

Diseño de biocatalizador para la producción continua de mono y diglicéridos



AUTORES: AGUSTÍN LUCINI MAS^[1]; GRISELDA A. EIMER^[2]; GABRIEL O. FERRERO*^[2]

*E-mail: gferrero@frc.utn.edu.ar

^[1] CIQUIBIC-CONICET, Fac. Cs. Qcas., UNC, Av. Haya de la Torre s/n, Ciudad Universitaria, CP:5016, Córdoba, Argentina. Tel: +54 351 5353855.

^[2] CTeQ-UTN-CONICET, Universidad Tecnológica Nacional, Fac. Regional Córdoba, Maestro López esq. Cruz Roja, Ciudad Universitaria, CP:5016, Córdoba Capital, Argentina. * Tel.: +54 0351 4690585; fax: +54 0351 4690585.

Trabajo original preparado especialmente para A&G.

Resumen / Abstract

Los mono y diglicéridos son compuestos utilizados como emulsionantes y tensioactivos en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y química en general. La principal forma de producción de los mismos es a partir de esterificación del glicerol o transesterificación y alcoholólisis de aceites, mediante el uso de catálisis homogénea ácida o básica a altas temperaturas. En este trabajo se propuso producir mono y diglicéridos en forma continua, mediante la reacción opuesta, la alcoholólisis parcial de los triglicéridos, usando un biocatalizador desarrollado a partir de la enzima lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en el material mesoporoso SBA-15.

Se encontró que en tan solo 20 minutos de reacción (tiempo que tarda en atravesar el reactor la mezcla de reacción) se producen 44% de diglicéridos y 27% de monoglicéridos, manteniéndose prácticamente constante en el tiempo en el caso de los primeros y disminuyendo apenas en el caso de los monoglicéridos. Surge entonces una valiosa forma de producción de estos compuestos, suavizando las condiciones de reacción y utilizando un catalizador que mantiene su actividad y no requiere ser separado de los productos finales.

*Mono- and di-glycerides are compounds used in the food, pharmaceutical, cosmetic and chemical industry as emulsifiers and surfactants. The main methods of production are esterification of glycerol or transesterification and alcoholysis of oils, by using basic or acidic homogeneous catalysis at high temperatures. In this paper, the inverse reaction was used: the alcoholysis of triglycerides, as a new way to produce continuously mono and diglycerides, using a biocatalyst of *Pseudomonas fluorescens* lipase enzyme immobilized in the mesoporous material SBA-15.*

It was found that at 20 minutes of reaction (the time that the reaction mixture takes to traverse the reactor) 44% diglycerides and 27% monoglycerides was produced, remaining constant in time the yield. This way of producing emulsifying compounds appears as a valuable method, with mild reaction conditions and using a catalyst that maintains its activity and does not require to be separated from the final products.

Palabras claves / Key words

Monoglicéridos; diglicéridos; inmovilización enzimática; SBA-15; biocatálisis.

Monoglycerides; diglycerides; enzymatic immobilization; SBA-15; biocatalysis.

• Introducción

Los mono y diglicéridos son ésteres del glicerol con uno o dos ácidos grasos respectivamente. Son de gran importancia en la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica y química debido a su acción como emulsificantes y surfactantes que le otorga su estructura anfipática (Thengumpillil *et al.*, 2003). Las principales formas de producción utilizadas hoy en día son la esterificación del glicerol con el ácido graso bajo catálisis homogénea ácida, la alcoholólisis y la transesterificación de triglicéridos y glicerol con diferentes catalizadores, como óxidos de metales, bases inorgánicas (CaO, NaOH o KOH) y sales sódicas de alcoholes de bajo peso molecular. Todos estos procesos necesitan temperaturas muy elevadas de entre 210-240 °C (Bossaert *et al.*, 1999). Cualquiera de estas vías utilizadas da como resultado una mezcla de glicéridos que generalmente posee color y aroma, lo que hace que no puedan ser utilizados directamente en alimentos o cosméticos, por lo que es necesario una purificación por destilación. Por otro lado, estos procesos utilizan altas temperaturas además de ácidos y bases; lo que genera la necesidad de una infraestructura especial en la industria.

Como alternativa a estos catalizadores, surge la posibilidad de utilizar enzimas para la producción de los mismos compuestos con la ventaja de obtener mayores rendimientos en condiciones de reacción suaves, lo que resulta en productos de mayor calidad y menor consumo de energía (Ferreira-Dias *et al.*, 2001).

Las enzimas que presentan actividad para realizar reacciones de transesterificación, alcoholólisis o esterificación se denominan lipasas (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acilhidrolasa) y representan un grupo de enzimas solubles en agua que catalizan originalmente la ruptura y formación de los enlaces éster de sustratos lipídicos insolubles en agua. Una desventaja de utilizar estas enzimas en medios no acuosos, es que tien-

den a formar agregados que dificultan la interacción de las enzimas internas con el sustrato y por lo tanto sólo las que se encuentran en la superficie pueden realizar su función, lo que resulta en una reducción de su actividad (Salis *et al.*, 2010). Sin embargo, estas lipasas pueden inmovilizarse en distintos materiales para mejorar su estabilidad y reutilización, obteniéndose biocatalizadores con alta selectividad, eficiencia y rendimiento (Liu *et al.*, 2010; Salis *et al.*, 2008).

Para lograr el máximo de sitios activos y lograr un poder catalítico completo, es conveniente dispersar la enzima en superficies como las de los materiales mesoporosos. Distintos materiales han sido utilizados para este fin como sílica gel, epoxy SiO₂-PVA, Celita, SBA-15 entre otros; como así también enzimas lipasas de distintos microorganismos tales como *Penicillium camemberti*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizomucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* y más (Berger and Schnelder, 1992; Mendes *et al.*, 2011; Salis *et al.*, 2009).

En base a esto, se propuso desarrollar un biocatalizador utilizando la enzima lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada por medio de adsorción física al soporte SBA-15 (Santa Bárbara Amorphous 15) y a partir de ello, generar un reactor continuo de producción de mono y diglicéridos por transesterificación de triglicéridos con etanol 96%.

• Materiales y métodos

Materiales

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL, $\geq 20,000$ UI/g a 55 °C, pH 8,0) fue adquirida de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EE.UU.). Ésta es una enzima con alta actividad lipolítica producida por "Amano Labs". Tiene un peso molecular de aproximadamente 33 kD, un punto isoeléctrico igual a 4, un intervalo de estabilidad de 4<pH<10, y un pH óptimo

de actividad en el rango de 8<pH<10. El aceite de girasol utilizado (comercial, marca "Vicentin") fue adquirido en una tienda local. Los reactivos empleados fueron KH₂PO₄, K₂HPO₄ (Anedra), bioetanol comercial 96% v/v (Porta Hnos.), ácido clorhídrico (HCl) (grado analítico, Cicarelli), n-hexano (grado analítico, Merck), isopropanol (estándar analítico, Fluka), acetonitrilo (grado analítico, Merck), copolímero Pluronic P123 (BASF Corp), tetraetil ortosilicato (TEOS) (Aldrich) y agua miliQ. Filtros de jeringa (polipropileno, de 25 mm de diámetro y 0,2 micras de tamaño de poro) fueron suministrados por VWR.

Síntesis y modificación del material SBA-15

El material SBA-15 puro se sintetizó disolviendo 4,0 g de Pluronic P123 en 30 g de agua y 120 g de HCl 2 M con agitación a 40 °C. A continuación se añadieron 8,50 g de TEOS y se agitó a 40 °C durante 20 h. La mezcla se envejeció a 100 °C durante toda una noche sin agitación. El producto sólido se filtró, se lavó y se secó a 60 °C durante una noche. Luego se calcinó a 500 °C durante 6 horas, con una rampa de calentamiento de 1°C/min.

Caracterización del material

El análisis de SAXS (dispersión de rayos X a bajos ángulos) se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas, Brasil. El detector utilizado fue un Pilatus 300k de Dectris. Los patrones de difracción de rayos X (XRD) de las muestras se registraron en un difractómetro PANalytical X'Pert Pro con radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418$ Å) en el rango de 2θ de 20 ° a 80 °. Las micrografías SEM (microscopía electrónica de barrido) se obtuvieron mediante un JEOL modelo JSM 6380 LV. El voltaje de aceleración fue de 20 kV. Imágenes TEM (microscopía electrónica de transmisión) fueron obtenidas mediante JEOL modelo JEM-1200

EXII, con un voltaje de funcionamiento de 120 kV. La superficie específica se determinó utilizando un Micromeritics Pulse ChemiSorb 2700 por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Las muestras se secaron previamente usando un flujo de N₂ durante 3 horas a 350 °C.

Inmovilización de lipasa de *Pseudo-monas fluorescens* en el soporte

Se preparó una solución de lipasa comercial con concentración 5 mg/mL en buffer fosfato 25 mM de pH 8. Se suspendió 0,125 g del soporte en 10 mL de la solución anterior para obtener una relación óptima de 400 mg_{enzima}/g_{soporte} (Ferrero *et al.*, 2016). La suspensión se mantuvo con agitación suave a temperatura ambiente por 24 horas, luego se centrifugó para quitar el sobrenadante y se lavó dos veces con 10 mL de buffer fos-

fato 25 mM de pH 8. La determinación del contenido de proteína no inmovilizada se llevó a cabo mediante un ensayo de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron 10 µL del sobrenadante de la primera centrifugación y se mezclaron con 190 µL de reactivo de Bradford (1x). La absorbancia a λ = 595 nm se determinó por medio de un espectrofotómetro Cary 50. El contenido de proteína se estimó por medio de una curva de calibración obtenida utilizando concentraciones de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 y 1 mg/mL de BSA (98%) como proteína estándar. El material híbrido obtenido a partir de la inmovilización enzimática de 400 mg_{enzima}/g_{soporte} fue nombrado como L_{PF}/SBA-15.

Reacción de producción de mono- y di-glicéridos

Para el desarrollo de un reactor continuo (Figura 1) se utilizó una columna de 24 cm × 0,6 cm, se la termostatóizó a 37 °C y se agregó en ella 1g de L_{PF}/SBA-15(2,5)

mezclado con 11 g de microsferas de vidrio de diámetro 150 µm para evitar la obstrucción de la columna y luego varillas de vidrio de largo aproximado 0,5 cm hasta completar el volumen de la columna. Se hizo pasar en ella una mezcla de aceite de girasol y etanol 96% en proporción molar 1/3 a flujo constante de 0,5 mL/min y se tomaron muestras a diferente tiempo. Estas muestras fueron diluidas a un volumen de 1 mL con acetonitrilo, filtradas con un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm y analizadas por HPLC.

Análisis cromatográfico (HPLC)

Los análisis se realizaron con un HPLC Perkin Elmer con detector UV-vis de la serie 200 equipado con una unidad de suministro de solvente con gradiente de elución binario, una columna Agilent Eclipse Plus 18 (C18 con un diámetro de 4,6 mm × 25 cm de longitud y un tamaño de partícula de 5 µm), el soft-

Figura 1. Esquema del reactor continuo utilizado: 1) Plancha de calentamiento, 2) Tanque mezclador de reactivos, 3) Bomba peristáltica, 4) Columna termostatóizada, 5) Controlador de temperatura.

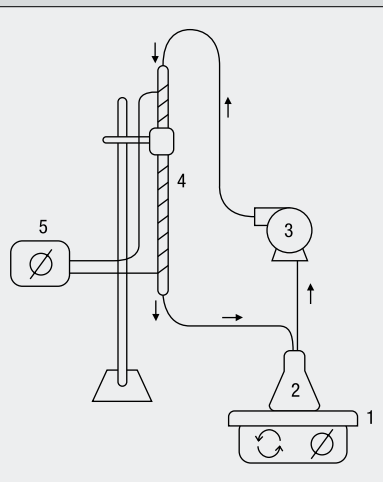


Figura 2 - Caracterización estructural del soporte mesoporoso SBA-15: a) patrones de SAXS, b) Imagen de TEM.

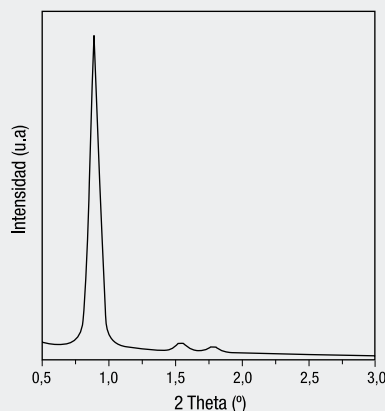
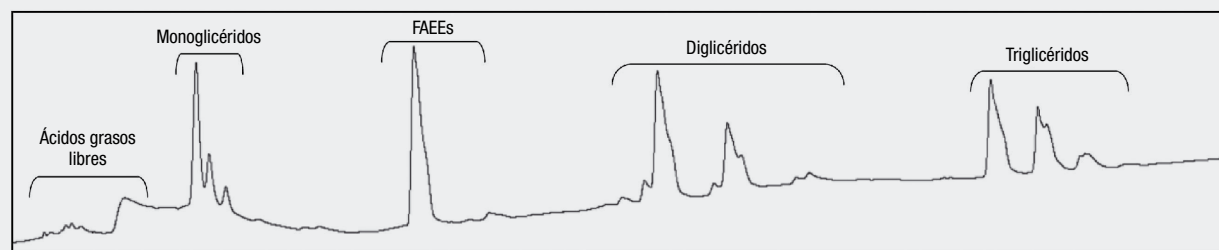


Figura 3 - Cromatograma de productos de reacción utilizando LPF/SBA-15 como catalizador y aceite de girasol comercial con etanol al 96% en proporción 1/3.



ware para el control remoto del equipo y la cuantificación fue el TotalChrom. La longitud de onda del detector de UV se fijó en 210 nm, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el flujo fue de 1 mL/min. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración externa. Para las corridas cromatográficas, se utilizó un método en etapas: 6 min de 30:70 de agua:acetonitrilo, 10 min de 100% de acetonitrilo, 15 min de 80:20 de acetonitrilo:isopropanol/n-hexano (5/4) y 29 min en gradiente hasta 30:70 de acetonitrilo:isopropanol/n-hexano (5/4). Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado y los resultados se expresaron como valores medios cuyas diferencias porcentuales entre ellos fue siempre menor que el 5 % de la media.

• Resultados y discusión

Caracterización del soporte

La caracterización estructural y textural de los soportes mesoporosos se realizó mediante dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS), microscopia

electrónica de transmisión (TEM). Los correspondientes espectros de SAXS del material modificado con calcio muestran la presencia de picos bien definidos asociados a la presencia de una estructura porosa altamente ordenada con una matriz de poros hexagonal (Figura 1a). En la Figura 1b, se presenta la imagen de TEM del material Ca/SBA-15 donde se pueden observar poros nanotubulares paralelos bien ordenados a lo largo del eje mostrando una buena estructura de los sólidos obtenidos. Estos resultados demostraron que la matriz hexagonal de la SBA-15 se conserva a lo largo de la modificación química de su superficie con el metal.

Reacción de producción de mono- y di-glicéridos

Utilizando el reactor anteriormente descrito, se llevó a cabo la reacción de producción de mono y di-glicéridos (MG y DG respectivamente) y se tomaron muestras a diferentes tiempos, en las cuales se cuantificó la conversión de aceite (triglicéridos, TG) a MG y DG mediante una curva de calibración externa realizada

en un HPLC. Los cromatogramas obtenidos tuvieron el aspecto mostrado en la Figura 3. Cabe destacar que se asignó regiones de señales a los cinco tipos de compuestos que se pueden determinar en el cromatograma, sin hacer diferencia entre los diferentes compuestos dentro de cada región o sea aquellos ésteres formados por diferentes ácidos grasos.

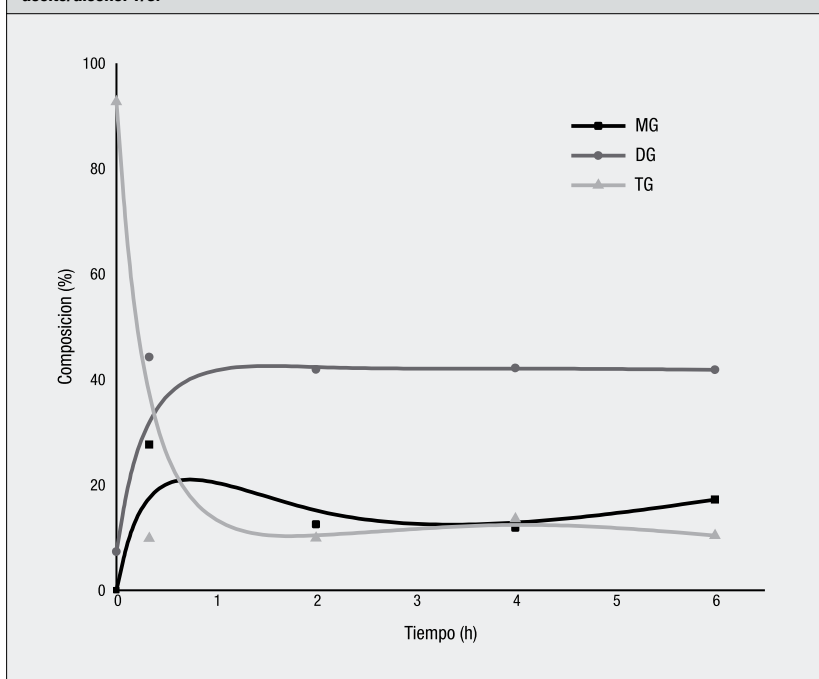
La mezcla de reacción formada por aceite de girasol y etanol comercial (96% V/V) en proporción 1/3 fue inyectada en el reactor diseñado a través de una bomba peristáltica, tras 20 minutos (tiempo en que tardó en atravesar la columna) se obtuvo 27,63% de MG y 44,23 % de DG, convirtiéndose el 90,16% de los TG totales. Este rendimiento de conversión se mantuvo prácticamente constante durante las 6 horas que se hizo pasar la mezcla de reacción, como puede verse en la Figura 4; convirtiéndose en ese tiempo cerca de 150 g de aceite. Esto muestra que la actividad del biocatalizador desarrollado se mantiene constante y es capaz de convertir grandes cantidades de aceite en relación a la baja cantidad de enzima utilizada (0,2% respecto del catalizador). Luego de las 2 h de reacción en adelante la producción de biodiesel, como sub producto, se mantuvo constante en aproximadamente un 31 % hasta las 6 h de reacción.

• Conclusión

El material SBA-15 resultó eficiente para la inmovilización de la enzima lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, debido a su estructura mesoporosa y tamaño de poro.

La reacción de transesterificación de triglicéridos con etanol para la producción de mono y di glicéridos catalizada por el biocatalizador desarrollado mostró buenos rendimientos a tiempo de reacción pequeños, y la actividad del catalizador se mantuvo prácticamente constante durante el tiempo de reacción estudiado. Si bien se obtuvo aproximadamente un 30% de biodiesel, si se anexa un pro-

Figura 4. Evolución de la reacción en columna a 37 °C con flujo constante de 0,5 mL/min, relación aceite/alcohol 1/3.



ceso de destilación para la separación y purificación de los productos (biodiesel, mono y di glicéridos) se podría obtener más de un producto utilizando el mismo biocatalizador. Ésta es la principal ventaja que posee el método, permitiendo un proceso de producción en continuo, además de utilizar temperaturas de reacción bajas (37 °C) y etanol al 96% (materia prima renovable, de producción nacional, de fácil acceso y bajo costo).

• Agradecimientos

G.O.F and G.A.E son miembros de CONICET. Los autores agradecen al CONICET y a la UTN por el soporte financiero brindado. Los autores agradecen al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón de Brasil (LNLS) y al Dr. R. Oliveira por su ayuda en las discusiones. Los autores agradecen a la Dra. Vascetto E.G. por las imágenes de TEM.

• Referencias

- Berger, M., Schnelder, M.P., 1992. Enzymatic esterification of glycerol II. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-racmonoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 961-965. doi:10.1007/BF02541058
- Bossaert, W.D., De Vos, D.E., Van Rhijn, W.M., Bullen, J., Grobet, P.J., Jacobs, P.A., 1999. Mesoporous Sulfonic Acids as Selective Heterogeneous Catalysts for the Synthesis of Mono-glycerides. *J. Catal.* 182, 156-164. doi:10.1006/jcat.1998.2353
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Ferreira-Dias, S., Correia, A., Baptista, F., da Fonseca, M.M., 2001. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11, 699-711. doi:10.1016/S1381-1177(00)00079-5
- Ferrero, G.O., Rojas, H.J., Argaraña, C.E., Eimer, G.A., 2016. Accepted Manuscript Towards sustainable biofuel production: Design of a new biocatalyst to biodiesel synthesis from waste oil and commercial ethanol. *J. Clean. Prod.* 139, 495-503. doi:10.1016/j.jclepro.2016.08.047
- Liu, S., Zhang, Z., Scott, G., Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F., 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* 28, 628-634.
- Mendes, A.A., Freitas, L., de Carvalho, A.K.F., de Oliveira, P.C., de Castro, H.F., 2011. Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies. *Enzyme Res.* 2011, 1-8. doi:10.4061/2011/967239
- Salis, A., Bhattacharyya, M.S., Monduzzi, M., Solinas, V., 2009. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 262-269. doi:10.1016/j.molcatb.2008.09.015
- Salis, A., Casula, M.F., Bhattacharyya, M.S., Pinna, M., Solinas, V., Monduzzi, M., 2010. Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance. *ChemCatChem* 2, 322-329. doi:10.1002/cctc.200900288
- Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V., 2008. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 54, 19-26. doi:10.1016/j.molcatb.2007.12.006
- Thengumpillil et al., 2003. (12) United States Patent. doi:10.1016/j.(73) ■



Sistemas de protección contra incendios



EXTINCIÓN

DETECCIÓN

GLOBAL FIRE S.A.

• **Administración:**
Salguero 1575 - 1º Piso (1177) Capital

• **Talleres, Depósito y Oficina Técnica:**
Quirno Costa 799, San Fernando, Prov. de Buenos Aires, Argentina
Tel./Fax: (00 54-11) 4745-6808
www.globalfire.com.ar
e-mail: global-fire@globalfire.com.ar

Representante:
Rosario/Santa Fe - ASVEN
Juan José Paso 7410, Rosario, Prov. de Santa Fe
Tel.: 0341 525 3762