

INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA EN LA ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Ana María Cortés, Raúl E. Mora, Julio César Vargas*

Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Carrera 30 – Calle 45, Edificio 453, Bogotá – Colombia

*Fax: +57 (1) 3 16 53 21 e-mail: jcvargass@unal.edu.co

Resumen

La producción de ésteres de ácidos grasos tiene gran interés dadas sus propiedades emulsificantes. En la actualidad, se producen mundialmente 300000 toneladas de agentes de actividad superficial para ser utilizados en el procesamiento de alimentos. Los procesos tradicionales emplean catalizadores químicos (H_2SO_4 , APTS), de notable impacto ambiental y baja selectividad hacia α -monoglicéridos. La búsqueda de nuevos catalizadores amigables con el ambiente, que sean económicos y con un rendimiento comparable a los catalizadores tradicionales es de gran interés.

En la literatura de la última década se reportan aluminosilicatos, zeolitas, resinas de intercambio y óxidos, básicos y ácidos, como catalizadores de la reacción de esterificación. Recientemente, se han estudiado catalizadores de origen biológicos (enzimas). Las enzimas son catalizadores promisorios dadas sus condiciones de proceso (presión, temperatura, tiempo) y su buena conversión, selectividad y estereoespecificidad.

Trabajos previos han mostrado que la lipasa *Candida antarctica* y que algunas resinas de intercambio iónico tipo Lewatit presentan actividad catalítica en la reacción de esterificación de ácidos grasos.

Nuestra aproximación consiste en la inmovilización de la lipasa *Candida antarctica* sobre dos resinas de intercambio iónico: Lewatit 2431 (resina con grupos funcionales sulfónicos) y Lewatit S 3428 (con grupos funcionales amínicos), y el estudio de la actividad catalítica en la reacción de esterificación de ácido esteárico con glicerol para la producción de monoésteres.

Para la determinación de la actividad catalítica, la enzima libre e inmovilizada (2% p/p de enzima – ácido esteárico) se alimentó al reactor a 70 °C con agitación continua (800 rpm), posterior a la fusión del ácido. Se introduce el glicerol y se lleva a cabo mediciones de valor ácido en el tiempo durante 1 h para determinar la conversión. Para la determinación de la selectividad hacia α -monoglicéridos se empleó el método del *Food Chemical Codex*. Para evaluar la estabilidad operacional se realizaron ciclos sucesivos a las mismas condiciones.

La resina Lewatit 2431 presenta mejor retención de la actividad (60%, comparada con la enzima libre) frente a un 35% de la resina Lewatit S 3428. La conversión final a monoestearato de glicerilo para la misma carga en peso de catalizador presenta una disminución del 30% para Lewatit 2431 frente a la enzima libre, mientras que la selectividad no se ve afectada.

La estabilidad operacional de la enzima inmovilizada descendió al 60% de la actividad inicial después de 3 ciclos. Esto se puede atribuir a la desorción de la enzima, la cual se pierde en la mezcla reaccionante y a la desactivación térmica de la enzima debido a la temperatura de reacción.

Palabras clave: Monoglicéridos, inmovilización enzimática, lipasa.

Introducción

Los ésteres grasos son una clase importante de compuestos orgánicos que se sintetizan de diferentes formas: mediante la reacción entre alcoholes y ácidos carboxílicos (esterificación) con eliminación del agua para desplazar el equilibrio, intercambio de grupos acilo entre ésteres y alcoholes (alcohólisis) y entre ésteres (transesterificación). Los productos de la esterificación de ácidos de cadena larga y alcoholes de cadena corta se utilizan como aditivos en la industria de alimentos, aseo, cosmética y farmacéutica. Comúnmente, se producen por reacción química entre un alcohol y un ácido orgánico en presencia de un catalizador ácido.

La preparación de ésteres grasos mediante catálisis enzimática ha promovido la optimización de reacciones en medio no acuoso para la producción de compuestos ampliamente utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica. El incremento en el número de patentes y publicaciones en esta área de investigación puede ilustrar la importancia comercial del acercamiento enzimático. En biotransformaciones, las lipasas se destacan por su versatilidad para llevar a cabo reacciones de hidrólisis, esterificación e interesterificación con extrema simplicidad del proceso, calidad superior del producto final y altas conversiones. Estas características dan a las lipasas un potencial bioquímico comparable con las esterasas y las amilasas, enzimas ampliamente utilizadas a gran escala, estimulando la investigación en la optimización de la producción de lipasas, la inmovilización y las aplicaciones industriales [1].

Las lipasas, que catalizan las reacciones de hidrólisis y esterificación, han encontrado amplias aplicaciones en productos de alto valor agregado como compuestos enantioméricamente puros y de química fina. La actividad hidrolítica normalmente se obtiene utilizando las lipasas en solventes orgánicos de baja actividad acuosa o en medios libres de solvente compuestos tan solo de los sustratos que intervienen en la reacción. Los medios bifásicos se han estudiado ampliamente aunque lo que se busca a nivel industrial es el desarrollo de procesos de esterificación simples.

La aplicación conveniente de los biocatalizadores usualmente impone su utilización después de ser inmovilizados en un soporte trasladándolos al campo de la catálisis heterogénea, donde los fenómenos de transporte se convierten en un factor importante. La utilización de un solvente tiene diferentes ventajas ya la reacción se lleva a

cabo en presencia de una sustancia buffer, pero se requieren etapas de extracción y purificación posteriores y se aumenta el riesgo de obtener residuos en el producto final. Además, el costo del solvente y su manejo incrementan los costos de producción. En un sistema libre de solvente se incrementa la producción volumétrica, lo que hace estos procesos atractivos para las aplicaciones industriales. La mayor ventaja de los sistemas libres de solvente es que la ausencia del mismo facilita la purificación al final del proceso, ya que al término de la reacción, en la mezcla hay menos componentes. [2]

La enzima inmovilizada permite incrementar la estabilidad, la reutilización, la operación continua, y la posibilidad de mejor control de las reacciones. Por ende, se pueden esperar factores económicos favorables. Las lipasas han sido inmovilizadas por diferentes métodos: adsorción, entrecruzamiento, unión covalente y atrapamiento físico utilizando como soporte diferentes materiales orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, la actividad y la estabilidad operacional de las lipasas dependen de varios parámetros como la fuente de la lipasa, el tipo de soporte y el protocolo de inmovilización. Dentro de las técnicas de inmovilización, la adsorción es la de mayor potencial comercial ya que los soportes utilizados en otros métodos de inmovilización presentan resistencia mínima en las mezclas reaccionantes mientras que los soportes que se pueden utilizar para la adsorción son mecánicamente resistentes y pueden reutilizarse [3,4].

Dentro de los emulsificantes más importantes para la industria alimenticia y farmacéutica se encuentran los monoglicéridos. Industrialmente se producen por transesterificación de grasas a altas temperaturas utilizando catalizadores alcalinos, y por esterificación del glicerol con ácidos grasos o por la alcohólisis del triglicérido con glicerol empleando como catalizadores agentes ácidos inorgánicos como ácido sulfúrico, ácido fosfórico y ácido paratoluensulfónico (APTS).

Estos catalizadores además de influir negativamente en algunas propiedades físicas del producto final, como el color y el olor, dificultan las etapas de purificación posteriores y resultan contaminantes para el ambiente.

La producción con lipasas inmovilizadas ha llamado la atención porque aminora las condiciones de operación y se limita la formación de productos de reacciones paralelas [4].

Los monoglicéridos son separados de los di y triglicéridos mediante destilación molecular.

Actualmente, productos comerciales libres de catalizador, ácidos grasos y glicerina y con un contenido de monoglicéridos superior al 90% son utilizados ampliamente en la industria de alimentos, a pesar de su precio.

La producción de monoglicéridos de alta pureza es complicada y costosa, básicamente por la alta carga energética del proceso y las etapas posteriores de purificación. Por ésta razón, el estado del arte de la producción de monoglicéridos se ha enfocado en la solución de estos dos problemas. Hasta ahora, no existen procesos de producción más rentables que los enunciados anteriormente. La gran mayoría de las investigaciones que se han desarrollado se encuentran a nivel laboratorio. Sin embargo, en la última década se ha intensificado el estudio de la catálisis heterogénea, encontrándose buenas perspectivas en resinas de intercambio iónico, zeolitas, aluminosilicatos y en catalizadores biológicos (enzimas). Estas últimas de altísimo interés por las bajas temperaturas de operación, alta conversión, selectividad y estereoespecificidad.

Los productos obtenidos mediante catálisis enzimática tienden a ser más puros que los que se obtienen por medios químicos alternativos, dado que la catálisis química tiende a ser no específica y por lo tanto genera varios subproductos. Por lo tanto, el uso de lipasas para realizar la esterificación alivia la necesidad de una variedad amplia de procesos complejos de separación en la post-reacción y conlleva a una disminución de costos totales de operación.

Sin embargo, las reacciones catalizadas por lipasas tienen una inconveniencia asociada importante: las conversiones son relativamente bajas en comparación con procesos químicos

tradicionales, si se emplean las preparaciones enzimáticas comerciales crudas. Estas bajas productividades volumétricas pueden conducir a productos menos puros que los obtenidos por síntesis química (que son más versátiles en el sentido en que las condiciones de proceso se pueden modificar en intervalos más amplios), y tal desventaja se puede entonces juntar con la inhibición del catalizador biológico por los productos y/o los sustratos y de la desactivación térmica del biocatalizador [1,3].

En el presente trabajo se estudia el comportamiento catalítico -actividad, selectividad y estabilidad operacional- de la Lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre dos resinas de intercambio iónico, para la obtención de monoestearato de glicerilo a partir de la esterificación de ácido esteárico con glicerol, en un medio libre de solvente.

Metodología

La reacción de esterificación de ácido esteárico y glicerol se estudió con una relación molar 1:1, empleando 2% de catalizador enzimático con respecto al ácido esteárico presente. La actividad catalítica se obtuvo empleando el método de velocidades iniciales. Para la determinación se utilizó glicerina grado USP con pureza mínima del 99.5% y ácido esteárico triple prensado comercial. La reacción se llevó a cabo en el montaje que se muestra en la Figura 1, en medio libre de solvente, en un reactor enchaquetado de vidrio de 200mL equipado con deflectores y un agitador de tres aspas tipo turbina a 800 rpm. La temperatura de la mezcla reaccionante se mantuvo a 70°C mediante un baño termostatado (Julabo).

Figura 1. Esquema del equipo de reacción

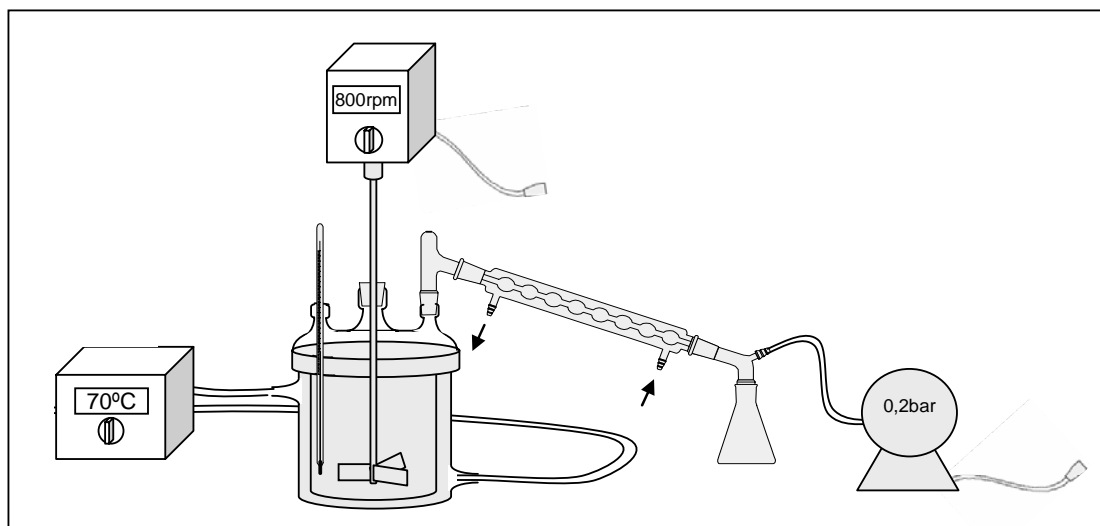
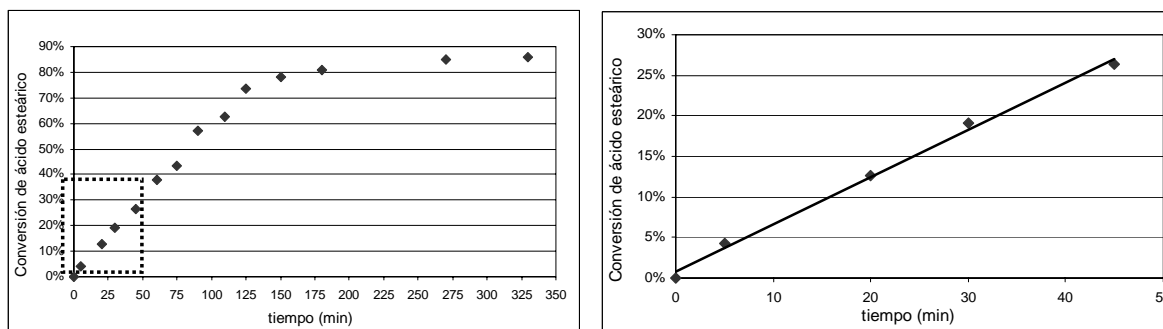


Figura 2. Determinación de la actividad enzimática de Lipozyme CALB en la reacción de esterificación



Para favorecer la reacción de esterificación el agua producida se retiró con vacío (0,24 bar).

La reacción se llevó a cabo por 40 minutos durante los cuales se realizó el seguimiento del avance mediante la determinación del índice de acidez. El método se basa en la determinación de la cantidad de ácido presente en la muestra mediante el cambio de pH. El hidróxido de sodio reacciona con el ácido presente en la muestra llevando a un cambio de pH de ácido a básico, que se detecta utilizando fenolftaleína como indicador. Una unidad de índice de acidez se define como los gramos de hidróxido que reaccionan con un gramo de muestra.

Con la variación de la conversión en el tiempo se determinó la actividad enzimática, definiendo la unidad de actividad como los moles de ácido esteárico que reaccionan por minuto y por gramo de lipasa.

Para calcular la actividad catalítica a partir de los valores de conversión, se escoge la sección lineal y se determina la pendiente (Figura 2). La enzima utilizada fue Lipozyme CALB-L (Novozymes), la cual se inmovilizó sobre una resina de matriz de poliestireno con grupos funcionales sulfónicos (Lewatit 2431, Bayer) y una resina de matriz de poliestireno con grupos funcionales amina terciaria (Lewatit S3428, Bayer) siguiendo el protocolo descrito por Mora *et al.* [5].

El procedimiento para evaluar la enzima soportada y libre fue el mismo. Para cada resina se evaluó la actividad de diez preparaciones diferentes utilizando distintas cargas de lipasa Lipozyme CALB-L.

La estabilidad operacional de los catalizadores enzimáticos soportados se determinó realizando la reacción de esterificación después de lavarlos con etanol, estableciendo el número de ciclos que trabaja el catalizador hasta que la actividad disminuya hasta el 60% de la actividad inicial.

Posteriormente, se llevó a cabo la esterificación

empleando el derivado enzimático de mejor desempeño en un reactor de 500 mL. El método seleccionado para seguir el avance de la reacción fue la medición del índice de acidez.

Las condiciones de operación se mantuvieron constantes a excepción de la temperatura, que se incrementó hasta 170°C para evaluar la acción catalizadora de los soportes en la reacción de esterificación. La selectividad del catalizador se definió como el porcentaje de α -monoglicéridos, cuantificados por el método descrito en el *Food Chemical Codex*. El método permite determinar la cantidad de monoglicéridos en la posición α en una mezcla de monoglicéridos, mediante el ácido peryódico (HIO_4) consumido en la oxidación de los grupos hidroxilo adyacentes.

Discusión de Resultados

La correspondencia entre el porcentaje inmovilizado y la actividad residual de la enzima para la lipasa inmovilizada sobre Lewatit 2431 (Figura 3) y Lewatit S 3428 (Figura 4) muestra que para las mismas condiciones de reacción, la actividad residual expresada como porcentaje en relación a la enzima libre cuya actividad es de 1,98 mmol de ácido esteárico. g^{-1} de lipasa. min^{-1} , incrementa a medida que aumenta la carga inicial de inmovilización.

Para el mismo intervalo de cargas de lipasa utilizados en la inmovilización (entre 5 y 70mg), Lipozyme/Lewatit 2431 retiene mayor porcentaje de la actividad del catalizador libre, llegando a un máximo de 67%, mientras que la actividad residual de Lipozyme/Lewatit S 3428 tan solo retiene en el mejor de los casos un 28%. Este comportamiento puede atribuirse a las diferencias estructurales de los soportes.

La unión con la resina Lewatit S 3428 se da, posiblemente, por adsorción mediante un enlace químico covalente por la presencia de grupos amino en la superficie del soporte, generando de esta manera una modificación estructural de la enzima llevándola a una conformación cerrada

hacia el centro activo [6,7].
 Por el contrario, la estructura de la resina Lewatit 2431 lleva a pensar en una adsorción netamente física mediante la cual la lipasa mantiene gran parte de su conformación estructural original. Lipozyme/Lewatit 2431 con cargas iniciales entre 0,60 y 0,80 g ofrecen los mejores resultados de

actividad para llevar a cabo la reacción de esterificación (Figura 3). Es conveniente que los máximos para las dos variables se encuentren próximos, ya que se busca inmovilizar mayor cantidad de enzima con una actividad igual o mayor a la obtenida con la enzima libre.

Figura 3. Relación entre la cantidad de enzima inmovilizada y la actividad en la reacción de esterificación utilizando enzima inmovilizada en Lewatit 2431.

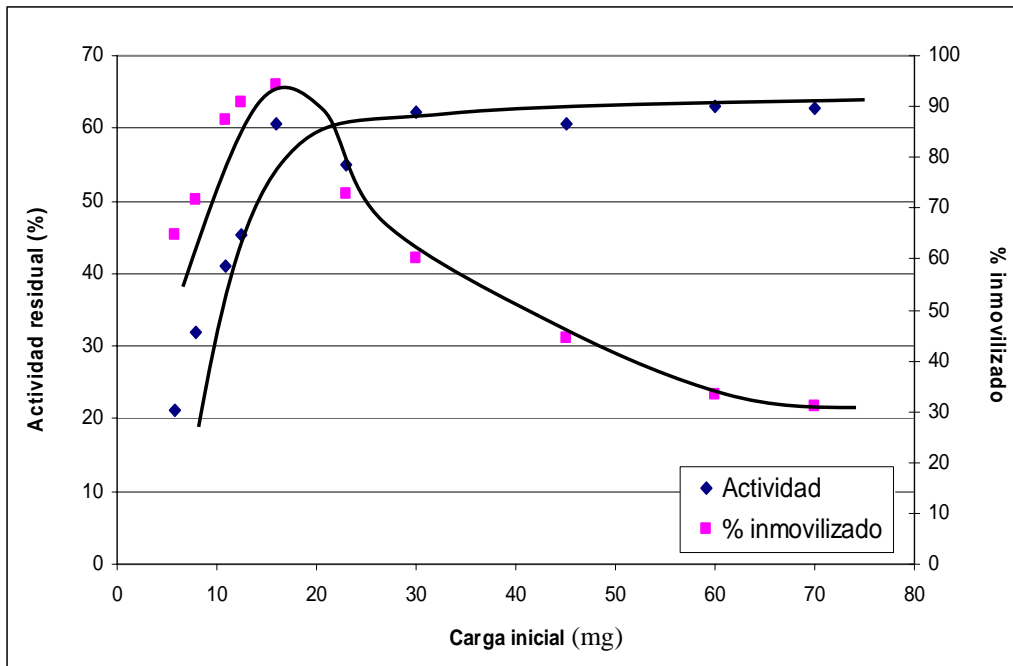


Figura 4. Relación entre la cantidad de enzima inmovilizada y la actividad en la reacción de esterificación utilizando enzima inmovilizada en Lewatit S 3428

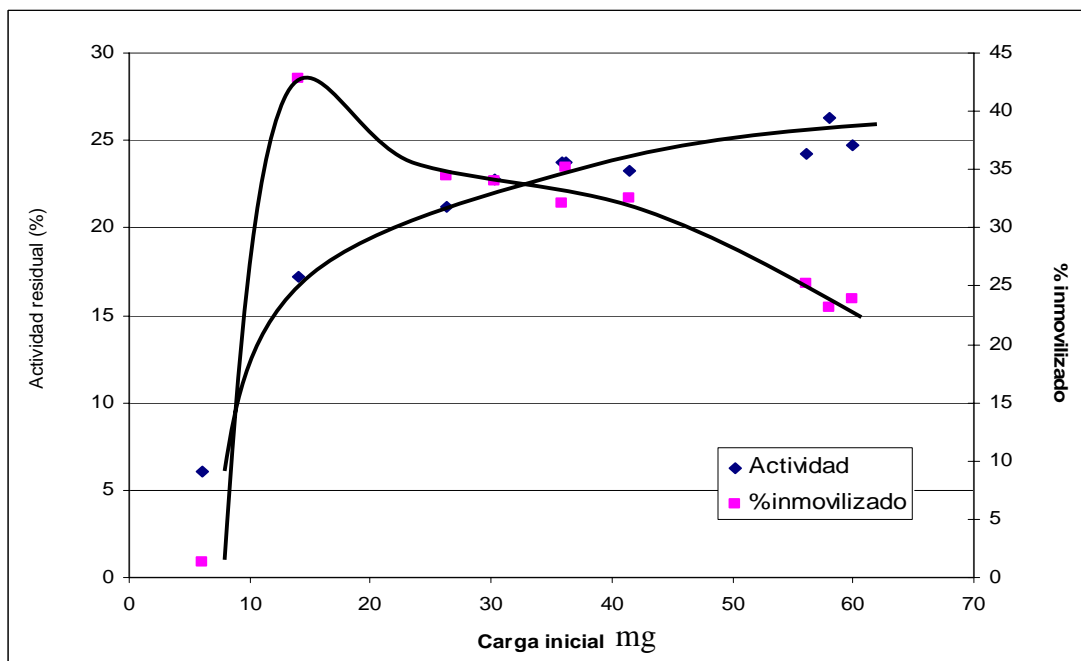


Tabla 1. Influencia de la carga inicial de Lipozyme/Lewatit 2431 en el desempeño catalítico

Catalizador	Inmovilizado (%)	R _A (%)	X (%)	S (%)	Estabilidad operacional (Retención de actividad, %)		
					Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
0.6Lipozyme/Lewatit 2431	79	36	59	37	100	72	61
0.7Lipozyme/Lewatit 2431	89	43	55	35	100	66	59
0.8Lipozyme/Lewatit 2431	93	53	52	38	100	69	61

R_A: Retención de actividad, X: Conversión de ácido esteárico, S: Selectividad hacia α -monoglicéridos

Finalmente, la reacción de esterificación hasta obtener conversión constante se realizó empleando Lipozyme/Lewatit 2431 con cargas de 0.6, 0.7 y 0.85 g de enzima.g⁻¹ de soporte durante la inmovilización. En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para la retención de actividad, conversión final, selectividad hacia α -monoglicéridos y la estabilidad operacional. La carga de enzima inmovilizada utilizada fue el equivalente al 2% de enzima libre con respecto a la cantidad de ácido esteárico.

Estabilidad operacional

Para los tres catalizadores seleccionados se realizaron los ensayos de estabilidad operacional. Para tres ciclos se determinó la actividad, siendo la actividad del primero tomada como el 100%. En el segundo ciclo los catalizadores obtenidos sufren una pérdida de actividad del 30% y para el tercer ciclo la retención de actividad es del 60%. La caída brusca en la actividad de la enzima puede deberse a la desorción de la enzima o a la desactivación térmica de la misma. La menor caída de la actividad en el siguiente ciclo muestra que la primera posibilidad es la más factible, indicando que la unión física no es irreversible y

que gran parte de la enzima adsorbida está débilmente unida al soporte.

Comparación de catalizadores

El avance de la reacción para los catalizadores 0.6 Lipozyme/Lewatit 2431, Lipozyme, la enzima inmovilizada comercial Novozyme 435 y el soporte Lewatit 2431 se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 2 se muestra la comparación de conversión y selectividad. La temperatura de reacción cuando se utiliza como catalizador Lewatit 2431 es 170 °C; para los catalizadores enzimáticos la temperatura de reacción es de 70°C, que corresponde a la temperatura de fusión del ácido esteárico.

La resina de intercambio cataliza la reacción de esterificación a partir de la tercera hora de contacto; alcanzado un nivel de conversión del 50% a las 4.5 h de tiempo reacción. Para los catalizadores enzimáticos el tiempo de activación es de sólo 30 min, alcanzando el 50 % de conversión a las dos Lipozyme y a los 30 min., con la Novozyme 435.

Figura 5. Seguimiento de la conversión del ácido esteárico en la reacción utilizando diferentes catalizadores

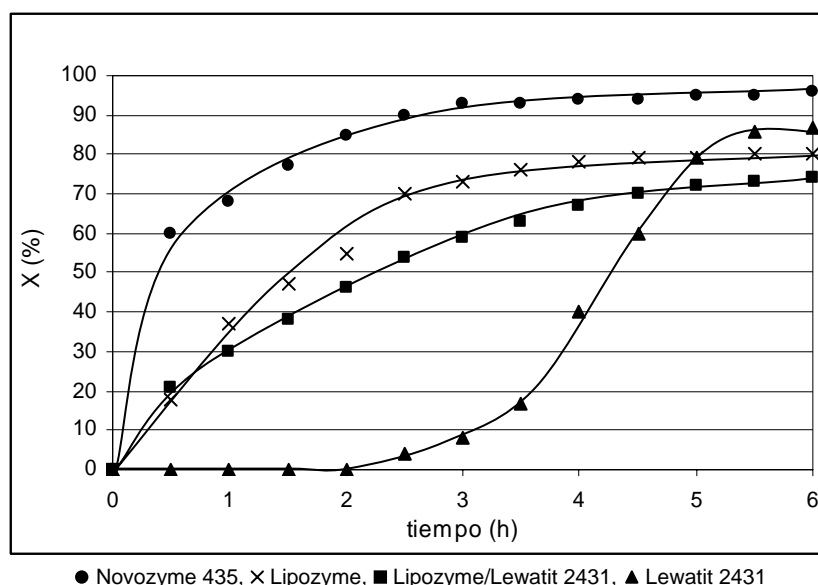


Tabla 2. Comparación de catalizadores en la reacción de esterificación.

Catalizador	X (%)	S (%)
Lewatit 2431	89	45
Lipozyme	85	35
0.6 Lipozyme/Lewatit 2431	55	38
Novozyme 435	99	36

X: Conversión del ácido esteárico, S: Selectividad hacia α monoglicéridos

Conclusiones

La conversión total del ácido esteárico en la esterificación disminuye notablemente con la inmovilización de la lipasa. Con Lipozyme CALB-L se obtiene conversión máxima del 85%, con 0.6 Lipozyme/Lewatit 2431 la conversión máxima alcanzada es del 59%.

El incremento de la cantidad de enzima adsorbida sobre el soporte no incrementa la conversión.

La retención de actividad de la lipasa en la esterificación es mayor para cargas más altas de enzima, lo cual representa menores tiempos de reacción.

La forma como se une la enzima al soporte influye sobre la selectividad del catalizador. La carga de la lipasa no ejerce influencia sobre la selectividad.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del Programa Semilleros de Investigación de la Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia a través del proyecto "Producción enzimática de ésteres grasos caso monoestearato de glicerilo".

Bibliografía

1. De Oliveira P., Alves G., de Castro H., Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. 2002. *Biochemical Engineering Journal* vol 5: 36 – 71.
2. Sandoval G., Condoret J.S., Monsan P., Marty A. Esterification by immobilized lipase in solvent free media: Kinetic and thermodynamic arguments. 2002. *Wiley Interscience Periodicals*: 313 – 320.
3. Tan T., Wang F., Zhang H., Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* vol 18: 325 – 331.
4. Pouilloux Y., Abro S., Vahoe C., Barrault J., Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion exchange resins. 1999. *Journal of Molecular*

catalysis A: Chemical vol 149: 243 – 254.

5. Mora R.E., Cortés A.M., Algecira N., Vargas J.C., Inmovilización de lipasas: estudio del equilibrio de adsorción sobre resinas de intercambio. *Memorias XXI Congreso Interamericano de Ingeniería Química*. 2005.

6. Krishnakant S., Madamwar D., Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels. 2001. *Process Biochemistry* vol 36: 607 – 61.

7. Bryjak J., Bachman J., Pawlow B., Immobilization of lipases on various acrylic copolymers. 1997. *Chemical Engineering Journal* vol 65: 249 – 256.

