. El modelo fue altamente significativo, así como los parámetros asociados al término lineal de cantidad de PL (L_{DBB}), goma arábica en la solución de goma arábica:agua (A) y concentración de aceite en la emulsión (O_{DBB}), junto con otros términos. La actividad lipásica específica aumentó al utilizar baja concentración de PL y alta concentración de aceite en ausencia de goma arábica. Se concluyó que la goma arábica produjo una contribución negativa sobre la reacción enzimática y que la actividad máxima predicha se localizó en el borde del área estudiada. Además, la validación de la actividad lipásica máxima demostró que el modelo ofrece una buena predicción de los ensayos experimentales. Por otro lado, el diseño factorial se ajustó bien a los datos experimentales y también fue significativo. Nuevamente, se determinó que los efectos de la concentración de polvo fueron significativos, señalando un incremento de la acción hidrolítica al utilizar concentraciones bajas del mismo. El diseño factorial demuestra que el PL puede hidrolizar eficientemente el aceite dentro de la región experimental estudiada. Además, esta lipasa pareciera no mostrar especificidad para las posiciones de los ácidos grasos en las moléculas de TAG ya que las relaciones molares de AGL/ glicerol obtenidas fueron superiores a 3 en todos los experimentos. Finalmente, esta enzima vegetal demostró poder competir con enzimas microbianas en reacciones de hidrólisis de aceite bajo las condiciones estudiadas.

Con los resultados de este capítulo se publicó el artículo, "Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of arabic gum, lipase and oil concentrations" en la revista indexada Journal of the American Oil Chemist Society (94:741-745) ISSN 1558-9331 y el trabajo completo "Hydrolysis reaction using Ricinus communis powder as biocatalyst: lipase activity optimization" en el VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, realizado en la ciudad de Córdoba (2 al 3 de Noviembre de 2016). ISBN 978-987-45380-3-1.

7.5 Referencias

Aguieiras, E.C.G., Cavalcanti-Oliveira, E.D., de Castro, A.M., Langone, M.A.P. & Freire, D.M.G. (2014). Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. Fuel 135: 315-321.

Avelar, M.H.M., Cassimiro, D.M.J., Santos, K.C., Domingues, R.C.C., De Castro, H.F. & Mendes, A (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products* 44: 452-458.

Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C. & Verger, R. (2000). Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 133-153.

Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007). Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 7: 57-66.

Eastmond, P.J. (2004). Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45540-45545.

Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, 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. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 597: 179-186.

Lombard, S., Helmy, M.E. & Piéroni, G. (2001). Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *The Biochemical Journal* 358: 773-781.

Morlon-Guyot, J., Helmy, M., Lombard-Frasca, S., Pignol, D., Piéroni, G. & Beaumelle, B. (2003). Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry* 278(19): 17006-11.

Moya-Ramírez, I., Fernández-Arteaga, A., Jurado-Alameda, E. & García-Román, M. (2016). Waste frying oils as substrate for enzymatic lipolysis: optimization of reaction conditions in O/W emulsion. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93: 1487-1497.

Noma, A. & Borgström, B. (1971). The acid lipase of castor beans: positional specificity and reaction mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 227: 106-115.

Palekar, A.A., Vasudevan, P.T. & Yan, S. (2000). Purification of lipase: A review. *Biocatalysis and Biotransformation* 18: 177-200

Rodrigues, M.I. & Iemma, A.F. (2015). *Experimental design process and optimization*. Nueva York: CRC Press.

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R. & Mendes, A. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant

seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Industrial Crops and Products* 49: 462-470.

Schieltz, D.M., McWilliams, L.G., Kuklenyik, Z., Prezioso, S.M., Carter, A.J., Williamson, Y.M., McGrath, S.C., Morse, S.A. & Barr, J.R. (2015). Quantification of ricin, RCA and comparison of enzymatic activity in 18 *Ricinus communis* cultivars by isotope dilution mass spectrometry. *Toxicon* 95: 72-83.

Tiss, A., Carrière, F., Douchet, I., Patkar, S., Svendsen, A. & Verger, R. (2002). Interfacial binding and activity of lipases at the lipid-water interface: Effects of gum arabic and surface pressure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 26: 135-145.

Tüter, M. (1998). Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(3): 417-420.

Vescovi, V., Jimenez Rojas, M., Baraldo, A., Botta, D.C., Santana, F.A.M., Costa, J.P., Machado, Honda M.S., Kasuyoshi Honda, V., de Lima Camargo, R. & Tardioli, P.W. (2016). Lipase-catalyzed production of biodiesel by hydrolysis of waste cooking oil followed by esterification of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93(12): 1615-1624

CINÉTICA DE HIDRÓLISIS EMPLEANDO POLVOS DE RICINO COMO BIOCATALIZADOR

8.1 Introducción

La catálisis es un fenómeno en donde una cantidad relativamente pequeña de un compuesto, denominado catalizador, aumenta la velocidad de una reacción química sin ser consumida por la misma. A su vez, ofrece un mecanismo alternativo que es energéticamente favorable en comparación con la reacción equivalente sin catalizador, permitiendo así que los procesos se lleven a cabo en condiciones de presión y temperatura industrialmente más favorables. Si bien actualmente las reacciones catalíticas son ampliamente utilizadas en muchos procesos industriales, la catálisis no fue reconocida sino hasta el siglo XIX (Vannice et al. 2005).

Los catalizadores pueden encontrarse en una amplia variedad de formas, pueden ser átomos, moléculas, enzimas o superficies sólidas. Además, pueden emplearse en diversos entornos: líquidos, gaseosos o en la superficie de sólidos. Dentro de la catálisis, es habitual distinguir tres subgrupos: homogénea (misma fase de reacción), heterogénea (sobre superficie sólida) o la biocatálisis en donde se utilizan enzimas como catalizadores altamente específicos y eficientes (Chorkendorff et al. 2007). El estudio de la estructura de dichas enzimas permite conocer la secuencia lineal de los aminoácidos que conforman las cadenas proteicas, he incluso existen técnicas que permiten obtener una imagen tridimensional de las mismas. Sin embargo, esto solo representa un momento estático de la enzima. Para poder apreciar el comportamiento de estos catalizadores en acción, es necesario estudiar la denominada cinética enzimática. A grandes rasgos, el estudio de este tema contempla el análisis de la velocidad de reacción frente a diferentes condiciones como pH, temperatura y fuerza iónica, entre otros. Estas investigaciones son necesarias para poder utilizar a las enzimas como herramienta en el ensayo de metabolitos específicos, diagnósticos clínicos o análisis de alimentos (Engel 1981).

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

Los experimentos tradicionales utilizados para analizar la cinética de una reacción enzimática involucran ensayos en donde se varía la concentración de sustrato (S) al mismo tiempo que se mide la velocidad inicial de la reacción (a tiempos cortos) manteniendo constante el resto de las variables. Es de esperar que, a concentraciones bajas de sustrato, la enzima (E) se encuentre en exceso, obteniendo velocidades mayores a medida que se incrementa la concentración de S. Por otro lado, si la cantidad de S sigue aumentando, se alcanzará una concentración a partir de la cual ya no se observarán cambios en la velocidad de reacción debido a que E se transformará en el factor limitante. A partir de esta curva es posible obtener parámetros característicos de la cinética utilizando el modelo propuesto por Michaelis-Menten, entre otros (Enzyme kinetics 2017). En relación a las lipasas, hasta el momento se han reportado numerosos trabajos que determinan estos parámetros característicos, tanto para lipasas de origen animal y microbiano, como vegetal (Hasan et al. 2009; Christiansen et al. 2010). Dentro de estas últimas se pueden mencionar las lipasas de germen de trigo, de granos de café y de semillas de laurel y ricino, entre otras (Muto et al. 1974; Jing et al. 2003; Isbilir et al. 2008; Patui et al. 2014).

Además del enfoque tradicional, la cinética también puede analizarse en cuanto a la producción del compuesto de interés en relación al tiempo de reacción. Existen diferentes trabajos que consideran la evolución en el tiempo de la reacción de hidrólisis de aceite utilizando lipasa proveniente de semillas de ricino (Hills et al. 1987; Lin 1986; Avelar et al. 2013; Bressani et al. 2014). Los tiempos de reacción empleados en estas investigaciones son relativamente cortos (2,5 h máximo), y si bien en algunos casos se alcanzan niveles elevados de hidrólisis, el análisis de la cinética es netamente experimental y no involucra el modelado matemático de los datos. Hasta el momento, no se tiene conocimiento de la existencia de bibliografía que proponga el modelado matemático y análisis de parámetros para la reacción de hidrólisis empleando biocatalizadores obtenidos de la semilla de ricino, ni de ninguna otra planta (sin considerar el enfoque de tipo Michaelis-Menten).

Por este motivo en este capítulo se decidió profundizar en el estudio de la evolución de la producción de ácidos grasos libres (AGL), considerando tiempos de reacción cortos y largos, empleando polvo lipásico de semillas de ricino (PL). En primer lugar, se realizó un estudio específico para determinar si el efecto negativo de la goma arábiga discutido en el Capítulo 7 también se manifiesta una vez alcanzado el equilibrio de la reacción (tiempos largos). En segundo lugar, se obtuvieron las curvas de cinética correspondientes a diferentes temperaturas y concentraciones de PL. Por último, se prosiguió con el modelado matemático de dichas curvas de

acuerdo a dos propuestas diferentes: modelado empírico y modelado basado en primeros principios. Los fundamentos teóricos necesarios, serán desarrollados en mayor profundidad en la sección de metodología.

8.2 Fase I: obtención de datos empíricos de cinética

8.2.1 Materiales y métodos

8.2.1.1 *Materiales y métodos generales*

Se utilizaron semillas de ricino (*Ricinus communis*) de una planta ornamental. El aceite de girasol alto oleico se compró en un supermercado local. La goma arábica fue de grado extra puro (Anedra) y todos los reactivos, gases y solventes utilizados fueron de grado cromatográfico o pro-análisis.

Los polvos enzimáticos de semillas de ricino fueron obtenidos a partir del descascarado y molienda de las semillas (molienda B, Sección 1.3.2.2), que luego fueron desaceitadas empleando el método Acetona-16h (Sección 1.3.2.3).

El %AGL (m/m) y la actividad lipásica específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) fueron calculados mediante la determinación simultánea de AGL, MAG, DAG y TAG por CLG (Sección 2.5.3) utilizando la extracción B (Sección 1.5.3.1.2) que emplea éter etílico y hexano como solventes para la recuperación de los subproductos luego de la reacción.

8.2.1.2 *Efecto de la goma arábica a tiempos largos de reacción*

Se decidió evaluar el efecto de la goma arábica a tiempos largos de reacción para determinar si se mantienen los efectos observados a tiempos cortos de reacción (disminución de la actividad lipásica específica, Sección 7.3.1). Se utilizaron dos medios de reacción conteniendo concentraciones diferentes de aceite, en presencia y en ausencia de goma arábica, a 0,5 y 24 h de reacción. Se utilizó una temperatura de 37 °C y 0,05 g_{PL} . El volumen final de reacción fue 5 mL. Los diferentes medios ensayados se describen en la Tabla 8.1.

La concentración de goma arábica se eligió de forma tal que permitió la comparación de resultados entre 0,21:1-CG y 1:1-CG (ver nomenclatura en Tabla 8.1). Debido a que este surfactante fue disuelto en la fase acuosa, su concentración en la interfase agua-aceite fue similar para ambos medios de reacción estudiados.

Tabla 8.1 Descripción de la composición de los medios de reacción empleados para estudiar el efecto de la goma arábica a tiempos de reacción largos.

Medio de reacción*	Composición	Característica diferencial	$g_{\text{Agua}}/g_{\text{Sustrato}}$
0,21:1-CG	- 2,5 mL buffer acetato (100 mM, pH 4,4) - 2,5 mL emulsión: 0,5 g aceite/ g solución de goma arábica 3 % (m/m)	Relación aceite:agua 0,21:1 (v/v) o en presencia de goma arábica	5,12
0,21:1-SG	- 2,5 mL buffer acetato (100 mM, pH 4,4) - 2,5 mL emulsión: 0,5 g aceite/ g agua	Relación 0,21:1 (v/v) aceite:agua en ausencia de goma arábica	5,12
1:1-CG	- 2,5 mL aceite - 2,5 mL solución de goma arábica en buffer de acetato (100 mM, pH 4,4) 3 % (m/m)	Relación 1:1 (v/v) aceite:agua en presencia de goma arábica	1,15
1:1-SG	- 2,5 mL aceite - 2,5 mL buffer de acetato (100 mM, pH 4,4)	Relación 1:1 (v/v) aceite:agua en ausencia de goma arábica	1,15

*CG: con goma arábica, SG: sin goma arábica.

8.2.1.3 Cinética de la reacción de hidrólisis

A grandes rasgos se evaluó la cinética de reacción desde dos aspectos diferentes. En primer lugar, se analizó el efecto de la temperatura y la concentración de PL sobre las curvas de cinética. En segundo lugar, se evaluó el efecto de otras variables como la presencia de goma arábica, o la concentración de aceite manteniendo la temperatura constante.

Las diferentes temperaturas (30, 37, 45 y 50 °C) se evaluaron utilizando el medio de reacción 1:1 descrito en la Sección 2.4.8 empleando 0,0137 y 0,0274 g_{PL} (ésta última no se analizó a 50 °C). En todos los casos la relación agua/aceite fue 1,15 $g_{\text{Agua}}/g_{\text{Aceite}}$ mientras que la relación catalizador/aceite fue 0,006 y 0,012 $g_{\text{PL}}/g_{\text{Sustrato}}$, para la menor y mayor masa de PL, respectivamente. Los tiempos de reacción fueron diferentes de acuerdo a la temperatura; en todos los casos se evaluó la reacción a 0,5 y 24 h, pero para las temperaturas de 30 y 37 °C también se emplearon tiempos de reacción intermedios (1,5, 3 y 12 h). También se evaluó la reacción a 48 h empleando la menor cantidad de PL para 30 y 37 °C. Las curvas correspondientes a 30 y 37 °C, para ambas cantidades de PL, fueron utilizadas en el modelado matemático que será discutido en la siguiente sección.

Por otro lado, se construyeron dos curvas adicionales realizadas a 37 °C utilizando diferentes medios de reacción que los mencionados anteriormente. El primero tuvo una composición utilizada previamente en el primer diseño experimental ($n_E=11$, Sección 7.2.4.4), empleando tiempos de reacción de 0,5, 2 y 24 h, 0,05 g_{PL} y el medio de reacción "0,21:1-CG" descrito en la Tabla 8.1. Al mismo tiempo también se generó una curva de cinética empleando

una condición utilizada en el segundo diseño experimental ($n_E=6$, Sección 7.2.4.5) que corresponde a una concentración aceite:agua de 0,32:1 (v/v) sin goma arábica, empleando 0,0137 g_{PL}. En este caso los tiempos de reacción fueron 0,5, 1,5 y 24 h.

8.2.2 Discusión de resultados de la Fase I

8.2.2.1 Efecto de la goma arábica a tiempos largos de reacción

De acuerdo con los resultados del primer diseño experimental (DBB, Sección 7.3.1), la incorporación de la goma arábica en el medio de reacción resultó en un efecto negativo, disminuyendo la actividad lipásica específica a tiempos de reacción de 1,5 h. Por esta razón, el objetivo principal de esta experiencia fue evaluar si dicho efecto negativo es observado incluso a tiempos largos de reacción (24 h). Es importante destacar que el efecto potencialmente positivo de la goma arábica solo podría evaluarse al utilizar concentraciones de polvo que aseguren la saturación del área interfacial. En otras palabras, si la interfase no estuviera saturada de lipasa, entonces no tendría sentido adicionar surfactante ya que la función del mismo es disminuir la tensión interfacial, aumentando el número de gotas de aceite, lo que produciría una disminución del diámetro promedio de las mismas y a su vez un incremento en el área interfacial disponible para la reacción de hidrólisis. Bajo condiciones de saturación de la interfase, en presencia de goma y a tiempos de reacción largos podría suceder que la enzima se adapte a la presencia de este componente y que el rendimiento de la reacción se incremente en comparación con la reacción sin goma (a pesar de que a tiempos cortos los efectos sean inhibitorios).

Para evaluar estos efectos se consideraron medios de reacción utilizando dos proporciones diferentes de aceite:agua. La primera fue una proporción de aceite baja con respecto a la fase acuosa (0,21:1 aceite:agua, v/v) asemejándose a las proporciones evaluadas en el primer diseño experimental, pero utilizando una concentración de polvo que aseguró la saturación del área interfacial (considerando que una relación inferior a $18 \frac{\text{g}_{\text{Aceite}}}{\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}}$ corresponde a una interfase saturada de polvo, ver Sección 6.3.5). Por otro lado, en la segunda condición se utilizó una relación aceite:agua mayor (1:1) equivalente a $18 \frac{\text{g}_{\text{Aceite}}}{\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}}$ por lo que también corresponde a una concentración de saturación de la interfase.

En la Figura 8.1 se muestran los resultados de los experimentos de acuerdo a la masa neta de AGL producidos. El %AGL no se consideró como una medida apropiada para comparar muestras ya que, si bien existen condiciones de saturación en todos los medios de reacción, aquellas con mayor cantidad de aceite podrían presentar %AGL proporcionalmente más bajos que aquellos medios con poco aceite. Al analizar el efecto de la goma arábica en el medio de reacción con menor proporción de aceite (medios 0,21:1-CG y 0,21:1-SG), se observó una leve

disminución en la producción de AGL, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos, cuando se utiliza este surfactante. Esto verifica que, para esta concentración de aceite, el efecto negativo de la presencia de goma descrito en el capítulo de optimización (Sección 7.3.1), se mantuvo incluso a tiempos largos de reacción.

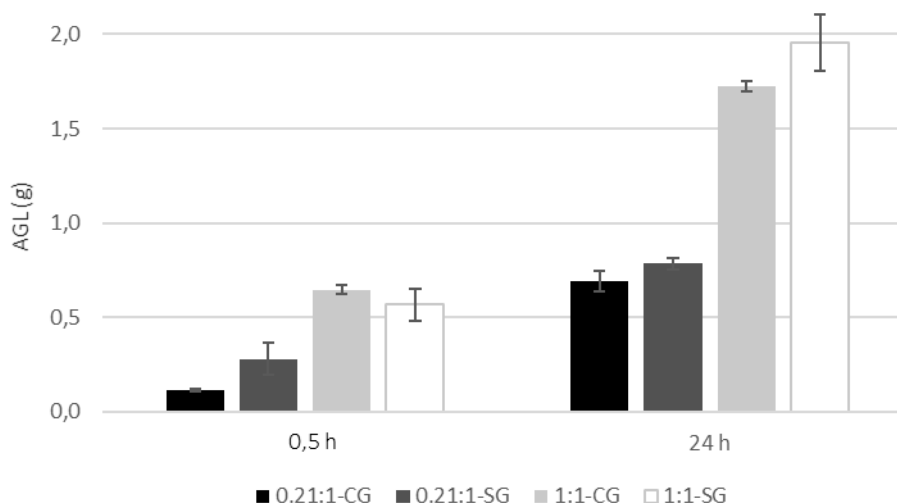


Figura 8.1 Efecto del uso de goma arábica como surfactante a tiempos de reacción de 0,5 y 24 h, utilizando proporciones diferentes de aceite:agua (v/v) en el medio de reacción (0,21:1 y 1:1) con y sin goma arábica (CG y SG). Los resultados se expresan en cantidades absolutas de AGL (g). Condiciones de reacción: 0,05 g_{PL}, 37 °C, volumen de reacción constante (5 mL), pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM). Relación catalizador/sustrato: 0,022 y 0,063 g_{PL}/g_{Sustrato}; relación agua/sustrato: 1,15 y 5,13 g_{Agua}/g_{Sustrato}, para el medio 1:1 y 0,21:1, respectivamente.

Al incrementar la concentración de aceite (relación 1:1) con tiempos de reacción de 0,5 h, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,15$) en comparación con la misma condición en ausencia de goma arábica (1:1-CG y 1:1-SG). Esto podría estar indicando que, a tiempos cortos y altas concentraciones de aceite, parte del efecto negativo de inhibición sería contrarrestado por un incremento en el área interfacial. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos a 24 h, se observó que la cantidad de AGL producido en presencia de goma arábica fue menor que en ausencia de la misma, en concordancia con los resultados de optimización (Sección 7.3.1).

De todas formas, si bien al observar la producción absoluta de AGL de cada par de situaciones evaluadas se encontraron diferencias estadísticas en la mayoría de las comparaciones, a fines prácticos de rendimiento no representaron grandes diferencias. Desde el aspecto industrial, seguiría siendo más beneficioso no incorporar goma arábica al medio de

reacción, disminuyendo costos de insumos y de los posibles procesos de separación luego de la reacción. A pesar de esto, se debe tener en cuenta que las experiencias realizadas se llevaron a cabo bajo una agitación vigorosa la cual podría no llegar a ser viable en un proceso a escala industrial. De ser así, el uso de goma arábica podría llegar a presentar ventajas ya que podría disminuir los requerimientos energéticos/mecánicos de agitación debido a una posible disminución en la tensión superficial entre las fases, facilitando el mezclado e incrementando el área interfacial.

Como se mencionó anteriormente, en ambas condiciones existió una saturación del área interfacial, por lo tanto, es de esperar que al incrementar la cantidad de aceite, se observe un aumento en la masa absoluta de AGL producida ya que el polvo dispone de una mayor área de gota para realizar la hidrólisis. Como se puede observar en la Figura 8.1, este comportamiento se respetó bajo todas las condiciones estudiadas (tiempos cortos o largos y con o sin goma arábica en el medio), verificando nuevamente las hipótesis de saturación propuestas (Sección 6.3.5).

8.2.2.2 Cinética de la reacción de hidrólisis

La cinética de reacción fue evaluada a diferentes temperaturas utilizando un medio de reacción con una proporción 1:1 (v/v) aceite:agua y diferentes concentraciones de PL (0,0137 y 0,0274 g). Considerando las hipótesis sobre la saturación/insaturación de la interfase (Sección 6.3.5), y que el medio y la concentración de PL utilizadas se mantuvieron entre 28 y 56 $\text{g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$, se podría inferir en que el PL fue el factor limitante. Para el caso de estudio, fue considerado que al menos una de las dos concentraciones de PL mantuviera el área interfacial en exceso para poder evaluar verdaderamente el efecto de un incremento en la concentración de PL. Si ambas interfases se encontraran saturadas y no existiera ninguna otra interacción o efecto negativo, entonces sería de esperar que la velocidad de reacción fuera la misma para ambas concentraciones de PL. Las temperaturas (30, 37, 45 y 50 °C) fueron elegidas en base a diferentes fuentes bibliográficas (Cavalcanti *et al.* 2007; Santos *et al.* 2013) en donde se reportan diferentes rangos óptimos para el uso de polvo de ricino. Luego de realizar las reacciones se registraron los resultados y se obtuvieron diferentes curvas del %AGL en función del tiempo. Los comportamientos generales esperados que pueden deducirse de forma lógica en base a los fundamentos de las reacciones enzimáticas (Segel, 1993) son los siguientes:

Efecto de la temperatura:

- Al incrementar la temperatura de la reacción, se esperaría que la producción de AGL se incremente ya que se favorece el movimiento molecular, aumentando la posibilidad de que el sustrato y el catalizador se encuentren.

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

- Al utilizar enzimas, se debe contemplar que su naturaleza proteica la vuelve sensible a la temperatura, por lo que la misma no puede incrementarse de forma arbitraria.

Efecto de la masa de PL utilizada:

- Se debe contemplar que para el caso de estudio, las conclusiones que se obtienen al estudiar la masa de catalizador, es equivalente a los de concentración de polvo, ya que se utilizó volumen de reacción constante en todos los casos.
- Al aumentar la masa de PL, en donde PL es el factor limitante, se espera observar un incremento en el valor de la pendiente que corresponde a los tiempos de reacción más cortos. Dicha pendiente se denomina velocidad inicial de reacción.
- A pesar de lo anterior, se espera que el equilibrio final de la reacción sea el mismo, asumiendo que un incremento de PL solo reducirá el tiempo en el que se alcanza dicho equilibrio. De no ser así, se podría sospechar que existe otro fenómeno que interfiere.

Las curvas obtenidas se muestran en las Figuras 8.2, 8.3 y 8.4, las cuales fueron analizadas en conjunto. Como observación inmediata, se puede mencionar que independientemente de la concentración de polvo, las temperaturas superiores a 45 °C no fueron favorecedoras para la acción lipásica, ya que inactivaron en gran medida a la lipasa presente en el polvo, durante todo el rango de tiempo estudiado. Esto está de acuerdo con Cavalcanti et al. (2007) quienes reportaron actividad óptima a 30 °C de diferentes genotipos de ricino. A su vez, se contrapone con lo reportado por Santos et al. (2013), quienes encontraron 50 °C como temperatura óptima. Por este motivo, a continuación, se le dará mayor importancia a la discusión de los resultados obtenidos para 30 y 37 °C.

En primer lugar, se analizó el *efecto de la temperatura*. En la Figura 8.2 se puede observar que para tiempos cortos de hasta 1,5 h, las curvas de cinética se comportan de acuerdo a lo esperado. Para describirlo mejor se pueden comparar las pendientes de las regresiones lineales cuyos valores fueron $11,63 \pm 1,33$ (30 °C, 0,0137 g_{PL}), $15,47 \pm 2,40$ (37 °C, 0,0137 g_{PL}), $22,99 \pm 1,56$ (30 °C, 0,0274 g_{PL}) y $26,18 \pm 2,23$ (37 °C, 0,0274 g_{PL}) %AGL/h. Estos resultados muestran que existiría una tendencia a incrementar la pendiente (o velocidad de reacción inicial, *v*) con el aumento de la temperatura de reacción, para ambas concentraciones de PL. En esta figura también se puede apreciar que, al trazar las líneas de tendencia, no se obtuvieron buenas representaciones de los datos experimentales a 0,5 h de reacción. Esto indica que, entre 0,5 y 1,5 h, la producción de AGL no fue exactamente proporcional al tiempo de reacción aunque a fines prácticos se consideró que el cálculo de la actividad específica promedio

($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) es una medida aceptable y representativa para comparar muestras obtenidas con distintas condiciones de reacción a tiempos cortos.

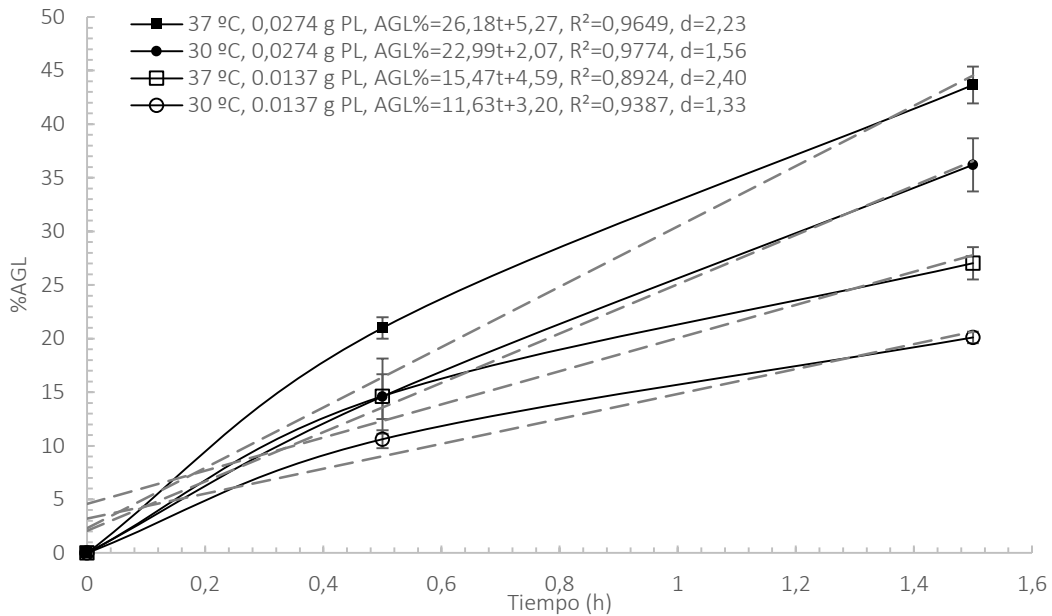


Figura 8.2 Cinética y regresiones lineales (---) a 30 y 37 °C hasta 1,5 h de reacción para ambas masas de PL. La pendiente de las regresiones lineales indica el valor de la velocidad inicial de reacción para cada condición (%AGL/h) y la letra d su desvío estandar. Condiciones de reacción: pH 4 (buffer de acetato 100 mM), volumen de reacción= 5 mL, relación agua/aceite= 1,15 $\text{g}_{\text{Agua}}/\text{g}_{\text{Aceite}}$, y relación catalizador/aceite= 0,006 y 0,012 $\text{g}_{\text{PL}}/\text{g}_{\text{Sustrato}}$, para la menor y mayor masa de PL, respectivamente.

Por el contrario, al extendernos en el tiempo (Figuras 8.3 y 8.4), se pudo observar fácilmente que los comportamientos de las curvas a 30 y 37 °C difieren entre sí, dependiendo de la concentración de PL utilizada. Si bien para 0,0137 g_{PL} se obtuvieron diferencias marcadas en el equilibrio final entre las curvas a diferentes temperaturas ($p < < 0,001$), al utilizar 0,0274 g_{PL} este efecto ya no fue visible.

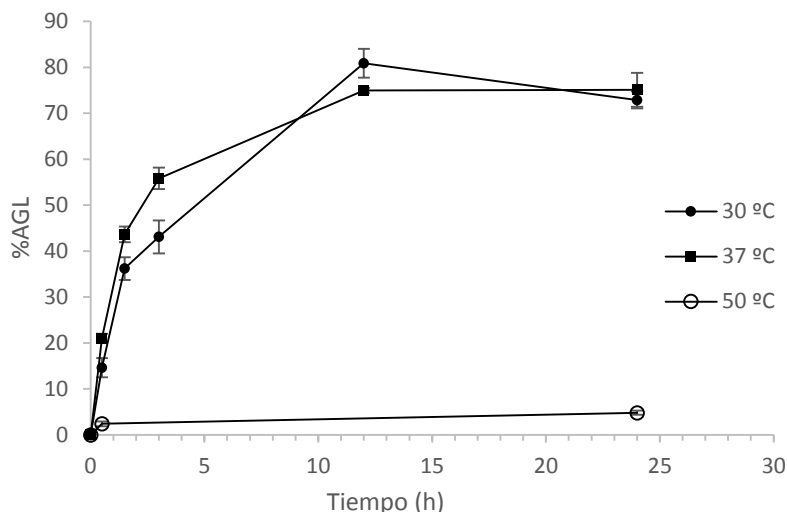


Figura 8.3 Curvas de cinética obtenidas a 30, 37 y 50 °C utilizando 0,0274 g_{PL} (0,012 g_{PL}/g_{Sustrato}). Condiciones de reacción: pH 4 (buffer de acetato 100 mM), volumen de reacción 5 mL y relación agua/aceite 1,15 g_{Agua}/g_{Aceite}.

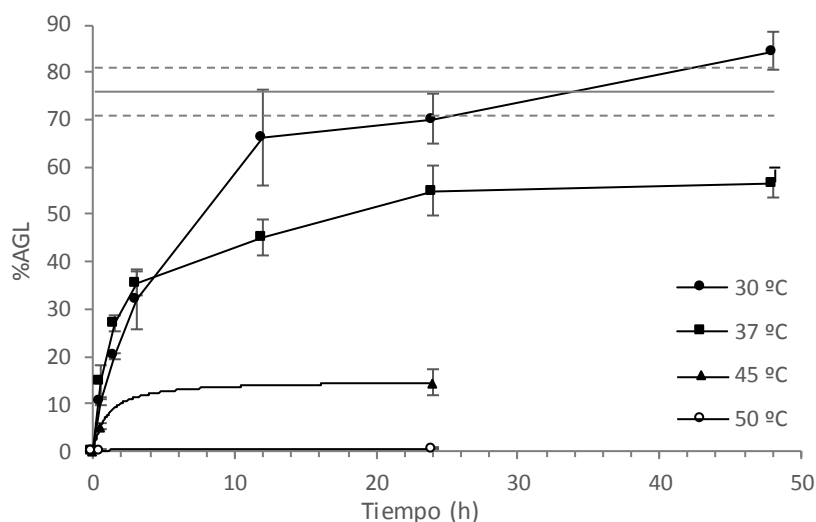


Figura 8.4 Curvas de cinética obtenidas a 30, 37, 45 y 50 °C utilizando 0,0137 g_{PL} (0,006 g_{PL}/g_{Sustrato}). La línea horizontal continua (—) representa el equilibrio final alcanzado con 0,0274 g_{PL} para 30 y 37 °C (promedio de 12 y 24 h en conjunto), mientras que las líneas punteadas (- - -) indican el desvío estándar de dicho valor. Condiciones de reacción: pH 4 (buffer de acetato 100 mM), volumen de reacción 5 mL y relación agua/aceite 1,15 g_{Agua}/g_{Aceite}.

Existen diferentes hipótesis que podrían justificar estos resultados. La primera de ellas (Hipótesis A), se basa en la suposición de que las diferencias entre los equilibrios alcanzados con la menor concentración de PL (Figura 8.4) podrían ser el resultado de una posible inactivación

térmica del PL a 37 °C. Esta hipótesis conduce a la siguiente pregunta: ¿Por qué al utilizar una mayor concentración de PL (Figura 8.3) las curvas a 30 y 37 °C son tan similares? Una respuesta a esto podría ser que, al existir una mayor cantidad de PL al inicio de la reacción, el mismo alcanzaría a hidrolizar el aceite antes de inactivarse. A su vez, la posible existencia de un efecto de “autoprotección” de parte del mismo polvo tampoco debería descartarse. Si bien este fenómeno no fue investigado en mayor profundidad, el mismo podría ser evaluado utilizando diferentes concentraciones de PL en condiciones de saturación de la interfase. En base a la similitud de las curvas a 30 y 37 °C de la Figura 8.3 y al observar que el efecto de la inactivación no fue detectado al utilizar 0,0274 g_{PL}, se podría asumir que el equilibrio final de la reacción para estas condiciones no estuvo afectado por la inactivación. Esto a su vez, sugeriría que las constantes cinéticas de la reacción de producción de AGL no se verían afectadas dentro del rango entre 30-37 °C.

La segunda hipótesis (Hipótesis B) se obtuvo al considerar que las diferencias alcanzadas en el equilibrio de la Figura 8.4 fueron producto del efecto de la temperatura sobre las constantes de reacción cinética, y no debido a la inactivación térmica del LP. Esta situación sería la menos probable ya que la mayoría de las reacciones químicas evolucionan más rápido a medida que se incrementa la temperatura (Segel, 1993). Como se puede observar, este no fue el caso ya que la curva de 30 °C resultó superior a la de 37 °C. A su vez, al analizar la Figura 8.3, no se encontró una explicación lógica para justificar la similitud de las curvas obtenidas a ambas temperaturas. Por este motivo, esta hipótesis será descartada y se considerará a la Hipótesis A como la más probable.

En cuanto al *efecto de la concentración de PL*, se puede mencionar que para tiempos cortos de reacción los comportamientos fueron los esperados. En otras palabras, la Figura 8.2 permite observar que, al comparar datos con igual temperatura de reacción, la pendiente de la recta (v) aumentó al incrementar la concentración de PL. Al analizar los equilibrios finales de reacción, se observó que si bien para 0,0274 g_{PL} y 30 °C (Figura 8.3) se alcanzó el mismo valor final que al utilizar 0,0137 g_{PL} (30 °C) (Figura 8.4), esto no fue así para las mismas cantidades de PL a 37 °C. Una vez más, esta diferencia podría ser atribuida a la inactivación térmica, lo que resulta consistente con la Hipótesis A planteada anteriormente. Por otro lado, la similitud del equilibrio final de las curvas a 30 °C luego de 24 h podría estar indicando que se trata del equilibrio real de la reacción sin efectos de la inactivación térmica.

Cuando se determina la temperatura óptima, no basta con analizar la velocidad inicial de reacción debido a que la temperatura óptima depende del tiempo de reacción transcurrido. Segel

(1993) menciona que la temperatura óptima real de la reacción es aquella que mantiene una relación lineal entre la cantidad de producto y el tiempo que dura la misma. A pesar de lo sugerido por dicho autor, se debe considerar que, dicha linealidad no es fácil de observar, ya que depende de múltiples variables como la concentración de sustrato o posibles inhibiciones e/o inactivación, entre otros. En los experimentos realizados en esta tesis los periodos lineales no fueron sostenidos en el tiempo y tal vez deberían realizarse ensayos a menor temperatura. De todas formas, dentro de los experimentos realizados, se pudo identificar que la temperatura óptima para el PL resultó ser 30 °C, lo que sería favorable desde el aspecto industrial ya que reduciría los requerimientos energéticos de calefacción, aunque también debería considerarse un posible incremento en el requerimiento energético asociado a la agitación debido a la reducción de la viscosidad de la mezcla. Es importante resaltar que, como se mencionó anteriormente, la concentración de enzima utilizada junto con una proporción elevada de aceite:agua (1:1) favoreció la insaturación del área interfacial, lo que mantuvo al PL como factor limitante. Esta condición pudo haber disminuido el posible efecto negativo causado por el uso de temperaturas más bajas (incremento en viscosidad del aceite y, por lo tanto, disminución del área interfacial).

Además de evaluar la cinética a diferentes temperaturas, se decidió comparar algunas curvas de cinética bajo diferentes condiciones de reacción. La Figura 8.5 muestra las curvas obtenidas empleando distintas proporciones de aceite:agua (0,21:1, 0,32:1 y 1:1) y cantidades de polvo. La variable graficada corresponde a los AGL netos producidos en cada reacción ya que el %AGL no era una medida representativa de la cinética debido a que las muestras presentaron diferentes cantidades de aceite y, como se mencionó anteriormente, esto afecta de forma directa en el cálculo del %AGL.

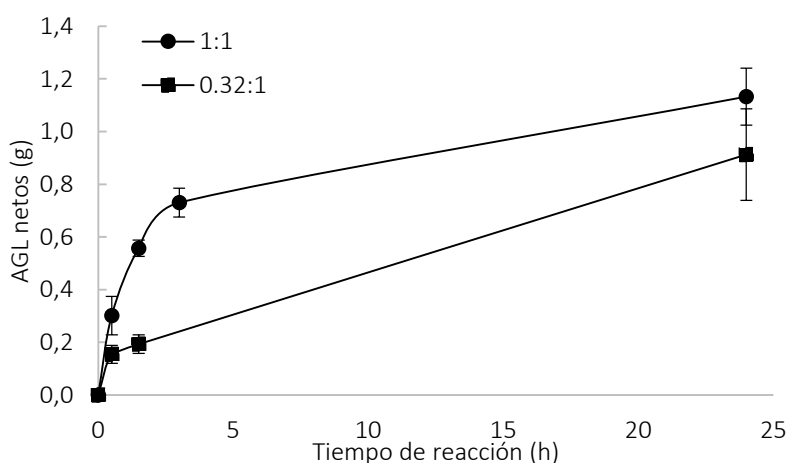


Figura 8.5 Curvas de cinética utilizando diferentes relaciones de aceite:agua y 0,0137 g_{PL}. Condiciones de reacción: 37 °C y pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).

Los resultados observados son consistentes con otras conclusiones previas. La Figura 8.5 permite evaluar los efectos de disminuir la proporción de aceite utilizando 0,0137 g_{PL}. Anteriormente se analizó el efecto de la concentración de polvo en donde se concluyó que al utilizar una relación 1:1 aceite:agua y 0,0137-0,027 g_{PL} la interfase no se encontraba saturada de enzima, indicando que el aceite se encontró en exceso (Sección 6.3.5). En base a esto y considerando tiempos cortos de reacción (hasta aproximadamente 3 h) se encontraron diferencias significativas entre las curvas 1:1 y 0,32:1 lo que indicaría que, a diferencia de la relación 1:1, la relación 0,32:1 presentó el aceite como el factor limitante. Esto se puede verificar al evaluar la proporción de aceite, agua y polvo lipásico para esta condición, la cual fue de $11 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$, siendo éste inferior a la condición de saturación de la interfase definida en la Sección 6.3.5 en donde se determinó que a $18,48 \text{ g}_{\text{Aceite}}/\text{g}_{\text{PL}} \cdot \text{g}_{\text{Agua}}$ la interfase se encuentra saturada de lipasa (polvo en exceso). Por otro lado, si bien a 24 h de reacción no se encontraron diferencias significativas entre las curvas 1:1 y 0,32:1 ($p > 0,10$) debido al gran desvío estándar que presentaron los datos de ésta última curva (CV=20 %), la tendencia cualitativa indicaría que la producción neta de AGL fue menor al reducir la proporción de aceite:agua.

8.3 Fase II: Modelado matemático de la cinética de reacción

La matemática aplicada presenta dos aspectos diferentes, pero íntimamente vinculados: el modelado matemático y la simulación numérica. Un modelo matemático es una representación o una interpretación abstracta de la realidad física sujeto al análisis y cálculo matemático. Por otro lado, la simulación numérica permite calcular las soluciones de estos modelos en una computadora y, por lo tanto, simular la realidad física. Estas tareas presentan un carácter multidisciplinario, combinando matemática, informática e ingeniería. A su vez, el modelado no solo requiere conocimientos fundamentales de las matemáticas aplicadas, sino también de la disciplina científica a la que se aplica. Si bien en muchos casos el modelo matemático se desconoce, en otros casos se debe elegir el más adecuado entre varias posibilidades o bien realizar simplificaciones de aquellos modelos que son demasiado complejos (Allaire, 2007).

Los siguientes párrafos se centrarán en las aplicaciones del modelado matemático, así como también en los diferentes enfoques desde los cuales se puede abordar la tarea del modelado. Para ello se citará el libro *“Principles of system identification: theory and practice”* (Tangirala, 2015), a menos que se indique lo contrario.

Existen grandes beneficios del desarrollo de modelos, y sus aplicaciones se resumen en cuatro ramas principales de la ingeniería de procesos: diseño, estimación (predicción), control y

monitoreo. El núcleo de todas estas aplicaciones es el uso de modelos en simulaciones y predicciones, constituyendo los incentivos principales para el desarrollo del modelo. Las simulaciones, por su naturaleza computacional, ofrecen un menor costo y una alternativa segura y efectiva para los experimentos que pueden demandar mucho tiempo, ser costosos y/o peligrosos. Los avances en los campos de la ciencia y la tecnología computacional han convertido a las simulaciones en estrategias poderosas para entender procesos, generar innovaciones y probar nuevos diseños. Por otro lado, en las predicciones el modelo se usa para predecir la respuesta del proceso correspondiente a las condiciones operativas deseadas en un horizonte de tiempo determinado. Conceptualmente, las predicciones no son muy diferentes de las simulaciones; sin embargo, técnicamente la simulación está reservada para predicciones en condiciones especiales, como es el caso de las predicciones a tiempo infinito.

En los inicios del control y la automatización de los procesos, los modelos se desarrollaban principalmente utilizando el enfoque de los *primeros principios* (leyes físicas, balances de masa, entre otros), los cuales se encuentran íntimamente relacionados con el uso de variables dinámicas. Para ello, es indispensable una buena comprensión de la física del proceso, pero esto se contrapone con los procesos de interés más modernos, los cuales son cada vez más complejos. Para solucionar este conflicto, surge la posibilidad de crear modelos con un enfoque *basado en datos*, los cuales dependen en gran medida de las observaciones experimentales de entrada y salida. Este enfoque ganó impulso con los avances en la tecnología de medición y el comienzo de la era digital a principios de la década de 1960, y presenta ciertas ventajas como la construcción de modelos con un conocimiento mínimo del proceso y la flexibilidad de seleccionar la estructura del modelo más conveniente. A pesar de esto, existe una diferencia sustancial entre ambos enfoques. Debido al método de construcción de los modelos basados en primeros principios, estos resultan transparentes en relación a la física del proceso. Por el contrario, los modelos basados en datos no suelen poseer esta propiedad ya que se desarrollan en gran medida utilizando métodos matemáticos en lugar de leyes físicas.

8.3.1 Introducción al modelado de cinética enzimática

La recopilación de datos biológicos cuantitativos en los sistemas biológicos comenzó hace más de un siglo, cuando Michaelis y Menten publicaron en 1913 su artículo sobre los mecanismos cinéticos de las enzimas. Estos autores mostraron que la velocidad de la reacción enzimática es hiperbólica y depende de la concentración del sustrato. En ese momento era muy difícil analizar y comprender el comportamiento no lineal, por lo que solían linealizar los datos, utilizando las intersecciones con los ejes (mediante el uso de una regla) para calcular los valores de los

parámetros del modelo. Estos datos podían ser comparados, almacenados y publicados. Luego, los biólogos y las ciencias médicas introdujeron al modelo diferentes constantes similares, pero todas tenían esencialmente el mismo objetivo: determinar algunos parámetros biológicos que se pudieran medir en experimentos reproducibles y luego comparar y publicar. En la ciencia moderna, todas las enzimas, vías y modelos de células completas se crean, analizan y simulan utilizando computadoras. Estos análisis dieron lugar a la cinética enzimática, el análisis del control y modelado metabólico y ahora forman parte del campo de los sistemas biológicos. Los avances experimentales (mediciones *in vitro* y *in vivo*), teóricos (ecuaciones diferenciales, análisis de regresión) e informáticos (revistas científicas, bases de datos) fueron imprescindibles para el progreso científico en este campo. En el pasado, para hacer un descubrimiento, a veces era suficiente con proporcionar imágenes con una explicación cualitativa mientras que ahora, la comprensión de estos sistemas requiere de medidas cuantitativas a lo largo del tiempo. Aunque las ciencias biológicas se investigan desde hace tiempo, el equipo experimental moderno aún no permite la observación directa de todas las muestras biológicas posibles, por lo que los modelos matemáticos desarrollados representan una parte esencial para el avance científico dentro de este campo (Demin et al. 2010).

8.3.2 Estado del arte del modelado matemático de reacciones catalizadas por lipasas

Antes de adentrarse en el mecanismo de reacción de las lipasas, es necesario describir la nomenclatura específica necesaria de acuerdo a la notación de Cleland. En primer lugar, el número de sustratos o productos cinéticamente importantes en un mecanismo se designa mediante las sílabas *Uni*, *Bi* y *Ter*. Por lo tanto, una reacción con dos sustratos y dos productos será de tipo *Bi-Bi* mientras que la reacción donde hay un sustrato y dos productos será *Uni-Bi*. Por último, el término *Ter*, se utiliza cuando existen 3 productos y/o sustratos. En segundo lugar, el orden de unión de los sustratos y la liberación de productos determinan si un mecanismo es *secuencial* o de tipo *ping pong*. El primero implica que todos los sustratos deben unirse a la enzima antes de que se liberen los productos, mientras que en el segundo el/los producto/s se liberan antes de que todos los sustratos se hayan unido a la enzima, lo que significa que la enzima existe en dos o más formas estables (por ej. como enzima libre y como complejo enzima-sustrato) (Galimova 2017). A continuación, se describirá el estado del arte del modelado cinético de reacciones catalizadas por lipasas, utilizando el trabajo de Paiva et al. (2000) como referencia, a menos que se indique lo contrario.

Independientemente del tipo de reacción catalizada (hidrólisis, esterificación o interesterificación), la descripción más general, precisa y aceptada de la acción catalítica de las

lipasas es un mecanismo ping pong Bi-Bi constituido por dos pasos principales: 1) formación de un complejo enzimático acilado y la liberación del residuo de alcohol del sustrato original; y 2) hidrólisis del complejo enzimático acilado, lo que da como resultado la formación del producto y la regeneración de la enzima. Ambos pasos resultan en la reacción global representada por la Ecuación 8.1, utilizando la hidrólisis de TAG como ejemplo, donde W representa una molécula de agua. La ecuación final de la velocidad de reacción inicial obtenida mediante este mecanismo resulta compleja, involucrando un gran número de parámetros y concentraciones de especies. A pesar de esto, en la bibliografía se encuentran trabajos que utilizan este modelo para determinar los diferentes parámetros en lipasas inmovilizadas provenientes de *Mucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antártica*, *Pseudomonas sp.*, *Candida rugosa*, entre otros (Paiva et al. 2000).



Cuando el agua está presente en exceso, como es el caso de las reacciones realizadas en la presente tesis, la reacción de hidrólisis se encuentra favorecida y se considera que la concentración de agua permanece prácticamente constante. La expresión genérica de la velocidad inicial (v_0) que se obtiene a partir del mecanismo ping pong Bi-Bi se puede simplificar a la ecuación de una hipérbola, tal como la propuesta por Michaelis-Menten para representar su dependencia con la concentración de sustrato S (unión ester) (Ecuación 8.2). Esta ecuación involucra constantes de Michaelis-Menten denominadas “aparentes”. Por un lado, la velocidad inicial máxima aparente ($v_{max,app}$) involucra la concentración de agua (constante) así como también la constante original de Michaelis-Menten correspondiente a este compuesto. Por otro lado, la constante aparente de Michaelis-Menten ($K_{M,app}$) incluye, además de los términos anteriores, la constante original de Michaelis-Menten correspondiente al sustrato (S).

$$v_0 = \frac{v_{max,app}[S]}{K_{M,app} + [S]} \quad (Ec. 8.2)$$

Este enfoque representa el mecanismo más utilizado para describir el comportamiento de las lipasas, encontrando numerosos ejemplos en la bibliografía como *Mucor miehei*, *Candida*

rugosa, *Mucor javanicus*, *Penicillium camembertii*, semillas de *Vermonia galamensis*, páncreas porcino, *Rizhomucor miehei*, entre otros (Paiva et al. 2000). Debido a que las reacciones catalizadas por lipasas involucran múltiples reacciones para alcanzar el producto final, es poco probable que los modelos cinéticos basados en mecanismos simples (como el último mencionado) proporcionen descripciones precisas de los fenómenos químicos en juego. A pesar de esto, sigue siendo el modelo elegido con mayor frecuencia.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, hasta el momento se han reportado numerosos trabajos que determinan estos parámetros característicos, tanto para lipasas de origen animal y microbiano, como vegetal (Paiva et al. 2000; Hasan et al. 2009; Christiansen et al. 2010). Dentro de estas últimas se pueden mencionar la lipasa de germen de trigo, de granos de café y de semillas de laurel y ricino, entre otras (Muto et al. 1974; Jing et al. 2003; Isbilir et al. 2008; Patui et al. 2014). En su mayoría, los trabajos que estudian los parámetros cinéticos de biocatalizadores de origen vegetal, se basan en el modelado cinético clásico, el cual se centra en el cálculo de la velocidad inicial, asociada a tiempos de reacción cortos, donde la curva que relaciona la concentración de sustrato y la velocidad inicial de formación del producto es lineal (Michaelis-Menten).

Otro enfoque menos común surge a partir del modelado matemático de las curvas que se obtienen al cuantificar la formación de producto a lo largo del tiempo, las cuales no involucran el cálculo de la velocidad inicial de reacción. Este enfoque será el elegido para el modelado matemático propuesto en la presente tesis.

8.3.3 Metodología

El objetivo general fue modelar la cinética de la reacción de hidrólisis catalizada por polvo lipásico obtenido de la semilla de ricino para los datos experimentales obtenidos a 30 y 37 °C utilizando 0,0137 y 0,0274 g_{PL} en el medio 1:1 (Sección 8.2.2.2). Para ello, el problema se abordó desde dos aspectos diferentes. En primer lugar, se planteó la posibilidad de realizar un **modelado basado en datos**, de forma de obtener una expresión matemática explícita que represente los puntos experimentales. Para ello, y basado en la observación cualitativa del comportamiento de las curvas obtenidas, se adoptó una estructura hiperbólica (Ecuación 8.3), donde la producción de AGL (AGL% m/m) se expresa como función del tiempo (h), mientras que α (AGL% m/m) y β (h) son los parámetros del modelo. El software empleado para realizar el ajuste fue OriginPro 9.1 (Origin Lab).

$$\%AGL = \frac{\alpha t}{\beta + t} \quad (\text{Ec. 8.3})$$

El planteo de este tipo de modelos permite obtener de forma relativamente sencilla parámetros cuantitativos representativos del caso en estudio y su comparación con otros sistemas de reacción.

En segundo lugar, se planteó la posibilidad de implementar un **modelo basado en primeros principios**. En base al análisis de los resultados obtenidos experimentalmente, sobre los cuales se consideró que podría existir una inactivación térmica de la lipasa, se recurrió al trabajo propuesto por (Garrido-del Solo *et al.* 1993) como punto de partida. Estos autores desarrollaron el análisis cinético de un mecanismo tipo Michaelis-Menten para los casos en que la enzima libre y/o el complejo enzima-sustrato, son inestables, ya sea por una inactivación espontánea o por la presencia de un inhibidor (Figura 8.6). Para ello, los autores plantearon el balance de masa dinámico correspondiente a cada especie y asumieron, entre otras cosas, que la concentración de sustrato se mantuvo aproximadamente constante, lo que resultó en un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) lineal. El resultado final fue la obtención de las ecuaciones explícitas para representar a todas las especies involucradas expresadas en función del tiempo de reacción.

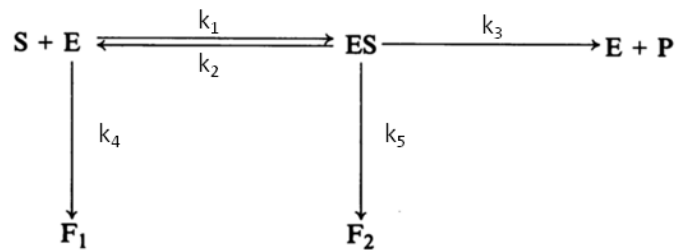


Figura 8.6 Mecanismo de reacción enzimática propuesto por Garrido-del Solo et al. (1993) donde la enzima presenta inactivación/inhibición irreversible. S: sustrato, E: enzima, F₁: enzima inactiva, ES: complejo enzima-sustrato, F₂: complejo enzima-sustrato inactivo, P: producto y k_i representan las constantes cinéticas de reacción.

Como se observó en los resultados de la Fase I (Sección 8.2.2.2), los porcentajes de hidrólisis alcanzaron aproximadamente el 80 % (m/m) por lo que no fue posible considerar la condición de sustrato constante, resultando en un sistema ODE no lineal. Por este motivo, no fue

posible obtener una expresión explícita de las especies en función del tiempo y se decidió simplificar el mecanismo de reacción propuesto en la Figura 8.6, tal como se muestra en la siguiente figura:

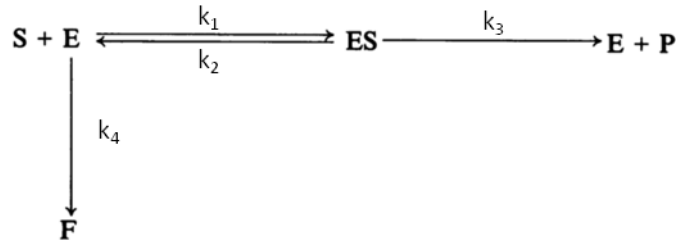


Figura 8.7 Mecanismo de reacción propuesto en la presente tesis. S: sustrato, E: enzima, F: enzima inactiva, ES: complejo enzima-sustrato, P: producto y k_i representan las constantes cinéticas de reacción.

Para el mecanismo propuesto en la Figura 8.7, el sistema de ecuaciones diferenciales se representa mediante las Ecuaciones 8.4-8.8 donde la concentración de cada especie, denotadas entre corchetes, fueron definidas en unidades de mmol/h. Además, la letra S representa el sustrato cuantificado como moles de uniones éster, y no como moles de moléculas de triglicéridos (por este motivo los coeficientes estequiométricos del mecanismo son iguales a uno). Antes de proceder con la descripción de la metodología computacional empleada para su resolución, es necesario recordar las hipótesis empíricas acordadas previamente en la Etapa I (Sección 8.2.2.2) las cuales suponen que, a fines prácticos, solo existe inactivación térmica al utilizar 37 °C y 0,0137 g_{PL}. Esta suposición implica que el sistema de ecuaciones (Ecuaciones 4-8) fue planteado diferente dependiendo de si se consideró o no el término de inactivación.

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_2[ES] + k_3[ES] - k_4[E] \quad (\text{Ec. 8.4})$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_2[ES] \quad (\text{Ec. 8.5})$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] \quad (\text{Ec. 8.6})$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \quad (\text{Ec. 8.7})$$

$$\frac{d[F]}{dt} = k_4[E] \quad (\text{Ec. 8.8})$$

Por este motivo para las muestras realizadas a 30 °C (con 0,0137 y 0,0274 g_{PL}) y la muestra a 37 °C con 0,0274 g_{PL}, el sistema de ecuaciones fue idéntico al representado mediante las Ecuaciones 8.4-8.7, con la diferencia de que los términos que involucran a k_4 no fueron incluidos, así como tampoco se consideró la Ecuación 8.8. Se recuerda también que debido a que las cinéticas obtenidas para estas condiciones alcanzaron el mismo equilibrio final, entonces se utilizó un mismo valor de k_1 , k_2 y k_3 para los tres perfiles empíricos. Para simplificar la redacción, cada muestra será denominada de acuerdo a la nomenclatura de la Tabla 8.2

Tabla 8.2 Nomenclatura para datos cinéticos considerados en el modelado matemático.

Temperatura (°C)	Polvo lipásico (g)	Nomenclatura
30	0,0137	30-1
30	0,0274	30-2
37	0,0137	37-1
37	0,0274	37-2

En base a lo expresado anteriormente, el procedimiento para la estimación de las constantes se describe a continuación:

- 1) Estimación en conjunto de k_1 , k_2 y k_3 planteando un sistema de ecuaciones que incluya los balances de masa para las condiciones 30-1, 30-2 y 37-2, sin considerar los términos de inactivación.
- 2) Estimación de k_4 planteando el balance de masa incluyendo los términos de inactivación y fijando los parámetros k_1 , k_2 y k_3 en los valores obtenidos en el paso (1).
- 3) Simulación en conjunto del sistema global para obtener el perfil en el tiempo de todas las especies consideradas en el mecanismo propuesto.

La implementación del modelo matemático y la interacción con el mismo se llevó a cabo utilizando el entorno gProms (P.S.E. Ltd, 2004). Esta plataforma permite la escritura y resolución de modelos algebraico-diferenciales. Esta característica se explota para implementar un modelo basado en primeros principios para representar la variación de la concentración de las diferentes especies en el tiempo.

Una vez establecido el modelo, la plataforma permite tanto la simulación como la optimización, lo que conlleva la capacidad de resolución de problemas inversos (estimación de parámetros) que minimicen cierta función objetivo de ajuste a los datos. Los métodos de resolución que la plataforma implementa (CVP Control Vector Parametrization) (Cervantes et al. 2009) se encuentran específicamente desarrollados para la resolución de este tipo de problemas, lo que permite una convergencia relativamente robusta.

La plataforma mencionada implementa dos funciones de ajuste diferentes: mínimos cuadrados o máxima verosimilitud. Ambos criterios intentan minimizar la distancia entre la solución encontrada y los datos empíricos. El segundo lo hace en forma robusta, teniendo en cuenta la varianza presente en las mediciones (Tarantola, 2005). En este caso, se hace necesario seleccionar un modelo para la varianza considerada para la observación de salidas del modelo, inclusive pudiendo someterse el valor de los parámetros de varianza como una variable a ser manipulada por la optimización. Considerando estas capacidades, en la presente tesis se resolvieron diferentes instancias del problema inverso, o sea, encontrar valores de los parámetros que maximicen una función de ajuste de los datos para el modelo diferencial algebraico basado en primeros principios antes mencionado, que intenta describir los perfiles temporales de las diferentes concentraciones. Debido a que las observaciones experimentales (Figuras 8.3 y 8.4) presentaron desvíos estándares dependientes de la magnitud de la media, se consideró solo el criterio de máxima verosimilitud, definiendo un coeficiente de variación promedio de aproximadamente 15 %. Este valor se obtuvo a partir del promedio de coeficientes de variación de todos los datos experimentales, donde dicho coeficiente fue calculado como el desvío estándar sobre la media porcentual.

Además del coeficiente de variación, fue necesario indicar diversos valores numéricos como: valores de las concentraciones iniciales de todas las especies (datos empíricos) y valores estimativos iniciales de los parámetros a estimar, así como también la cota inferior y superior del rango que se desea evaluar para cada parámetro. Estos valores son detallados en la discusión de resultados.

Por último, cabe destacar que si bien la simulación de sistemas dinámicos no lineales como el de la presente tesis es fácilmente resoluble, no es el mismo caso para la optimización de estos sistemas, donde es teóricamente imposible conseguir garantías de “optimalidad” sobre las soluciones alcanzadas por los algoritmos, que se enfrentan a los diversos problemas de la optimización no-lineal: degeneración, influencia del escalado, influencia de los valores iniciales,

etc. Esta posibilidad debe ser contemplada a la hora de evaluar los resultados obtenidos (Gábor et al. 2015).

El análisis estadístico de las curvas ajustadas fue realizado aplicando el test de falta de ajuste. Dicho test permitió evaluar si el modelo planteado fue adecuado o no para representar los datos empíricos. Un valor de p inferior a 0,05 indica que existen evidencias suficientes de que el ajuste no es bueno, mientras que un p elevado indica lo contrario (no existen evidencias para descartar el modelo propuesto). Además, se realizó el análisis de la varianza asociado a la regresión obtenida, el cual solo cobra sentido si la falta de ajuste no fue significativa. Para el caso de la presente tesis, si el valor p de la regresión es inferior a 0,05, entonces se puede inferir en que existe una dependencia de la producción de AGL con respecto al tiempo.

8.3.4 Discusión de resultados de la Fase II

8.3.4.1 Modelado basado en datos

El modelado basado en datos, obtenido mediante una regresión no lineal utilizando la Ecuación 8.3, permitió obtener las ecuaciones explícitas que describen el comportamiento de los datos experimentales. La falta de ajuste no fue significativa en ninguna regresión, indicando que no existen evidencias suficientes para descartar el modelo elegido (Tabla 8.3). Por otro lado, la regresión sí fue significativa, lo que significa que existe una dependencia del %AGL con respecto al tiempo de reacción. Las regresiones junto con los datos experimentales pueden observarse gráficamente en la Figura 8.8.

Tabla 8.3 Valores obtenidos para los parámetros α y β correspondientes a la Ecuación 8.3 para las muestras 30-1, 30-2, 37-1 y 37-2.

Muestra	Parámetros		Valor p	
	α (AGL% m/m)	β (h)	Ajuste ^a	Regresión ^b
30-1	90,85±3,57	5,14±0,77	0,4561	<0,0001
37-1	56,66±1,62	1,71±0,22	0,1697	<0,0002
30-2	86,45±3,84	2,37±0,37	0,0870	<0,0003
37-2	81,04±1,20	1,33±0,08	0,2579	<0,0004

^a Valor p de la prueba de ajuste. ^b Valor p de la prueba de significancia de la regresión.

Condiciones ensayadas: 30 y 37 °C, 0,0137 y 0,0274 g PL (ver nomenclatura en Tabla 8.2), tiempos de reacción entre 0,5-48 h, pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM) y volumen de reacción = 5mL.

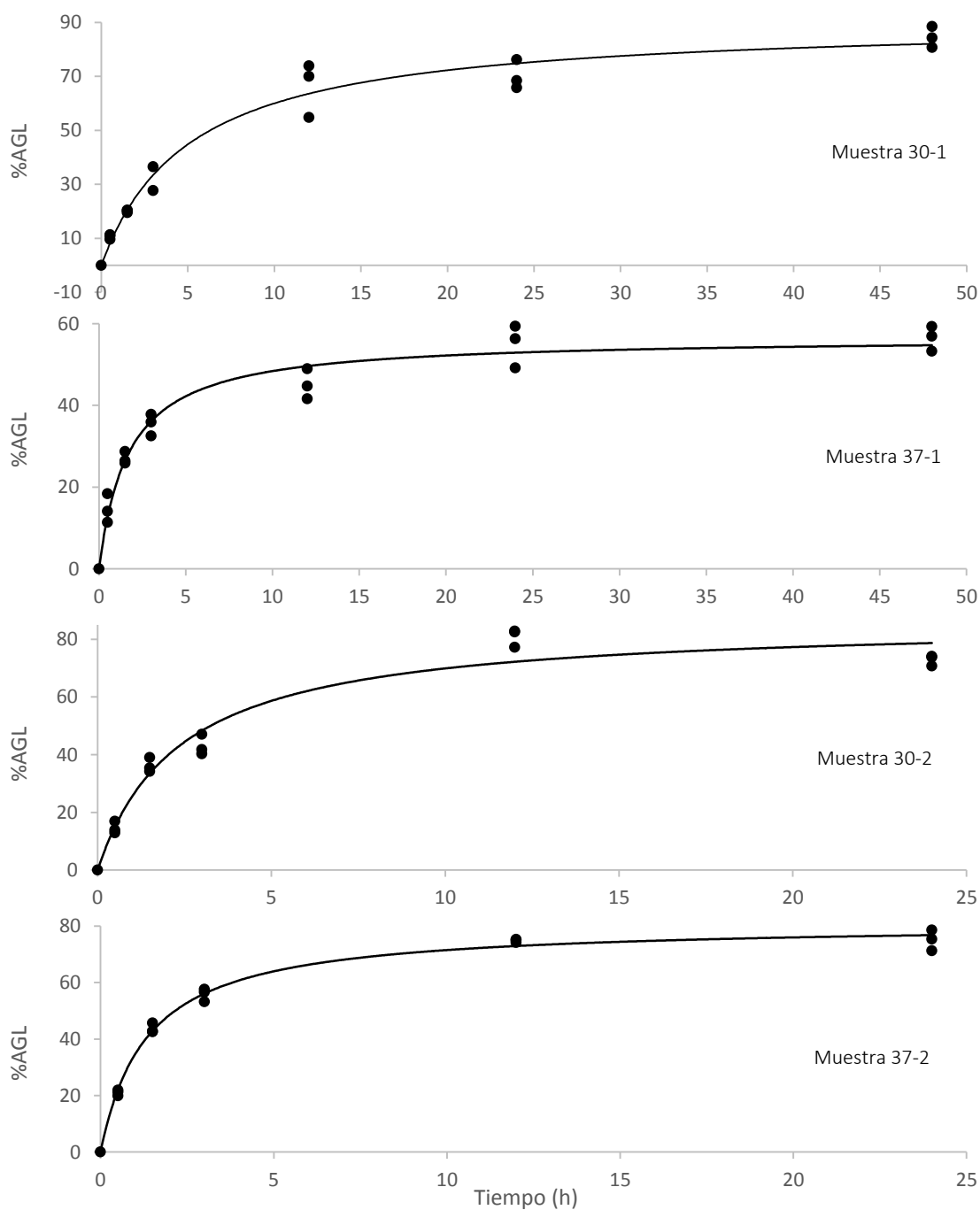


Figura 8.8 Representación gráfica de las regresiones no lineales para el %AGL (m/m) en función del tiempo de reacción. Los puntos negros representan los datos experimentales. Condiciones ensayadas: 30 y 37 °C, 0,0137 y 0,0274 g PL (ver nomenclatura en Tabla 8.2), tiempos de reacción entre 0,5-48 h, pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM) y volumen de reacción = 5mL.

Por último, la Figura 8.9 resume las curvas obtenidas para todas las muestras y ayuda a analizar los resultados presentados en la Tabla 8.3. Los mismos están en concordancia con el

análisis de resultados descrito en la Sección 7.2.2.2. Se puede observar que el parámetro α correspondiente a 37 °C y 0,0137 g_{PL} fue el único valor que presentó mayores diferencias con respecto a los otros valores, reflejando el resultado de una posible inhibición térmica cuando se utiliza baja concentración de lipasa. Por otro lado, con el parámetro β pudo apreciarse que en ausencia de inhibición (30 °C), al duplicar la cantidad de enzima se redujo de forma proporcional el tiempo necesario para alcanzar la mitad de %AGL máximo. En cambio, a 37 °C el fenómeno de inhibición térmica quedó enmascarado por la duplicación de la carga enzimática.

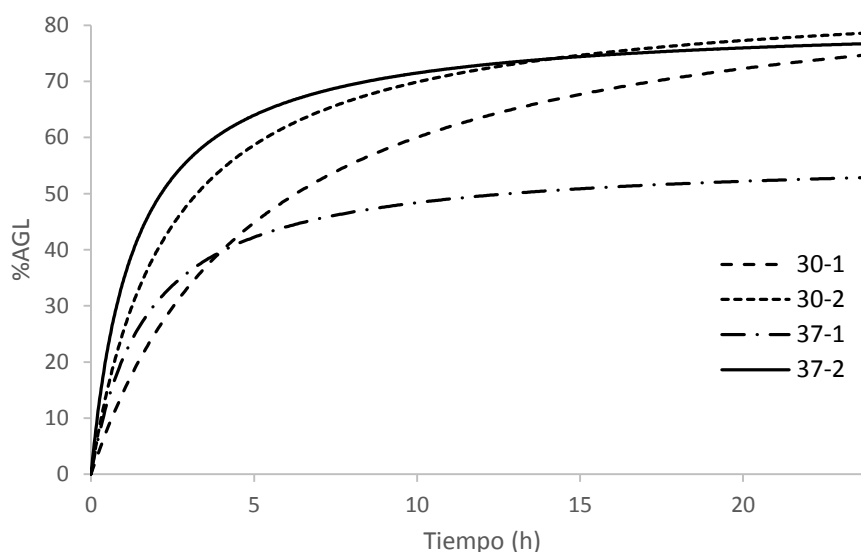


Figura 8.9 Representación conjunta de las regresiones obtenidas para las diferentes muestras. Condiciones ensayadas: 30 y 37 °C, 0,0137 y 0,0274 g PL (ver nomenclatura en Tabla 8.2), tiempos de reacción entre 0,5-24 h, pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM) y volumen de reacción = 5mL.

8.3.4.2 Modelado basado en primeros principios

Como se mencionó anteriormente (Sección 8.3.3), para obtener una resolución del modelo se deben proporcionar los valores de las concentraciones iniciales de todas las especies (datos empíricos), valores estimativos iniciales de los parámetros a estimar, así como también la cota inferior y superior del rango que se desea evaluar para cada parámetro. Estos valores se reportan en la Tabla 8.4, con excepción de los valores estimativos iniciales de los parámetros los cuales se discuten luego en mayor detalle. Para el cálculo de la concentración de lipasa inicial (en mmol/mL) se recurrió a la literatura, debido a que solo se disponía de la masa de PL, y no de la concentración de E. Por este motivo, el trabajo de Su et al. (2010) fue utilizado para calcular la concentración de lipasa en el polvo de ricino ($5,56 \cdot 10^{-6}$ mmol/g_{PL}). Estos autores purificaron y caracterizaron la lipasa “ácida” de ricino, la cual presentó mayor actividad a pH 4,5 (variedad de

semilla ZB 5), pero también detectaron actividad de la lipasa “básica” en el día 4 de germinación a pH 9,5. La primera, localizada en los cuerpos lipídicos, fue purificada hasta la homogeneidad aplicando sucesivas metodologías: aislamiento, delipidación, solubilización DEAE-sefarosa CL-6B y cromatografía con butil-sefarosa CL-4B. Al utilizar los datos de Su et al. (2010) y considerando el volumen de reacción utilizado en este capítulo, se calculó un valor de $1,55 \cdot 10^{-8}$ mmol_E/mL. Como puede observarse, dicho valor resultó sorprendentemente bajo en relación a los porcentajes de hidrólisis obtenidos (aproximadamente 80 %, alcanzando concentraciones finales de $1,16 \pm 0,08$ mmol_P/mL en la mejor condición). Por este motivo, se consideró apropiado aplicar un factor de multiplicación de 10 suponiendo que, luego de los tratamientos de purificación, los autores recuperaron una fracción de lipasa mucho menor a la que poseería el polvo lipásico y contemplando la posibilidad de que la semilla utilizada en la presente tesis contuviera una mayor cantidad de lipasa que la evaluada por los autores.

Tabla 8.4 Concentraciones iniciales de las especies, rangos evaluados de los parámetros y unidades utilizados en el modelado basado en primeros principios.

Especie ^a	Concentración inicial (mmol/mL) ^b	Parámetro	Rango	Unidades
E	$1,55 \cdot 10^{-7}$ o $3,1 \cdot 10^{-7}$	k1	10 -10 10^8	mL/h·mmol
S	1,36	k2	0 -1000	1/h
P	0	k3	10 -10 10^8	1/h
ES	0	k4	0 -100	1/h
F	0			

^a E: enzima (lipasa), S: sustrato (unión éster), P: producto (AGL), ES: complejo enzima-sustrato y F: lipasa inactiva.

^b Expresado como mmoles de cada especie por volumen total de reacción.

Habiendo definido lo anterior, se prosiguió a especificar las estimaciones iniciales de los parámetros a calcular. Al realizar varias resoluciones preliminares del modelo utilizando valores estimativos aleatorios (datos no reportados), fue posible obtener la convergencia de múltiples condiciones, las cuales resultaron en diferentes valores finales para cada parámetro estimado. Esto se explica debido a que se dispuso de pocos datos experimentales en el sentido de que se conocía el perfil de una única especie (producto) dentro del sistema propuesto. El perfil del sustrato también se conoce, pero como el mismo se calcula a partir de la cantidad de producto (la suma de sus fracciones molares es igual a 1 siempre), su incorporación al modelo sería redundante. Por otro lado, el sistema de reacción y cuantificación propuesto no permitió la medición de las concentraciones de ES, E o F en el tiempo, por lo que tampoco pueden ser

incluidas en el conjunto de datos experimentales del modelo. Por este motivo, el sistema planteado no permitió obtener valores absolutos de las constantes cinéticas.

Se observó también que la magnitud de las constantes resultó elevada y no fue posible encontrar un ajuste cualitativamente aceptable utilizando valores de k_1 y k_3 inferiores a 1500000. Al mismo tiempo, el parámetro k_2 obtenido en las pruebas preliminares resultó en un valor muy inferior al de k_1 y k_3 tomando un valor de cero en la mayoría de las resoluciones. Además, la baja concentración de E junto con el elevado porcentaje de hidrólisis alcanzado (aproximadamente 80 %), indicarían que la reacción de hidrólisis (formación de P) se encontró ampliamente favorecida con respecto a la reacción inversa. Por estos motivos, se asumió que k_2 sería despreciable frente a k_1 y k_3 y fue eliminada del modelo.

En base a esto, se evaluaron diferentes escenarios para las estimaciones iniciales:

Tabla 8.5 Estimaciones iniciales de los parámetros k_1 y k_3 en los diferentes escenarios evaluados (A, B, C, D y G).

Escenarios	Estimación inicial	
	k_1 (mL _{volumen total} /h·mmol)	k_3 (1/h)
A: $k_1=k_3$	$15 \cdot 10^5$	$15 \cdot 10^5$
B: $k_1>k_3$	$15 \cdot 10^6$	$15 \cdot 10^5$
C: $k_1>>k_3$	$15 \cdot 10^7$	$15 \cdot 10^5$
D: $k_1<k_3$	$15 \cdot 10^5$	$15 \cdot 10^6$
H: $k_1<<k_3$	$15 \cdot 10^5$	$15 \cdot 10^7$

Se recuerda que k_4 fue incluida una vez definidas k_1 y k_3 , y por este motivo la misma no fue considerada en la Tabla 8.5. Por el contrario, la Tabla 8.6 muestra los valores finales de todos los parámetros considerados en el modelado total: k_1 y k_3 (obtenidas a partir de los valores iniciales mencionados anteriormente) y k_4 .

Tabla 8.6 Valores finales de los parámetros k_1 , k_3 y k_4 obtenidos para los escenarios A, B, C, D y H.

Escenario	k_1 (mL _{volumen total} /h·mmol)	k_3 (1/h)	k_4 (1/h)
A	1500270	1500520	0,27
B	15000000	1497430	3,13
C	150000000	1496150	32,0
D	1498330	15000000	0,31
H	1497660	150000000	0,32

A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1<<k_3$

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

Como se mencionó anteriormente, estos valores no representan las constantes cinéticas absolutas, sino que se utilizaron para evaluar los perfiles de concentración de cada especie (E, S, ES, F y P) para cada escenario (A, B, C, D y H) y cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2). Los resultados de la simulación del sistema correspondiente a la especie P fue estudiada en mayor profundidad debido a que es el único perfil que dispone de datos experimentales. La Tabla 8.7 muestra el análisis estadístico para evaluar la falta de ajuste mientras que la Figura 8.10 muestra los perfiles obtenidos.

Como se observa en la Tabla 8.7, todas las curvas presentaron falta de ajuste ($p < 0,05$). Existen dos causas que podrían explicar estos resultados. Por un lado, podría significar que el modelo propuesto no fue adecuado. En base a esto, se realizaron algunas modificaciones sobre el sistema de ecuaciones.

Tabla 8.7 Valores p obtenidos en la prueba de falta de ajuste para el perfil de cada escenario y sus puntos experimentales correspondientes (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2).

Muestra	Valor p* para cada escenario				
	A	B	C	D	H
30-1	<0,00000	<0,00000	<0,00000	<0,00000	<0,00000
30-2	0,00005	<0,00000	<0,00000	<0,00000	<0,00000
37-1	<0,00000	0,00003	0,00004	0,00011	0,00020
37-2	<0,00000	<0,00000	<0,00000	<0,00000	<0,00000

* Un valor p inferior a 0,05 indica que la falta de ajuste fue significativa.

Condiciones de reacción: 30-1: 30 °C y 0.0137 g_{PL}, 30-2: 30 °C y 0.0274 g_{PL}, 37-1: 37 °C y 0.0137 g_{PL}, 37-2: 37 °C y 0.0274 g_{PL}; pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM); volumen de reacción 5 mL.

Escenarios: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1<<k_3$.

Debido a que la falta de ajuste aparentó ser mayor a tiempos largos de reacción, se realizó la prueba considerando solo hasta un tiempo de reacción de 3 h, aunque no se observaron cambios significativos en los valores de p. En segundo lugar, se consideró incorporar al modelo un set de parámetros k_1 y k_3 independiente para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2), pero tampoco se obtuvo mejora en el ajuste. Por este motivo se plantea como trabajo a futuro, la modificación del mecanismo de reacción propuesto, incorporando nuevas especies y reacciones intermedias.

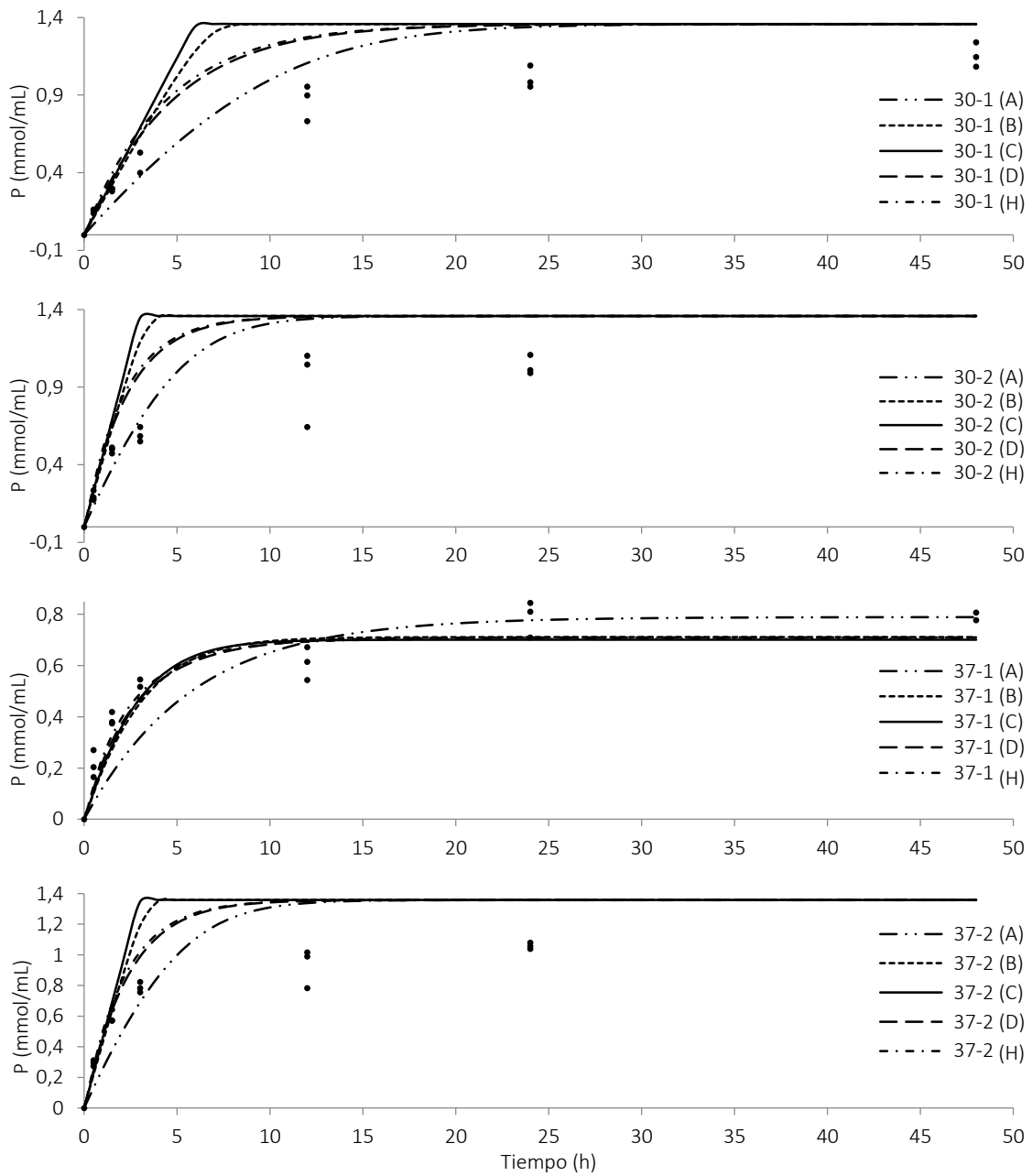


Figura 8.10 Perfiles de concentración de P para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario (A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1\gg k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1\ll k_3$). Condiciones de reacción: 30-1: 30 °C y 0.0137 g_{PL}, 30-2: 30 °C y 0.0274 g_{PL}, 37-1: 37 °C y 0.0137 g_{PL}, 37-2: 37 °C y 0.0274 g_{PL}; pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM); volumen de reacción 5 mL.

En un trabajo publicado por Chew et al. (2008) se usó una lipasa comercial inmovilizada, Lipozyme TL IM, para catalizar la hidrólisis de la oleína de palma en una fase acuosa-orgánica utilizando tiempos de reacción de hasta 6 h. Utilizaron un mecanismo tipo ping pong Bi-Bi con inhibición de sustrato por agua y las constantes de velocidad de reacción del mecanismo propuesto (10 en total) se determinaron ajustando el modelo a los datos experimentales (sistema no lineal).

Los autores mencionados, mencionaron que el modelo propuesto fue capaz de ajustar los datos adecuadamente y que la velocidad de formación de P estuvo limitada por la formación de glicerol. Eventualmente, podría evaluarse la posibilidad de incluir alguna de las reacciones consideradas por estos autores al modelo planteado en esta tesis. Se debe considerar que, al incrementar el número de parámetros resulta lógico que el modelo ajuste mejor, por lo que se debería intentar encontrar el modelo más simple que presente un ajuste aceptable.

Por otro lado, podría suceder que, debido a la no linealidad del sistema, el algoritmo de optimización no fuera capaz de converger hacia el óptimo global. De ser así, entonces el mecanismo planteado aún podría ser adecuado. Por este motivo, en las Figuras 8.11, 8.12, 8.13 y 8.14 se muestran los perfiles de las especies restantes (E, ES, P y F), los cuales permiten estudiar el comportamiento de los mismos al utilizar los diferentes escenarios (A, B, C, D y H) del modelo planteado.

En general, se puede mencionar que se observaron dos tipos de curvas diferentes, aquellas que presentan una “montaña” o “valle” pronunciado (Figuras 8.11 y 8.12) y aquellas que son crecientes o decrecientes de forma continua durante todo el rango de tiempo estudiado (Figuras 8.10, 8.13 y 8.14). Los perfiles de E y ES corresponden a especies que se regeneran una y otra vez (comportamiento de “valle” o “montaña”) y presentan perfiles complementarios en todas las condiciones experimentales respetando el balance másico, con la excepción de 37-1 (existencia de inactivación).

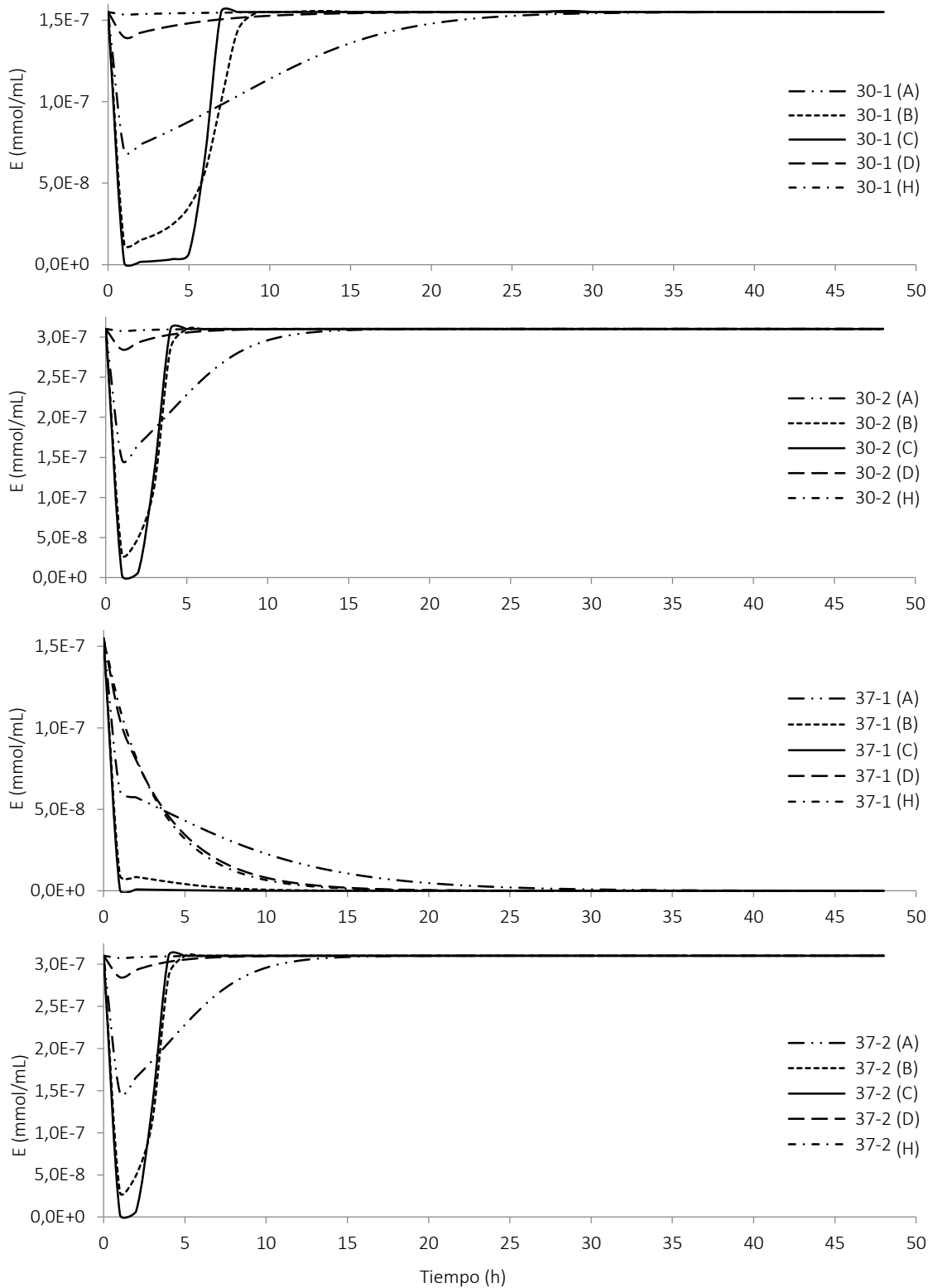


Figura 8.11 Perfiles de concentración de E para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1\gg k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1\ll k_3$. Condiciones de reacción: 30-1: 30 °C y 0.0137 g_{PL}, 30-2: 30 °C y 0.0274 g_{PL}, 37-1: 37 °C y 0.0137 g_{PL}, 37-2: 37 °C y 0.0274 g_{PL}; pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM); volumen de reacción 5 mL.

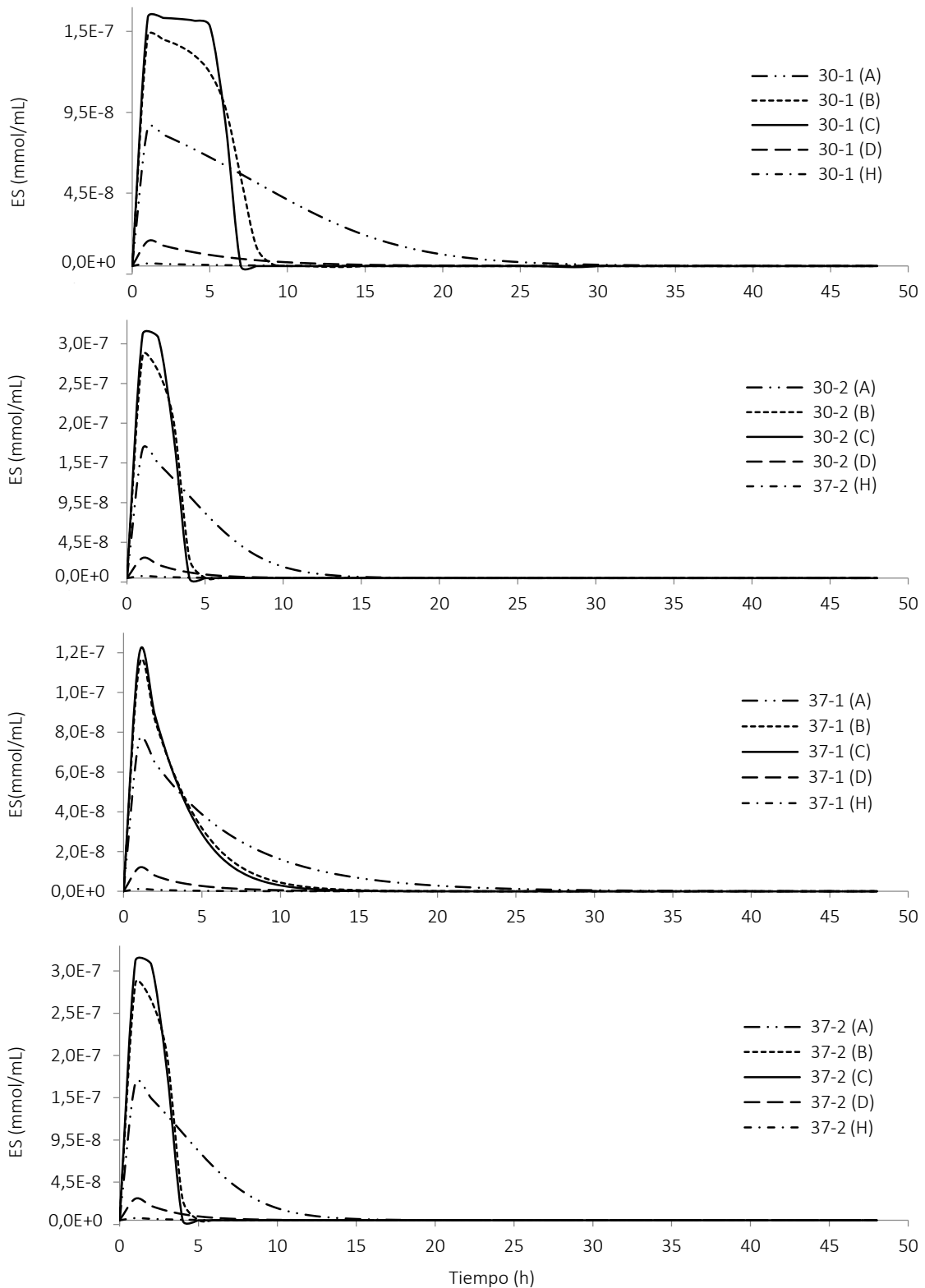


Figura 8.12 Perfiles de concentración de ES para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1\gg k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1\ll k_3$. Condiciones de reacción: 30-1: 30 °C y 0.0137 g_{PL}, 30-2: 30 °C y 0.0274 g_{PL}, 37-1: 37 °C y 0.0137 g_{PL}, 37-2: 37 °C y 0.0274 g_{PL}; pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM); volumen de reacción 5 mL.

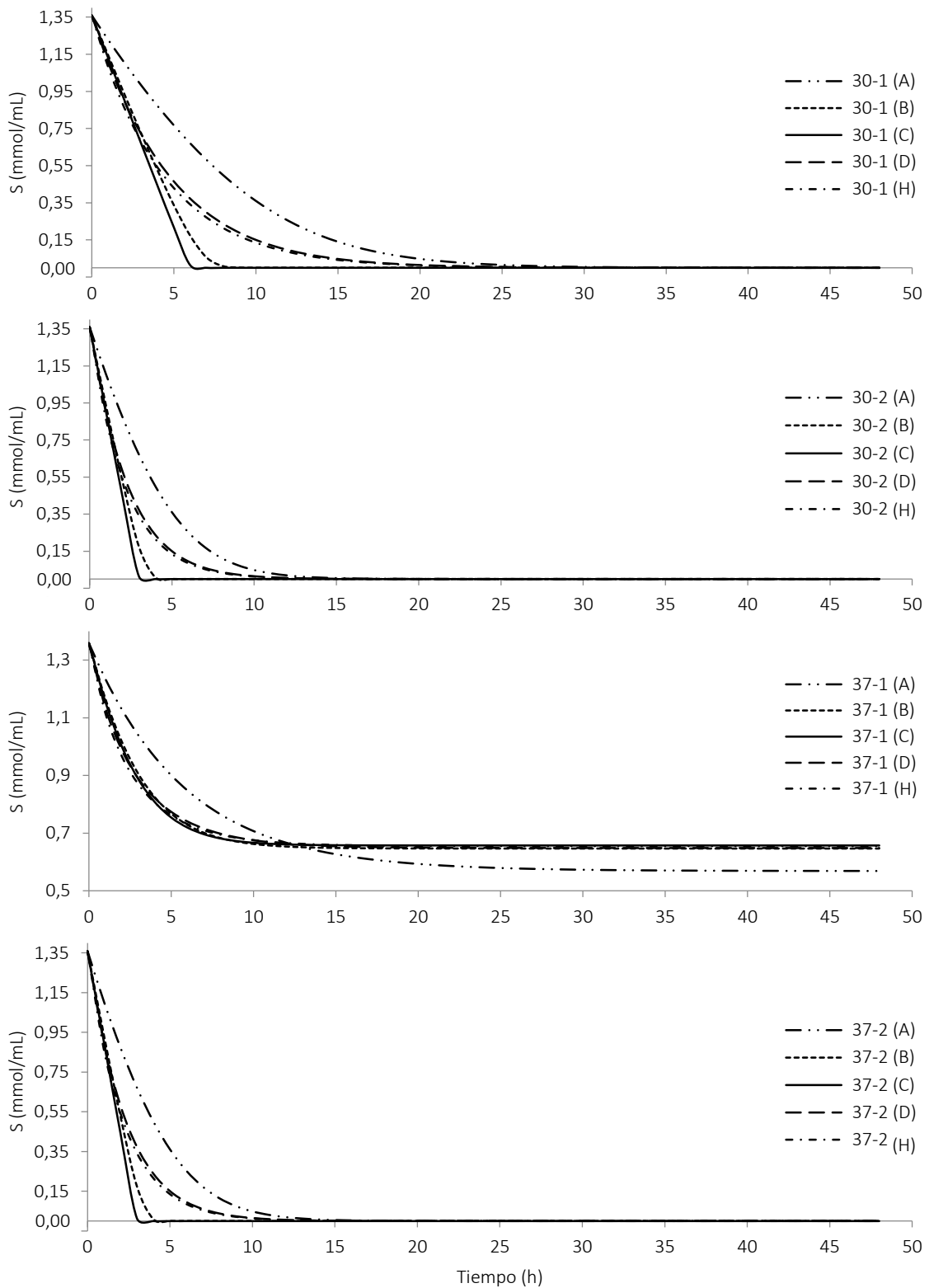


Figura 8.13 Perfiles de concentración de S para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1\gg k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1\ll k_3$. Condiciones de reacción: 30-1: 30 °C y 0.0137 g_{PL}, 30-2: 30 °C y 0.0274 g_{PL}, 37-1: 37 °C y 0.0137 g_{PL}, 37-2: 37 °C y 0.0274 g_{PL}; pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM); volumen de reacción 5 mL.

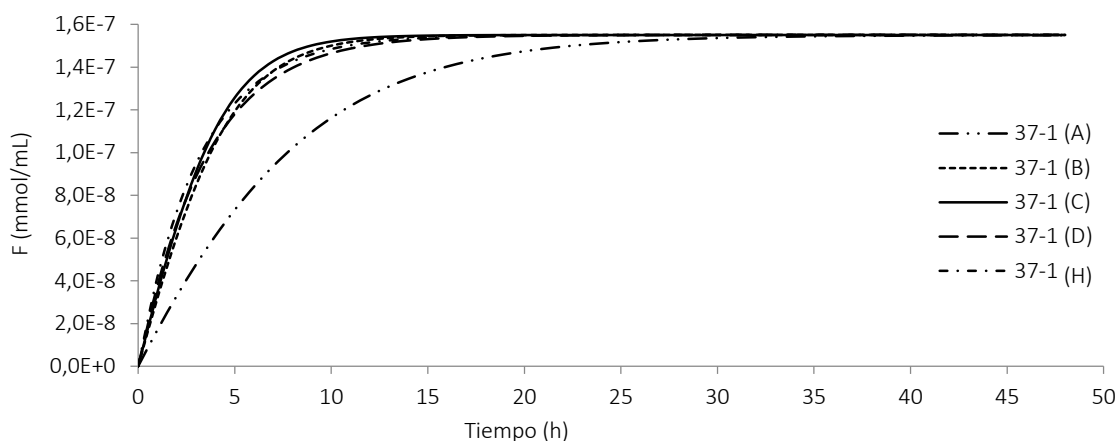


Figura 8.14 Perfiles de concentración de F en la muestra 37-1 (0.0137 g_{PL} a 37 °C) para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1\gg k_3$, D: $k_1<k_3$ y H: $k_1\ll k_3$.

Por otro lado, las curvas que crecen o decrecen de forma continua, corresponden a S, P y F, especies que no vuelven a producirse/desaparecer una vez que son consumidas/producidas.

Si se observan los perfiles de P (Figura 8.10), se puede identificar que la opción A resultó ser el escenario que mejor describe los resultados, dentro de las alternativas propuestas, particularmente al observar su concentración hasta un tiempo de 12 h. Por el contrario, los escenarios B, C, D y H se alejaron más notoriamente de los puntos experimentales para ese tiempo. Además, puede observarse que un incremento de igual magnitud en la diferencia existente entre k_1 y k_3 , pareciera tener un efecto de diferenciación más notorio entre D y H, que el observado entre B y C, las cuales se encuentran casi superpuestas. Solo en la muestra 37-1 estos resultados no se respetaron, obteniendo curvas muy similares para B, C, D y H, las cuales ajustaron mejor a tiempos cortos, mientras que la opción A lo hizo mejor a tiempos largos.

Aunque la concentración final de P fue sobre-estimada en la mayoría de las situaciones planteadas, se observó que la resolución del modelo para las condiciones 30-1, 30-2 y 37-2 alcanzaron los mismos valores de concentración final, tal como se observó en los datos experimentales, al mismo tiempo que 37-1 alcanzó un valor inferior a las mismas (existencia de inactivación).

En contraste con los perfiles de P, los escenarios D y H en los perfiles de la lipasa de las muestras 30-1, 30-2 y 37-2 (Figura 8.11), sí presentaron diferencias, al igual que en B y C (principalmente antes de las 5 h de reacción). En todas las condiciones experimentales se observó que D y H representaron a perfiles donde la lipasa permaneció en una concentración

aproximadamente constante, lo cual se corresponde con la situación en que k_1 es menor que k_3 , significando que la lipasa se liberó del producto más rápidamente de lo que se unió. Además, se identificó un comportamiento general independiente de las condiciones experimentales, en donde el escenario A se posicionó en un punto medio entre los escenarios B y C, y D y H. En el caso particular de la condición 37-1, se observó la existencia de inactivación (Figura 8.11 y Figura 8.14) tal como se propuso en el mecanismo de reacción. Una diferencia que podría estar asociada a las diferentes concentraciones de PL puede observarse en la Figura 8.11 para las muestras 30-1 y 30-2, donde se encontró que en el primer caso se obtuvieron perfiles más aplanados entre 0 y 5 h en los escenarios B y C (región de baja concentración de lipasa). El efecto opuesto se observó en la Figura 8.12, donde la sección del perfil aplanado corresponde a una concentración de ES elevada, lo cual resultó consistente con los perfiles de la Figura 8.11 (si aumenta E, disminuye ES y viceversa). Esta diferencia encontrada entre los perfiles de las muestras 30-1 y 30-2 en los escenarios B y C (prolongación del perfil aplanado), ya no pueden ser detectados entre 37-1 y 37-2, lo cual podría explicarse debido a la presencia de inactivación para el caso de 37-1.

Por último, en la Figura 8.13, puede observarse que los perfiles de sustrato resultaron complementarios a aquellos obtenidos para el producto (Figura 8.10). También se observó que las muestras 30-1, 30-2 y 37-2 alcanzaron el mismo equilibrio final mientras que 37-1 presentó una concentración final superior, justificada por la inactivación de la lipasa.

8.4 Conclusiones

Al analizar el efecto de la goma arábica en el medio de reacción con menor proporción de aceite (medios 0,21:1-CG y 0,21:1-SG), se observó que el efecto negativo de la presencia de goma arábica se mantuvo incluso a tiempos largos de reacción mientras que al incrementar la concentración de aceite (relación 1:1) a tiempos cortos de reacción, parte del efecto negativo de inhibición fue contrarrestado por un incremento en el área interfacial. Sin embargo, los resultados obtenidos a 24 h, mostrarían que la cantidad de AGL producida en presencia de goma arábica fue menor que en ausencia de la misma, en concordancia con los resultados de optimización. Desde el aspecto industrial, sigue siendo más beneficioso no incorporar goma arábica al medio de reacción, disminuyendo costos de insumos y de los posibles procesos de separación luego de la reacción. A pesar de esto, se debe tener en cuenta que las experiencias realizadas se llevaron a cabo bajo una agitación vigorosa la cual podría no llegar a ser viable en un proceso a escala industrial. De ser así, el uso de goma arábica podría llegar a presentar ventajas ya que podría disminuir los requerimientos energéticos/mecánicos de agitación.

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

Independientemente de la concentración de polvo, las temperaturas superiores a 45 °C no fueron favorecedoras para la acción lipásica, inactivando en gran medida a la lipasa presente en el polvo, durante todo el rango de tiempo estudiado. Al utilizar 30 y 37 °C en las curvas de cinética hasta tiempos de 1,5 h, se observó que una mayor temperatura se correspondió con una mayor velocidad de reacción inicial para ambas concentraciones de PL. Si bien a tiempos cortos, la producción de AGL no fue exactamente proporcional al tiempo de reacción, a fines prácticos sería posible considerar que el cálculo de la actividad específica promedio ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) fue una medida aceptable y representativa para comparar muestras obtenidas con distintas condiciones de reacción a tiempos cortos.

Por el contrario, al extendernos en el tiempo, se determinó que los equilibrios finales en las cinéticas a 30 y 37 °C dependerían de la concentración de PL utilizada, observando una disminución del equilibrio final al emplear bajas concentraciones a 37 °C. Este fenómeno podría haber sido el resultado de una posible inactivación térmica del PL a 37 °C. El hecho de que este efecto no fue observado al emplear el doble de PL podría explicarse debido a que al existir una mayor cantidad de PL al inicio de la reacción, el mismo alcanzó a hidrolizar el aceite antes de inactivarse a 37 °C. A su vez, la posible existencia de un efecto de “autoprotección” de parte del mismo polvo no debería ser descartada.

En base a esto, se podría inferir que las constantes cinéticas de la reacción asociadas a la producción de AGL no se verían afectadas dentro del rango entre 30-37 °C en ninguna condición y que para la menor concentración de PL a 37 °C se debería considerar una constante cinética de inactivación. En cuanto al efecto de la concentración de PL, se observó que la velocidad inicial de reacción hasta 1,5 h, aumentó al incrementar la concentración de PL para ambas temperaturas. La temperatura óptima para el PL resultó ser 30 °C, lo que sería favorable desde el aspecto industrial ya que reduciría los requerimientos energéticos de calefacción, aunque también debería considerarse un posible incremento en el requerimiento energético asociado a la agitación debido a la escasa reducción de la viscosidad de la mezcla.

En cuanto al modelado matemático, se obtuvieron modelos basados en datos que lograron representar satisfactoriamente a los puntos experimentales para cada condición, utilizando un modelo tipo Michaelis-Menten. Por el contrario, el modelo basado en primeros principios presentó falta de ajuste ($p < 0,05$) en todas las condiciones evaluadas. Por un lado, esto podría significar que el modelo propuesto no fue adecuado, sugiriendo la modificación del mecanismo de reacción propuesto. Por otro lado, podría suceder que, debido a la no linealidad del sistema, el algoritmo de optimización no fuera capaz de converger hacia el óptimo global. De

haber sido así, entonces el mecanismo planteado aún podría ser adecuado permitiendo el análisis cualitativo de los perfiles obtenidos. En general, los comportamientos observados fueron similares para todas las condiciones experimentales, con la excepción de las reacciones a 37 °C, las cuales contemplaron la inactivación del PL.

Con los resultados de este capítulo se publicó el trabajo completo “Cinética de reacción de la hidrólisis enzimática de aceite empleando polvo de semillas de ricino como catalizador” en el Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, realizado en la ciudad de Mar del Plata (18-20 septiembre, 2017).

8.5 Referencias

Allaire, G. (2007). Numerical analysis and optimization: An introduction to mathematical modelling and numerical simulation. Oxford: Oxford University Press.

Avelar, M.H.M., Cassimiro, D.M.J., Santos, K.C., Domingues, R.C.C., De Castro, H.F. & Mendes, A. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. *Industrial Crops and Products* 44: 452-458.

Bressani, A.P., Garcia, K.C. a, Hirata, D.B. & Mendes, A. (2014). Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (38): 287-297.

Cavalcanti, E.D.C., Maciel, F.M., Villeneuve, P., Lago, R.C.A., Machado, O.L.T. & Freire, D.M.G. (2007). Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 7: 57-66.

Cervantes, A. & Biegler, L. (2009). Optimization strategies for dynamic systems. *Encyclopedia of Optimization*, Boston: Springer.

Chew, Y.H., Chua, L.S., Cheng, K.K., Sarmidi, M.R., Aziz, R.A. & Lee, C.T. (2008). Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. *Biochemical Engineering Journal* 39: 516-520.

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

Chorkendorff, I. & Niemantsverdriet, J.W. (2007). Concepts of Modern Catalysis and Kinetics (2nd ed.). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Christiansen, A., Backensfeld, T. & Weitschies, W. (2010). Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes. European Journal of Pharmaceutical Sciences 41(2): 376-382.

Demin, O. & Goryanin, I. (2010). Kinetic modelling in systems biology. London: Chapman & Hall/ CRC Press.

Engel, P. (1981). Enzyme Kinetics: The steady-state approach (2nd ed.). Springer-Science+Business Media, B.Y.

Enzyme kinetics. (2017). [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_\(Chang\)](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang))

Gábor, A. & Banga, J.R. (2015). Robust and efficient parameter estimation in dynamic models of biological systems. BMC Systems Biology, <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0219-2>.

Galimova, M. (2017). Modified Cleland notation. http://astro.prao.ru/erm/cleland_not.html.

Garrido-del Solo, C., García-Cánovas, F., Havsteen, B.H. & Varón-Castellanos, R. (1993). Kinetic analysis of a Michaelis-Menten mechanism in which the enzyme is unstable. The Biochemical journal 294: 459-64.

Hasan, F., Shah, A.A. & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. Biotechnology Advances 27: 782-798.

Hills, M.J. & Beevers, H. (1987). Ca²⁺ stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. Plant Physiology 84: 272-6.

Isbilir, S.S., Ozcan, H.M. & Yagar, H. (2008). Some biochemical properties of lipase from bay laurel (*Laurus nobilis* L.) seeds. Journal of the American Oil Chemists' Society 85: 227-233.

Jing, F., An, X. & Shen, W. (2003). The characteristics of hydrolysis of triolein catalyzed by wheat germ lipase in water-in-oil microemulsions. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 24-25: 53-60.

Capítulo 8: Cinética de Hidrólisis Empleando Polvos de Ricino como Biocatalizador

Lin, Y.H. (1986). Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics 244(1): 346-356.

Muto, S. & Beevers, H. (1974). Lipase activities in castor bean endosperm during germination. Plant Physiology 54: 23-28.

Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X.X., Balcão, V.M. & Malcata, F.X.X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme Microb Technol 27(3-5): 187-204.

Patui, S., Clincon, L., Peresson, C., Zancani, M., Conte, L., Del Terra, L., Navarini, L., Vianello, A. & Braidot, E. (2014). Lipase activity and antioxidant capacity in coffee (*Coffea arabica* L.) seeds during germination. Plant science: an international journal of experimental plant biology 219-220: 19-25.

Santos, K.C., Cassimiro, D.M.J., Avelar, M.H.M., Hirata, D.B., de Castro, H.F., Fernández-Lafuente, R. & Mendes, A. (2013). Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. Industrial Crops and Products 49: 462-470.

Segel, I. (1993). Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. EEUU: Wiley-Interscience.

Su, E.Z., Zhou, Y., You, P.Y. & Wei, D.Z. (2010). Lipases in the castor bean seed of chinese varieties: Activity comparison, purification and characterization. Journal of Shanghai University 14(2): 137-144.

Tangirala, A.K. (2015). Principles of system identification: Theory and practice. CRC Press.

Tarantola, A. (2005). Inverse problem theory and methods for model parameter estimation. SIAM Press.

Vannice, M.A. & Joyce, W.H. (2005). Kinetics of catalytic reactions. Springer.

CONCLUSIONES GENERALES Y TRABAJO A FUTURO

Capítulo

9

El desarrollo de la presente tesis involucró un gran número de metodologías para evaluar la acción lipásica ejercida por diferentes extractos vegetales: titulación con fenolftaleína, en continuo, a punto final, curvas de titulación y cromatografía gaseosa. En general, las pruebas realizadas no demostraron evidencias para descartar ninguna de las metodologías. Si bien el método de titulación con fenolftaleína parecería ser una determinación confiable cuando se trabajó con el medio Santos-10, en otros medios se encontraron ciertas inconsistencias. Además, al utilizar polvos de ricino como catalizador, se pudo identificar una sub-estimación del %AGL al compararlo con la técnica cromatográfica. Por otro lado, la titulación en continuo presentó como desventaja que no permitió reacciones de tiempos largos ni el procesamiento de más de una muestra a la vez. En cuanto al método de titulación a punto final utilizando un pH-metro, la experiencia comprobó que esta técnica sería lo suficientemente sensible como para detectar grados de hidrólisis enzimática realmente bajas (1 % AGL). A pesar de esto, la cromatografía gaseosa fue el único método que permitió medir de forma exacta y precisa la concentración de ácidos grasos libres en las muestras hidrolizadas, y si bien es más costosa y requiere mayor tiempo de análisis, fue la metodología más confiable.

El estudio de la actividad lipásica en polvos obtenidos a partir de girasol presentó uno de los mayores desafíos de esta tesis debido a la baja repetitividad de los resultados. Esto generó diversos problemas que intentaron resolverse realizando modificaciones sucesivas a las técnicas empleadas como las condiciones de reacción, metodología de obtención del polvo, técnica de titulación, tipo de semilla y, principalmente, los blancos de reacción. Los blancos ensayados indicarían que es importante la inclusión del polvo durante la incubación del blanco ya que el mismo aporta compuestos “titulables” que podrían afectar las mediciones de los productos de reacción, particularmente en muestras con niveles de hidrólisis bajos. Si bien la bibliografía disponible sugiere la existencia de actividad hidrolítica en esta semilla, los resultados finales obtenidos mediante cromatografía, indicarían que la misma fue lo suficientemente baja como

para desalentar su aplicación en procesos de modificación de grasas y aceites con potencial uso industrial.

La lipasa comercial de germen de trigo presentó resultados generales similares a los de semilla de girasol. Al utilizar una lipasa comercial, era de esperar que los métodos de obtención, así como la calidad de semilla de partida se encontraran estandarizados y desarrollados de forma de ofrecer un producto que presente actividad hidrolítica. A pesar de considerar diferentes condiciones para la evaluación de actividad (concentración de sustrato, tiempo de reacción, método de determinación), no fue posible detectar una hidrólisis lo suficientemente alta como para impulsar la continuación de su estudio con vistas a realizarla a una mayor escala. Tampoco se observaron niveles apreciables de esterificación o acidólisis bajo las condiciones estudiadas. Como trabajo a futuro se plantea la posibilidad de ampliar las condiciones de reacción estudiadas, tanto para hidrólisis como para esterificación y acidólisis, así como también considerar sustratos de cadena más corta.

A diferencia del girasol y la lipasa de germen de trigo, las semillas de ricino utilizadas como materia prima permitieron obtener polvos de acetona con acción lipásica elevada. Considerando la alta variabilidad intrínseca que presentan los experimentos que involucran sistemas biológicos, como es el caso de las lipasas de origen vegetal, los primeros ensayos realizados demostraron que el sistema de reacción propuesto presentó una repetitividad aceptable. Durante el almacenamiento del polvo a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, se detectó una marcada inestabilidad en el % AGL relativo, obtenidos en la hidrólisis enzimática empleando dicho polvo durante los primeros 10 días, la cual fue asociada al proceso de templado. De todas formas, dicho porcentaje se mantuvo elevado, incluso luego de 460 días de almacenamiento. Como trabajo a futuro podrían evaluarse tiempos de almacenamiento más prolongados de forma de identificar el momento en el que la lipasa comienza a disminuir su actividad. También se determinó que fue posible reutilizar el polvo más de una vez, implementando un recambio de sustrato y manteniendo la fase acuosa y el biocatalizador. Dado que en ambos usos la actividad específica se mantuvo, esto indicaría la ausencia de fase lag para el biocatalizador bajo las condiciones evaluadas. Este ensayo se realizó utilizando tiempos de reacción cortos de media hora, por lo que sería de interés realizar ensayos a tiempos mayores para evaluar los límites de reuso del catalizador, incorporando una etapa de lavado del catalizador con acetona antes de cada ciclo. A su vez, esto permitiría identificar si parte de la lipasa se solubiliza en la fase acuosa del medio de reacción. Por otro lado, se realizaron pruebas para la reacción de esterificación, pero no se encontró actividad lipásica, sugiriendo explorar otras condiciones a futuro. Como ensayos adicionales de interés se puede mencionar la

caracterización proximal del polvo de ricino y el estudio de micrografías de dicho polvo en el medio de reacción.

En cuanto a la toxicidad mencionada anteriormente, la cual se encuentra asociada a la actividad lipásica, no existen evidencias de que su toxicidad se mantenga luego del desgrasado con acetona. De existir dicha toxicidad, sería de interés evaluar si la misma se mantiene incluso en el producto purificado. Lógicamente, estos aspectos son de suma importancia si se desea emplear este producto en la industria alimentaria por lo que el riesgo potencial debe ser considerado.

La optimización de la reacción de hidrólisis empleando polvos de ricino permitió obtener dos modelos matemáticos que, en conjunto, permitieron estudiar el comportamiento de la acción lipásica para diferentes condiciones de algunas variables como la concentración de goma arábica, proporción de aceite y cantidad de polvo de lipasa. La actividad lipásica específica aumentó al utilizar concentración de polvo baja y concentración de aceite alta, en ausencia de goma arábica. La validación de la actividad lipásica específica máxima demostró que el modelo ofrece una buena predicción de los ensayos experimentales. La conclusión principal fue que la goma arábica produjo un efecto negativo sobre la reacción enzimática, contribuyendo a la inhibición de la reacción, ya sea por impedimentos físicos o por la inactivación del biocatalizador. Este comportamiento fue inesperado, ya que se verificó que la ausencia del surfactante redujo significativamente el área interfacial agua-aceite disponible, pero de todas formas la ausencia de goma resultó desfavorable. Por otro lado, este biocatalizador parecería no mostrar especificidad por las posiciones de los ácidos grasos en las moléculas de TAG. La optimización demostró que este biocatalizador de origen vegetal podría competir con enzimas microbianas en reacciones de hidrólisis de aceite, logrando alcanzar hasta un 66 % (m/m) de hidrólisis en un tiempo de 1,5 h.

La cinética de reacción de los polvos de ricino sugirió una posible inactivación de la lipasa al utilizar concentraciones bajas de polvo a 37 °C mientras que a 30 °C el equilibrio de la reacción alcanzó un nivel de hidrólisis superior (aproximadamente 85 % m/m). Al incrementar la temperatura a 45 y 50 °C, el efecto de inactivación se incrementó significativamente. El modelado matemático basado en datos mostró un buen ajuste al comportamiento típico de Michaelis-Menten mientras que el modelo basado en primeros principios presentó limitaciones en cuanto a la falta de ajuste. Si bien la tendencia general de la curva ajustada fue representativa de los datos experimentales, como trabajo a futuro se plantea la posibilidad de ampliar las posibles reacciones intermediarias, incluyendo más parámetros al modelo, con el objetivo de mejorar el ajuste.

Si bien en el transcurso de la tesis se lograron evaluar tres fuentes diferentes para la obtención de catalizadores de origen vegetal, existen dos alternativas de particular interés que se podrían investigar a futuro. En primer lugar, la posibilidad de obtener polvos de acetona a partir del germen de trigo de uso doméstico, el cual podría ser comparado con la lipasa comercial de trigo evaluada en la presente tesis. En segundo lugar, el estudio de las propiedades catalíticas que podrían poseer los polvos de acetona provenientes del alperujo, desecho principal de la industria del aceite de oliva. Esto contribuiría a aportar valor a una corriente de proceso que actualmente se trata como residuo.

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1		<i>Página</i>
Tabla 1.2	Fórmula molecular y abreviatura de los ácidos más abundantes en las grasas y aceites.	3
Capítulo 2		
Tabla 2.1	Catalizadores empleados en las reacciones enzimáticas junto con una descripción general del procesamiento de obtención de cada uno.	39
Capítulo 3		
Tabla 3.1	Cantidad de AH y %AGL de las muestras que fueron empleadas para las pruebas de titulación con fenolftaleína.	62
Tabla 3.2	Porcentaje de AGL determinados en las pruebas preliminares utilizando el método de titulación empleando fenolftaleína y el medio Santos-10.	64
Tabla 3.3	Cantidades aproximadas empleadas en las reacciones enzimáticas para la producción de APH y composición másica de cada APH obtenido.	73
Tabla 3.4	Emulsiones empleadas (EM) en la simulación de reacciones de hidrólisis para el medio de reacción Santos-10 y su posterior cuantificación mediante CGL.	74
Tabla 3.5	Fases oleosas empleadas en la simulación de reacciones de hidrólisis para el medio de reacción Sigma y su posterior cuantificación mediante CGL.	74
Tabla 3.6	Composición de subproductos (% m/m) en el APH1 y en las muestras obtenidas luego de la extracción con solventes de acuerdo a los métodos A y B.	75
Tabla 3.7	Porcentajes de AGL en la fracción lipídica de los medios de reacción ensayados (M_{EM} y M_{FO}).	76
Tabla 3.8	Diámetro medio de gota y $D_{90\%}$ de la emulsión inmediatamente luego de ser preparada (EM_{0h}) y después de 2 h con agitación (EM_{2h}).	80
Tabla 3.9	Diámetro promedio (μm) y relación aceite:agua (v/v) de las muestras analizadas: Medio Santos-10 s/goma, Medio Santos-10 c/goma, Medio 1:1 y Medio 1:1 hidrolizado.	81
Capítulo 4		
Tabla 4.1	Tabla global de experiencias realizadas con extractos obtenidos a partir de semilla de girasol.	90
Tabla 4.2	Experiencias pertinentes a las reacciones en las que se utilizó el método de titulación en continuo.	93

Tabla 4.3	Experiencias pertinentes a las reacciones en las que se utilizó el método de titulación a punto final para la determinación de la productividad específica.	96
Tabla 4.4	Experiencias pertinentes utilizando extractos de girasol y evaluadas mediante CGL: Comparación de medias del %AGL en muestras, blancos y aceite puro y %AGL neto de los experimentos realizados.	100
Capítulo 5		
Tabla 5.1	Especificaciones comerciales de la lipasa de germen de trigo.	106
Tabla 5.2	Condiciones de reacción ensayadas utilizando lipasa comercial de germen de trigo.	108
Capítulo 6		
Tabla 6.1	Análisis de los coeficientes de variación de diferentes ensayos independientes para los medios de reacción ensayados utilizando PL.	126
Tabla 6.2	Porcentaje de AGL obtenido para las reacciones a 50 °C empleando el medio 1:1 y diferente masa de PL y tiempo de reacción a pH 4,4 (buffer de acetato 100 mM).	133
Capítulo 7		
Tabla 7.1	Experimentos aplicados en el diseño experimental Box-Behnken.	147
Tabla 7.2	Experimentos realizados en el diseño experimental factorial.	149
Tabla 7.3	Respuestas sin codificar obtenidas para cada experimento del DBB.	151
Tabla 7.4	Tabla ANOVA para el diseño experimental Box-Behnken.	153
Tabla 7.5	Respuestas obtenidas para cada experimento del diseño experimental factorial.	156
Tabla 7.6	Tabla ANOVA para el DF.	158
Tabla 7.7	Porcentaje de hidrólisis (m/m) y composición de productos de reacción (AGL, MAG, DAG, TAG y G en μ moles) para los puntos experimentales del DF.	161
Capítulo 8		
Tabla 8.1	Descripción de la composición de los medios de reacción empleados para estudiar el efecto de la goma arábica a tiempos de reacción largos.	168
Tabla 8.2	Nomenclatura para datos cinéticos considerados en el modelado matemático.	184
Tabla 8.3	Valores obtenidos para los parámetros A y B correspondientes a la Ecuación 8.3 para las muestras 30-1, 30-2, 37-1 y 37-2.	186
Tabla 8.4	Concentraciones iniciales de las especies, rangos evaluados de los parámetros y unidades utilizados en el modelado basado en primeros principios.	189
Tabla 8.5	Estimaciones iniciales de los parámetros k_1 y k_3 en los diferentes escenarios evaluados (A, B, C, D y E).	190

Tabla 8.6	Valores finales de los parámetros k_1 , k_3 y k_4 obtenidos para los escenarios A, B, C, D y E.	190
Tabla 8.7	Valores p obtenidos en la prueba de falta de ajuste para el perfil de cada escenario y sus puntos experimentales correspondientes (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2).	191

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Capítulo 1</i>		<i>Página</i>
Figura 1.5	Esquema de una molécula de ácido graso saturado e insaturado.	2
Figura 1.6	Esquemas de moléculas de tri-, di- y monoacilglicerol.	4
Figura 1.7	Principales interacciones de aceites, grasas y derivados (Gunstone 1996).	16
Figura 1.8	Reacciones más comunes que involucran lípidos. R, Y ¹ , Y ² e Y ³ representan cadenas carbonadas genéricas (Barros et al. 2010).	16
<hr/>		
<i>Capítulo 2</i>		
Figura 2.1	Esquema simplificado de los tratamientos realizados a las semillas para la obtención de extractos con potencial uso como biocatalizador.	36
Figura 2.2	Ejemplo de reacción completa de hidrólisis.	40
Figura 2.3	Esquema general del procedimiento experimental. El paso 2 debe ser omitido si la cuantificación del paso 3 se realiza mediante titulación en continuo (Sección 2.5.2.2).	40
Figura 2.4	Representación gráfica del sistema A de blancos de reacción utilizado en el método de titulación a punto final empleando pH metro.	48
Figura 2.5	Representación gráfica del sistema B de blancos de reacción utilizado en el método de titulación a punto final empleando pH metro.	50
<hr/>		
<i>Capítulo 3</i>		
Figura 3.1	Consumo de NaOH en función del tiempo de reacción durante la titulación en continuo del medio de reacción Novozymes utilizando lipasa microbiana comercial.	65
Figura 3.2	Consumo de NaOH en función del tiempo de reacción durante la titulación en continuo del medio de reacción Santos-60 utilizando lipasa microbiana comercial.	66
Figura 3.4	Curvas de titulación para el medio Santos-10 (buffer de fosfato, 100 mM, pH 7) simulando 0, 3,5 y 9 % de hidrólisis (%H, mÁcido Oleico/mAceite).	69
Figura 3.5	Curvas de titulación del medio Sigma y determinación del punto de equivalencia.	70
Figura 3.6	Comparación entre valores experimentales (-E) y teóricos esperados (-T) de MAG y DAG en la fracción lipídica luego de realizar la extracción con solvente de los medios Sigma (FO, Tabla 3.4) y Santos-10 (EM, Tabla 3.5). Determinación mediante CGL.	71
Figura 3.7	Distribución del tamaño de gota de la emulsión, para EM _{0h} (sin incubar) y EM _{2h} (2h incubación). V (%): porcentaje volumétrico.	80
Figura 3.8	Distribución del diámetro promedio de gota de las diferentes muestras analizadas (cada una por duplicado): Medio Santos-10 s/goma, Medio	82

Santos-10 c/goma, Medio 1:1 y Medio 1:1 hidrolizado. V (%): porcentaje volumétrico.

Figura 3.9	Esquema general de la metodología experimental para evaluar efecto del etanol y el catalizador sobre el pH del medio de reacción.	83
-------------------	---	----

Capítulo 6

Figura 6.1	Semillas de ricino (a) y polvo lipásico (b) obtenido luego del desaceitado con Acetona-16h.	118
Figura 6.2	Imagen microscópica (10X) de las partículas del polvo de ricino suspendidas en agua destilada.	124
Figura 6.3	Imagen microscópica (40X) de las partículas del polvo de ricino suspendidas en agua destilada.	124
Figura 6.4	Distribución de tamaño de partícula del polvo de ricino suspendido en agua (duplicado).	124
Figura 6.5	Evolución del %AGL (m/m) relativo al día de obtención (%AGL*) del polvo durante el tiempo de almacenamiento (días).	127
Figura 6.6	Efecto de la masa de polvo enzimático en la actividad lipásica específica ($\text{mmol}_{\text{AGL}}/\text{h}\cdot\text{g}_{\text{Aceite}}\cdot\text{g}_{\text{PL}}$) y el %AGL (m/m).	132

Capítulo 7

Figura 7.1	Posibilidades de realizar experimentos con tres variables: (a) análisis de una variable a la vez, (b) matriz con todas las combinaciones posibles, y (c) diseño experimental (Rodrigues et al. 2015).	142
Figura 7.2	Esquema representativo de la codificación de factores.	145
Figura 7.3	Esquema ilustrativo del DBB.	147
Figura 7.4	Esquema ilustrativo del DF.	148
Figura 7.5	Gráficos estadísticos del DBB: (A) gráfico de probabilidad normal para análisis de normalidad de los datos, (B) gráfico de residuales para el análisis de homocedasticidad.	152
Figura 7.6	Resultados obtenidos para los diferentes niveles de los factores O_{DBB} y A.	154
Figura 7.7	Resultados obtenidos al utilizar diferentes niveles de: (A) los factores A y L_{DBB} empleando $O_{\text{DBB}}=0,33$ (para $O_{\text{DBB}}=0,16$ y $0,50$ se observó el mismo comportamiento) y (B) factores L_{DBB} y O_{DBB} empleando $A=3$ (para $A=0$ y 6 se observó el mismo comportamiento).	155
Figura 7.8	Gráficos estadísticos del DF: (A) gráfico de probabilidad normal para análisis de normalidad de los datos, (B) gráfico de residuales para el análisis de homocedasticidad.	157
Figura 7.9	Superficie de respuesta para el diseño experimental factorial.	159

Capítulo 8

Figura 8.1	Efecto del uso de goma arábica como surfactante a tiempos de reacción de 0,5 y 24 h, utilizando proporciones diferentes de	170
-------------------	--	-----

	aceite:agua (v/v) en el medio de reacción (0,21:1 y 1:1) con y sin goma arábica (CG y SG).	
Figura 8.2	Curvas de cinética a 30 y 37 °C hasta 1,5 h de reacción para ambas masas de PL.	173
Figura 8.3	Curvas de cinética obtenidas a 30, 37 y 50 °C utilizando 0,0274 g _{PL} (0,012 g _{PL} /g _{Sustrato}).	174
Figura 8.4	Curvas de cinética obtenidas a 30, 37, 45 y 50 °C utilizando 0,0137 g _{PL} (0,006 g _{PL} /g _{Sustrato}).	174
Figura 8.5	Curvas de cinética utilizando diferentes relaciones de aceite:agua y 0,0137 g _{PL} .	176
Figura 8.6	Mecanismo de reacción enzimático propuesto por Garrido-del Solo et al. (1993) donde la enzima presenta inactivación/inhibición irreversible.	182
Figura 8.7	Mecanismo de reacción propuesto en la presente tesis.	183
Figura 8.8	Representación gráfica de las regresiones no lineales para el %AGL (m/m) en función del tiempo de reacción.	187
Figura 8.9	Representación conjunta de las regresiones obtenidas para las diferentes muestras.	188
Figura 8.10	Perfiles de concentración de P para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario (A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<K_3$ y E: $k_1<<k_3$).	192
Figura 8.11	Perfiles de concentración de E para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<K_3$ y E: $k_1<<k_3$.	194
Figura 8.12	Perfiles de concentración de ES para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<K_3$ y E: $k_1<<k_3$.	195
Figura 8.13	Perfiles de concentración de S para cada condición experimental (30-1, 30-2, 37-1 y 37-2) y para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<K_3$ y E: $k_1<<k_3$.	196
Figura 8.14	Perfiles de concentración de F en la muestra 37-1 (0.0137 g _{PL} a 37 °C) para cada escenario: A: $k_1=k_3$, B: $k_1>k_3$, C: $k_1>>k_3$, D: $k_1<K_3$ y E: $k_1<<k_3$.	197

TABLA DE NOMENCLATURA

AGL	Ácidos grasos libres
AGL _{Esp}	Ácidos grasos libres esperados medidos mediante cromatografía gaseosa
AGL _E	AGL experimental (CGL)
AGL _{Tit}	Ácidos grasos libres obtenidos mediante titulación
AGL _T	AGL teórico
AH	Aceite hidrolizado
ANOVA	Análisis de varianza
AO	Ácido oleico
APH	Aceite parcialmente hidrolizado
BI _{Inc}	blanco inactivado incubado
BI _{Ins}	blanco sin sustrato “instantáneo”
BI _{Ins}	blanco inactivado “instantáneo”
BM _{Ins}	blanco “instantáneo” de la muestra
BSS _{Inc}	Blanco sin sustrato incubado
CGL	Cromatografía gas-líquido
CV	Coefficiente de variación
D[4,3]	diámetro volumétrico medio
DAG	Diacilglicerol
DBB	Diseño Box-Benhken
DF	Diseño factorial
E	Enzima
EM	Emulsión
EMC	Equivalentes a la manteca de cacao
ES	Complejo Enzima-Sustrato
F	Enzima inactiva
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	Detector de ionización de llama
FO	Fase oleosa
G	Glicerol
L	Ácido linoleico
La	Ácido láurico
M	Ácido mirístico
MAG	Monoacilglicerol
MH	Muestra hidrolizada
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
n _E	Número estándar de experimento
O	Ácido oleico
ODE	Ecuaciones Diferenciales Ordinarias

OOO	Trioleína
P	Ácido palmítico
P	Producto
PL	Polvo lipásico
POP	1,3-dipalmitoleoil-2-oleoil glicerol
POSt	1-palmitoleoil-2-oleoil-3-estearoil glicerol
R	Variable de respuesta
S	Sustrato
St	Ácido esteárico
StOSt	1,3-estearoil-2-oleoil glicerol
TAG	Triacilglicerol
WGL	Lipasa comercial de gérmen de trigo (Wheat germ lipase)

ANEXO A

Caracterización del aceite de girasol alto oleico empleado como sustrato

Índice de acidez (método de Sección 2.2.1.1)

El índice de acidez del aceite de girasol alto oleico fue $0,050 \pm 0,005$ $\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{AGL}}$ y el %AGL fue $0,110 \pm 0,010$ (m/m) con un coeficiente de variación de 9,7 % para ambos casos. EL %AGL cumple con los requerimientos establecidos por el Código Alimentario Argentino (artículo 528) para el aceite de girasol refinado (acidez máxima expresada en ácido oleico de 0,2 %).

Composición de ácidos grasos (método de Sección 2.2.1.2)

El aceite de girasol alto oleico empleado como sustrato presentó la siguiente composición: $85,25 \pm 0,14$ % ácido oleico (C18:1n9c), $6,42 \pm 0,05$ % ácido linoleico (C18:2n6), $3,93 \pm 0,12$ % ácido palmítico (C16:0) y $2,65 \pm 0,03$ % ácido esteárico (C18:0). EL contenido de ácido oleico es superior al límite inferior establecido por el Código Alimentario Argentino para el aceite de girasol alto oleico (75 %, artículo 528). Además, posee un contenido de ácido oleico superior a aquel reportado por Sigma-Aldrich para el producto denominado Glycerol trioleate (código T7752), de grado analítico (65 %).

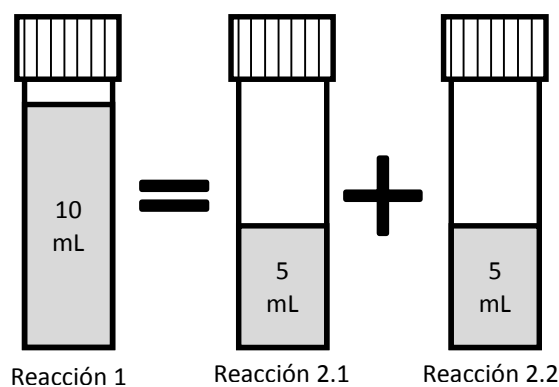
Valor peróxido (método de Sección 2.2.1.3)

El aceite de girasol alto oleico presentó un valor peróxido de $0,40 \pm 0,03$ miliequivalentes de Oxígeno/kg de aceite, con un coeficiente de variación de 6.3%. Este valor es muy inferior a aquel reportado por el CAA como límite superior para los aceites de girasol refinados (10 miliequivalentes de Oxígeno/kg de aceite).

ANEXO B

Factor de corrección para comparar muestras con diferente volumen de reacción

Considerando los siguientes sistemas de reacción, la deducción para obtener el factor de corrección por cambio de volumen de reacción se explica a continuación.



La actividad específica fue definida como la cantidad de ácidos grasos libres (AGL) en relación al tiempo de reacción (h), masa de aceite y polvo lipásico (PL) medida en $\frac{mmol_{AGL}}{h \cdot g_{Aceite} \cdot g_{PL}}$.

Si se conoce que:

$$g PL_{2.1} = g PL_{2.2} = \frac{1}{2} g PL_1 \quad (1)$$

$$g Aceite_{2.1} = g Aceite_{2.2} = \frac{1}{2} g Aceite_1 \quad (2)$$

$$\frac{mmol AGL_{2.1}}{h} = \frac{mmol AGL_{2.2}}{h} = \frac{1}{2} \frac{mmol AGL_1}{h} \quad (3)$$

Entonces la actividad de la reacción 1 puede escribirse como:

$$Actividad_1 = \frac{mmol AGL_1}{h \cdot g Aceite_1 \cdot g PL_1} \quad (4)$$

Reemplazando las equivalencias mencionadas anteriormente se obtiene:

$$Actividad_1 = \frac{2 \cdot mmol\ AGL_{2.1}}{h \cdot 2 \cdot g\ Aceite_{2.1} \cdot 2 \cdot g\ PL_{2.1}} = \frac{1}{2} Actividad_{2.1} = \frac{1}{2} Actividad_{2.2}$$

Finalmente,

$$\left[Actividad_{10\ mL} = \frac{1}{2} Actividad_{5\ mL} \right]$$

El factor de $\frac{1}{2}$ fue utilizado para realizar conversiones de actividad específica por diferencias en el volumen de reacción. Otras medidas como el %AGL o la productividad específica medida en $\frac{mmol\ AGL}{g\ PL}$ no deben ser afectadas por dicho factor.

ANEXO C

Cálculo de % m/m de cada subproducto de reacción utilizando el método de determinación conjunta de MAG DAG TAG G y AGL

A continuación, se muestra un ejemplo del cálculo empleado en la Sección 2.5.3.5 para determinar la composición de los productos de reacción de la hidrólisis. Los analitos que se utilizan para el ejemplo son el ácido esteárico (St), oleico (O) y linoleico (L), los cuales salen en conjunto en un único pico (StOL) y cuyo compuesto de referencia (estándar) será el tetradecano (TD). Esta determinación utiliza el método del estándar interno con algunas modificaciones. Además de incorporar el estándar dentro de la muestra, se prepara una mezcla adicional de cantidades conocidas de TD, St, glicerol, ácido palmítico, monopalmitina, monoestearina, dipalmitina, tricaprina, tripalmitina y tripalmitoleina. Esta mezcla se considera como un punto de referencia (*pto*) que permite identificar las relaciones de área y de masa necesarias, además de verificar diariamente que la respuesta del cromatógrafo fue relativamente estable en el tiempo (día a día, semana a semana) y permitir detectar posibles contaminantes en las soluciones empleadas. En base a esto, el procedimiento de cálculo fue el siguiente:

- 1) Calcular la relación másica entre el compuesto incógnita (StOL) y el compuesto de referencia (TD):

$$\left(\frac{\text{masa StOL}}{\text{masa TD}}\right)_{\text{Muestra}} = \frac{\left(\frac{\text{área StOL}}{\text{área TD}}\right)_{\text{muestra}} \times \left(\frac{\text{masa St}}{\text{masa TD}}\right)_{\text{pto}}}{\left(\frac{\text{área St}}{\text{área TD}}\right)_{\text{pto}}}$$

- 2) Calcular la masa del compuesto de referencia (TD para AGL) que se adicionó al eppendorf con la muestra incógnita:

$$\text{masa TD } (\mu\text{g}) = 4,55 \mu\text{L sol estándar TD} \times 10,6 \frac{\mu\text{g TD}}{\mu\text{L sol estándar TD}}$$

(Volumen colocado en eppendorf
junto con la muestra incógnita) (Concentración de TD en
solución estándar de TD)

- 3) Multiplicar (1) por (2) para obtener la masa de StOL en la muestra incógnita.
- 4) Calcular la masa de muestra contenidos en los 15 μL de solución madre de muestra tomados inicialmente (la concentración de la solución madre fue 40 mg/mL de piridina, equivalente a 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de piridina).
- 5) Dividir (3) por (4) y multiplicar por 100, obteniendo %StOL (m/m) en base a la masa de los productos recuperados luego de la extracción con solvente.

OBS: en todos los casos los volúmenes de muestra o estándar que fueron pesados se consideraron despreciables frente a los μL de piridina adicionada en la dilución. Por ejemplo:

$$40 \text{ mg}_{\text{Muestra}}/\text{mL}_{\text{Piridina}} = 40 \text{ mg}_{\text{Muestra}}/\text{mL}_{\text{Solución total}}$$

Para el % de glicerol, mono- y diacilgliceroles se procedió de la misma manera. Los triglicéridos se estimaron por balance de masa.

ANEXO D

Cálculo del factor de corrección para convertir el %AGL en base producto a %AGL base sustrato

En principio, los ácidos grasos libres (AGL) determinados mediante la técnica cromatográfica de la Sección 2.5.3 se obtuvieron en base producto (%AGL_P):

$$\%AGL_P = \frac{g\ AGL}{g\ P} * 100 \quad (Ec. C1)$$

Donde P representa la masa de producto recuperado luego de la extracción con solventes (Sección 2.5.3.1). Debido a que estos productos no contienen la masa de glicerol producido (que no es recuperada en la extracción) ni tampoco la masa de agua que fue consumida en la formación de los productos, las cuales serán mayor o menor dependiendo del grado de hidrólisis, se decidió referenciar la masa de AGL en relación a la masa de sustrato inicial (S₀):

$$\%AGL_S = \frac{g\ AGL}{g\ S_0} * 100 \quad (Ec. C.2)$$

Para ello, se construyeron los valores teóricos de una reacción de hidrólisis hipotética considerando que cada triacilglicerol (TAG) se hidrolizó por completo (sin mono- ni diacilgliceroles) obteniendo la Tabla C.1.

A partir de esta tabla, se pueden graficar dos curvas (Figura C.1). La primera (línea punteada) corresponde a la relación 1:1 y se puede utilizar como referencia de los datos sin corregir. La segunda línea (línea continua) describe el comportamiento del %AGL_P en función del %AGL_S. Ambas líneas pasan por el origen.

Tabla C.1 Valores teóricos de los sustratos y productos de la reacción asumiendo diferentes niveles de hidrólisis.

S_0 (g)	Aceite hidrolizado (g)	Aceite sin hidrolizar (g)	AGL producidos (g)	%AGL _P	%AGL _S
100	5	95	4.7643	4.7755	4.7643
100	10	90	9.5286	9.5737	9.5286
100	15	85	14.2929	14.3946	14.2929
100	20	80	19.0572	19.2385	19.0572
100	25	75	23.8215	24.1055	23.8215
100	30	70	28.5858	28.9958	28.5858
100	35	65	33.3501	33.9095	33.3501
100	40	60	38.1144	38.8468	38.1144
100	45	55	42.8787	43.8079	42.8787
100	50	50	47.6430	48.7930	47.643
100	55	45	52.4073	53.8022	52.4073
100	60	40	57.1716	58.835	57.1716
100	65	35	61.9359	63.8936	61.9359
100	70	30	66.7002	68.9762	66.7002
100	75	25	71.4645	74.0837	71.4645
100	80	20	76.2288	79.2162	76.2288
100	85	15	80.9931	84.3738	80.9931
100	90	10	85.7574	89.5569	85.7574
100	95	5	90.5217	94.765	90.5217
100	100	0	95.2860	100	95.2860

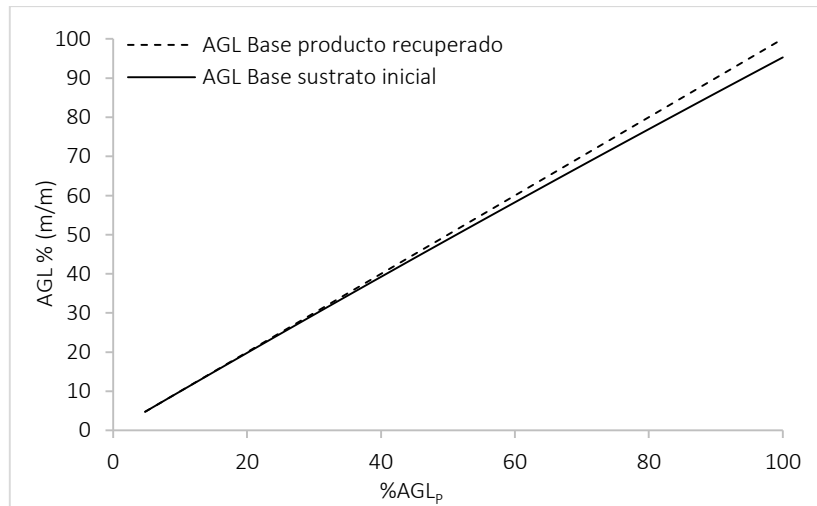


Figura C.19 Las líneas representan la relación entre el %AGL_P y %AGL_S para la hidrólisis teórica de aceite como función del %AGL_P.

La regresión lineal que pasa por el origen y que se obtiene a partir del %AGL_S como función del %AGL_P es la siguiente:

$$[\%AGL_S = 0.9636 \times AGL_P], R^2=0.9996 \quad (Ec. C.3)$$

Si se observa la Figura C1, podría considerarse que para valores inferiores a $AGL_p=60\%$, no existirían diferencias importantes entre las dos opciones. Si la corrección de la Ecuación C.3 se desestimara, entonces la media experimental de las muestras con $\%AGL_p$ elevados, quedarían levemente sobreestimadas mientras que aquellas con $\%AGL_p$ bajos no. Si bien no es una modificación importante, esta conversión será particularmente apropiada para comparar muestras con una diferencia marcada en su nivel de hidrólisis, como sería el caso de la cinética de reacción en donde se utilizan tiempos largos que alcanzan porcentajes de reacción muy elevados. De todas formas, el factor de conversión fue aplicado a todos los resultados de la tesis.