



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**BIOPROCESO DE SÍNTESIS DE ÉSTERES POR LIPASAS
PRODUCIDAS POR *Rhizopus* sp. POR FERMENTACIÓN EN
MEDIO SÓLIDO.**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

DR. JESÚS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

DR. HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO

DIRECTOR

ASESOR

ASESOR

AGOSTO DE 2013

México D.F. a 19 de Agosto de 2013

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

"Bioproceso de síntesis de ésteres por lipasas producidas por *Rhizopus* sp. por fermentación en medio sólido"

que presentó:

José Antonio Martínez Ruiz

Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

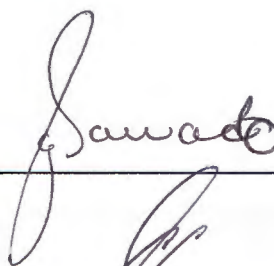
Asesor: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Dr. Hugo Sergio García Galindo

Jurado:

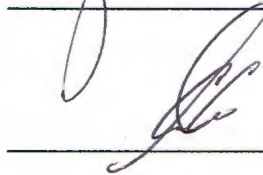
Presidente:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda



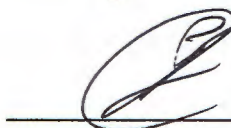
Secretario:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero



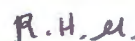
Vocal:

Dr. Jesús Antonio Córdova López



Vocal:

Dr. Ricardo Hernández Martínez



"El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466"

Esta tesis se realizó en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido (PP4) perteneciente al Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en México D.F., bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela Torres. Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT (Proyecto No. 60005). JAMR (Becario No. 180883) agradece al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado.

México D.F. a 19 de Agosto de 2013

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

"Bioproceso de síntesis de ésteres por lipasas producidas por *Rhizopus sp.* por fermentación en medio sólido"

que presentó:

José Antonio Martínez Ruiz

Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Dr. Hugo Sergio García Galindo

Jurado:

Presidente:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Vocal:

Dr. Jesús Antonio Córdova López

Vocal:

Dr. Ricardo Hernández Martínez

Gracias a mis padres y a mi familia por estar siempre presentes.

Gracias a Ernesto y al Dr. Saucedo por su amistad y apoyo para finalizar este proyecto.

Gracias al Dr. Hugo Sergio por su valiosa colaboración.

A todos los integrantes de la PP4 gracias por su amistad y compañía.

Gracias Luz por estar en mi vida. Te amo.

Gracias Leo por tu sonrisa, por tu valor y tu fuerza. Te extraño.

CONTENIDO

CONTENIDO	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iv
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Lipasas	4
2.2 Reacción de lipasas en medios no convencionales	6
2.2.1 Efecto de la concentración de agua	7
2.2.2 Efecto de la concentración de sustratos	10
2.2.3 Efecto de la temperatura en reacciones catalizadas por lipasas.....	14
2.3 Lipasas en reacciones en continuo	17
2.3.1. Reactores de flujo continuo.....	17
2.4 Producción de lipasas	23
2.4.1 Producción de lipasas por fermentación en medio sólido (FMS).....	24
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GENERAL	33
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Producción de lipasas	34
5.1.1 Microorganismos	34
5.1.2 Medio de cultivo	35
5.1.3 Soporte	35
5.1.4 Fermentación en medio sólido	36
5.2 Síntesis de acetato de isoamilo.....	37
5.2.1 Relación molar y concentración de sustratos	38

5.2.2 Actividad de agua	39
5.2.3 Selección de biocatalizadores	40
5.2.4 Fuente y cantidad de biocatalizador	40
5.2.5 Concentración de sustratos.....	41
5.3 Síntesis de oleato de etilo	41
5.3.1 Relación molar de sustratos.....	42
5.3.2 Concentración de sustratos.....	43
5.3.3 Concentración de biocatalizador	43
5.3.4 Temperatura.....	44
5.4 Reacción en lotes sucesivos	44
5.4.1 Agitación magnética	45
5.4.2 Agitación con agitador orbital	45
5.5 Lotes sucesivos variando la concentración de etanol.....	46
5.5.1 Tamiz molecular	47
5.5.2 Concentración de sustratos.....	47
5.6 Parámetros cinéticos	47
5.7 Síntesis de oleato de etilo en reactor 1L.....	48
5.7.1 En lote	48
5.7.2 En continuo.....	49
5.8 Síntesis de oleato de etilo en continuo	50
5.8.1 Estabilidad operacional, velocidad de agitación y tasa de alimentación	50
5.9 Métodos analíticos	51
5.9.1 Cromatografía de gases.....	51
5.9.2 Consumo de ácido oleico	51
5.9.3 Cuantificación de la actividad lipasa	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
6.1 Producción de lipasas	55

6.2 Producción del biocatalizador	58
6.3 Síntesis de acetato de isoamilo.....	60
6.4 Síntesis de oleato de etilo	73
6.4.1 Estudios preliminares	74
6.4.2 Efecto de la relación molar de sustratos	79
6.4.3 Efecto de la concentración de sustratos	83
6.4.4 Efecto de la concentración de biocatalizador.....	85
6.4.5 Efecto de la temperatura	86
6.5 Estimación de los parámetros cinéticos.....	88
6.6 Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos.....	93
6.7 Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos modificando la concentración de etanol.....	99
6.8 Síntesis de oleato de etilo en un reactor de 1L. Estudios preliminares	104
6.8.1 Síntesis en lote	105
6.8.2 Síntesis en continuo	107
6.9 Síntesis de oleato de etilo en continuo	111
6.9.1 Efecto de la velocidad de agitación.....	113
6.9.2 Efecto de la tasa de alimentación	115
6.9.3 Estabilidad operacional	117
7. CONCLUSIÓN	119
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
A-1 TRABAJOS DERIVADOS DE NUESTROS ESTUDIOS.....	144

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Composición del medio de cultivo para producción de lipasas.....	36
Tabla 2. Composición de la solución de oligoelementos.....	36
Tabla 3. Actividad de agua (a_w) de soluciones saturadas.	40
Tabla 4. Tiempos de retención de los sustratos y productos.	62
Tabla 5. Actividad de agua y porcentaje de humedad del biocatalizador.....	66
Tabla 6. Efecto de la relación molar sobre la velocidad inicial de reacción	79
Tabla 7. Efecto de la concentración de sustratos sobre la velocidad inicial	83
Tabla 8. Concentraciones para el cálculo de parámetros cinéticos.....	89
Tabla 9. Parámetros cinéticos	92
Figura 1. Viales para la síntesis de acetato de isoamilo.	38
Figura 2. Sistema para la síntesis de oleato de etilo.	42
Figura 3. Sistema para síntesis en continuo.....	50
Figura 4. Producción de CO ₂ por <i>Rhizopus homotallicus</i> en FMS.....	57
Figura 5. Biocatalizador obtenido por FMS	58
Figura 6. Actividad de hidrólisis.....	59
Figura 7. Síntesis de acetato de isoamilo.....	61
Figura 8. Efecto de la concentración de sustratos sobre la síntesis y conversión.....	63
Figura 9. Efecto de la relación de sustratos sobre la síntesis de acetato de isoamilo.....	64
Figura 10. Efecto de la actividad de agua sobre la síntesis de acetato de isoamilo.....	67
Figura 11. Efecto de la fuente de las lipasas sobre la síntesis de acetato de isoamilo. ...	68
Figura 12. Efecto de la concentración de biocatalizador sobre la síntesis de acetato de isoamilo.	69
Figura 13. Efecto de la concentración de sustratos sobre la síntesis y conversión.....	72
Figura 14. Consumo de ácido oleico.	77

Figura 15. Consumo de ácido oleico con relación de sustratos 1:5	78
Figura 16. Efecto de la relación molar de sustratos sobre la síntesis de oleato de etilo..	81
Figura 17. Efecto de la concentración de sustratos sobre la esterificación.....	84
Figura 18. Efecto de la concentración de biocatalizador en la velocidad inicial de reacción y sobre la conversión.....	85
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de oleato de etilo.....	86
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la tasa inicial de reacción.....	88
Figura 21. Ecuación para el mecanismo de reacción Ping Pong BiBi con inhibición por los dos sustratos.	89
Figura 22. Velocidad inicial de reacción, ácido oleico constante.	89
Figura 23. Velocidad inicial de reacción, etanol constante.	90
Figura 24. Velocidad inicial de reacción experimental y calculada, etanol constante.....	91
Figura 25. Velocidad inicial de reacción experimental y calculada, ácido oleico constante.	91
Figura 26. Eficiencia de conversión en lotes sucesivos en un minireactor.....	95
Figura 27. Síntesis en lotes sucesivos en frascos agitados en un shaker orbital.....	96
Figura 28. Síntesis en lotes sucesivos en frascos con 1.5 g de biocatalizador.....	97
Figura 29. Síntesis en lotes sucesivos variando la concentración de etanol.....	100
Figura 30. Efecto del tamiz molecular en lotes sucesivos.....	102
Figura 31. Efecto de la cantidad de tamiz molecular sobre la reacción de esterificación	103
Figura 32. Efecto de la concentración de sustratos en lotes sucesivos con relación molar 1:2.	104
Figura 33. Reacción de esterificación en un reactor de 1L operando en lote..	106
Figura 34. Síntesis en continuo en un reactor de tanque agitado.....	108
Figura 35. Distribución del tiempo de residencia RTD.....	109
Figura 36. Síntesis en continuo en un reactor de tanque agitado.....	112
Figura 37. Efecto de la velocidad de agitación sobre la síntesis en continuo.	114

Figura 38. Efecto de la tasa de alimentación sobre la síntesis en continuo.	117
Figura 39. Estabilidad operacional de la reacción de esterificación en continuo.....	118

Resumen

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar las mejores condiciones de operación para la transesterificación de acetato de isoamilo y la síntesis de oleato de etilo por lipasas producidas por *Rhizopus homothallicus* (13a) y *Rhizopus microsporus* (43aIV) respectivamente, en fermentación en medio sólido (FMS) en un reactor de tanque agitado. Se determinó el efecto de la concentración de sustratos, la velocidad de agitación, el flujo de alimentación de sustratos, entre otros, sobre la eficiencia y tasa de bioconversión de oleato de etilo.

En la primera etapa de este trabajo se establecieron las condiciones de producción de lipasas por *Rhizopus homothallicus* (13a) y *Rhizopus microsporus* (43aIV) en FMS con agrolita como soporte inerte. A las 16 h de cultivo, se obtuvo la mayor producción de lipasas (con una actividad de hidrólisis de 75 U/gms) para las dos cepas utilizadas. Para la obtención de los biocatalizadores empleados en las reacciones de síntesis, se deshidrató la materia fermentada con aire seco hasta alcanzar una humedad menor al 1%.

Los biocatalizadores obtenidos por FMS se utilizaron para llevar a cabo reacciones de transesterificación de acetato de isoamilo y síntesis de oleato de etilo. En el primer caso, la reacción se llevó a cabo con 50 mM acetato de etilo y 50 mM de alcohol isoamílico disueltos en hexano en viales de 1.5 mL sin agitación a 45 °C; obteniéndose una conversión del 25% después de 48 h de reacción. Para esta reacción se evaluaron siete biocatalizadores producidos por las cepas de hongos

termotolerantes: 13bIV, 19, 56cIV, 23aIV, 13a, 43aIV y 9a. El biocatalizador producido por *Rh. microsporus* (43aVI) logró la mejor conversión (80%) de sustratos en 48 h de reacción, siendo seleccionado para los estudios de esterificación de ácido oleico y etanol.

Para la síntesis de oleato de etilo se realizaron estudios preliminares; primero en viales de 1.5 mL sin agitación y posteriormente, en un mini reactor de 10 mL con agitación magnética. En el mini reactor se logró prácticamente el 100% de conversión en 90 min con 1.5 g del biocatalizador a 45 °C, con una relación molar de sustratos 1:5 (50 mM de ácido oleico y 250 mM de etanol). Posteriormente, se estudió el efecto de la relación molar de sustratos, de la concentración de sustratos, de la cantidad del biocatalizador y de la temperatura de reacción. Conversiones cercanas al 100%, se alcanzaron en 60 min empleando ácido oleico 50 mM y etanol 250 mM, disueltos en hexano con 0.5 g de biocatalizador a 45 °C.

Se realizaron dos experimentos, uno manteniendo la concentración de ácido oleico constante (50 mM) y otro manteniendo la concentración de etanol constante (250 mM). Con los resultados de estos experimentos y considerando el mecanismo de reacción enzimática Ping Pong Bi Bi se realizó una regresión no lineal para calcular los parámetros cinéticos, siendo éstos: $V_{max}=2.247$ mmol/Lmin, $K_{m(COOH)}=19.529$ mM, $K_{m(OH)}=101.997$ mM y $K_{i(OH)}=237.968$ mM, con una $R^2=0.94$.

Se evaluó la reutilización del biocatalizador mediante lotes sucesivos, manteniendo constante durante todos los lotes la relación molar de sustratos 1:5. El biocatalizador mantuvo alrededor del 50% de conversión después de ocho

ciclos de reacción de 60 min cada uno. Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de etanol (empleadas a partir del segundo lote), logrando más del 90 % de conversión con la relación molar de sustratos 1:2, la cual se mantuvo constante por cuatro ciclos de reacción.

Finalmente, se estudió la síntesis en continuo de oleato de etilo en un reactor de tanque agitado, encontrando que para lograr el 90% de conversión fue necesario agregar 88 g/L de biocatalizador en 60 min de reacción. Posteriormente, se estudió el efecto de la velocidad de agitación y de la tasa de alimentación en la reacción de síntesis; así como la estabilidad operacional del biocatalizador. Con este sistema, se logró una conversión cercana al 90% por 25 h de operación en continuo. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la factibilidad de usar los biocatalizadores producidos por FMS sin etapas de purificación e inmovilización, para su aplicación en sistemas de reacción en continuo.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) son serina hidrolasas de considerable importancia fisiológica e industrial. Estas enzimas catalizan la hidrólisis y la síntesis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Beys *et al.*, 2005).

La función natural de las lipasas es hidrolizar los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos durante la digestión. En la industria, a principios de la década de los 80's su principal aplicación era en procesos de lavandería y en la modificación de triglicéridos (Bornscheuer *et al.*, 2002); sin embargo, el interés por estas enzimas ha crecido enormemente en los últimos años (Destain *et al.*, 1997), debido a su versatilidad para catalizar diferentes tipos de reacciones (Beys *et al.*, 2005), entre las que destacan la esterificación (Wei *et al.*, 2003), la transesterificación (Bhagwat, 2005), la acilación regioselectiva (Ducret *et al.*, 1998), la alcoholólisis (Graber, 2003), entre otras.

Las lipasas son producidas principalmente en medio líquido, pero también se pueden utilizar métodos de fermentación en medio sólido para su producción (Rohit *et al.*, 2001). Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación líquida usando frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente. En este aspecto la fermentación líquida ofrece ventajas sobre la fermentación en medio sólido (FMS) (Hölker *et al.*, 2004). Por otro lado, todas las enzimas pueden ser producidas por FMS con microorganismos

sin manipular, ofreciendo ventajas biotecnológicas sobre la fermentación líquida (Hölker *et al.* 2004).

Los hongos filamentosos pertenecen al grupo de microorganismos más importantes usados en los procesos de fermentación en medio sólido (FMS) debido a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas (Raimbault, 1998).

La fermentación en medio sólido (FMS) se ha utilizado durante siglos para la fabricación de alimentos, bebidas y otros productos (Mitchell *et al.*, 2000). En tiempos recientes, la aplicación de procesos biotecnológicos que involucran la FMS ha generado gran interés debido a que estos procesos se han convertido en una herramienta biotecnológica importante, para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, etanol, biogas, antibióticos, surfactantes, biopesticidas, entre otros (Pandey, 1996, Mitchell *et al.*, 2000). Se han sugerido varias ventajas de la fermentación sólida sobre la fermentación líquida (Mitchell *et al.*, 2000) entre las que destacan, la baja represión catabólica, la alta producción y productividad de enzimas (Romero-Gómez *et al.*, 2000). Otra ventaja importante de la fermentación en medio sólido, es la producción de sólidos fermentados con actividad enzimática que pueden aplicarse directamente como biocatalizadores sin etapas de purificación e inmovilización (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008)

En este trabajo, se evaluó la producción de lipasas en FMS y el uso de la materia fermentada como biocatalizador para la reacción de transesterificación (síntesis de acetato de isoamilo) en un sistema operando por lotes y esterificación (síntesis de oleato de etilo) en un reactor de tanque agitado operando en continuo.

2. Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipasas

Las lipasas o triacilglicerol acil éster hidrolasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster en tri-, di- y monoacilgliceroles (los principales constituyentes de grasas y aceites de animales, plantas y microorganismos). Como resultado de este tipo de reacción se liberan ácidos carboxílicos y alcoholes (Paiva *et al.*, 2000).

En sistemas con bajo contenido de agua, las lipasas tienen la capacidad de catalizar la reacción inversa, es decir la esterificación. Ésta es una característica importante, ya que el interés en procesos industriales empleando lipasas como biocatalizadores para sintetizar ésteres de alto valor agregado, ha crecido enormemente, debido a la importancia y múltiples aplicaciones de estos compuestos. Por ejemplo, los ésteres producidos por ácidos grasos de cadena larga (de 12 a 20 átomos de carbono) y alcoholes de cadena corta (de 2 a 8 átomos de carbono), se utilizan ampliamente en la industria de alimentos, detergentes, cosméticos y en la industria farmacéutica. Los ésteres sintetizados por la reacción de ácidos grasos de cadena larga y alcoholes también de cadena larga (de 12 a 20 átomos de carbono), tienen importantes aplicaciones como plastificantes y lubricantes (Gandhi *et al.*, 1995). Otra aplicación industrial con un futuro prometedor es la síntesis de compuestos ópticamente puros y polímeros ópticamente activos mediada por lipasas, para su uso en química fina y en la industria farmacéutica (Gandhi *et al.*, 1995).

Esta diversidad de aplicaciones industriales ha incrementado el interés por las lipasas a través del mundo, en parte debido a su gran potencial económico que se incrementa año con año. El mercado global para la industria de enzimas reportado por Business Communications Company Inc., fue estimado en 2,000 millones de dólares en 2004 con un crecimiento anual del 4 al 5% (Pogori *et al.*, 2007). Las lipasas están colocadas sólo después de las proteasas y las carbohidrasas en el mercado mundial de enzimas, y representan el 5% del mercado total de enzimas (Vakhlu y Kour, 2006). Entre las lipasas, sólo las microbianas son comercialmente disponibles (Sharma *et al.*, 2001).

Como cualquier catalizador, las lipasas incrementan la velocidad de la reacción que catalizan, sin afectar el equilibrio químico de la reacción. Las lipasas originalmente fueron diseñadas por la naturaleza para catalizar el rompimiento del enlace éster, vía reacciones de hidrólisis (con el concomitante consumo de agua), sin embargo, como para cualquier reacción bioquímica, puede existir la reacción inversa a nivel molecular. Es decir, las reacciones de hidrólisis pueden ser promovidas por sistemas macroacuosa y las reacciones de síntesis de ésteres por sistemas microacuosa. Estos dos procesos básicos pueden ser combinados de manera secuencial para dar lugar a un grupo de reacciones usualmente llamadas interesterificaciones. Dependiendo del sustrato inicial se puede tener acidólisis (donde el grupo acilo es desplazado entre un éster y un ácido carboxílico), alcoholólisis (donde el grupo acilo es desplazado entre un éster y un alcohol) y transesterificación (donde dos grupos acilo son intercambiados entre

dos ésteres) (Paiva *et al.*, 2000). En todos estos procesos es necesaria la presencia de agua, por un lado, para mantener la integridad estructural de la enzima y por otro, la generación del intermediario catalítico.

2.2 Reacción de lipasas en medios no convencionales

Los medios acuosos son los medios tradicionalmente usados para procesos de biocatálisis (Sellek y Chaudhuri, 1999); sin embargo, las enzimas presentan actividad en solventes orgánicos. Este hecho hace más de 20 años era tomado con total escepticismo y se argumentaba que la actividad de las enzimas era resultado de artefactos (Lee y Dordick, 2002). Ahora se sabe que, el uso de solventes orgánicos como medio de reacción, es una técnica útil para incrementar el rango y la eficiencia de procesos biocatalíticos (Khmelnitsky y Rich, 1999). La ventaja de usar solventes orgánicos incluye por ejemplo, el incremento de la solubilidad de sustratos hidrofóbicos y cambios favorables del equilibrio de reacciones biocatalizadas (Sellek y Chaudhuri, 1999).

Las lipasas tienen una característica única de actuar en la interfase entre la fase acuosa y la no acuosa (Benjamin y Pandey, 2000); además, poseen un complejo mecanismo de acción sufriendo un cambio conformacional entre una estructura inactiva cerrada y una estructura activa abierta (Palomo *et al.*, 2004).

Al igual que todas las reacciones catalizadas por enzimas, las reacciones catalizadas por lipasas son influenciadas por diferentes factores. Cuando se trabaja con solventes orgánicos se destacan principalmente: el tipo de solvente usado, la cantidad de agua presente en el sistema de reacción, la concentración

de sustratos y la temperatura del proceso. A continuación se describen algunos parámetros que modifican la actividad de las lipasas en reacciones de síntesis.

2.2.1 Efecto de la concentración de agua

Como se mencionó anteriormente, los sistemas que contienen trazas de agua favorecen las reacciones de síntesis catalizadas por lipasas. Una manera de disminuir la concentración de agua es usar solventes orgánicos como medio de reacción (Torres y Otero 1999, Yadav y Tribedi 2003), sistemas libres de solventes (Foresti y Ferreira, 2005, Trubiano *et al.*, 2004) o sistemas en los cuales los componentes de la reacción se encuentran en fase gaseosa (Barton *et al.*, 1997). En estos sistemas, además de tener una baja concentración de agua, se tienen importantes ventajas, estas incluyen: el uso de cualquier sustrato hidrofóbico, alta selectividad de las lipasas, condiciones de reacción relativamente moderadas, una fácil recuperación del producto y la posibilidad de reutilizar el biocatalizador (Zaidi *et al.*, 2002).

En las reacciones de síntesis catalizadas por lipasas, el medio de reacción consiste principalmente de solventes orgánicos o sustratos (medio libre de solventes), aunque el agua es indispensable para mantener activa a la enzima (Foresti y Ferreira 2007). Aparte de mantener la estructura terciaria activa de la enzima, el agua está involucrada en el progreso de la reacción y su concentración controla la actividad de la lipasa hacia la hidrólisis o la síntesis. Además, contenidos elevados de agua pueden provocar limitación en la difusión de los sustratos y pueden estar asociados a problemas de agregación en las enzimas

(Salis *et al.*, 2005). Por lo tanto, el estudio del efecto de la concentración de agua es importante en reacciones de síntesis en medios orgánicos catalizadas por enzimas hidrolíticas.

Definir la concentración de agua tal que se mantenga intacta la estructura activa de la enzima, sin efectos adversos sobre la reacción de esterificación no es tarea fácil y puede depender de diferentes factores como el origen de la enzima, el tipo de solvente y el tipo de sustratos utilizados. Se ha sugerido que el contenido de humedad en reacciones catalizadas por lipasas en solventes no polares puede estar entre 0.05 a 1% (Bornscheuer, 1999). Esta observación es cierta para la reacción de esterificación entre ácido oleico y etanol catalizada por lipasas producidas por fermentación en medio sólido usadas directamente como catalizador, donde el contenido de humedad de este biocatalizador fue menor al 1% y logró prácticamente el 100% de conversión en 60 min de reacción (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

Muchos de los trabajos publicados están de acuerdo con el hecho de que las reacciones catalizadas por lipasas en medios orgánicos alcanzan su actividad óptima de síntesis con muy bajos contenidos de humedad que van del 0.1 al 3% (Rocha *et al.*, 1999, Yadav y Piyush, 2003). De esta manera, se hidrata a la enzima, sin cambiar el equilibrio de los reactantes, sin embargo, en sistemas libres de solventes las lipasas exhiben elevada actividad de síntesis con un contenido de humedad de hasta el 20%.

La esterificación de ácido oleico y etanol en sistemas sin agua adicionada, y con 10 y 20% de agua adicionada fue medida durante 24 h en reacciones catalizadas por lipasas producidas por *Candida antarctica B*, *Candida rugosa* y *Pseudomonas fluorescens* inmovilizadas en quitosano. En este caso, la síntesis de oleato de etilo fue favorecida en las primeras horas de reacción con cantidades elevadas de agua; de hecho, durante las primeras 24 h de reacción de síntesis se incrementó con la cantidad de agua adicionada a la mezcla de reacción. En este periodo, la elevada concentración de agua adicionada de 10 y 20% (superior a la concentración de agua necesaria para hidratar a la lipasa) no tuvo un efecto adverso en la reacción de esterificación. Para explicar esta observación se puede proponer un efecto adicional del agua relacionado con la inestabilidad del sistema monofásico a causa de la adición de grandes cantidades de agua (Foresti y Ferreira, 2007).

Con el 10 y 20% de agua adicionada se promueve la formación de un sistema bifásico líquido-líquido con una muy baja concentración de agua en la fase orgánica. Monot *et al.* (1991) reportaron la formación de un sistema bifásico durante la síntesis de butirato de butilo catalizada por lipasas. Durante el progreso de la reacción en un sistema libre de solventes, los autores detectaron la formación de una discreta fase acuosa. Al medir el contenido de agua en la fase orgánica se reveló una notoria reducción que se atribuyó a su migración a la segunda fase.

Lo mismo ocurre en la síntesis de oleato de etilo con alto contenido de agua en la mezcla de sustratos. Después de la formación del sistema bifásico, la presencia de ácido oleico en la fase acuosa es mínima restringiendo la reacción de esterificación a la fase orgánica. Aproximadamente 50-65% del etanol adicionado migra a la fase acuosa. La baja concentración de agua en la fase orgánica reactiva puede justificar la ausencia de efectos adversos importantes en la reacción de esterificación en sistemas con alta concentración de agua (20%).

2.2.2 Efecto de la concentración de sustratos

Otro parámetro importante que influye en el aspecto económico de un proceso catalizado por lipasas es la concentración de sustratos y productos en el solvente. Después de que la reacción es completada, se deben separar los productos. Usualmente, el solvente se elimina por evaporación, en otros casos, el producto es recuperado por extracción con un solvente inmiscible. Seguido de esta operación el solvente es reusado después de limpiarlo y reacondicionarlo para reducir costos de material y evitar daños al ambiente. Con el objetivo de reducir los costos asociados a la recuperación del producto y reciclaje del solvente, la concentración inicial de sustratos en solventes orgánicos debe ser optimizada. Esta es una tarea complicada, debido a que el uso de concentraciones elevadas de sustratos en solventes orgánicos o en sistemas libres de solventes es un reto para su aplicación en cualquier reacción industrial catalizada por enzimas. En este sentido, hay que tener en cuenta que la actividad enzimática de síntesis en cualquier

reacción típica, puede ser afectada fuertemente por el uso de altas concentraciones de uno o más sustratos.

Por lo tanto, es necesario determinar la posible inhibición causada por cualquier sustrato o producto involucrados en la reacción enzimática. El grado de inhibición depende en particular del tipo de enzima (fuente de la enzima, proceso de inmovilización, especificidad, etc.), el medio de reacción (solventes orgánicos, sistema libre de solventes) y de las condiciones de operación principalmente temperatura y pH.

El uso de lipasas para la síntesis de acetatos de cadena corta, como el acetato de isoamilo, que es uno de los ésteres más empleados en la industria de alimentos (74 ton/año) debido a su característico sabor a plátano (Welsh *et al.*, 1990), se realiza con ácido acético como donador del grupo acilo. Sin embargo, la esterificación directa resulta en un bajo rendimiento a concentraciones elevadas de ácido acético, debido a que el ácido puede ser un potente inhibidor de la actividad de las lipasas. Otra posibilidad para la reducción de la actividad enzimática puede estar relacionada con la desactivación de la lipasa por acidificación del microambiente de la enzima. Efectivamente, al incrementar la concentración de ácido acético de 0.1 a 0.8 M se disminuye la efectividad de la enzima. Gubicza *et al.* (2000) observaron que a concentraciones superiores a 0.3 M en *n*-pentano la velocidad de reacción disminuyó. En sistemas libres de solventes el comportamiento es similar ya que la conversión se ve afectada de manera importante al incrementar la concentración del ácido acético en el medio

de reacción (Ghamgui *et al.*, 2006). Sin embargo, existen alternativas para disminuir el efecto negativo del ácido acético sobre la reacción de síntesis de acetato de isoamilo. Una posibilidad es la adición de un buffer al medio de reacción.

Romero *et al.* (2005) adicionaron al medio de reacción Na_2HPO_4 0.14 M que contenía una concentración de ácido acético de 0.4 M. Después de 24 h de reacción, la conversión de acetato de isoamilo fue de 66% cuando el buffer está presente, mientras que sin buffer la conversión fue sólo de 30% al mismo tiempo de reacción. Esto indica que la presencia de sales de fosfato amortiguan los cambios de pH en la interfase micro-acuosa preservando la integridad de la enzima, así como su actividad. Otra alternativa es la adición progresiva del ácido acético al medio de reacción para evitar el efecto negativo del exceso de ácido libre (Bourg-Garros *et al.*, 1998).

Como se mencionó al inicio de esta sección, además del efecto negativo de concentraciones elevadas de sustratos, la relación molar en que se encuentran éstos también tiene un efecto importante en reacciones de síntesis catalizadas por lipasas. La manera en que el exceso de un reactante modifica la velocidad de reacción y el porcentaje de conversión en reacciones de esterificación o de transesterificación puede estar relacionada con el equilibrio de la reacción, ya que al incrementar la concentración de uno de los reactantes se orienta el equilibrio hacia la formación de producto. Se ha observado que al incrementar la concentración de uno de los sustratos (generalmente el alcohol), la velocidad de reacción; así como, la eficiencia de conversión aumenta hasta un punto en donde

se empiezan a presentar efectos adversos por el exceso de sustrato (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

El exceso de un sustrato puede beneficiar la reacción dependiendo de la naturaleza de los sustratos y los productos. Por ejemplo, la síntesis de acetato de isoamilo, a partir de alcohol isoamílico y anhídrido acético catalizada por la enzima comercial Novozym 435 en *n*-hexano como medio de reacción, tuvo los mejores resultados cuando la relación molar alcohol:anhídrido es de 3:1. El exceso de alcohol isoamílico tiene un efecto positivo en esta reacción, ya que puede estar consumiendo y eliminando el ácido acético producido, de esta manera se evita la disminución del pH en el microambiente de la enzima y su posterior inactivación en tiempos prolongados de reacción (Romero *et al.*, 2005).

Sin embargo, el exceso de un sustrato también puede causar efectos negativos al disminuir la velocidad de reacción y la eficiencia de conversión. La síntesis de oleato de etilo a partir de ácido oleico y etanol en sistemas libres de solventes y en solventes orgánicos catalizada tanto por lipasas comerciales (Trubiano *et al.*, 2007) como por lipasas producidas por fermentación en medio sólido (Fernandes *et al.* 2007) se ve favorecida al incrementar la concentración de etanol en el medio de reacción, hasta el punto en donde el etanol ejerce un efecto inhibitorio sobre el biocatalizador.

El etanol puede actuar de diferentes maneras. Primero, cuando el etanol es adicionado al sistema y debido a su alta polaridad, se dan una serie de interacciones hidrofílicas con la capa acuosa que rodea la superficie de la lipasa que produce modificaciones en la estructura terciaria de la proteína y por lo tanto

causa inhibición (Trubiano *et al.*, 2007). Por otro lado, el fenómeno de inhibición esta dado por la formación de un complejo binario entre la enzima libre y el alcohol (o el éster), así como por la formación de un complejo inactivo ternario entre el ácido graso o el éster y el complejo enzima-ácido (Segel, 1975). Otro factor que puede estar involucrado en la reacción entre la enzima acilada y el alcohol es el efecto estérico, a mayor tamaño de la cadena del alcohol el ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo se hace más difícil (Zaidi *et al.*, 2002).

El impacto de cada uno de estos fenómenos dependerá de las condiciones de esterificación: como el tipo de lipasas, el método de inmovilización, la presencia (o no) y naturaleza de los solventes orgánicos y las propiedades de los sustratos (Zaidi *et al.*, 2002).

2.2.3 Efecto de la temperatura en reacciones catalizadas por lipasas

Las reacciones químicas transcurren a una velocidad mayor si la temperatura aumenta; mientras que, las reacciones catalizadas enzimáticamente se comportan análogamente en un cierto rango de temperatura. Las enzimas son moléculas proteicas complejas, su actividad catalítica se debe a una estructura terciaria altamente ordenada y precisa que da lugar a la formación de los sitios estereoespecíficos de unión del sustrato (Segel, 1975). La estructura terciaria de una enzima se conserva en primer lugar por un gran número de interacciones no covalentes, es decir, una molécula de enzima es una estructura frágil y muy delicada. Si la molécula absorbe demasiada energía, la estructura terciaria se rompe y la enzima se desnaturaliza perdiendo su actividad catalítica (Segel, 1975).

Esto es un factor importante, debido a que la síntesis de ésteres por medios convencionales (síntesis química) requiere un consumo elevado de energía (Salis *et al.*, 2005), al contrario de las condiciones relativamente moderadas, cuando las reacciones son catalizadas enzimáticamente (Salis *et al.*, 2005).

La manera en que la temperatura afecta una reacción enzimática en medios con bajo contenido de agua (solventes orgánicos) es la misma que en un sistema acuoso. La velocidad inicial de reacción se incrementa con la temperatura, usualmente siguiendo la ecuación de Arrhenius (Segel, 1975). Sin embargo, la estabilidad de la enzima declina con la temperatura y a temperaturas elevadas la actividad catalítica se pierde rápidamente (Salis *et al.*, 2005).

En solventes orgánicos, las lipasas poseen actividad en un amplio intervalo de temperaturas (30-80°C); aunque esto depende de algunos factores importantes como el origen de la enzima, si ésta fue sometida a procesos de inmovilización y al medio de reacción, entre otros.

Foresti y Ferreira (2005) realizaron estudios comparativos para evaluar el efecto de la temperatura sobre la síntesis de oleato de etilo en un sistema libre de solventes. Para ello, se utilizó la lipasa B producida por *Candida antarctica* (Novozyme). Los investigadores utilizaron la enzima libre y la enzima inmovilizada por adsorción en polvo de polipropileno. Para la lipasa libre, la temperatura óptima fue de 45 °C con 80 % de conversión aproximadamente, sin embargo, la reacción de 35 a 65 °C también mostró altos porcentajes de conversión (65-75 %). A 75 °C, la actividad de la lipasa libre cayó considerablemente, disminuyendo hasta el 15%

de conversión en 7 h de reacción. Evidentemente, la operación a temperaturas iguales o mayores que 75 °C, incrementó considerablemente la velocidad de desactivación, que se reflejó en una drástica reducción de la actividad del biocatalizador en cortos periodos de tiempo.

Como es sabido, la desactivación térmica de las lipasas se puede disminuir considerablemente mediante un método de inmovilización. Sin embargo, en el estudio de Foresti y Ferreira (2005), la temperatura óptima de la lipasa inmovilizada no cambió considerablemente con respecto a la enzima libre; además, la lipasa adsorbida mostró mayor inactivación especialmente a 65 °C, con una disminución importante en la conversión, mayor a la reportada para la enzima libre.

Recientemente, se ha considerado la utilización de sólidos fermentados como biocatalizadores. Esta estrategia ha evitado la purificación e inmovilización de la enzima. Estudios realizados con este tipo de biocatalizadores demostraron prácticamente el 100% de conversión de ácido oleico y etanol en oleato de etilo en 60 min de reacción en un rango de temperaturas de 30-55°C (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008). Sin embargo, a 60°C, la enzima perdió actividad y el porcentaje de conversión disminuyó a menos del 40%. La energía de activación estimada para esta reacción (37 KJ/mol) estuvo dentro de los valores (37-45KJ/mol) que pueden considerarse típicos para procesos biocatalíticos limitados por la reacción (Zaidi *et al.*, 2002), por lo que los problemas de transferencia de masa pudieron ser considerados como despreciables (Trubiano *et al.*, 2007).

2.3 Lipasas en reacciones en continuo

El uso de biorreactores en continuo es decisivo para propósitos industriales o comerciales (Carvalho *et al.*, 2000).

Los biorreactores pueden ser clasificados dependiendo de la configuración operacional en: reactor por lote, reactor semi-lote, reactores de flujo continuo y reactores de lecho fluidizado (Foutch y Johannes, 2004). En esta sección sólo trataremos de los dos tipos de reactores más comúnmente usados en reacciones catalizadas por lipasas en sistemas operando en continuo, el reactor continuo de tanque agitado (CSTR) y el reactor de flujo pistón (PFR).

2.3.1. Reactores de flujo continuo

Este modo de operación es el más utilizado a nivel industrial para catálisis enzimática y puede ser de dos tipos principalmente:

2.3.1.1 Reactor Continuo de Tanque Agitado (CSTR)

Involucra el suministro de sustratos dentro del tanque con remoción simultánea del producto. El CSTR operando en condiciones ideales está bien mezclado cuando no existen zonas muertas o bifurcaciones dentro del reactor. Las suposiciones hechas para el CSTR son: 1) La composición y temperatura son uniformes dentro del tanque, 2) La composición del efluente es la misma que dentro del tanque y 3) el tanque opera en estado estacionario (Foutch y Johannes, 2004).

Los CSTR son particularmente útiles en esquemas de reacción que requieren bajas concentraciones de sustratos; así como cuando se requiere selectividad entre múltiples reacciones o cuando existe inhibición por sustrato. Estos reactores

también tienen aplicaciones en sistemas heterogéneos en donde se requiere alto contacto entre las fases. Las ventajas de utilizar CSTR incluyen: 1) operación en estado estacionario, 2) retro-mezclado del calor generado por reacciones exotérmicas lo cual incrementa la velocidad de reacción y subsecuentemente el desempeño del reactor, 3) evita la formación de zonas calientes dentro del reactor, facilitando el control de temperatura, 4) operación económica con grandes volúmenes que requieren tiempos de contacto prolongados y 5) favorece la transferencia de calor por el mezclado. Por otro lado, los CSTR generalmente requieren reactores de gran volumen comparado con otro tipo de reactores, además la energía requerida para agitar el tanque incrementa los costos de operación (Foutch y Johannes, 2004).

Este tipo de reactores son poco utilizados en reacciones catalizadas por lipasas, principalmente por el mayor volumen del reactor con respecto a otros sistemas y por el daño mecánico que pueden ocasionar los impulsores al biocatalizador.

Uno de los pocos trabajos es el reportado por Pang-Yen *et al.* (2005). El sistema involucra la esterificación de etanol y ácido oleico catalizada por lipasas en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) para determinar la multiplicidad de estados estacionarios.

Los reactores de membrana se pueden mencionar en este apartado, ya que en algunos casos son tratados como CSTR. Por ejemplo, Carvalho *et al.* (2000) desarrollaron un modelo para describir el grado de conversión en un biorreactor de membrana (MBR) para la síntesis de ésteres de cadena corta como función de la velocidad de flujo. La reacción de transesterificación fue catalizada por una

cutinasa recombinante de *Fusarium solani* microencapsulada en micelas reversas de AOT/isooctano. El estudio incluyó el análisis del MBR operando como un CSTR, un PFR y como reactores continuos en serie. Los autores reportaron que el desempeño del reactor de membrana operando en continuo fue modelado adecuadamente usando la ecuación de diseño de un CSTR, además observaron que la mejor descripción del sistema se obtuvo considerando dos CSTRs en serie. En un estudio similar, Wei *et al.* (2005) reportaron la producción del ácido de (S)-ibuprofeno usando lipasas para catalizar la reacción de hidrólisis en un reactor enzimático de membrana (EMR). En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura, la velocidad de flujo de la fase orgánica, la velocidad de flujo de la fase acuosa y la carga de enzima. El EMR presentado en este trabajo fue operado como un CSTR con alimentación continua de fase orgánica y acuosa. La alimentación de sustratos fue continuamente bombeada dentro del reactor al mismo tiempo que el producto fue removido, el circuito interno de membranas dentro del reactor fue considerado como un reactor de flujo mezclado. En este estudio se concluyó que los datos experimentales obtenidos con el reactor enzimático de membrana (EMR) fueron consistentes con los calculados mediante la ecuación de diseño de un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) con una máxima diferencia de poco más de 10% (Wei *et al.*, 2005).

2.3.1.2 Reactor de flujo pistón (PFR)

En este tipo de reactores existe una entrada y salida continua de materiales a través de un tubo. Las suposiciones hechas para los PFR son las siguientes: 1)

Los materiales pasan a través del reactor en rebanadas (cada rebanada está perfectamente mezclada radialmente, pero no existe mezcla hacia adelante o hacia atrás entre rebanadas, cada rebanada puede ser visualizada como un pequeño CSTR, 2) la composición y la conversión varían con el tiempo de residencia y pueden ser correlacionadas con el volumen del reactor o con la longitud del reactor y 3) el reactor opera en estado estacionario (Foutch y Johannes, 2004).

Las ventajas de utilizar este tipo de reactores incluyen: 1) operan en estado estacionario, 2) mínimo retro-mezclado del producto, por lo que la concentración permanece más alta que en un CSTR para reacciones normales, 3) menor volumen del reactor en comparación con un CSTR, 4) no requiere agitación, ni baffles. Sin embargo, con respecto al control de las condiciones de operación, los reactores de flujo pistón son más complejos que los reactores continuos de tanque agitado, además, para reactivos viscosos, se pueden presentar problemas debido a la caída de presión a través del tubo (Foutch y Johannes, 2004). Además, el sistema puede estar limitado por problemas de transferencia de masa (Rahman *et al.*, 2011).

Generalmente, los reactores de lecho empacado son los sistemas comúnmente usados a gran escala para la síntesis catalizada por lipasas de productos con aplicaciones comerciales (Jeong *et al.*, 2000). Esto se debe al menor volumen con respecto al CSTR que disminuye el trabajo, además al no requerir agitación se disminuyen los costos de operación (Nielsen *et al.*, 2006).

La concentración de sustratos es una de las variables importantes que se deben estudiar en este tipo de sistemas ya que dependiendo del sustrato y su concentración puede causar efectos negativos en la actividad enzimática. Carta *et al.* (1992) estudiaron la reacción de esterificación catalizada por una lipasa inmovilizada de *Candida cylindracea* en un reactor de lecho empacado y observaron que al utilizar etanol como sustrato la reacción no ocurría cuando la concentración era mayor a 0.2 M. Este resultado indica que el etanol inhibe la función catalítica a concentraciones relativamente bajas. En otro trabajo se reportó la producción de monoacilgliceroles (MAG) catalizada por una lipasa PS (IM-PS) en un reactor de lecho empacado con glicerol y oleína de palma como sustratos (Kittikun *et al.*, 2008). Una de las variables importantes en este trabajo fue la relación molar glicerol-oleína de palma, para alcanzar conversiones de MAG arriba del 60%, fue necesario incrementar la concentración de glicerol hasta alcanzar relaciones molares de 12:1 (Kittikun *et al.*, 2008).

Además de la concentración de sustratos, otro factor importante en los reactores de flujo continuo es el tiempo de residencia. Este factor es importante ya que determina el tiempo en que permanecen en contacto los sustratos y el biocatalizador para llevar a cabo la reacción. En este sentido, diferentes estudios coinciden que el efecto de un incremento en el flujo de alimentación provoca una disminución en el tiempo de residencia que se ve reflejado en una disminución en la conversión, y por otro lado, una disminución en el flujo de entrada aumenta la conversión (Sánchez *et al.*, 2000, Kittikun *et al.*, 2008, Fabiana *et al.*, 2010).

Tal vez, la principal variable que se debe controlar en un reactor operando en continuo con solventes orgánicos y con lipasas como biocatalizadores, es la actividad de agua. En la reacción de esterificación catalizada por lipasas el agua juega un papel crucial. Una mínima cantidad de agua es importante para asegurar una óptima conformación y por lo tanto una actividad óptima (Zaks y Klivanov, 1985, Monot *et al.*, 1991, Valivety *et al.*, 1993). Pero en exceso, el agua disminuye la actividad catalítica (Chulalaksananukul *et al.*, 1990, Marty *et al.*, 1992). El nivel óptimo de hidratación depende de cada enzima. Además, si el agua es producto de la reacción de esterificación, la cantidad de agua en el solvente orgánico varía con el progreso de la reacción, afectando no sólo la actividad de la enzima si no también el equilibrio termodinámico de la reacción (Halling, 1994).

En reactores de lecho empacado con lipasas inmovilizadas para catalizar la reacción de esterificación de ácido oleico y etanol en hexano, la acumulación de agua conduce a una drástica disminución en la conversión de 95 a 20% en 2 h de reacción (Marty *et al.*, 1997). Este fenómeno puede ser causado por: 1) Acumulación del agua que se produce durante el transcurso de la reacción y se absorbe en el soporte (Condoret *et al.*, 1997, Marty *et al.*, 1997) y 2) La alta hidrofobicidad del solvente provoca una excesiva acumulación de agua en la vecindad de la enzima que puede tener efectos desfavorables para la reacción, ya que pueden presentarse problemas de transferencia de masa (Colombie *et al.*, 1998).

Por lo tanto, resulta importante el control de la concentración de agua en medios orgánicos. Diferentes métodos se han desarrollado con este propósito, muchos de

estos métodos se basan en el uso de soluciones de sales saturadas (Goderis *et al.*, 1987), otras técnicas remueven el agua por evaporación/pervaporación (Kwon *et al.*, 1995) o por la adición de tamices moleculares (Vázquez-Lima *et al.*, 1995, Han *et al.*, 1998).

2.4 Producción de lipasas

Debido a las características y a la gran variedad de aplicaciones de las lipasas, resulta de gran importancia el método para producir estas enzimas. Las lipasas son producidas por muchos microorganismos, plantas y animales. Las lipasas disponibles comercialmente son derivadas de microorganismos (Schmid y Verger, 1998), siendo los hongos la fuente más importante de lipasas para su aplicación industrial, ya que los hongos excretan las enzimas facilitando la extracción de las enzimas del medio de fermentación (Beys *et al.*, 2005).

Los microorganismos productores de lipasas incluyen bacterias y hongos, que se han aislado de diferentes hábitats como desechos industriales, plantas procesadoras de aceites vegetales, suelos contaminados con aceites, aguas termales, entre otros (Rohit *et al.*, 2001).

Las fermentaciones en medio sólido (FMS) y en medio líquido (SmF) son dos procesos comunes y convencionales para producir enzimas y cada uno posee particulares ventajas y desventajas (Shu y Yan, 2009, Hölker *et al.*, 2004). Una de las principales ventajas de la FMS para la producción de lipasas, consiste en aplicar directamente los sólidos fermentados como biocatalizadores en reacciones de esterificación por lote (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008, Fernandes *et al.*, 2007).

Además, existe la posibilidad de aplicar el biocatalizador en sistemas que operan en continuo.

Las lipasas son producidas principalmente en medio líquido, pero también se pueden utilizar métodos de fermentación en medio sólido para su producción (Rohit *et al.*, 2001). Muchos estudios se han orientado a definir las condiciones óptimas de cultivo y requerimientos nutricionales para la producción de lipasas en cultivo sumergido (Rohit *et al.*, 2001), ya que su producción se ve afectada por diferentes factores como la temperatura, el pH, la composición del medio, la presencia de inductores, entre otros que pueden modificar la actividad y selectividad de las lipasas (Corzo y Revah, 1999; Reetz, 2002).

2.4.1 Producción de lipasas por fermentación en medio sólido (FMS)

Aproximadamente el 90% de todas las enzimas industriales son producidas por fermentación líquida, usando frecuentemente microorganismos manipulados genéticamente. En este aspecto la fermentación líquida ofrece ventajas sobre la fermentación en medio sólido (FMS) (Hölker *et al.*, 2004). Por otro lado, todas las enzimas pueden ser producidas por FMS con microorganismos sin manipular ofreciendo ventajas biotecnológicas sobre la fermentación líquida (Hölker *et al.*, 2004).

A pesar de que los procesos de FMS son relativamente más simples y económicamente más atractivos (ul-Haq *et al.*, 2002), la gran mayoría de estudios de producción de enzimas lipolíticas por bacterias, hongos y levaduras, se han

realizado en cultivo líquido y sólo existen unos pocos reportes de producción de lipasas en FMS (Domínguez *et al.*, 2003).

Benjamin y Pandey (2000) reportaron la producción de tres lipasas distintas por *Candida rugosa* en fermentación en medio sólido con aceite de coco y salvado de trigo. Gombert *et al.* (1999) estudiaron la producción de lipasas en FMS por *Penicillium restrictum* con aceite de babassu en un medio enriquecido con aceite de oliva (1 y 2%), peptona (1%) y almidón (2 y 4%). ul-Haq *et al.* (2002) reportaron la producción de lipasas por *Rhizopus oligosporous* en fermentación en medio sólido evaluando el efecto de diferentes factores como el tipo de sustrato sobre la producción de lipasas.

Como se mencionó anteriormente, la fermentación en medio sólido (FMS) y la fermentación en medio líquido (SmF) son dos procesos comunes y convencionales para producir enzimas y cada uno posee particulares ventajas y desventajas (Yang y Xu 2009, Hölker *et al.*, 2004). Una de las principales ventajas de la FMS para la producción de lipasas, consiste en aplicar directamente los sólidos fermentados como biocatalizador en reacciones de esterificación por lote (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008, Fernandes *et al.*, 2007). Además, existe la posibilidad de aplicar el biocatalizador en sistemas operando en continuo. Esta característica es muy interesante, ya que el biocatalizador obtenido por fermentación en medio sólido se utiliza sin procedimientos adicionales de purificación o inmovilización de la enzima, por lo que resulta importante estudiar variables que tienen relevancia en la FMS como tipo de microorganismo, humedad y tipo de soporte utilizado.

2.4.1.1 Fermentación en medio sólido (FMS)

La FMS se ha utilizado por siglos, en un principio para la producción de alimentos. En las últimas dos o tres décadas, el interés por los procesos de fermentación sólida se ha orientado a la síntesis de metabolitos secundarios (Barrios-González y Mejía, 1996; Trejo-Hernández *et al.*, 1992), entre otros productos.

Los procesos de FMS a escala industrial son utilizados principalmente en Japón, modificando gradualmente el tradicional proceso *koji*, hasta obtener procesos más sofisticados. En India se ha reportado la producción de pectinasas a mediana escala (Kumar, 1987). En Francia, Lyven S.A. desarrolló un proceso para la producción de pectinasas con pulpa de remolacha. El composteo que fue desarrollado a pequeña escala para la producción de setas (*Agaricus*, *Pleurotus* y *Shii-Take*) se ha modernizado y escalado en Europa y EEUU (Raimbault, 1998).

La mayor diferencia entre las fermentaciones en estado sólido y sumergido es la cantidad de agua libre en el sistema. La fermentación en medio sólido (FMS) involucra el crecimiento de microorganismos sobre partículas de sustratos sólidos húmedos con bajo contenido de agua libre entre las partículas (Mitchell *et al.*, 2000). Sin embargo, el sustrato debe poseer la humedad necesaria para mantener el crecimiento y metabolismo de los microorganismos (Pandey 1992, Pandey 1994, Pandey *et al.*, 2000, Pandey *et al.*, 2001). Existen varios aspectos importantes que deben ser considerados para el desarrollo de cualquier bioproceso en FMS; estos incluyen, la selección del microorganismo apropiado, la selección del sustrato, la cantidad de agua en el sistema, entre otros.

2.4.1.2 Microorganismos utilizados en FMS

Bacterias y hongos pueden crecer en sustratos sólidos. Las bacterias se utilizan principalmente en composteo, ensilaje y algunos procesos de alimentos (Doelle *et al.*, 1992). Las levaduras pueden ser usadas en la producción de etanol y alimentos (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1992).

La forma de crecimiento de los hongos (hifas), su tolerancia a bajas actividades de agua (a_w) y su resistencia a elevadas presiones osmóticas hacen a los hongos eficientes para su cultivo en FMS (Raimbault, 1998).

Los hongos filamentosos tienen otras características que ofrecen una ventaja sobre los organismos unicelulares. El crecimiento en forma de micelio rápidamente coloniza la superficie de los sólidos en la búsqueda de nutrientes disponibles. Además, muchos hongos filamentosos producen enzimas hidrolíticas como amilasas, celulasas, proteasas y lipasas para degradar las macromoléculas de los sustratos sólidos (Mitchell *et al.*, 2000).

Muchos hongos filamentosos pueden crecer a valores de pH bajos, esta característica puede usarse en combinación con actividades de agua bajas para crear un ambiente favorable para el crecimiento de hongos y al mismo tiempo evitar contaminantes como bacterias y levaduras (Mitchell *et al.*, 2000). De esta manera los hongos filamentosos se han empleado en la producción de diferentes enzimas (Couri *et al.*, 2000) como pectinasas (Bai *et al.*, 2004), glucoamilasas (Ellaiah *et al.*, 2002) y productos como ácido giberélico (Corona *et al.*, 2005) e inclusive moléculas que funcionan como inhibidores de enzimas (Rao *et al.*, 2005).

2.4.1.3 Humedad y actividad de agua (a_w) en FMS

Una de las características más importantes de la fermentación en medio sólido es la baja disponibilidad de agua en el sistema. Valores de a_w entre 0.95-0.98 pueden ser considerados típicos para sustratos sólidos, estos valores son ideales para el crecimiento de muchos hongos, especialmente hongos filamentosos, los cuales tienen un crecimiento óptimo a a_w de 0.96-0.98 y aún pueden crecer a a_w de 0.9.

Como consecuencia, la mayoría de los procesos de FMS utiliza hongos filamentosos (Mitchell *et al.*, 2000). En contraste muchas bacterias y levaduras crecen a actividades de agua de aproximadamente 0.99; este crecimiento disminuye cuando la a_w baja y es completamente inhibido a actividades de agua de 0.9 (Mitchell *et al.*, 2000).

El agua presente en los sistemas de FMS existe en forma compleja dentro de la matriz sólida o como una delgada capa que se absorbe en la superficie de las partículas. Sólo se tiene agua libre cuando la capacidad de saturación de la matriz sólida se excede (Raimbault, 1998). Sin embargo, el nivel de humedad al cual el agua libre se hace aparente, varía considerablemente entre sustratos y depende de las características de enlace con el agua (Raimbault, 1998). Por ejemplo, el agua libre se observa cuando la humedad contenida excede el 40% en corteza de arce y del 50-55% en arroz y casava (Oriol *et al.*, 1988). Con lignocelulosa como sustrato, el agua libre aparece después del 80% de humedad (Moo-Young *et al.*, 1983).

El nivel de humedad en los procesos de FMS puede variar entre 30 y 85% y tiene un marcado efecto en la cinética de crecimiento microbiano (Oriol *et al.*, 1988). El óptimo nivel de humedad para el cultivo de *Aspergillus niger* en arroz fue del 40%, mientras que en pulpa de café fue del 80%, lo que ilustra la ineficiencia del nivel de humedad como un parámetro para predecir el crecimiento microbiano (Raimbault, 1998).

El óptimo contenido de humedad para el crecimiento y la utilización de sustratos varían entre 40 y 70%, pero depende del microorganismo y del sustrato usado para el cultivo (Raimbault, 1998). Por ejemplo, en el cultivo de *Aspergillus niger* en sustratos como casava (Raimbault y Alazard 1980) y en trigo (Nishio *et al.*, 1979) los niveles de humedad óptimos fueron considerablemente menores a los usados con pulpa de café (Peñaloza *et al.*, 1991) o con bagazo de caña (Roussos *et al.*, 1991).

2.4.1.4 Soportes utilizados en FMS

Dos tipos de sustratos para FMS pueden ser distinguidos dependiendo de la naturaleza de la fase sólida usada. El primero y más comúnmente usado (y el más estudiado) involucra sistemas de cultivo en materiales naturales, estos sistemas son llamados “cultivo en sustratos naturales”. El segundo sistema que es menos usado, se basa en cultivos con soportes inertes impregnados con medios líquidos definidos (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Los sustratos naturales usados en FMS sirven como soporte y como fuente de nutrientes, esto es una desventaja, ya que la fuente de carbono forma parte de su

estructura (Ooijkaas *et al.*, 2000). Durante el crecimiento del microorganismo el sustrato sólido es degradado y como resultado la geometría y las características físicas del medio cambian y consecuentemente la transferencia de masa y calor pueden disminuir (Barrios-González y Mejía, 1996).

Los soportes inertes del segundo sistema pueden ser de origen natural y sólo sirven como punto de anclaje para los microorganismos. Estos materiales incluyen cáñamo, perlita, espuma de poliuretano (PUF), bagazo de caña, vermiculita entre otros (Ooijkaas *et al.*, 2000).

Una de las ventajas de los soportes inertes sobre los sustratos naturales es la menor dificultad para recuperar los productos. Por ejemplo, las esporas de *Penicillium roquefortii* formadas dentro de granos de trigo sólo pueden recuperarse rompiendo el sustrato, mientras que las esporas producidas en partículas de pozolano (material volcánico) pueden recuperarse rápidamente sin destruir el soporte, por lo tanto, el proceso de recuperación se simplifica y el soporte puede ser reusado (Larroche y Gros, 1989).

Otras ventajas de los soportes inertes son: 1) Se puede diseñar un medio de producción adecuado y 2) Los balances de masa para procesos de modelamiento más avanzados y procesos de control, son más fácilmente establecidos, debido a que las concentraciones de todos los nutrientes del medio de producción son conocidas y pueden ser analizadas (Zhu, 1994; Ooijkaas *et al.*, 2000).

Para la utilización de soportes inertes impregnados con medios definidos en fermentación en medio sólido, deben considerarse aspectos como costos y disponibilidad del soporte, factibilidad económica de utilizar un medio sintético o semisintético, impacto ambiental de los residuos sólidos generados, costos del proceso y formulación, costo de los registros y por supuesto el valor del producto (Ooijkaas *et al.*, 2000).

3. Justificación

3. JUSTIFICACIÓN

Las lipasas poseen cualidades que las hacen importantes para su aplicación en procesos industriales. Las preparaciones comerciales de lipasas han sido sometidas a diferentes etapas de recuperación, purificación e inmovilización. Si bien el proceso de inmovilización les confiere mayor estabilidad y la posibilidad de reutilización, la utilización intensiva de estos biocatalizadores puede estar limitada por su alto costo. A fin de mejorar su disponibilidad y accesibilidad, es necesario proponer nuevos métodos de elaboración de biocatalizadores económicos; siendo además deseable que, los biocatalizadores sean estables por periodos prolongados en medios no convencionales, requisito indispensable para su aplicación en biocatálisis.

Una alternativa viable para la obtención de los citados biocatalizadores, es la producción de lipasas a partir de hongos por fermentación en medio sólido con soportes inertes, obteniendo de esta manera, sólidos fermentados conteniendo lipasas naturalmente inmovilizadas, cuyas actividades catalíticas sean estables en solventes orgánicos, con posibilidad de reutilizarse y que se puedan usar directamente en sistemas de biocatálisis operando, tanto en lote, como en continuo.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de reacción de síntesis en continuo de ésteres, catalizada por lipasas producidas por fermentación en medio sólido naturalmente inmovilizadas en agrolita.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar las condiciones de producción de un biocatalizador naturalmente inmovilizado con actividad lipasa, obtenido por cultivo de hongos filamentosos en medio sólido (FMS) con agrolita como soporte inerte.
- Determinar las condiciones de reacción para la síntesis de acetato de isoamilo (reacción de transesterificación), empleando el biocatalizador producido por FMS
- Determinar las condiciones de reacción para la síntesis de acetato de isoamilo (reacción de esterificación), empleando el biocatalizador producido por FMS
- Determinar los parámetros cinéticos para la reacción de síntesis de oleato de etilo
- Evaluar la estabilidad del biocatalizador en reacciones sucesivas por lote, empleando ácido oleico y etanol
- Establecer las condiciones de operación en continuo para el reactor de síntesis de oleato de etilo, empleando el biocatalizador.

5. Materiales y métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Producción de lipasas

En esta sección, se describen los materiales y métodos utilizados para la producción de los biocatalizadores con actividad lipasa. Estos biocatalizadores fueron utilizados en todos los ensayos de biocatálisis realizados durante el trabajo experimental.

5.1.1 Microorganismos

Durante el desarrollo de este proyecto se utilizaron principalmente dos cepas de hongos filamentosos: *Rhizopus homothallicus* (13a) y *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (43aIV). Además se utilizaron cepas fúngicas de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (9a), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (13b), *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* (19), *Rhizomucor pusillus* (23a) y *Rhizopus microsporus* (56cIV). Las cepas pertenecen a una colección de hongos aislados a partir de residuos de coco. Las cepas fueron proporcionadas por el Dr. Jesús A. Córdova López de la Universidad de Guadalajara. Las cepas principales 13a y 43aIV se han reportado como productoras de lipasas (Mateos *et al.*, 2006, Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009). Ambas cepas fueron mantenidas mediante resiembra en tubos inclinados con medio agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30°C por un periodo de siete días. Las cepas se resembraron periódicamente a partir de un tubo inclinado al que se le adicionaron 5 mL de solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v). El contenido del tubo se homogeneizó con vórtex y se tomaron alícuotas de 1 mL con las que se inocularon matraces

Erlenmeyer que contenían 50 mL de PDA estéril. Los matraces se incubaron a 30°C por 7 días.

Transcurrido el tiempo de incubación, las esporas se cosecharon agregando a cada matraz, 20 mL de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v), homogenizando la suspensión mediante agitación magnética. Para cuantificar la concentración de esporas en la suspensión, se realizó una dilución 1:10 con agua destilada y se empleó una cámara de Neubauer.

5.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la producción de lipasas con *Rhizopus homothallicus* (13a) y *Rhizopus microsporus* (43aIV) fue el reportado por Rodríguez *et al.* en 2006. La composición del medio de cultivo y de los oligoelementos se detalla en la Tabla 1 y 2, respectivamente. Para preparar el medio de cultivo, se disolvieron primero la urea y lactosa; posteriormente, se disolvieron las sales (una por una), se ajustó el pH a 6.5 con HCl al 10%, se agregó el alcohol polivinílico y los oligoelementos. Finalmente, se adicionó el aceite de oliva. El medio de cultivo se emulsificó en un equipo Ultra-Turrax (IKA-WERK) a 10000 rpm durante 10 minutos.

5.1.3 Soporte

La fermentación en medio sólido se realizó usando como soporte inerte agrolita que fue tamizada hasta lograr un tamaño de partícula de 0.8-1.19 mm; la agrolita tamizada se lavó dos veces con agua caliente y posteriormente dos veces con agua destilada fría, se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h y

posteriormente, para lograr un secado completo del soporte inerte, se secó en una estufa a 60°C por 48 h.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo utilizado para producción de lipasas.

Compuesto	g/L
Urea	6
Aceite de oliva	60
Lactosa	7.5
K ₂ HPO ₄	7.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Alcohol polivinílico	2.4
Oligoelementos	6 ml/L

Tabla 2. Composición de la solución de oligoelementos.

Compuesto	g/L
EDTA	10
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.98
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.29
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.47
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.17
CoSO ₄ ·7H ₂ O	2.81

5.1.4 Fermentación en medio sólido

Las fermentaciones se realizaron mezclando el soporte (agrolita seca) con el medio de cultivo previamente inoculado. La humedad inicial para todas las fermentaciones fue del 60%. El medio de cultivo emulsificado se inoculó con la cantidad necesaria de suspensión de esporas para alcanzar una concentración de 3×10^7 esporas por gramo de soporte inerte (esporas/gsi). El soporte y el medio

inoculado se mezclaron manualmente por 5 min. Se empacaron aproximadamente 20 gramos de materia húmeda (gmh) en columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud. Las columnas se colocaron en un baño de agua con temperatura controlada a 45°C, con un flujo de aire de 40 mL/min.

La producción de los biocatalizadores utilizados en los estudios de transesterificación y esterificación se realizó siguiendo el procedimiento de fermentación en medio sólido descrito anteriormente. Al finalizar el tiempo de incubación (tiempo de mayor velocidad de producción de CO₂) se aplicó a cada columna un flujo de aire seco de aproximadamente 800 mL/min por 24 horas. Pasado este tiempo el contenido de las columnas se transfirió a frascos ámbar y se almacenó en refrigeración a 4°C. Se utilizó una Termobalanza Ohaus MB45 para determinar la humedad del biocatalizador. En todos los caso se aseguró que la humedad del biocatalizador fuera menor al 1%.

5.2 Síntesis de acetato de isoamilo

Para esta reacción, se emplearon como sustratos acetato de etilo (J.T. Baker) y alcohol isoamílico (SIGMA) para producir acetato de isoamilo (SIGMA) y etanol (Técnica Química). La transesterificación se llevó a cabo utilizando el biocatalizador producido por la cepa de *Rhizopus homothallicus* (13a). Los estudios se realizaron en viales de 1.5 mL con tapón de aluminio herméticamente cerrados (Figura 1). El consumo de sustratos y formación de producto se siguió por cromatografía de gases (CG) (Perkin Elmer).



Figura 1. Viales de 1.5 mL para la síntesis de acetato de isoamilo.

5.2.1 Relación molar y concentración de sustratos de sustratos

Se estudiaron diferentes relaciones molares de sustratos acetato de etilo/alcohol isoamílico (20/80, 40/60, 50/50, 60/40 y 80/20) que favorecieran el desempeño de la reacción de catálisis hacia la formación de acetato de isoamilo. Para llevar a cabo el estudio, se pesaron 100 mg de biocatalizador en viales de 1.5 mL y se adicionaron 0.7 mL de cada sustrato a la concentración indicada. Los sustratos se disolvieron en hexano. Los viales se incubaron a 45°C por 48 horas sin agitación. Al final del tiempo de incubación las muestras se analizaron por CG.

La relación 50/50 se utilizó como testigo y con esta relación de sustratos se estudió el efecto del biocatalizador molido y sin moler, así como el efecto de la humedad en el biocatalizador equilibrado con agua destilada y la enzima comercial.

Para todos los estudios la concentración final fue de 50 mM, por ejemplo para la relación 20/80 la concentración de acetato de etilo fue de 10 mM y la concentración de alcohol isoamílico fue de 40 mM.

Mediante el procedimiento descrito en el primer párrafo se estudió la síntesis de acetato de isoamilo a diferentes concentraciones de sustrato. Se analizaron concentraciones equimolares de sustratos de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM.

5.2.2 Actividad de agua

La actividad de agua (A_w) del biocatalizador molido se equilibró con soluciones de sales saturadas con una A_w conocida. En seis frascos de boca ancha se pesaron 600 mg de biocatalizador, cada uno de estos frascos se colocó dentro de un recipiente con cierre hermético que contenía 150 mL de una de las soluciones saturadas, el biocatalizador se incubó en cada condición por un periodo de 65 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron 100 mg del biocatalizador equilibrado en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.70 mL de cada sustrato (acetato de etilo y alcohol isoamílico en hexano) para alcanzar una concentración final de 50 mM de cada sustrato. Los viales se incubaron a 45°C por 48 h sin agitación. Los sustratos se deshidrataron con NaSO_4 por 12 h, las muestras se analizaron por CG. Las sales utilizadas fueron MgCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , NaNO_3 , K_2SO_4 y H_2O . En la Tabla 3 se muestra la a_w de cada solución saturada. La actividad de agua (a_w) del biocatalizador equilibrado se cuantificó mediante un equipo AQUA-LAB CX-2.

Tabla 3. Actividad de agua (A_w) de soluciones saturadas.

Compuesto	A_w
$MgCl_2$	0.36
$Ca(NO_3)_2$	0.582
NaCl	0.748
$NaNO_3$	0.77
K_2SO_4	0.98
H_2O	1.0

5.2.3 Selección de biocatalizadores

La producción de los biocatalizadores se llevó a cabo como se describe en la sección 5.1.4. Para la FMS, se utilizaron siete diferentes cepas (13bIV, 19, 56cIV, 23aIV, 13a, 43aIV y 9a) De cada biocatalizador deshidratado, se pesaron 100 mg en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.7 mL de acetato de etilo 100 mM y 0.7 mL de alcohol isoamílico 100 mM (sustratos disueltos en hexano) previamente deshidratados con sulfato de sodio por 24 h. La concentración final de cada sustrato fue de 50 mM. Los viales se incubaron a 45°C por 48 h. Finalmente, se tomaron muestras para su análisis por CG.

5.2.4 Fuente y cantidad de biocatalizador

Se utilizaron los biocatalizadores deshidratados producidos por tres cepas (13a, 43aIV y 9a). Se pesaron 100, 300 y 500 mg de cada biocatalizador en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.70 mL de acetato de etilo 100 mM y 0.70 mL de alcohol isoamílico 100 mM (sustratos disueltos en hexano), previamente deshidratados con sulfato de sodio por 24 h, la concentración final de cada sustrato fue de 50

mM. Los viales se incubaron a 45 °C por 48 h, sin agitación. Las muestras se analizaron por CG.

5.2.5 Concentración de sustratos

Se pesaron 500 mg del biocatalizador deshidratado producido por la cepa 43aIV en viales de capacidad de 1.5 mL, se adicionaron 0.70 mL de acetato de etilo y 0.70 mL de alcohol isoamílico para lograr diferentes concentraciones finales de cada sustrato. Las concentraciones estudiadas fueron 50, 100, 250, 500, 800 y 1000 mM (con hexano como disolvente). Los sustratos se deshidrataron con Na₂SO₄ por 24 h. Los viales se incubaron a 45 °C por 48 h, sin agitación. Finalmente, se tomaron muestras para su análisis por CG.

5.3 Síntesis de oleato de etilo

Para esta reacción se emplearon como sustratos ácido oleico y etanol para producir oleato de etilo y agua. La esterificación se llevó a cabo utilizando el biocatalizador producido por la cepa de *Rhizopus microsporus* (43aIV). La reacción se realizó en un mini reactor de vidrio de capacidad de 10 mL, con chaqueta para controlar la temperatura mediante un recirculador y un agitador magnético para mantener homogéneo el medio de reacción (Figura 2). En todos los estudios de síntesis de oleato de etilo las soluciones de ácido oleico y etanol se realizaron en hexano y se deshidrataron con mallas moleculares (Fluka Type 4A) durante 24 h antes de utilizarlas. El consumo de ácido oleico se cuantificó por el método de sales de cobre (Rodríguez *et al.*, 2006).



Figura 2. Sistema utilizado para la síntesis de oleato de etilo.

5.3.1 Relación molar de sustratos

En el reactor de 10 mL se adicionaron 4.5 mL de ácido oleico 50 mM y 4.5 mL de etanol variando su concentración para obtener diferentes relaciones molares. Las concentraciones de etanol estudiadas fueron: 50, 100, 125, 150, 250, 350 y 450 (relaciones molares 1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:9), manteniendo la temperatura a 45 °C por 15 min. Para iniciar la reacción, se adicionaron 0.5 g de biocatalizador, se transfirieron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf y se les adicionó 0.1 mL de HCl 6M, se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó en refrigeración.

Posteriormente, se tomaron muestras siguiendo el procedimiento anterior cada 5 min durante 60 min.

5.3.2 Concentración de sustratos

En el reactor de 10 mL se adicionaron 4.5 mL de ácido oleico y 4.5 mL de etanol para alcanzar concentraciones finales de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mM para ácido oleico y 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM para etanol (relación molar 1:5 en todos los casos), a 45°C por 15 min. Para iniciar la reacción, se adicionaron 0.5 g de biocatalizador, se transfirieron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf (tubos de reacción) y se les adicionó 0.1 mL de HCl 6M. Los tubos se agitaron en vórtex por 30 s y se almacenaron en refrigeración. Se tomaron muestras cada 5 min.

De los tubos de reacción para las concentraciones 10, 20, 30 mM de ácido oleico, se tomaron 0.4 mL y se adicionaron a un tubo que contenía 2.1 mL de hexano y se agitaron por 30 s. Para las concentraciones 40, 50 y 60 mM se tomaron 0.3 mL y se adicionaron en tubos con 2.2 mL de hexano y finalmente, para las concentraciones 70, 80, 90 y 100 mM se tomaron 0.1 mL y se adicionaron en tubos con 2.4 mL de hexano.

5.3.3 Concentración de biocatalizador

Para evaluar el efecto de la concentración de biocatalizador en el reactor de 10 mL se adicionaron 5 mL de ácido oleico 100 mM y 5 mL de etanol 500 mM, para alcanzar concentraciones finales de 50 mM para ácido oleico y 250 mM para etanol (relación molar 1:5), a 45 °C por 15 min. Para iniciar la reacción, se

incorporaron por separado 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 y 1.6 g de biocatalizador, se tomaron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf y se le agregaron 0.1 mL de HCl 6M. Se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó en refrigeración. Posteriormente, se tomaron muestras cada 5 min cuando se adicionaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g de biocatalizador durante 60 min y cada 2.5 min cuando se adicionaron 1.2, 1.4 y 1.6 g de biocatalizador durante 30 min.

5.3.4 Temperatura

Las temperaturas de reacción estudiadas fueron 25, 30, 35, 40, 45 y 50 °C. Al reactor de 10 mL, se le adicionaron 5 mL de ácido oleico 100 mM y 5 mL de etanol 500 mM, para alcanzar concentraciones finales de 50 mM para ácido oleico y 250 mM para etanol (relación molar 1:5). Los sustratos se mantuvieron por 15 min a la temperatura indicada. Para iniciar la reacción. se adicionó 1 g de biocatalizador e inmediatamente se tomaron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf y se adicionaron 0.1 mL de HCl 6M. Se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó en refrigeración. Posteriormente, se tomaron muestras siguiendo el procedimiento anterior cada 5 min.

5.4 Reacción lotes sucesivos

La estabilidad operacional del biocatalizador se realizó evaluando el reúso del biocatalizador en lotes sucesivos, se utilizaron dos sistemas para llevar a cabo la reacción; 1) en un mini reactor con agitación magnética y 2) en frascos de 20 mL con agitación orbital.

5.4.1 Agitación magnética

En el reactor de 10 mL se mezclaron 4.5 mL de cada sustrato: ácido oleico 50 mM y etanol 250 mM (relación molar 1:5), se incubaron a 45°C por 15 min, inmediatamente después se adicionó al reactor 0.5 g de biocatalizador, se tomaron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf, se adicionaron 0.1 mL de HCl 6 M, se agitó en vortex por 30 s y se almacenó en refrigeración a 4°C. Se tomaron muestras en intervalos de 5 min por 60 min de reacción. Al finalizar cada cinética de 60 min, se separó el medio de reacción residual y se adicionaron 4.5 mL de cada sustrato nuevo al mismo biocatalizador. Todas las muestras fueron almacenadas en refrigeración.

5.4.2 Agitación con agitador orbital

En frascos de capacidad de 20 mL se adicionaron 5 mL de ácido oleico 100 mM y 5 mL de etanol 500 mM para alcanzar concentraciones finales de 50 y 250 mM, respectivamente (relación molar 1:5). Los sustratos se incubaron a 45°C por 15 min, inmediatamente después se adicionó a los frascos 1.5 g de biocatalizador y se tomaron 0.5 mL de muestra en tubos Eppendorf, se le adicionaron 0.1 mL de HCl 6 M, se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó en refrigeración. Se tomaron muestras cada 5 minutos hasta los 60 min de reacción. Al finalizar cada cinética (60 min), se adicionaron 4.5 mL de cada sustrato al mismo biocatalizador. Los frascos se incubaron en una estufa Felisa[®] a 45°C y se agitaron en un agitador orbital Lab-Line a 200 rpm por 60 min.

5.5 Lotes sucesivos variando la concentración de etanol

El estudio se realizó en cuatro frascos de capacidad de 50 mL, 2 frascos marcados como 1 y 2 se utilizaron para la reacción testigo con ácido oleico 50mM y etanol 250mM (relación molar 1:5). Los dos frascos restantes marcados como 3 y 4 se utilizaron para la reacción de estudio. Se evaluaron tres relaciones molares 1:4, 1:2 y 1:1.

En el primer ciclo (ciclo de lavado) se colocaron en los cuatro frascos 5 mL de ácido oleico 100mM y 5 mL de etanol 500mM (las concentraciones finales fueron 50 y 250mM respectivamente), para obtener la relación 1:5. Se incubaron a 45 °C por 15 min. Para iniciar la reacción, se agregaron a cada frasco 1.5 g de biocatalizador. Los frascos se incubaron en una estufa a 45 °C y se agitaron a 250 rpm en un agitador orbital. Se tomaron muestras con una jeringa de 5 mL al tiempo 0, 10, 20, 30 y 60 min.

Una vez terminado el primer ciclo se eliminó todo el sustrato restante en cada frasco, para iniciar los siguientes ciclos en dos frascos (1 y 2) se agregaron 5 mL de los sustratos para tener una relación molar 1:5 (testigos) y en dos frascos (3 y 4) se agregaron los sustratos a la concentración correspondiente para evaluar las diferentes relaciones molares (1:4, 1:2 y 1:1). Se tomaron muestras con una jeringa de 5 mL al tiempo 0, 10, 20, 30 y 60 min. Todas las muestras se almacenaron en congelación.

5.5.1 Tamiz molecular

El efecto del tamiz molecular se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.5. Para este estudio, se seleccionó la relación molar de sustratos 1:1. El tamiz molecular se adicionó a cada frasco en el segundo ciclo de reacción. Las cantidades de tamiz molecular adicionadas fueron 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 y 3.5 g. Se tomaron muestras con una jeringa de 5 mL al tiempo 0, 10, 20, 30 y 60 min. Todas las muestras se almacenaron en congelación.

5.5.2 Concentración de sustratos

El primer ciclo de reacción se llevó a cabo como se detalla en la sección 5.8.2.2. Una vez terminado el primer ciclo, se eliminó todo el sustrato restante en cada frasco, para iniciar los siguientes ciclos en dos frascos (1 y 2) se agregaron los sustratos con relación molar 1:5 (testigos) y en dos frascos (3 y 4) se agregaron los sustratos para evaluar el efecto de la concentración de sustratos, manteniendo constante la relación molar 1:2. Las concentraciones estudiadas fueron 50, 70, 90, 100 y 150mM para ácido oleico y 100, 140, 180, 200 y 300mM para etanol. Se tomaron muestras con una jeringa de 5 mL al tiempo 0, 10, 20, 30 y 60 min. Todas las muestras se almacenaron en congelación.

5.6 Parámetros cinéticos

La estimación de los parámetros cinéticos se llevó a cabo mediante dos series de experimentos en el reactor de 10 mL con 4.5 mL de cada sustrato; una serie de experimentos se realizó manteniendo la concentración de ácido oleico constante en 50mM y variando la concentración de etanol a 100, 150, 200, 250, 300 y

350mM. La siguiente serie de experimentos se realizó manteniendo la concentración de etanol constante en 250 mM y variando la concentración de ácido oleico a 10, 30, 40, 50, 70 y 90 mM. los sustratos se incubaron a 45 °C por 15 min y se adicionaron 500 mg de biocatalizador para iniciar la reacción, se transfirieron 0.5 mL de muestra a tubos Eppendorf y se les adicionaron 0.1 mL de HCl 6M, se agitó en vórtex por 30 s y se almacenó en refrigeración. Se tomaron muestras a intervalos de 5 min.

Para estimar los parámetros cinéticos se realizó una regresión no lineal con el programa Polymath 6.0, usando las velocidades iniciales calculadas en cada uno de los experimentos.

5.7 Síntesis de oleato de etilo en un reactor de 1L

Los estudios de síntesis de oleato de etilo se realizaron también en un reactor de tanque agitado de 1 L, modelo ADI 1025 Applikon, con un diámetro interno de 9.5 cm y un volumen de operación de 0.7 L. El reactor se equipó con una turbina Rushton colocada a 2.5 cm del fondo del recipiente, dos baffles equidistantes de 1 cm de ancho para mejorar el mezclado del sistema y un serpentín para controlar la temperatura del medio de reacción.

5.7.1 En lote

Al reactor de 1 L se adicionaron 125 mL de ácido oleico 50mM y 125 mL de etanol 250mM, se incubaron a 45°C hasta que los sustratos alcanzaron dicha temperatura. Se fijó la velocidad de agitación en 300 rpm. Para iniciar la reacción se agregaron 37.5 g de biocatalizador. Se tomó 1 mL de muestra cada 10 min con

una jeringa de 5 mL, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se adicionaron 0.1 mL de HCl 6M. Todas las muestras se almacenaron en refrigeración.

5.7.2 En continuo

La alimentación de sustratos se realizó con una bomba peristáltica Cole Palmer Masterflex[®] L/S[™] Economy Drive. En la tapa del reactor se adaptó un tubo de vidrio, que se colocó en la superficie del líquido para extraer el exceso y mantener el volumen constante. Este procedimiento se realizó con una bomba peristáltica (Cole Palmer Masterflex[®] L/S[™] Economy Drive). Las muestras se tomaron por un ducto en la tapa del reactor diseñado para este propósito. La temperatura del medio se controló mediante un recirculador conectado al serpentín equipado en el reactor. El sistema general para la síntesis en continuo se muestra en la Figura 3. Para la síntesis de oleato de etilo en continuo, primero se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.8.1. Inmediatamente después de agregar el biocatalizador se inició la alimentación de los sustratos. En un frasco cerrado de capacidad de 1 L, se mezclaron 375 mL de ácido oleico 100 mM y 375 mL de etanol 500 mM. El flujo de entrada se fijó en 2 mL/min. Se tomó muestra a los 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min y a las 4, 5 y 6 h. Todas las muestras se almacenaron en congelación.

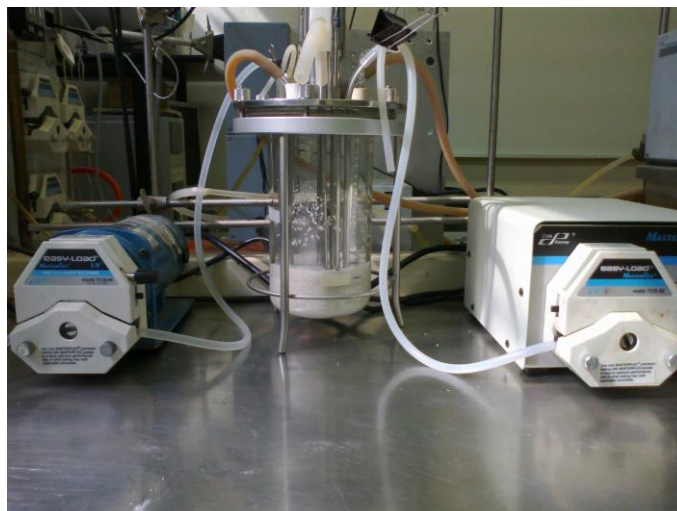


Figura 3. Sistema para síntesis en continuo.

5.7.2.1 Distribución de tiempos de residencia

Para evaluar la distribución de tiempos de residencia se utilizó el sistema descrito en la sección 5.8.2. En el reactor de 1L se adicionaron 250 mL de amortiguador de citratos 0.1M, pH 5, se incubó a 45 °C con agitación a 300 rpm. Cuando la temperatura del líquido en el reactor alcanzó los 45 °C, se midió el pH para obtener el punto inicial. Posteriormente, se adicionó un pulso de NaOH 0.5N para incrementar el pH. Los cambios de pH se monitorearon automáticamente cada min durante los primeros 17 min y después cada 5 min. La alimentación al reactor se hizo con el mismo amortiguador de citratos. El flujo de entrada se fijó en 2 mL/min.

5.8 Síntesis de oleato de etilo en continuo

5.8.1 Estabilidad operacional, velocidad de agitación y tasa de alimentación

Para arrancar la reacción, se inició el proceso en lote (sección 5.7.1). Después de dos horas de funcionamiento en lote, se alimentó con los sustratos al reactor para iniciar con el proceso en continuo (sección 5.7.2). Los sustratos alimentados

posterior a la etapa en lote fueron ácido oleico 50 mM y etanol 100 mM (relación molar 1:2). 750 mL de cada sustrato (etanol 0.2M y ácido oleico 0.1M) se mezclaron y se colocaron en un recipiente cerrado para alimentar el reactor. Se tomó muestra a los 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min y después cada 30 min hasta las 12 h.

Mediante este procedimiento, se estudió la velocidad de agitación de 200 a 400 rpm y la tasa de alimentación con flujos de entrada de 1.1 a 9.3 mL/min.

5.9 Métodos analíticos

5.9.1 Cromatografía de gases

Para la reacción de transesterificación, el consumo de sustratos (acetato de etilo, alcohol isoamílico) y la formación de productos (acetato de isoamilo, etanol), se hizo el análisis de estos compuestos por cromatografía de gases. Se utilizó un equipo Perkin-Elmer Auto System XL equipado con un detector de ionización de flama (FID) y helio como gas acarreador, una columna capilar PE-FFAP N931-6352 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de película que opera de 40 a 250 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del inyector y del detector se mantuvieron en 250 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno inició en 100 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min, posteriormente se incrementó la temperatura 20 $^{\circ}\text{C}$ por min hasta alcanzar 170 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de inyección fue de 5 μL . La presión del gas acarreador fue de 16.4 psig.

5.9.2 Consumo de ácido oleico

El consumo de ácido oleico se cuantificó mediante la técnica de sales de cobre. La preparación del reactivo acetato de cobre-piridina se llevó a cabo disolviendo en

agua destilada acetato de cobre (J.T. Baker) a una concentración de 50 g/L, se agitó durante 30 min con un agitador magnético y se ajustó el pH a 6.1 con piridina (J.T. Baker). Se llevó a cabo una curva de calibración empleando una solución estándar de 0.79 mL de ácido oleico en 25 mL de hexano. Se etiquetaron tubos del 1 al 8 y se les agregaron 2.5 mL de hexano, al tubo 1 se le adicionaron 2.5 mL de la solución estándar y se agitó en vórtex, de este tubo se tomaron 2.5 mL y se agregaron al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 6, al cual después de la agitación se le extrajeron 2.5 mL. Los tubos 7 y 8 sólo contenían hexano y se utilizaron como blanco. Finalmente, a todos los tubos se les adicionó 0.5 mL del reactivo acetato de cobre piridina, se agitaron en vortex por 30 s y se leyó absorbancia a 715 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800.

Todas las muestras provenientes de la reacción de esterificación catalizada por lipasas, se analizaron siguiendo el método de sales de cobre. Se colocaron 0.3 mL de muestra en tubos que contenían 2.3 mL de hexano, se agitaron en vórtex y se adicionaron 0.5 mL del reactivo acetato de cobre-piridina, nuevamente se agitaron en vórtex por 30 s y se leyó absorbancia a 715 nm.

5.9.3 Cuantificación de la actividad lipasa

Método espectrofotométrico: Sales de cobre.

El método consiste en la cuantificación de los ácidos grasos (ácido oleico) liberados durante la hidrólisis de los triglicéridos del aceite de oliva por las lipasas, los cuales en presencia de iones de cobre dan origen a la formación de una sal

colorida (verde esmeralda), cuya intensidad se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 715 nm (Rodríguez *et al.*, 2005).

La concentración de los ácidos grasos presentes en la muestra de reacción se obtuvo a partir de la ecuación de la curva estándar de ácido oleico, el cual representa aproximadamente el 80% de la composición del aceite de oliva.

Preparación de reactivos

Emulsión

Para mantener constante el pH de catálisis, la fase continua de la emulsión consistió de una solución amortiguadora de Tris-HCl 100 mM pH 8 (Bio-Rad), además de contener CaCl₂ (J.T. Baker) 10mM (los iones Ca⁺² estabilizan la estructura de la lipasa), 0.25% de alcohol polivinílico (PVA)(Sigma) como agente emulsificante y 0.3% de goma arábiga (Sigma) como agente estabilizante. Finalmente se ajustó el pH a 8 con HCl 1M.

Para preparar la emulsión se pesaron 20 g de aceite de oliva (Garbonell) y se le agregaron 100 mL de la solución amortiguadora descrita anteriormente. La mezcla se homogeneizó empleando un equipo Ultra-Turrax (IKA-WERK) a 10,000 rpm durante 10 min.

Reactivo para el análisis de ácidos grasos

Se preparó una solución de acetato de cobre a 50 g/L (J.T. Baker), el cual fue disuelto en agua destilada agitando durante 30 minutos. Posteriormente se ajustó el pH a 6.1 con piridina (J.T. Baker)

Ensayo de actividad lipasa

Se pre-incubaron a 45 °C por 15 min, 3 mL de emulsión contenida en tubos cónicos (Corning) de 15 mL. Una vez alcanzada la temperatura, se adicionaron 25 µL de extracto enzimático con agitación en vórtex, se incubaron nuevamente a 45°C durante 15 min. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 0.6 mL de HCl 6 M con agitación en vórtex por 5 s para detener la reacción. Posteriormente se agregaron 3 mL de hexano y se mezclaron por 1 min con la finalidad de extraer los ácidos grasos liberados del sistema de reacción. Los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 minutos a 4°C. Una vez que se tienen las dos fases separadas, se extraen 2.5 mL de la fase orgánica (que contiene a los ácidos grasos liberados) y se adicionan 0.5 mL del reactivo acetato de cobre-piridina seguido de agitación en vórtex por 30 segundos. Finalmente, se lee la absorbancia a 715 nm. Por otra parte, fue necesario descartar la concentración de los ácidos grasos provenientes del aceite de oliva empleado como sustrato, así como los provenientes del extracto enzimático, por lo cual se realizó la siguiente determinación (Blanco): a 3 mL de emulsión (45°C) se adicionaron 0.6 mL de HCl 6 M y 25 µL del extracto enzimático, incubando a 45°C por 15 min y se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

6. Resultados y discusiones

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección, se presenta en primer lugar la producción de lipasas por fermentación en medio sólido, primer paso para la producción del biocatalizador; posteriormente, se describe el uso del biocatalizador producido por la cepa 13a (*Rhizopus homothallicus*) para catalizar la reacción de transesterificación entre alcohol isoamílico y acetato de etilo, para producir acetato de isoamilo y etanol. Para ello, se evaluaron algunos factores que influyen la reacción, como la concentración de sustratos, la relación molar de sustratos y la cantidad de agua en el medio de reacción. También, se evaluaron diferentes biocatalizadores y cantidades del mismo para llevar a cabo esta reacción.

Con el biocatalizador producido por la cepa 43aIV (*Rhizopus microsporus*), se llevó a cabo la reacción de esterificación entre el ácido oleico y el etanol para producir oleato de etilo. Se realizaron estudios preliminares en viales sin agitación y en un mini reactor de 10 mL con agitación magnética, de igual manera se evaluaron algunos factores que afectan la reacción, como la relación molar de sustratos, la cantidad de biocatalizador y la temperatura, entre otros. Finalmente, con este biocatalizador y usando la reacción de esterificación entre ácido oleico y etanol, se realizaron estudios en un reactor de 1L operando en continuo.

6.1 Producción de lipasas

El principal objetivo en esta etapa fue verificar que bajo las condiciones de cultivo ambas cepas de *Rhizopus* (13a y 43aIV) tenían la capacidad de producir lipasas

de una manera reproducible. Para ello, se consideró la actividad hidrolítica de la lipasa producida como variable de respuesta.

Debido a las características del proyecto, la primera etapa consistió en la producción del biocatalizador por fermentación en medio sólido (FMS) con agrolita como soporte inerte. Se utilizaron dos cepas de hongos filamentosos para realizar las fermentaciones en medio sólido y producir lipasas naturalmente inmovilizadas en el soporte. Se utilizaron los sólidos fermentados por la cepa de *Rhizopus homothallicus* (13a) para llevar a cabo la reacción de transesterificación y por la cepa de *Rhizopus microsporus* (43aIV) para la reacción de esterificación.

Estudios previos en nuestro laboratorio sugirieron una mayor producción de lipasas con la cepa 13a, utilizando el medio de cultivo descrito en la sección 5.1.2, con 60% de humedad inicial, aireación de 40 mL/min, temperatura de incubación de 45°C y 16 h de fermentación en columnas de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 43 cm de longitud. Bajo estas condiciones, se realizaron las fermentaciones para producir el biocatalizador. La evolución de CO₂ se monitoreó mediante el procedimiento descrito en estudios anteriores (Saucedo-Castañeda y Trejo-Hernandez 1994) y se eligió como criterio para detener la fermentación, la mayor tasa de producción de CO₂.

En la Figura 4 se muestra la evolución de la tasa de producción de CO₂ en función del tiempo. Se puede observar que, la tasa aumenta hasta alcanzar el máximo valor aproximadamente a las 16 h de cultivo. Este tiempo fue menor al reportado por Fernandes *et al.*, (2007), para la producción de lipasas con *Burkholderia*

cepacia, con salvado de trigo como soporte y aceite de maíz como inductor. A 72 h de cultivo, *B. cepacia* produjo la mayor actividad de hidrólisis (108 UI/gms), que fue mayor a la reportada en este trabajo (75 UI/gms); sin embargo, las condiciones de cultivo y el método para medir la actividad enzimática fueron diferentes, por lo que una comparación directa tal vez no sería adecuada.

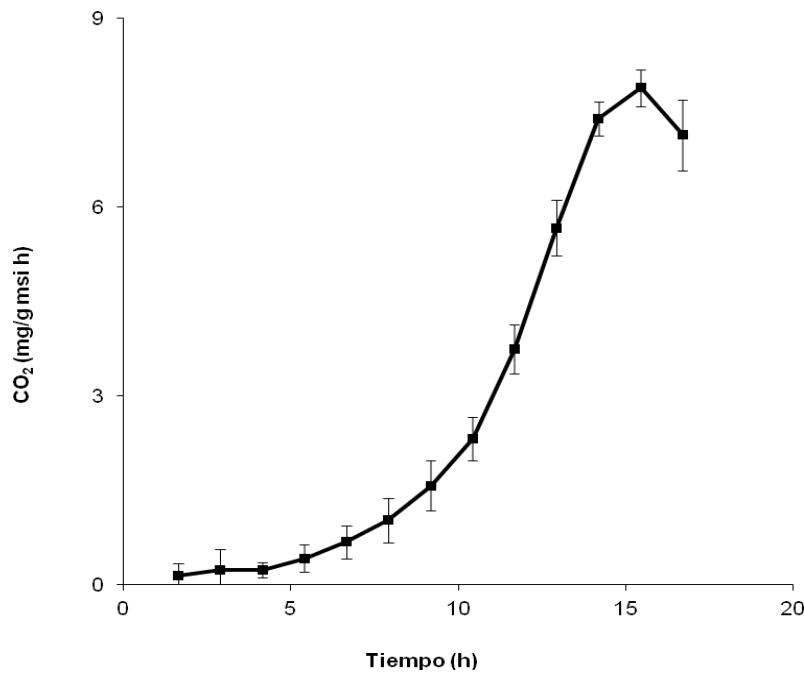


Figura 4. Producción de CO₂ por *Rhizopus homotallicus* en fermentación en medio sólido a 45°C. Condiciones de operación: inóculo 3×10^7 esp/gms, 60% de humedad, aereación 40 mL/min.

La actividad hidrolítica de las lipasas se cuantificó únicamente en la primera etapa de este proyecto; posteriormente, la producción de lipasas se evaluó mediante la conversión de ácido oleico. Una conversión igual o mayor a 85% se estableció como criterio para evaluar la producción de lipasas. Se realizaron diez cultivos para la producción de lipasas durante el desarrollo de este trabajo, en todos los cultivos se observó una conversión de ácido oleico de 85 a 95 %.

6.2 Producción del biocatalizador

Una vez que se determinó el tiempo de mayor actividad lipolítica, el siguiente paso fue la producción del biocatalizador. Para ello, se realizaron fermentaciones bajo las condiciones descritas en la sección 5.1. A las 16 h de cultivo, el material fermentado se dividió en tres fracciones para determinar el efecto del tratamiento sobre la actividad residual. Una de las fracciones se deshidrató directamente con aire seco (800 mL/min por 24 h), otra fracción se liofilizó y la tercera fracción se extrajo con agua destilada (20 mL de agua destilada por cada gramo de materia fermentada fresca).

Para determinar la actividad residual, la materia sólida extraída con agua fue deshidratada con aire seco. Es importante mencionar que al aplicar los métodos de secado, la humedad final del biocatalizador fue menor al 1% en todos los casos (Figura 5).



Figura 5. Biocatalizador obtenido por FMS

Posteriormente, se cuantificó la actividad de hidrólisis de aceite de oliva por cada fracción de lipasas (Figura 6). La actividad del biocatalizador liofilizado y del secado con aire fue prácticamente la misma; esta actividad fue considerada como total, ya que incluye la actividad de la lipasa soluble y la actividad de la lipasa asociada a la biomasa; sin embargo, es menor a la suma de la actividad del extracto líquido y la actividad residual en el biocatalizador extraído que también representan la actividad total de la enzima. Esta disminución puede ser ocasionada por la etapa de deshidratación de la enzima, o tal vez porque el sistema de reacción para cuantificar la actividad enzimática no se encuentra bien mezclado ya que se encuentra el biocatalizador sólido en la emulsión.

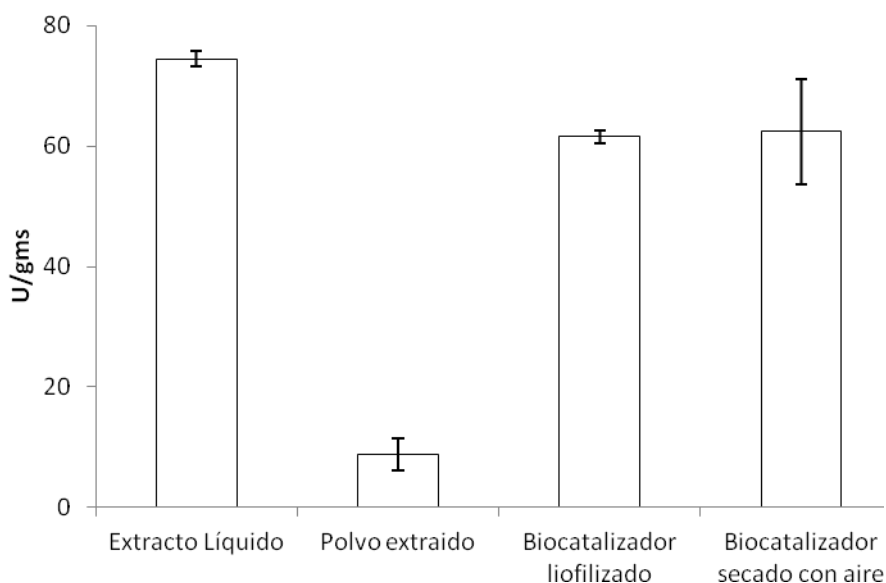


Figura 6. Actividad de hidrólisis del aceite de oliva, empleando los biocatalizadores obtenidos por FMS de *Rhizopus homotallicus*. El sólido fermentado fue sometido a tres tratamientos diferentes: 1) Extracción con agua, 2) Liofilización y 3) Secado con aire

Tomando como base los resultados que se muestran en la Figura 6, se decidió deshidratar el biocatalizador mediante un flujo de aire seco, ya que la actividad de

hidrólisis y la humedad final del biocatalizador (menor al 1%) son muy similares con ambos métodos de secado. En el contexto de este trabajo, este resultado representa un avance importante; por un lado se obtuvo un biocatalizador con una humedad cercana al 1%, valor que está dentro del rango recomendable para trabajar con lipasas en solventes orgánicos (Bornscheuer, 1999) y además todas las fracciones estudiadas después de deshidratarlas tuvieron actividad lipasa. Estas dos características son indispensables para aplicar el biocatalizador directamente en reacciones de síntesis en solventes orgánicos.

6.3 Síntesis de acetato de isoamilo

Los ésteres de acetato se obtienen por esterificación del alcohol correspondiente con ácido acético o un compuesto anhídrido que contenga un grupo acetato, eliminándose agua durante la reacción, por ejemplo, el acetato de metilo se obtiene mediante la esterificación de alcohol metílico con ácido acético en presencia de ácido sulfúrico como catalizador, sin embargo, la esterificación también puede ser catalizada por lipasas, como es el caso de la transesterificación de acetato de isoamilo a partir de acetato de etilo y alcohol isoamílico (Figura 7).

Los ésteres de isoamilo son fragancias y saborizantes ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, bebidas, cosméticos y farmacéutica. El acetato de isoamilo es uno de los más empleados en la industria de los alimentos (74 Ton/año) por su característico sabor a plátano (Welsh *et al.*, 1989).

Los ésteres que se utilizan como saborizantes naturales son extraídos en poca cantidad de plantas y los producidos por fermentación son demasiado costosos

para su explotación comercial (Langrand *et al.*, 1988; Prapulla *et al.*, 1992). En este sentido, la síntesis enzimática puede ser un método atractivo, ya que se lleva a cabo a presiones y temperaturas moderadas, comparadas con la síntesis química. Los ésteres producidos por biocatálisis pueden ser considerados muy cercanos a los naturales y tienen el potencial para satisfacer la demanda de los consumidores (Gillies *et al.*, 1987).

Por las características de los sustratos (acetato de etilo y alcohol isoamílico) y los productos (acetato de isoamilo y etanol) que son compuestos volátiles, el método para detectarlos y cuantificarlos es mediante cromatografía de gases (Cameron *et al.*, 2001).

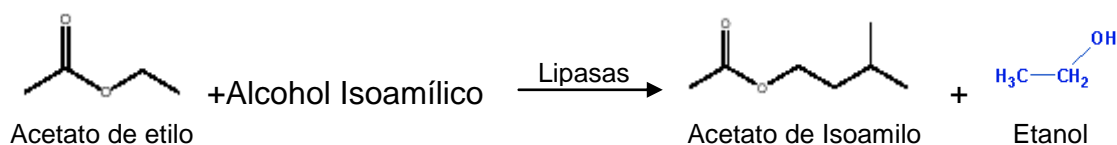


Figura 7. Síntesis de acetato de isoamilo catalizada por lipasas.

En este trabajo, la síntesis de acetato de isoamilo fue el primer acercamiento con reacciones catalizadas por sólidos fermentados sin tratamientos adicionales de purificación e inmovilización. Para iniciar los estudios sobre la síntesis enzimática, se prepararon soluciones 0.5 M de cada uno de los componentes de la reacción utilizando como disolvente hexano. Estas soluciones se analizaron por cromatografía de gases para establecer el tiempo de retención de cada compuesto. La Tabla 4 muestra los tiempos de retención de cada componente de la reacción.

Tabla 4. Tiempos de retención de los sustratos y productos para la reacción de síntesis de acetato de isoamilo.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Acetato de etilo	2.115
Etanol	2.220
Acetato de isoamilo	2.605
Alcohol isoamílico	2.890

El primer experimento para evaluar la actividad de síntesis del biocatalizador, consistió en estudiar el efecto de la concentración de los sustratos sobre la síntesis de acetato de isoamilo. Para esto, se utilizaron viales de 1.5 mL con 100 mg de biocatalizador y concentraciones equimolares de sustratos (acetato de etilo y alcohol isoamílico en hexano) de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 mM. Los viales se incubaron sin agitación a 45°C por 48 h. Al término de las 48 h, las muestras se analizaron por cromatografía de gases.

En la Figura 8 se puede observar que la producción de acetato de isoamilo se incrementó al aumentar la concentración de sustratos en el medio de reacción, hasta alcanzar la mayor formación de acetato de isoamilo cuando la concentración de sustratos en el medio es de 450 mM. Sin embargo, la mayor conversión (25%) se logró a concentraciones de sustratos bajas (50 mM) y disminuyó al aumentar la concentración de sustratos, hasta terminar con un porcentaje de conversión menor al 10%, cuando la concentración de sustratos fue de 450 mM (Figura 8).

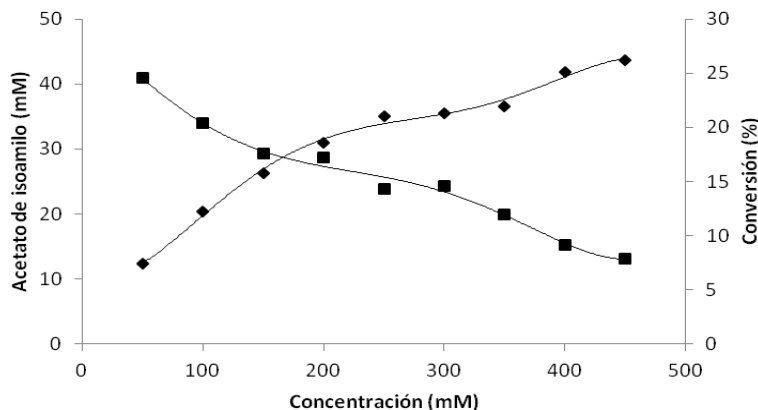


Figura 8. Efecto de la concentración de sustratos (acetato de etilo y alcohol isoamílico en hexano) sobre la síntesis (♦) y % de conversión (■) de acetato de isoamilo en viales de 1.5 mL incubados a 45°C sin agitación durante 48 h.

En este estudio se observó que la mayor concentración de producto después de 48 h de incubación fue muy baja (menor a 50 mM) con una conversión menor al 10%. Por lo que se decidió incrementar la conversión y disminuir el tiempo de reacción; para ello, se evaluó la relación acetato de etilo/alcohol isoamílico con una concentración inicial de 50 mM (tomando como criterio de selección el porcentaje de conversión).

Los ensayos se realizaron en viales de 1.5 mL con 100 mg de biocatalizador, se incubaron a 45°C por 48 h sin agitación. Finalmente, las muestras se analizaron por cromatografía de gases.

Para prevenir los problemas de transferencia de masa que pudieran existir debido a que el sistema no está agitado, se molió el biocatalizador y se comparó con el biocatalizador sin moler (sm) sólo en la relación 50/50. En la Figura 9 se presenta la concentración de acetato de isoamilo en función de la relación acetato de etilo/alcohol isoamílico para las reacciones catalizadas con el biocatalizador B13a.

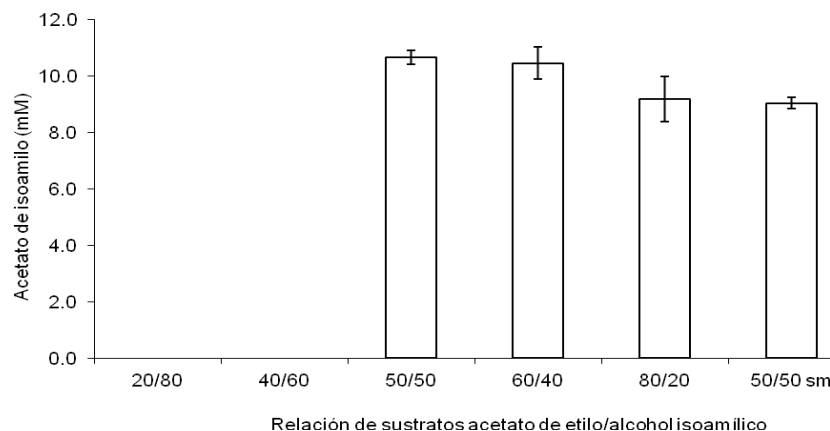


Figura 9. Efecto de diferente relación de sustratos sobre la síntesis de acetato de isoamilo en viales de 1.5 mL sin agitación en 48 horas.

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo la reacción, la transesterificación sólo ocurre cuando la proporción de acetato de etilo es mayor a la del alcohol isoamílico. Cumplida esta condición, la síntesis de acetato de isoamilo no parece verse afectada por la relación de sustratos. Reportes anteriores (Romero *et al.*, 2005, 2007) indicaron que, el rendimiento de la reacción de transesterificación de acetato de isoamilo con la enzima Novozym 435 depende de manera importante de los sustratos utilizados. Por ejemplo, al utilizar ácido acético como donador de acilo, es necesario incrementar la concentración del alcohol correspondiente o adicionar una solución amortiguadora para evitar la disminución del pH del microambiente de la enzima. Los autores también observaron que el acetato de etilo, no tiene efectos negativos sobre la lipasa y la reacción se puede llevar a cabo a concentraciones equimolares de sustratos.

En nuestro caso al utilizar acetato de etilo como sustrato, la síntesis de acetato de isoamilo sólo se detectó cuando la concentración de sustratos fue equimolar y

cuando el acetato de etilo esta en exceso; sin embargo, las concentraciones de acetato de isoamilo fueron muy parecidas en los cuatro casos en donde ocurrió lo anterior.

La enzima comercial logró una mayor síntesis de acetato de isoamilo, siendo tres veces mayor a la reportada por el biocatalizador producido por fermentación en medio sólido en nuestro trabajo.

La síntesis lograda por el biocatalizador molido fue ligeramente superior a la observada con el biocatalizador sin moler, lo que puede sugerir que al disminuir el tamaño de partícula, se mejoró la transferencia de masa. Romero *et al.* 2007 realizaron un estudio para la síntesis de acetato de isoamilo catalizada por Novozym 435 en hexano para evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre la transferencia de masa. Estos autores observaron que, al incrementar la velocidad de agitación no se mejoró la transferencia de masa y concluyeron que la reacción no estuvo influenciada por la transferencia de masa, sino que estuvo controlada por la cinética enzimática.

Otro factor importante en las reacciones de síntesis catalizada por lipasas, es el contenido de agua en el sistema. En los estudios anteriores, el contenido de agua en la reacción no se controló. Para tratar de controlar el contenido de agua en el biocatalizador se prepararon soluciones saturadas de diferentes sales con un contenido de agua conocido (Tabla 3). Estas soluciones se colocaron en recipientes herméticos y dentro de los recipientes se colocó el biocatalizador, para equilibrar su contenido de agua con el de la solución saturada; bajo estas

condiciones se dejó equilibrar al biocatalizador por 60 horas y finalmente se midió la actividad de agua (A_w) y el contenido de humedad en el biocatalizador (Tabla 5)

Tabla 3. Actividad de agua de diferentes soluciones saturadas

Compuesto	A_w
MgCl ₂	0.36
Ca(NO ₃) ₂	0.582
NaCl	0.748
NaNO ₃	0.77
K ₂ SO ₄	0.98
H ₂ O	1.00

Tabla 5. Actividad de agua y porcentaje de humedad del biocatalizador, después de equilibrar con soluciones saturadas de diferentes sales.

Compuesto	A_w	Humedad (%)
Biocatalizador	0.248	0.95
MgCl ₂	0.248	0.57
Ca(NO ₃) ₂	0.221	0.56
NaCl	0.294	0.59
NaNO ₃	0.282	0.81
K ₂ SO ₄	0.948	4.76
H ₂ O	0.974	5.62

Para este estudio, los sustratos en hexano se deshidrataron con Na₂SO₄ por 12 h. En la Figura 10 se observa que el contenido de agua en el sistema de reacción es muy importante, ya que al tener actividades de agua en el biocatalizador de 0.948 y 0.974 y porcentajes de humedad de 4.76 y 5.62, respectivamente, no se detecta actividad de síntesis.

Al disminuir la actividad de agua y el contenido de humedad es posible observar la síntesis de acetato de isoamilo; sin embargo, no se observan diferencias en la síntesis de acetato de isoamilo al equilibrar el biocatalizador con las diferentes

soluciones saturadas en sales. Esto puede deberse a que la actividad de agua y el porcentaje de humedad fueron muy parecidos, lo que da como resultado, niveles de síntesis similares en todos los casos, con conversiones alrededor del 10%, para todas las condiciones en donde procede la reacción.

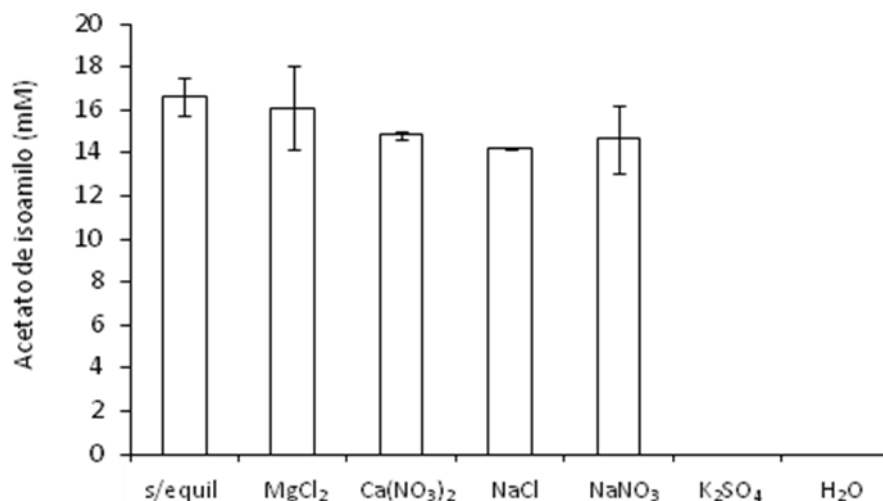


Figura 10. Efecto de la actividad de agua sobre la síntesis de acetato de isoamilo, con biocatalizador equilibrado a diferentes actividades de agua. Reacción en viales de 1.5 mL sin agitación.

Los estudios anteriores se realizaron con el biocatalizador producido por la cepa 13a (*Rhizopus homothallicus*); sin embargo, esta cepa pertenece a una colección de siete cepas aisladas de pulpa de coco, por lo que se decidió evaluar la actividad de síntesis de las siete cepas. Para esto, se utilizaron los biocatalizadores deshidratados producidos por las cepas 13bIV, 19, 56cIV, 23aIV, 13a, 43aIV y 9a. Se pesaron 100 mg de cada biocatalizador en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.75 mL de acetato de etilo 100 mM y 0.75 mL de alcohol isoamílico 100 mM (disueltos en hexano) previamente deshidratados con sulfato

de sodio por 24 h. Los viales se incubaron a 45°C por 48 h. Finalmente, se tomaron muestras para su análisis por CG.

En la Figura 11, se puede observar que bajo las mismas condiciones de reacción, los biocatalizadores que mostraron una mayor actividad de síntesis fueron los producidos por la cepa 43aIV (*Rhizopus microsporus*) y la cepa 9a, aproximadamente el doble de lo alcanzado por las tres cepas en donde se detectó actividad de síntesis (cepa 13bIV, 23aIV y 13a).

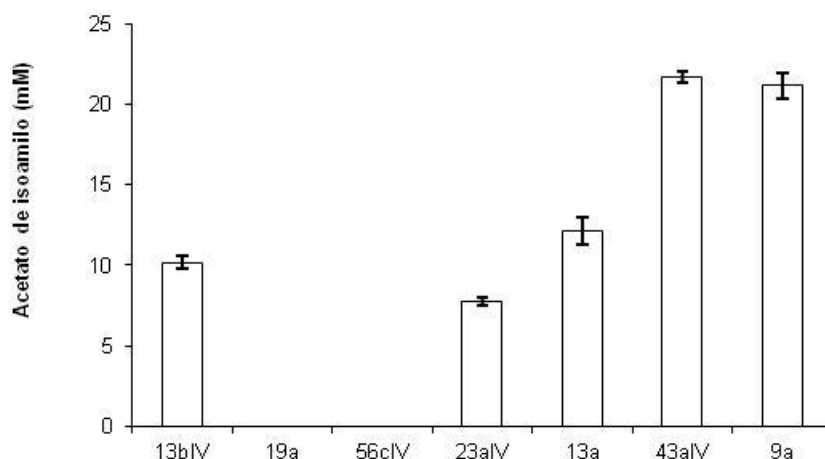


Figura 11. Síntesis de acetato de isoamilo empleando los biocatalizadores obtenidos por FMS de siete cepas de hongos (13bIV, 19, 56cIV, 23aIV, 13a, 43aIV y 9a), en viales de 1.5 mL incubados a 45°C sin agitación durante 48 h.

En consideración a estos resultados, se decidió utilizar los biocatalizadores producidos por las cepas 43aIV 9a y 13a, para evaluar el efecto de la concentración del biocatalizador sobre la síntesis de acetato de isoamilo. Se pesaron 100, 300 y 500 mg de cada biocatalizador en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.70 mL de acetato de etilo 100 mM y 0.70 mL de alcohol isoamílico

100 mM (disueltos en hexano) previamente deshidratados con sulfato de sodio por 24 h. Los viales se incubaron a 45°C por 48 horas sin agitación. Finalmente, se analizaron por CG.

Se observó que, al aumentar la concentración de biocatalizador producido empleando las tres cepas, aumentó la concentración de acetato de isoamilo, logrando la mayor concentración del producto con 500 mg de biocatalizador producido por la cepa 43aIV (*Rhizopus microsporus*) (Figura 12).

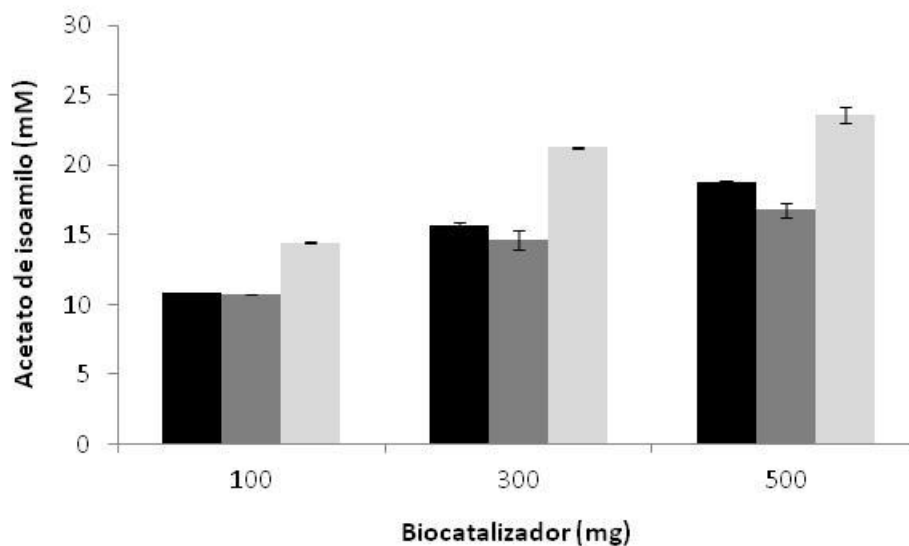


Figura 12. Efecto de la concentración del biocatalizador, producido por las cepas de hongos 13a (■), 9a (■) y 43aIV (■), sobre la síntesis de acetato de isoamilo.

En virtud de esos resultados, se decidió utilizar 500 mg del biocatalizador producido por la cepa 43aIV, para evaluar el efecto de la concentración equimolar de sustratos, sobre la síntesis de acetato de isoamilo. Se pesaron 500 mg del biocatalizador en viales de 1.5 mL, se adicionaron 0.70 mL de acetato de etilo y

0.70 mL de alcohol isoamílico, para lograr diferentes concentraciones finales de cada sustrato (50, 100, 250, 500, 800 y 1000 mM). Las soluciones de los sustratos se realizaron en hexano, previamente deshidratados con sulfato de sodio por 24 h. Los viales se incubaron a 45°C por 48 h sin agitación. Finalmente, se analizaron por CG.

La reacción de síntesis empleando el catalizador producido por la cepa 43aIV, tuvo un comportamiento similar al reportado para la cepa 13a; ya que, la concentración de acetato de isoamilo aumentó al aumentar la concentración equimolar de sustratos (Figura 13) y se alcanzó la mayor producción de acetato de isoamilo, cuando la concentración fue de 1 M; sin embargo, al igual que el biocatalizador producido por la cepa 13a, la mayor de conversión (80%) se alcanzó a bajas concentraciones de sustratos (50 mM) y disminuye, al incrementar la concentración hasta llegar al 20% de conversión cuando la concentración de sustratos fue de 1 M (Figura 13).

Es importante mencionar que se lograron conversiones del 80% con un biocatalizador producido por fermentación en medio sólido, aplicado directamente al medio de reacción, con un tiempo de reacción de 48 h. Krishna *et al.* (2001), usaron una lipasa comercial (Lipozyme IM-20) para catalizar la síntesis de acetato de isoamilo, evaluaron el efecto de la concentración de sustratos sobre la síntesis y observaron un comportamiento muy similar al reportado en este trabajo. Los autores lograron elevadas conversiones (mayores a 90%) a concentraciones bajas de sustrato (60 mM) y disminuyó drásticamente (menos de 12%), cuando la

concentración fue de 1M, el tiempo para alcanzar estas conversiones con Lipozyme IM-20 fue de 72 h, 24 h más al tiempo reportado en este trabajo.

Por otro lado, Romero *et al.* (2005) evaluaron diferentes enzimas comerciales (Novozym 435, Lipozyme RM-IM y lipozyme TL-IM) para catalizar la síntesis de acetato de isoamilo en hexano como medio de reacción, observaron que la enzima Novozym 435 logró los mejores resultados al tener conversiones cercanas al 100% en 2 h de reacción, a concentraciones relativamente elevadas de sustratos (0.8M).

Las lipasas comerciales son ampliamente usadas en síntesis de compuestos de alto valor agregado; estos procesos se realizan usualmente en medios orgánicos con poca cantidad de agua. Desafortunadamente, la reproducibilidad de los resultados no es muy buena aunque las lipasas sean proporcionadas por el mismo distribuidor. Este comportamiento se debe a las diferentes concentraciones (cantidad) de lipasas en cada preparación o por la presencia de diferentes isoenzimas (calidad) en el biocatalizador (Domínguez de María *et al.*, 1999). Otra causa para la falta de reproducibilidad puede ser la presencia de algunas otras enzimas hidrolíticas, como las esterases en las preparaciones comerciales (Sánchez *et al.*, 1999).

Estas pueden ser las razones que expliquen la diferencia en los tiempos de reacción para las preparaciones enzimáticas Novozym 435 (Romero *et al.*, 2005) y Lipozyme IM-20 (Krishna *et al.*, 2001), comparados con el biocatalizador usado en este trabajo.

La síntesis de oleato de heptilo es una prueba sencilla que se usa para comparar las capacidades de síntesis de extractos crudos de lipasas, siendo la reacción selectiva para lipasas, excluyendo a las estererasas y las proteasas, las cuales no son activas en esta reacción de esterificación (Domínguez de María *et al.*, 2002).

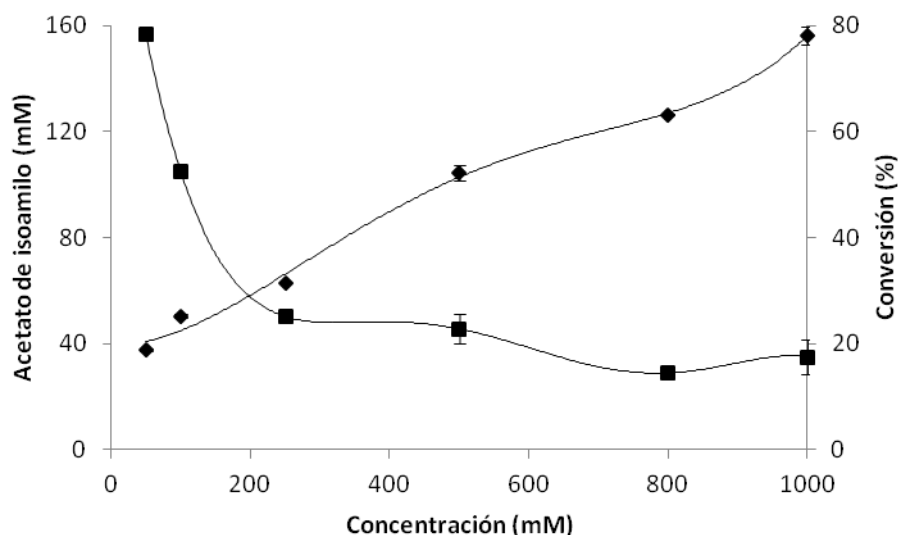


Figura 13. Efecto de la concentración equimolar de sustratos sobre la síntesis (◆) y la conversión (■) de acetato de isoamilo empleando el biocatalizador producido por la cepa 43aIV y usando viales de 1.5 mL incubados a 45°C sin agitación durante 48 h.

La conversión alcanzada (80%) con el biocatalizador producido por fermentación en medio sólido que cataliza la síntesis de acetato de isoamilo en hexano como medio de reacción, es comparable con las reportadas para enzimas comerciales (Krishna *et al.*, 2001, Romero *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2007), incluso, el tiempo de reacción (48 horas), fue menor al reportado para algunas lipasas comerciales (Krishna *et al.*, 2001) y esto resulta de gran importancia en el contexto de este proyecto por tres razones principalmente: 1) Se demostró que mediante la fermentación en medio sólido con soportes inertes se pueden producir sólidos

fermentados, que mediante una sencilla etapa de deshidratación dan lugar al biocatalizador con actividad enzimática y con menos del 1% de humedad, factor importante para este tipo de reacciones, 2) se demostró también, que no son necesarios procesos de purificación o inmovilización, el biocatalizador se puede aplicar directamente para catalizar reacciones de transesterificación presentando conversiones elevadas (80%), y 3) el biocatalizador es estable y mantiene su actividad en disolventes orgánicos como el hexano, al menos por 48 h.

Con el objetivo de evaluar el potencial que tiene el biocatalizador producido por fermentación en medio sólido, surge una pregunta importante ¿cómo mantener conversiones elevadas y al mismo tiempo disminuir el tiempo de reacción? Primero es importante diferenciar entre lipasas y esterases, las primeras tienen mayor afinidad por ácido grasos de cadena larga, mientras que las esterases prefieren ácidos grasos de cadena corta (Bornscheuer, 1999), tomando en cuenta esta condición, una alternativa, es llevar a cabo una reacción de esterificación entre un ácido graso de cadena larga (ácido oleico) y un alcohol de cadena corta (etanol), de esta manera se privilegiaría la actividad lipasas sobre las esterases y otras hidrolasas que posiblemente se encontraran en el biocatalizador producido por fermentación en medio sólido y se evaluaría el potencial del biocatalizador para catalizar este tipo de reacción.

6.4 Síntesis de oleato de etilo

La gran variedad en las propiedades de los diferentes ésteres, hacen de éstos una de las clases más importantes de compuestos orgánicos con aplicación comercial

(Foresti *et al.*, 2005). Se emplean ampliamente en la preparación de perfumes, cosméticos, detergentes, saborizantes y fármacos (Bauer *et al.*, 1990); también, son ampliamente utilizados como solventes, plastificantes, biocombustibles y lubricantes (Gandhi *et al.*, 1995).

En particular, el oleato de etilo es utilizado como aditivo biológico, como plastificante, como agente resistente al agua y para fluido hidráulico (Hazarika *et al.*, 2002). Los ésteres no se encuentran disponibles en grandes cantidades en las fuentes naturales para su extracción y por lo general, son costosas para su aplicación comercial (Radzi *et al.*, 2006). Por esta razón, a pesar de los problemas que se presentan al utilizar dichos procesos, muchos de los ésteres usados comercialmente son de origen sintético (Trani *et al.*, 1991).

Recientemente, la producción biotecnológica de ésteres utilizando lipasas ha recibido gran atención, esto debido a que las condiciones de operación son relativamente moderadas, el alto grado de pureza de los productos y la aceptación de estos en la industria de alimentos (Trubiano *et al.*, 2007).

6.4.1 Estudios preliminares

En esta etapa se realizó la síntesis de oleato de etilo en viales de 1.5 mL sin agitación y en un mini-reactor de 10 mL con agitación magnética. Para esta etapa, se utilizó el biocatalizador producido por la cepa 43aIV (*Rhizopus microsporus*).

6.4.1.1 Síntesis de oleato de etilo en viales sin agitación

Tomando como base los resultados sobre la síntesis de acetato de isoamilo, los primeros estudios para la reacción de esterificación entre ácido oleico y etanol se llevaron a cabo en viales de 1.5 mL sin agitación a 45°C. En esta primera etapa se utilizaron el biocatalizador producido por la cepa 43aIV, la enzima comercial Lipozyme RM-IM y un blanco que se mantuvo bajo las mismas condiciones pero en lugar de biocatalizador contenía únicamente agrolita sin fermentar.

Tomando como referencia los datos de la síntesis de acetato de isoamilo, en esta primera parte se estudió el efecto de la relación equimolar de sustratos (1:1) y el efecto de un exceso de etanol (1:5) sobre la reacción de esterificación.

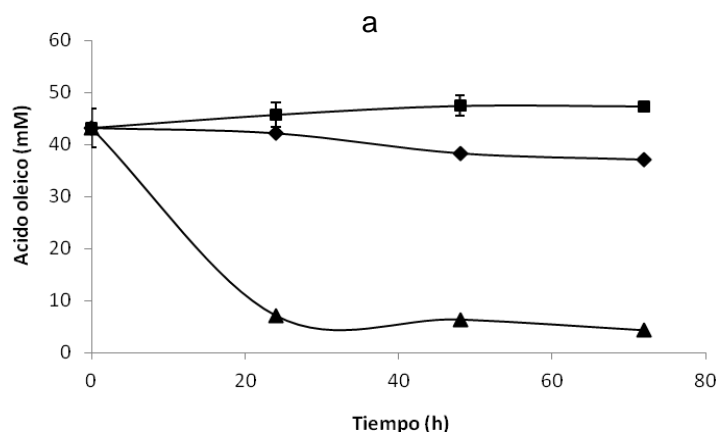
En la Figura 14a se presenta el consumo de ácido oleico (como consecuencia de la reacción de esterificación) en función del tiempo y del tipo de biocatalizador utilizado. Se observa que, la relación de sustratos (ácido oleico/etanol) juega un papel importante en la esterificación por el biocatalizador. A concentraciones equimolares (50 mM de ambos sustratos), no se observa consumo del ácido oleico. La causa de este comportamiento no es muy clara; es posible que la cantidad de agua contenida en el biocatalizador (1-2% de humedad) interaccione con el etanol y disminuya la concentración de sustrato en el medio de reacción, modificando de esta manera la relación molar de sustratos.

Sin embargo, dado que bajo las mismas condiciones, la enzima comercial si logró llevar a cabo la reacción de esterificación, disminuyendo la concentración de ácido oleico hasta en un 90%, no parece que esta sea la razón para la nula actividad del

biocatalizador producido en FMS y es posible que esta falta de actividad esté relacionada con la limitación de sustratos, en este caso de etanol.

Al incrementar la concentración de etanol a 250 mM (relación de sustratos 1:5), el biocatalizador producido en FMS logró utilizar el 100% del ácido oleico en 24 h de reacción; mientras que, la enzima comercial alcanzó este mismo porcentaje a las 72 h de reacción (Figura 14b).

La actividad de hidrólisis de la lipasa preparada por FMS y de la enzima comercial fueron 75 y 130 U/gms, respectivamente; sin embargo, la cantidad del biocatalizador utilizado en cada ensayo fue de 500 mg para el biocatalizador producido por FMS y 100 mg para la enzima comercial; es posible que esta diferencia en la cantidad de catalizador sea la responsable de la menor velocidad de reacción con la enzima comercial (Figura 14b).



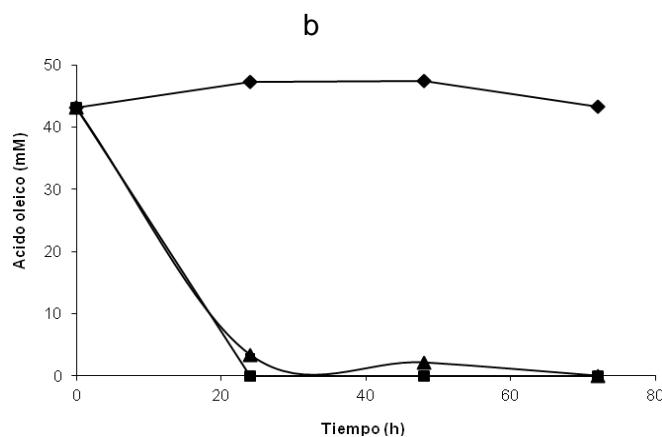


Figura 14. Consumo de ácido oleico durante la reacción de síntesis de oleato de etilo con el biocatalizador producido por FMS (■), la enzima comercial Lipozyme TL-IM (▲) y un blanco de reacción (◆). Con relación equimolar de sustratos (a) y con relación de sustratos 1:5 (b) en viales sin agitación a 45°C.

6.4.1.2 Síntesis de oleato de etilo en un mini reactor agitado

Como se pudo observar en la Figura 14b, el consumo de ácido oleico a las 24 h de reacción fue total (100%). Con el fin de verificar si el ácido oleico se consumía antes de las 24 h de reacción, se realizó una cinética más detallada. La cinética se llevó a cabo en viales de 1.5 mL sin agitación a 45°C con 0.5 g de biocatalizador y 0.7 mL de cada sustrato (ácido oleico 100 mM y etanol 500 mM), tomando muestras cada 5 h.

En este estudio se observó que después de 5 h de reacción la concentración de ácido oleico disminuyó más del 90% y se mantuvo constante durante las 25 h de ensayo. En función de estos resultados, se decidió utilizar un mini reactor agitado (de 10 mL) para la síntesis de oleato de etilo.

La reacción en el mini reactor agitado se llevó a cabo con 0.15 g de biocatalizador y 4 mL de cada sustrato (ácido oleico 50 mM y etanol 250 mM) a 45°C, tomando

muestras a los 0, 10, 20, 30, 90 y 210 minutos. En la Figura 15 se observa un consumo de ácido oleico de casi 100% a los 90 min de reacción .

Este resultado es de gran importancia, porque se establecieron las condiciones estándares para la reacción de esterificación entre ácido oleico y etanol, logrando conversiones y tiempos de reacción comparables a los alcanzados por enzimas comerciales (Torres y Otero, 1999, Yadav y Trivedi, 2003). Tal vez la importancia de este resultado radica en el hecho de que se trata de un biocatalizador producido por fermentación en medio sólido que sin procesos de purificación o etapas de inmovilización se aplicó directamente en la reacción de esterificación entre ácido oleico y etanol y resultó no sólo capaz de llevar a cabo la reacción sino además ser estable a la temperatura de trabajo (45°C) durante el tiempo del estudio (210 minutos)

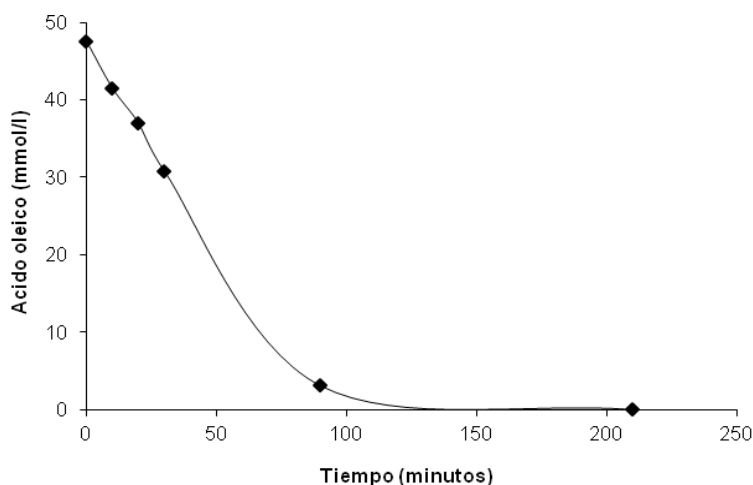


Figura 15. Cinética del consumo de ácido oleico durante la síntesis de oleato de etilo, empleando el biocatalizador producido en FMS por la cepa 43aIV, con una relación de sustratos 1:5 (ácido oleico:etanol) en un mini reactor agitado a 45°C.

6.4.2 Efecto de la relación molar de sustratos

Una vez que se determinó que el biocatalizador es capaz de llevar a cabo la reacción de esterificación con elevadas conversiones y en tiempos cortos de reacción, se evaluaron diferentes variables que tienen impacto en la reacción de esterificación. Una de estas variables es la relación molar de sustratos.

El efecto de la relación molar ácido oleico:etanol sobre la reacción de esterificación, se estudió fijando la concentración de ácido oleico en 50 mM y variando la concentración de etanol de 50 a 450 mM. Todos los experimentos se realizaron con 1 g de biocatalizador en un reactor en lote de 10 mL con agitación magnética. La mezcla de reacción fue incubada a 45°C por 60 min. La Tabla 6 muestra la velocidad inicial de la reacción a las diferentes relaciones molares.

Tabla 6. Efecto de la relación molar de sustratos sobre la velocidad inicial de reacción catalizada por el fermento sólido producido por la cepa 43aIV en FMS^a

Relación molar	Etanol (mM)	Velocidad (mmol/Lmin)
1:1	50	0.45
1:2	100	0.83
1:2.5	125	0.99
1:3	150	1.52
1:5	250	1.64
1:7	350	1.12
1:9	450	0.53

^a Condiciones de reacción: Reactor con agitación magnética a 45°C con 1 g de biocatalizador. La concentración de ácido oleico fue mantenida constante (50 mM)

La máxima velocidad inicial de reacción se alcanzó con una relación molar 1:5 (ácido oleico: etanol); de la misma manera. La síntesis de oleato de etilo se ve favorecida al incrementar la concentración de etanol en el medio de reacción hasta 1:5 (Figura 16). Con concentración de ácido oleico 50 mM y etanol 250 mM se obtuvo una conversión del 97.8% en 60 min de reacción.

Es importante mencionar que los sólidos fermentados contienen ácido oleico residual; dependiendo del lote de fermentación, el contenido de ácido oleico en el biocatalizador fue de 7.57 mmol/L. Esta concentración de ácido oleico no afectó de manera considerable la velocidad inicial de reacción ni el porcentaje de conversión.

Al incrementar la concentración de etanol hasta 450 mM, el porcentaje de conversión disminuye hasta 54.8%; este comportamiento puede indicar la naturaleza inhibitoria del etanol. A la relación molar 1:5, puede tener lugar la máxima transferencia de acilo dando lugar al mayor porcentaje de conversión, a relaciones molares mayores a 1:5. El incremento en la concentración de etanol puede dificultar ligeramente la unión del ácido oleico al sitio activo, debido al aumento de la unión de etanol y por lo tanto disminuir el porcentaje de conversión; esto sugiere que la transferencia de acilo puede ser afectada por la concentración de etanol libre disponible (Krishna *et al.*, 2001).

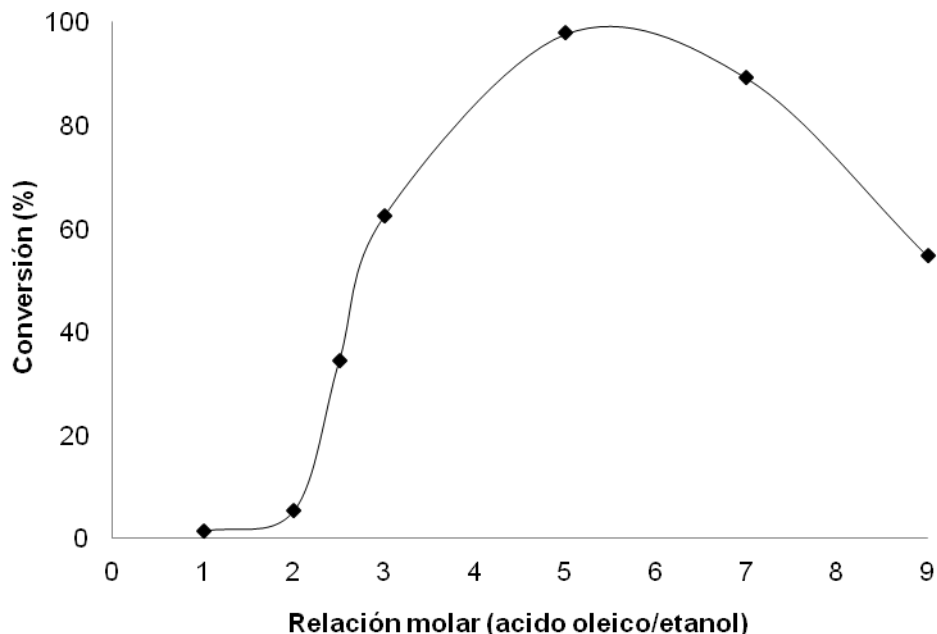


Figura 16. Efecto de la relación molar de sustratos sobre la síntesis de oleato de etilo. Condiciones de reacción: 50 mM de ácido oleico, 1 g de biocatalizador, 60 min de reacción a 45°C. La concentración de ácido oleico se mantuvo constante, modificando la concentración de etanol para alcanzar las siguientes relaciones molares: 1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:5, 1:7 y 1:9.

El efecto positivo de un exceso de etanol sobre las reacciones de esterificación o transesterificación se ha reportado anteriormente (Romero *et al.*, 2005, Fernandes *et al.*, 2007, Torres y Otero, 1999, Yadav y Trivedi, 2003, Kim *et al.*, 2004, Serri *et al.*, 2006). Sin embargo, el tiempo para alcanzar altos porcentajes de conversión varía considerablemente, por ejemplo, Fernandes *et al.* 2007 al estudiar un sistema muy similar al utilizado en este trabajo y concentraciones de sustrato del mismo orden de magnitud (70 mM de ácido oleico), lograron su mejor nivel de conversión (94%) después de 18 h de reacción a 37°C, un tiempo considerablemente mayor al reportado en este trabajo (97.8 % en 60 min).

Inclusive, la enzima comercial Novozym 435 (de *Candida antarctica* B) que cataliza reacciones de esterificación con ácidos láctico y glicólico, y alcoholes de cadena larga como sustratos, logró los mayores porcentajes de conversión (95 y 87%) a las 48 y 24 h de reacción, respectivamente (Torres y Otero, 1999). Tiempos de reacción similares se han logrado con enzimas comerciales para catalizar la reacción de transesterificación entre el *n*-octanol y el acetato de vinilo, logrando el 82% de conversión en 90 min (Yadav y Trivedi, 2003). Las diferencias en los porcentajes de conversión y en el tiempo de reacción pueden estar asociadas a la actividad catalítica de la enzima; sin embargo, si comparamos la actividad de la enzima utilizada por Fernandes *et al.* (2007) y la actividad de la enzima utilizada en este trabajo (108 y 75 UI/gms, respectivamente) no es posible aseverar que las diferencias se deben a este factor, ya que el tiempo de reacción para las lipasas producidas por FMS es mucho menor al reportado por Fernandes *et al.* (2007), aún cuando en ambos casos, se hayan utilizado los mismos sustratos (ácido oleico y etanol). De igual manera, con la enzima Novozym 435 para catalizar reacciones de esterificación y de transesterificación (Torres y Otero 1999, Yadav y Trivedi 2003) se lograron tiempos de reacción muy diferentes. Esto sugiere que el tiempo de reacción y el porcentaje de conversión puede estar relacionado con diferentes factores tales como: la actividad catalítica de la enzima, el tipo de enzima, el tipo de reacción, el tipo de sustratos utilizados y el tipo de solvente utilizado como medio de reacción.

6.4.3 Efecto de la concentración de sustratos

Para estudiar el efecto positivo del exceso de etanol sobre la síntesis de oleato de etilo, se realizaron una serie de experimentos aumentando la concentración de los sustratos pero manteniendo constante la relación molar en 1:5, por ejemplo, al aumentar la concentración de ácido oleico a 70 mM, la concentración de etanol se incrementó a 350 mM. Se utilizaron 0.5 gramos de biocatalizador para cada ensayo y 4.5 ml de cada sustrato. Los estudios se llevaron a cabo en el reactor por lote con agitación magnética a 45°C. En la Tabla 7 se presenta la velocidad inicial de reacción para cada condición.

Tabla 7. Efecto de la concentración de sustratos sobre la velocidad inicial de síntesis de oleato de etilo^b

Ac. oleico (mmol/L)	Etanol (mmol/L)	Velocidad (mmol/L min)
10	50	0.082
20	100	0.629
30	150	0.747
40	200	1.236
50	250	1.293
60	300	1.308
70	350	1.79
80	400	1.584
90	450	0.631
100	500	0.526

^b Condiciones de reacción: relación molar 1:5, 1 g de biocatalizador, 4.5 mL de cada sustrato, 60 minutos de reacción a 45°C.

La mayor velocidad de reacción (1.79 mmol/Lmin) se obtuvo con las concentraciones de 70 y 350 mM para ácido oleico y etanol, respectivamente; sin embargo, los porcentajes de conversión considerables (87.8%) se lograron a partir de concentraciones bajas de sustratos (30 mM para ácido oleico y 150 mM para etanol) y la conversión se incrementó hasta 95.5%, cuando la concentración fue de 70 y 350 mM para ambos sustratos (Figura 17). A concentraciones superiores (90mM:450mM y 100mM:500mM) el porcentaje de conversión disminuyó hasta 38.1%.

Esta disminución en la conversión puede estar asociada a las propiedades del etanol; por una parte, al ser un solvente orgánico miscible en agua, puede cambiar la conformación de la enzima y con ello, la pérdida de la actividad (Heidari *et al.*, 2007) y por otro lado puede actuar como un inhibidor competitivo bloqueando el sitio que normalmente está destinado para el proceso de acilación (Zaidi *et al.*, 2002).

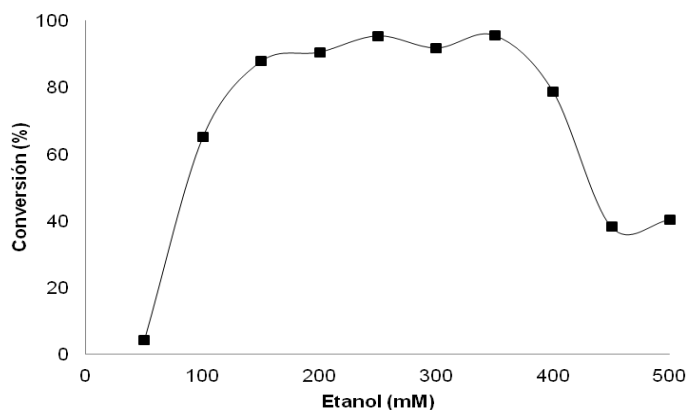


Figura 17. Efecto de la concentración de sustratos sobre la esterificación de ácido oleico y etanol, con 1 g de biocatalizador producido por FMS con la cepa 43aIV, incubando con agitación magnética a 45°C durante 60 min de reacción, en 9 mL de medio de reacción.

6.4.4 Efecto de la concentración del biocatalizador sobre la síntesis de oleato de etilo

Los estudios se realizaron bajo las condiciones mencionadas, para la reacción estándar (sección 6.3.1.2) y diferentes niveles de enzima (de 0.2 a 1.6 g). En la Figura 18 se muestran los resultados para 60 min de reacción.

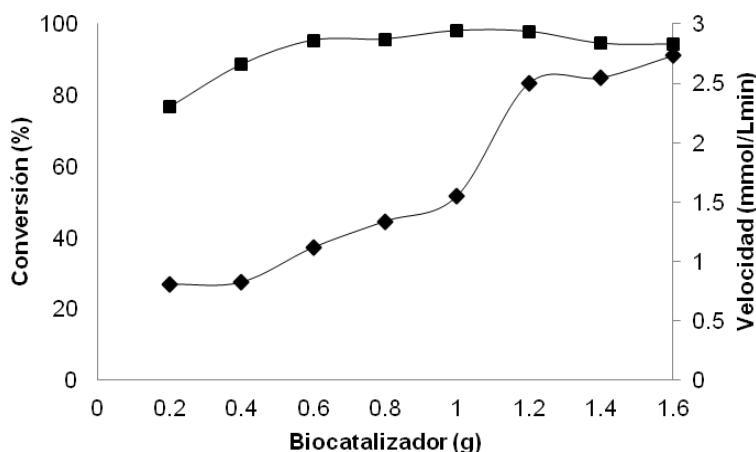


Figura 18. Efecto de la concentración del biocatalizador en la velocidad inicial de reacción (◆) y sobre la conversión (■) de oleato de etilo. Condiciones de reacción: ácido oleico 50mM, etanol 250 mM, 60 min de reacción a 45°C, en 9 mL de medio de reacción.

El porcentaje de conversión se incrementó al aumentar la cantidad de biocatalizador hasta alcanzar un valor máximo alrededor de 95% cuando la cantidad de biocatalizador fue de 0.6 g. Posteriormente, la conversión permanece constante al aumentar la concentración de biocatalizador. Aunque este comportamiento ha sido previamente reportado (Foresti *et al.*, 2005, Gandhi *et al.*, 1995, Krishna *et al.*, 2001), no se ha demostrado la razón por la que no se alcanza el 100 % de conversión de sustratos. Esto puede deberse a la constante de afinidad de la enzima. Gandhi *et al.* (1995) propusieron que los sitios activos de las

enzimas presentes en exceso pueden no estar expuestos a los sustratos, evitando que la reacción se lleve a cabo.

La Figura 18 también muestra la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de biocatalizador, observando una respuesta lineal de la velocidad al incrementar la concentración de enzima.

6.4.5 Efecto de la temperatura sobre la síntesis de oleato de etilo

El efecto de la temperatura sobre la síntesis de oleato de etilo catalizada por las lipasas producidas por FMS también fue estudiada (Figura 19).

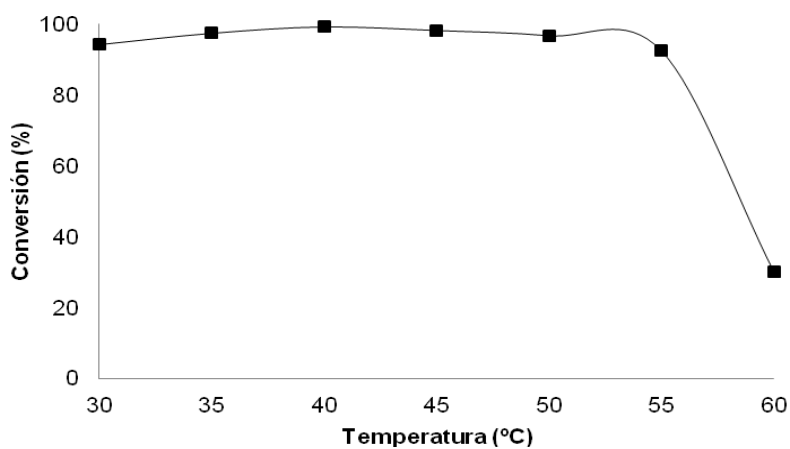


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de oleato de etilo. Condiciones de reacción: 50 mM de ácido oleico, 250 mM de etanol (disueltos en hexano), 1 g de biocatalizador, periodo de incubación 60 minutos en 9 mL de medio de reacción.

La temperatura de incubación tiene gran influencia en las reacciones catalizadas por enzimas. La temperatura puede afectar tanto la tasa de esterificación como la eficiencia de conversión de producto. En la Figura 19 se presenta el porcentaje de conversión de oleato de etilo en función de la temperatura de reacción. De 30 a 55

°C se obtuvo una conversión cercana al 100 %; sin embargo a 60 °C la conversión disminuyó hasta el 28%. Esto pudo ser debido a la desnaturalización de la enzima.

La Figura 20 muestra las velocidades iniciales de reacción en función de la temperatura empleando el biocatalizador obtenido por FMS de la cepa *Rhizopus microsporus* 43aIV. A partir de estos valores, se calculó la energía de activación utilizando la ecuación descrita por Nielsen *et al.* (2003). La energía de activación calculada fue de 37.3 KJ/mol; la cual fue similar a la reportada por Zaidi *et al.* (2002) para la esterificación de ácido oleico con alcohol oleico que resultó de 38 KJ/mol. Estos valores pueden ser considerados típicos para procesos biocatalíticos limitados por la reacción (Zaidi *et al.*, 2002).

Estudios más detallados sobre los efectos de la transferencia de masa en la reacción de esterificación de ácido oleico y etanol, concluyen que la resistencia a la transferencia de masa no es importante y puede ser despreciable por lo que se puede considerar que el sistema se encuentra controlado por la reacción (Trubiano *et al.*, 2007).

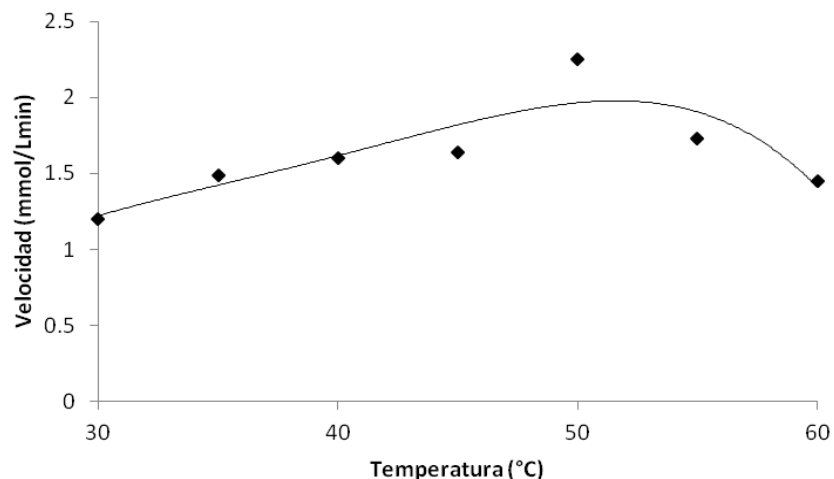


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial de reacción empleando el biocatalizador obtenido por FMS de la cepa *Rhizopus microsporus* 43aIV. Condiciones de reacción: 50 mM de ácido oleico, 250 mM de etanol, 1 g de biocatalizador, periodo de incubación 60 min.

6.5 Estimación de los parámetros cinéticos

La estimación de los parámetros cinéticos se realizó mediante dos series de experimentos; en la primera serie se fijó la concentración de ácido oleico y se estudiaron diferentes concentraciones de etanol; para la segunda serie de experimentos se mantuvo constante la concentración de etanol variando la concentración de ácido oleico (Tabla 8).

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizó la ecuación para el mecanismo de reacción Ping Pong Bi Bi que es el mecanismo considerado por diferentes autores que describe la acción catalítica de las lipasas independientemente de que reacción catalizan (esterificación, interesterificación, transesterificación, etc.) (Tsai y Chiang, 1991; Marty *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1999). Se realizó una regresión no lineal con el programa Polymath 6.0 para obtener los parámetros cinéticos.

$$V = \frac{V_m[R_1\text{COOH}][R_2\text{OH}]}{K_m(\text{COOH})[R_2\text{OH}]\left(1 + \frac{[R_2\text{OH}]}{K_i(\text{OH})}\right) + K_m(\text{OH})[R_1\text{COOH}]\left(1 + \frac{[R_1\text{COOH}]}{K_i(\text{COOH})}\right) + [R_1\text{COOH}][R_2\text{OH}]}$$

Figura 21. Ecuación para el mecanismo de reacción Ping Pong BiBi con inhibición por los dos sustratos.

Tabla 8. Concentraciones de ácido oleico y etanol empleadas para los estudios de síntesis de oleato de etilo

Ác. oleico (mM)	50	50	50	50	50	10	30	40	50	70
Etanol (mM)	100	150	200	250	300	250	250	250	250	250

Las velocidades iniciales para ambas series de experimentos se muestran en la Figura 22 y la Figura 23. Se observa que en ambos casos, la velocidad inicial de reacción se incrementa al incrementarse la concentración de cada sustrato, hasta que se mantiene más o menos constante a partir de 150 mM, para el caso de ácido oleico constante. La Tabla 9 muestra los parámetros cinéticos para la reacción de esterificación de diferentes concentraciones de sustratos.

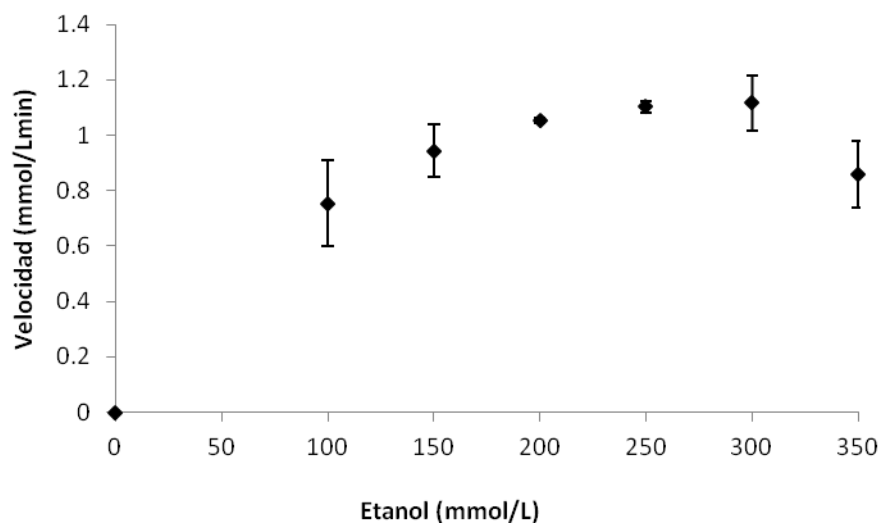


Figura 22. Velocidad inicial de reacción manteniendo la concentración de ácido oleico constante 50mM, en un mini reactor con agitación magnética, 0.5 g de biocatalizador incubado a 45°C.

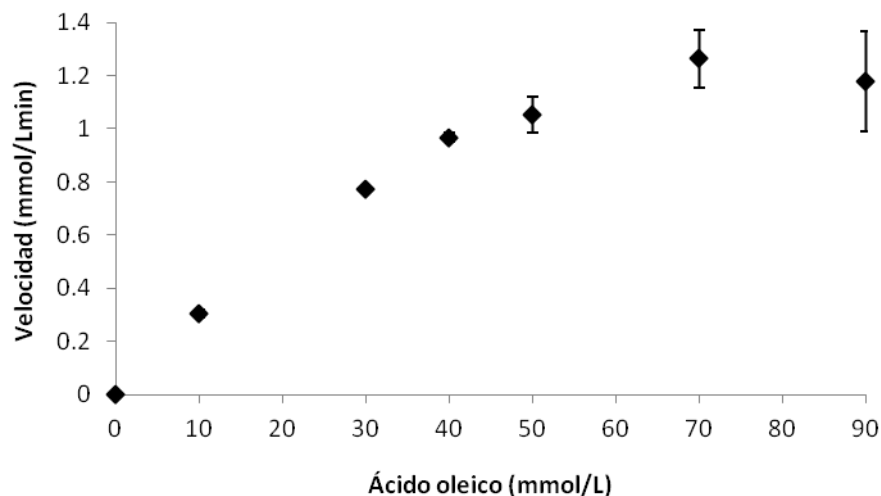


Figura 23. Velocidad inicial de reacción manteniendo la concentración de etanol constante 250mM, en un mini reactor con agitación magnética, 0.5 g de biocatalizador incubado a 45°C.

Los parámetros cinéticos obtenidos fueron: $V_{\max}=2.247$ mmol/Lmin, $K_{M(\text{COOH})}=19.529$ mM, $K_{m(\text{OH})}=101.997$ mM y $K_{i(\text{OH})}=237.968$ mM. Basados en estos resultados, se propone que la afinidad de la enzima hacia el ácido oleico es mayor que para el etanol, comportamiento reportado anteriormente (Chulalaksananukul *et al.*, 1990, Marty *et al.*, 1992). Sin embargo, el valor para cada constante de afinidad o inhibición puede variar considerablemente aun tratándose de los mismos sustratos, como se puede apreciar en la Tabla 9 columnas b y d. Estas diferencias pueden ser explicadas por el origen del biocatalizador, además del medio de reacción utilizado.

Con los parámetros cinéticos obtenidos mediante la regresión no lineal y la ecuación del mecanismo Ping Pong Bi Bi, se calcularon datos de velocidad y se compararon con los valores experimentales. La Figura 24 y la Figura 25 muestran el ajuste logrado con los parámetros cinéticos calculados ($R^2=0.94$).

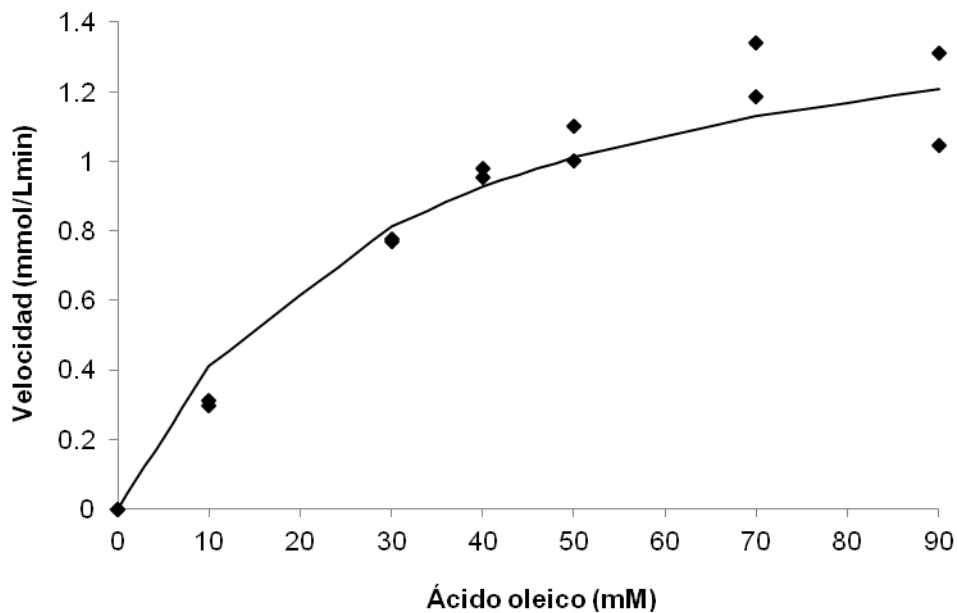


Figura 24. Velocidad inicial de reacción experimental (◆) y calculada (—), manteniendo la concentración de etanol constante 250mM, en un mini reactor con agitación magnética, 0.5 g de biocatalizador incubado a 45°C.

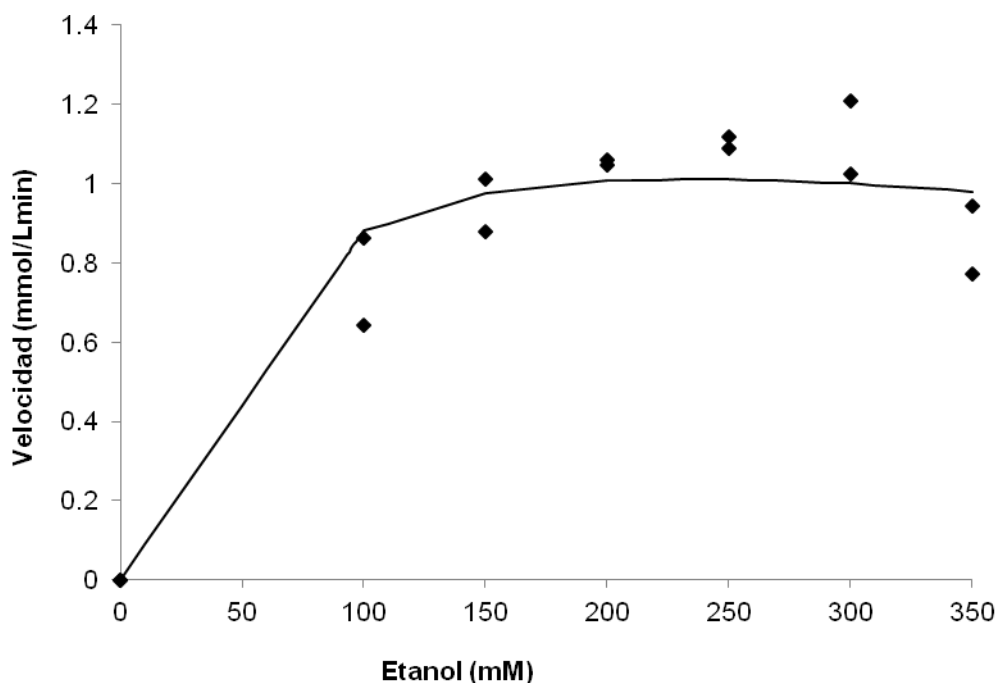


Figura 25. Velocidad inicial de reacción experimental (◆) y calculada (—), manteniendo la concentración de ácido oleico constante 50mM, en un mini reactor con agitación magnética, 0.5 g de biocatalizador incubado a 45°C.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para la reacción de síntesis de oleato de etilo catalizada por lipasas producidas por FMS.

Ácido	Oleico	Oleico	Oleico	Láurico	Butanóico	Oleico	Oleico
Alcohol	Metanol ^a	Etanol ^b	Butanol ^c	Butanol ^c	Oleico ^c	Etanol ^d	Etanol ^e
V_{max} (mol/gh)	0.57	0.009	0.19	0.45	0.38	342	2.247 (mmol/Lmin)
$K_{m(COOH)}$ (mmol/L)	33	170	380	650	760	120	19.529
$K_{m(OH)}$ (mmol/L)	34	180	190	100	280	190	101.997
$K_{i(COOH)}$ (mmol/L)	710	530	780	90	520		
$K_{i(OH)}$ (mmol/L)	3	58	230	15	230	40	237.968

^a Ramamurthi y McCurdy (1994), ^b Marty *et al.* (1992), ^c Zaidi *et al.* (2002), ^d Chulalaksananukul *et al.* (1990), ^e Este trabajo.

Cuando se utilizan como sustratos ácido oleico y un alcohol de cadena corta como metanol o etanol, se mantiene una tendencia (Tabla 9); por ejemplo, en las columnas a, b, d y e, los valores de $K_{m(COOH)}$ son ligeramente menores al valor de $K_{m(OH)}$ (para las columnas d y e, la diferencia es mayor), esto indica la mayor afinidad que tiene la enzima por el ácido graso, si consideramos que el primer paso de la reacción catalizada por lipasas es la unión del ácido graso a la enzima. Es reconocido que tanto los ácidos grasos como los alcoholes tienden a inhibir las reacciones catalizadas por lipasas (Manjon *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991; Rizzi *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1999); sin embargo, cuando se trata de alcoholes de cadena corta (metanol, etanol), su efecto inhibitorio es mayor que el ocasionado por ácidos grasos de cadena larga, como el ácido oleico (Martínez *et al.*, 2008).

Esto se puede apreciar en las constantes de inhibición (K_i) para las columnas a, b, d y e en donde la $K_{i(OH)}$ es menor a la $K_{i(COOH)}$.

Cuando la longitud de la cadena del alcohol aumenta (columna c) ocurre un fenómeno que no está bien claro; por un lado las $K_{m(OH)}$ son menores a las $K_{m(COOH)}$, esto indicaría que bajo estas condiciones, la enzima tiene mayor afinidad por el alcohol; sin embargo, las $K_{i(OH)}$ son menores a las $K_{i(COOH)}$ lo que refleja el mayor carácter inhibitorio del alcohol.

6.6 Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos

Para procesos a gran escala, la reutilización de enzimas es importante en términos de la economía del proceso. El número de ciclos o lotes que se puede usar la enzima sin una pérdida de actividad importante, es una medida de la estabilidad de dicha enzima. Esta estabilidad está dada por diferentes factores, uno de los principales es el tipo de inmovilización.

Una de las principales ventajas de utilizar enzimas inmovilizadas, además de mejorar la estabilidad de la enzima, es la posibilidad de reusar el biocatalizador. Sin embargo, para reutilizar la enzima se tiene que realizar un proceso de reacondicionamiento del medio entre ciclos de reacción. Por ejemplo, si la reacción que cataliza la enzima es una esterificación se produce agua durante la reacción, que puede disminuir la actividad de la enzima.

Yu *et al.* (2004) estudiaron la actividad y enantioselectividad de una lipasa comercial producida por *Candida rugosa* inmovilizada en resinas macro porosas para la resolución de ibuprofeno en isooctano. Las lipasas comerciales

inmovilizadas fueron liofilizadas por al menos 8 h entre cada ciclo de reacción para remover el agua y poder reutilizarlas; de esta manera, observaron una mínima pérdida de actividad para los primeros cuatro ciclos. Después de 10 ciclos, perdió 5% de actividad y después de 20 ciclos sólo perdió 10% de actividad.

En este trabajo, se utilizó el biocatalizador obtenido directamente de la fermentación en medio sólido previa deshidratación con aire seco (ver sección 6.2). Es decir, el biocatalizador así producido no fue sometido a protocolos de inmovilización. El objetivo de llevar a cabo lotes sucesivos fue, además de evaluar la estabilidad del biocatalizador, cuantificar la pérdida de actividad debida a la liberación de enzima del biocatalizador y/o a la acumulación de agua en el sistema de reacción.

Primeramente, se llevaron a cabo estudios preliminares en un mini reactor de 10 mL con agitación magnética a 45°C. Al reactor se adicionaron 4.5 mL de cada sustrato (ácido oleico, etanol) manteniendo una relación molar 1:5, se incubaron a 45°C por 15 min; para iniciar la reacción se adicionaron 0.5 gramos de biocatalizador. Al final de cada ciclo de reacción (60 min), se adicionaron sustratos nuevos al mismo biocatalizador sin algún proceso de reacondicionamiento. En la Figura 26 se observa que la conversión disminuye en cada lote. Después de cuatro ciclos de reacción se obtiene 60% de conversión de ácido oleico. Esta disminución pudo ser debida a la pérdida de enzima por la ruptura del biocatalizador debida a la agitación mecánica.

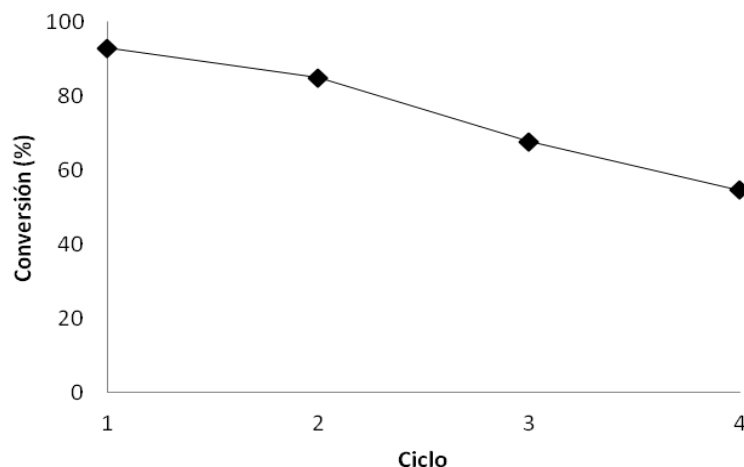


Figura 26. Eficiencia de conversión durante la síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos en un minireactor con agitación magnética. Relación molar de sustratos 1:5, ácido oleico 50 mM y etanol 250 mM, con 0.5 gramos de biocatalizador a 45°C.

Para eliminar las posibles interferencias causadas por el mecanismo de agitación y la toma de muestra, se decidió utilizar frascos de 20 mL, agitados en un agitador orbital a 200 rpm. A cada frasco se le adicionaron 10 mL de sustratos con una relación molar 1:5, se incubaron en una estufa a 45°C por 15 min; posteriormente, se agregaron 0.5 gramos de biocatalizador para iniciar la reacción. Al cambiar el sistema de agitación, la conversión bajó al 60% en el primer ciclo (Figura 27). En el segundo ciclo se obtuvo una reducción del 20% en la conversión de ácido oleico. Posteriormente, la conversión se mantuvo prácticamente constante en los ciclos 3 y 4. A pesar de que el cambio en el sistema de agitación redujo la velocidad de conversión (65% de conversión en una hora), ésta se mantuvo constante a partir del 2º ciclo.

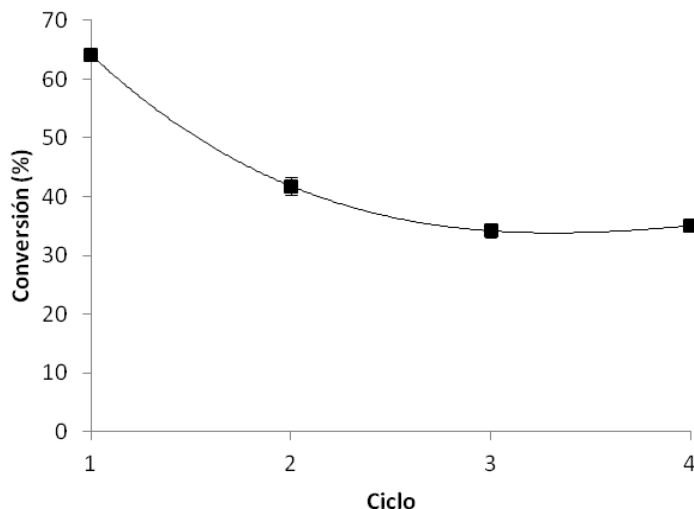


Figura 27. Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital. Relación molar de sustratos 1:5, con 0.5 gramos de biocatalizador a 45°C.

Para mejorar la conversión, se mantuvieron las mismas condiciones y se incrementó la cantidad de biocatalizador adicionado a los frascos 1.5 g. Al mismo tiempo, se aumentó el número de ciclos para evaluar la estabilidad del biocatalizador y la pérdida de actividad.

Se observó un incremento a más del 90% en la conversión inicial (ciclo 1); además, como se observó en los estudios anteriores, a partir del segundo ciclo hubo una disminución en la actividad, pero se mantuvo más o menos constante alrededor del 60% por 7 ciclos de reacción (Figura 28).

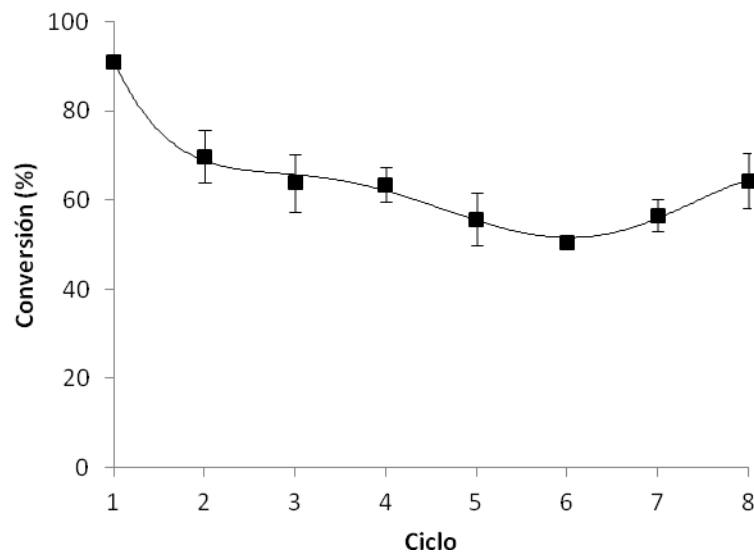


Figura 28. Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital. Relación molar de sustratos 1:5, con 1.5 gramos de biocatalizador a 45°C.

Existen al menos dos factores que pudieron contribuir para disminuir la conversión en este sistema. Debido a que se trata de una reacción de esterificación y que uno de los productos que se forma continuamente durante la reacción es agua, que debería ser eliminada del medio de reacción en cada ciclo, para evitar el efecto negativo de la acumulación de agua sobre la reacción de síntesis (Xu *et al.*, 2002; Krishna *et al.*, 2001; Dave y Madamwar 2005; Marty *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2011). Además del agua, la concentración de etanol también tiene una influencia importante, ya que al alcanzar ciertos niveles, alrededor de 200 mM, la actividad enzimática podría ser afectada (Carta *et al.*, 1992).

Es importante señalar que la estabilidad de este biocatalizador o el número de ciclos que mantiene conversiones elevadas, es comparable a los obtenidos con enzimas que se han sometido a procesos de inmovilización o incluso a enzimas

comerciales, que además, reciben un reacondicionamiento antes de cada ciclo de reacción. Por ejemplo, Dave y Madamwar (2006) utilizaron una lipasa producida por *Candida rugosa* inmovilizada en un polímero de alcohol polivinílico (PVA), alginato y ácido bórico, para catalizar la síntesis de hexanoato de etilo en isooctano. Ellos observaron que el proceso de inmovilización incrementó la estabilidad térmica de la enzima y además se pudo reutilizar hasta por 10 ciclos con una retención completa de la actividad.

En otro caso Krishna *et al.* (2001) utilizaron una enzima comercial (Lipozyme IM-20) para catalizar la síntesis de acetato de isoamilo. En ese trabajo, se llevó a cabo un proceso de acondicionamiento de la enzima entre cada ciclo. Primero se filtró y se lavó con solvente fresco y posteriormente, se eliminó el solvente antes de reutilizar el biocatalizador. Ellos observaron que la concentración de sustratos tuvo un fuerte impacto en la reutilización de la enzima. Cuando la concentración de sustratos fue de 0.06 M, la enzima se pudo reutilizar hasta 10 veces, manteniendo un 85% de conversión. Cuando la concentración de sustratos fue incrementada a 1.0 M, la actividad cayó dramáticamente después de 2 ciclos. Esto ocurrió si la relación molar fue de 1:1 (alcohol:ácido), al incrementar la relación molar a 8:1, la actividad permaneció estable en 80% y la enzima se pudo reutilizar hasta por 10 ciclos.

Los resultados obtenidos con el biocatalizador producido por fermentación en medio sólido son importantes; ya que, éste se aplicó directamente al medio de reacción y no se realizó ningún procedimiento para reacondicionar el

biocatalizador entre ciclos de reacción; sin embargo, la pérdida de actividad puede representar un problema, considerando que el objetivo final es aplicar el biocatalizador en sistemas operando en continuo.

6.7 Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos modificando la concentración de etanol

En la sección 6.6 se evaluó la estabilidad del biocatalizador durante 8 lotes sucesivos manteniendo constante la concentración de ácido oleico y etanol durante todos los ciclos. Los resultados obtenidos son interesantes ya que el biocatalizador mantuvo más del 60% de actividad después de ocho ciclos de reacción de 60 min cada uno. Esta baja conversión pudo ser debida a la alta concentración de etanol en la mezcla de reacción. Por esta razón, decidimos evaluar el efecto de la concentración de etanol, pero de un modo diferente al descrito en la sección 6.4.2.

Para este estudio se mantuvo constante la concentración de ácido oleico (50 mM) y la concentración de etanol se varió de 50 a 250 mM. La característica de este estudio consistió en que el primer ciclo de reacción en todos los casos se inició con la relación molar 1:5. Esto con la finalidad de tener un exceso de etanol para esterificar los ácidos grasos presentes en el biocatalizador provenientes de la hidrólisis del aceite de oliva durante la FMS. Al finalizar el primer lote, se eliminó la fase líquida y se adicionó la mezcla de reacción para iniciar el segundo ciclo.

Después del primer ciclo de reacción, se obtuvo más de 90% de conversión en 60 min (Figura 29). Esta conversión fue similar a la reportada anteriormente usando

sólidos fermentados como biocatalizador (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008). Para las relaciones ácido oléico:etanol de 1:5 y 1:4, el comportamiento fue similar, después del primer ciclo la conversión disminuyó hasta llegar a 77% en el cuarto ciclo. Si bien, la pérdida de actividad es relativamente pequeña (14%) esta pudo ser ocasionada por el exceso de etanol y sus efectos adversos sobre la enzima (Nie *et al.*, 2006).

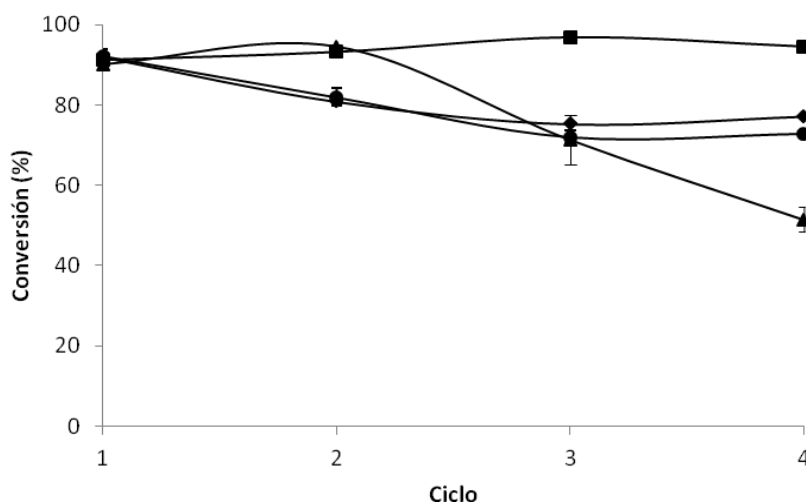


Figura 29. Síntesis de oleato de etilo en lotes sucesivos variando la concentración de etanol, en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital, con 1.5 g de biocatalizador a 45°C. (▲) 1:1, (■) 1:2, (◆) 1:4, (●) 1:5.

Con la relación molar 1:1, la conversión se incrementó a 94% para el segundo ciclo (ver Figura 29), pero cayó de forma importante durante los siguientes ciclos hasta finalizar con una conversión del 51% en el cuarto ciclo. Dado que en este caso no hubo etanol en exceso, esta disminución pudo estar asociada a la acumulación de agua producida durante la reacción favoreciendo la dirección de la reacción hacia la hidrólisis (Rahman *et al.*, 2011).

La relación molar 1:2 presentó los mejores resultados, cuya conversión aumentó (96%) y se mantuvo constante durante todo el estudio. Este resultado es relevante por dos razones: 1) Con la metodología usada se alcanzan conversiones elevadas que se mantienen constantes durante cuatro ciclos de reacción, no se observaron los efectos adversos de la acumulación de agua o los efectos inhibitorios de concentraciones altas de etanol. 2) El biocatalizador es estable y se puede reutilizar sin pérdida de actividad, lo que abre la posibilidad de aplicarlo en procesos que operan en régimen continuo.

Como se mencionó anteriormente, con la relación molar 1:1, la conversión cayó alrededor del 50% después de cuatro ciclos de reacción y se atribuyó esta disminución, a la acumulación de agua producida durante la reacción (Rahman *et al.*, 2011). Para verificar este punto, se evaluó la adición de diferentes cantidades de tamiz molecular al medio de reacción, manteniendo la relación molar de sustratos en 1:5 para iniciar la reacción y a partir del segundo ciclo se fijó la relación molar en 1:1.

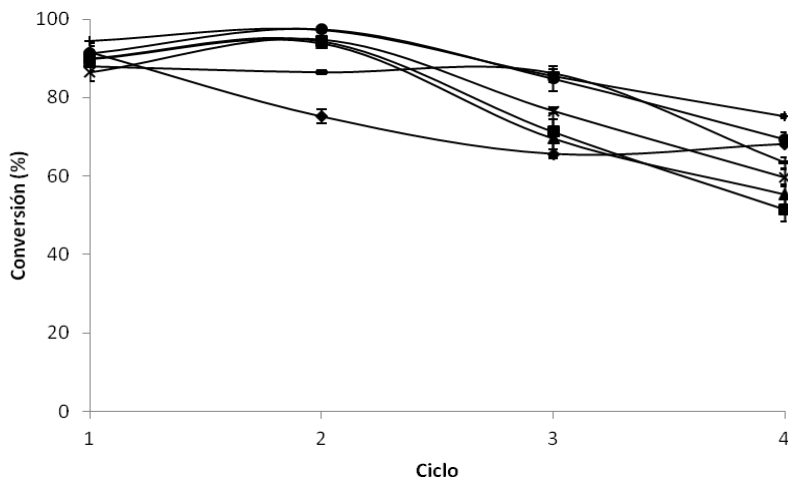


Figura 30. Efecto de la cantidad de tamiz molecular sobre la reacción de esterificación en lotes sucesivos de 60 min cada uno, en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital, con 1.5 g de biocatalizador a 45°C. Relación molar inicial (♦) 1:5, relación molar a partir del segundo ciclo (■) 1:1. Cantidades de tamiz (g): (▲) 0.5, (x) 1.0, (-) 1.5, (●) 2.5 y (+) 3.5.

Como se puede observar en la Figura 30, la conversión se incrementó ligeramente al aumentar la cantidad del tamiz molecular en el medio de reacción, pasó de 51% sin tamiz molecular a 75% con 3.5 g en el cuarto ciclo de reacción. Es importante mencionar que el efecto más importante de la cantidad de tamiz molecular se ve reflejado en el segundo ciclo de reacción, ya que en este ciclo, se alcanzó prácticamente el 100% de conversión en 30 min de reacción (Figura 31). Después del segundo ciclo la conversión comenzó a disminuir (Figura 3), posiblemente por la saturación del tamiz molecular y no puede seguir eliminando el agua del medio de reacción. Posiblemente, adicionando tamiz molecular nuevo en cada ciclo, se pueda lograr mantener la conversión cercana al 100%; sin embargo, resulta poco práctico si se considera que se comienza con 1.5 gramos de biocatalizador y por

ejemplo, al final, de cuatro ciclos se acabaría con 10.5 gramos de tamiz molecular.

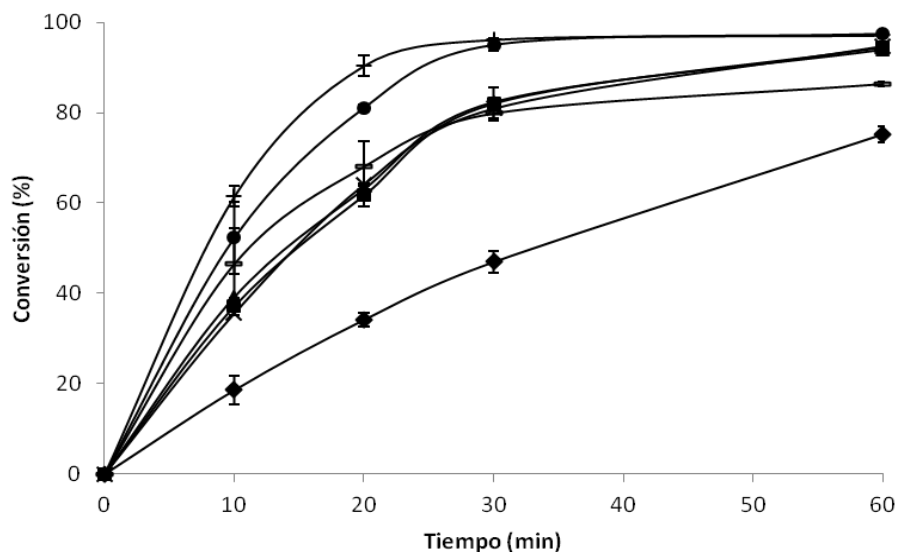


Figura 31. Efecto de la cantidad de tamiz molecular sobre la reacción de esterificación con relación molar 1:1, en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital, con 1.5 g de biocatalizador a 45°C. (◆) 1:5, (■) 1:1, (▲) 0.5 gramos, (x) 1.0 gramos, (-) 1.5 gramos, (●) 2.5 gramos y (+) 3.5 gramos.

El estudio reportado en la Figura 29 permitió seleccionar la relación molar de sustratos (1:2), de tal manera que se lograron conversiones alrededor del 95% por cuatro ciclos de reacción y se evitaron los efectos negativos del etanol y del agua producida durante la reacción. Manteniendo la relación 1:2 se evaluó el efecto de la concentración de sustratos. El lote inicial para todos los estudios se realizó con la relación molar 1:5; a partir del segundo ciclo se varió la concentración de sustratos, siempre respetando la relación molar 1:2. Las concentraciones de ácido oleico estudiadas fueron 50, 70, 90, 100 y 150 mM y para etanol 100, 140, 180, 200 y 300 mM. Los resultados muestran conversiones elevadas (más del 90%) con 50 y 70 mM de ácido oleico. Al incrementar su concentración provocó una

disminución importante, hasta alcanzar apenas un 39% de conversión con 150 mM (Figura 32). A pesar de utilizar la relación 1:2, la concentración de etanol (300 mM) es mayor a la utilizada previamente en la relación 1:5 (250mM), lo que pudo afectar la eficiencia catalítica de la enzima (Carta *et al.*, 1992).

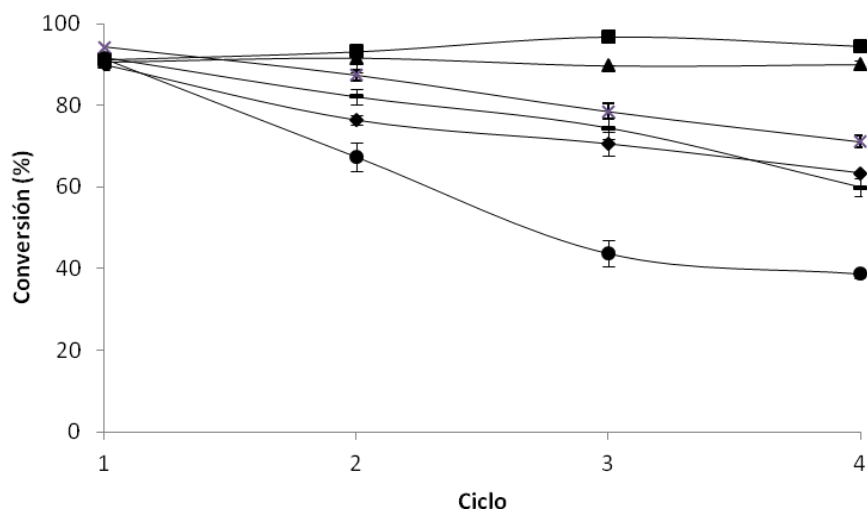


Figura 32. Efecto de la concentración de sustratos sobre la reacción de esterificación en lotes sucesivos con relación de 60 ml cada uno, molar 1:2, en frascos de 20 mL agitados en un agitador orbital, con 1.5 g de biocatalizador a 45°C. (♦) Referencia (50mM:250mM), (■) 50 mM, (▲) 70 mM, (x) 90 mM, (-) 100 mM y (●) 150 mM.

6.8 Síntesis de oleato de etilo en un reactor de 1L. Estudios preliminares

Se llevó a cabo la reacción de esterificación catalizada por lipasas producidas por FMS, en un reactor de 1L con un volumen de operación de 250 mL. Primero se estudió la reacción de esterificación en un sistema operando en lote y posteriormente, se realizó la reacción en un sistema continuo.

6.8.1 Síntesis en lote

Los resultados obtenidos en el mini reactor de 10 mL (sección 6.4) sirvieron como referencia para establecer las condiciones en el reactor de 1L, con 250 mL de volumen de operación. Las condiciones estándar establecidas en el mini reactor fueron: relación molar de sustratos, 1:5, concentración de sustratos, 50 mM de ácido oleico y 250 mM de etanol, temperatura 45°C, volumen de operación 9 mL y 0.5 g de biocatalizador.

Las condiciones de operación como temperatura, relación molar y concentración de sustratos se mantuvieron constantes en el reactor de 1 L. La relación volumen de operación/gramos de biocatalizador también se mantuvo constante con el fin de obtener conversiones elevadas como las reportadas en la sección 6.4. El volumen mínimo de operación del reactor fue de 250 mL, por lo tanto, la cantidad de biocatalizador necesario para este volumen de operación fue de 12.5 g.

En el reactor se adicionaron 125 mL de cada sustrato manteniendo la relación molar 1:5, se incubaron a 45 °C por 15 min a 300 rpm. Para iniciar la reacción, se agregaron 12.5 g de biocatalizador. Se tomaron muestras cada 10 min y se almacenaron en refrigeración.

Los resultados revelaron que bajo estas condiciones y con 12.5 g de biocatalizador, no se alcanza el nivel de conversión logrado en el mini reactor (sección 6.4.2), existiendo una disminución cercana al 20% con respecto a lo reportado para el mini reactor. Este es un fenómeno atribuido al cambio de escala (Büchs, 2001). La disminución en la conversión y en el funcionamiento del reactor

debido al cambio de escala puede ser el resultado de una menor eficiencia en el mezclado y de condiciones hidrodinámicas alteradas (Nunes *et al.*, 2013).

Para contrarrestar este fenómeno, se evaluaron dos alternativas: aumentar el tiempo de reacción e incrementar la cantidad de biocatalizador. Como se muestra en la Figura 33, fue necesario incrementar al doble el tiempo de reacción para alcanzar conversiones cercanas al 100%. Otra alternativa para incrementar la conversión consistió aumentar la cantidad de biocatalizador en el medio de reacción. Como se puede observar en la Figura 33, al aumentar de 12.5 a 22 g de biocatalizador, la conversión se incrementó de 75 a 90% en el mismo tiempo de reacción (60 min). De esta manera, quedaron establecidas las condiciones de operación para trabajar en el reactor de 1 L con 250 mL de volumen de operación obteniendo altos niveles de conversión (90%) a 300 rpm en 60 min de reacción.

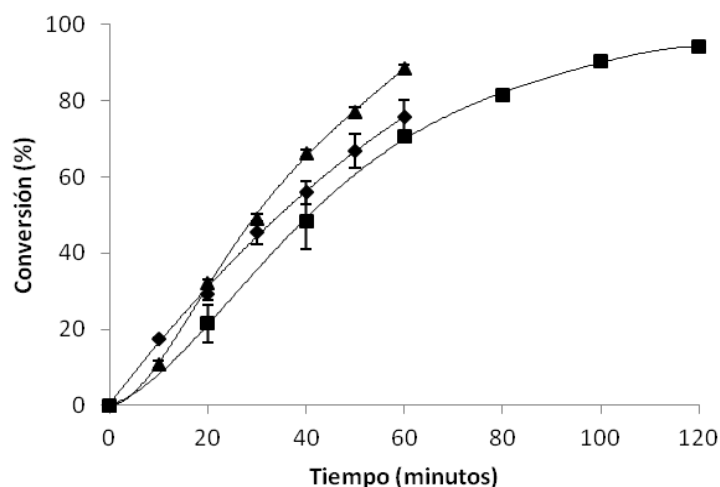


Figura 33. Reacción de esterificación en un reactor de 1L operando en lote. Volumen de operación 250 mL, relación molar 1:5, a 45°C, 300 rpm y diferentes cantidades de biocatalizador: (◆)12.5 g, 60 min, (■) 12.5 g, 120 min, (▲) 22 g, 60 min.

6.8.2 Síntesis de oleato de etilo en continuo catalizada por lipasas producidas por FMS

Con base en el resultado anterior, se realizó la reacción de síntesis en flujo continuo alimentando una solución de oleato de etilo 50 mM y etanol 250 mM, a un flujo de 2 mL/min en el reactor de 1L con 250 mL de volumen de operación y 300 rpm. Para el arranque del reactor se adicionaron 125 mL de cada sustrato y se incubaron hasta alcanzar 45°C; para iniciar la reacción se agregaron 37.5 g de biocatalizador. La alimentación al reactor se inició inmediatamente después de agregar el biocatalizador. Como se puede observar en la Figura 34, la conversión más alta fue de 80% en 80 min de reacción, después de 6 h de operación en continuo se conservó el 70% de conversión.

Este resultado fue alentador por dos razones:

En primer lugar, hay que considerar el origen del biocatalizador, que es un sólido fermentado únicamente deshidratado sin procesos de purificación o inmovilización, por lo que podría esperarse que en las primeras horas del estudio la enzima sufriera un proceso de liberación y lavado del reactor, disminuyendo considerablemente la conversión, este fenómeno no se presentó. Al contrario, la conversión se mantuvo más o menos constante de los 80 a los 240 min.

En segundo lugar, es importante enfatizar la estabilidad del biocatalizador; si bien existió una disminución en la conversión, ésta sólo fue del 10 % después de operar 6 h en continuo. Los resultados obtenidos son importantes, sin embargo, es

necesario mencionar que existe una disminución del 10% en la conversión con respecto a lo reportado en la sección 6.8.1 con el sistema operando en lote.

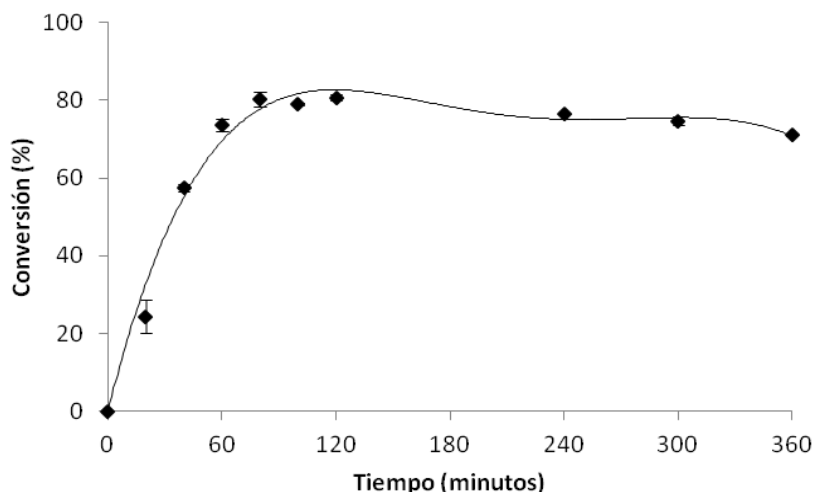


Figura 34. Síntesis en continuo en un reactor de tanque agitado a 45°C. Cantidad de biocatalizador 37.5 g. Ácido oleico 50 mM, etanol 250 mM. Agitación 300 rpm. Flujo de alimentación 2 mL/min.

Para predecir o simular la eficiencia del sistema, sólo se necesita saber cuánto tiempo permanece cada una de las moléculas en el recipiente, o más exactamente la distribución de tiempos de residencia de la corriente del fluido. En general, los distintos elementos del fluido al seguir diferentes caminos a lo largo del reactor, tardan tiempos diferentes en pasar a través de él. La distribución de estos tiempos en la corriente de fluido que sale del recipiente se denomina distribución de la edad a la salida E o distribución del tiempo de residencia RTD del fluido (Levenspiel, 1987). Esta información puede determinarse de manera relativamente sencilla y directa por un método experimental ampliamente usado de estímulo-respuesta (Levenspiel, 1987). A continuación se describe el procedimiento para

simular la eficacia del sistema operando en continuo usando la metodología de estímulo-respuesta.

Este procedimiento consta de seis pasos: Paso 1. Calcular la concentración (C) del trazador o de la respuesta, en nuestro caso la variable respuesta fue el pH, por lo que calculamos la concentración (C) de OH⁻ a cada tiempo. Paso 2. Calcular el área bajo la curva de la concentración vs tiempo (Q), mediante la Ecuación 1. Paso 3. Para determinar E, el área bajo la curva debe ser la unidad, por lo que cada concentración leída debe dividirse por Q (Ecuación 2).

$$Q = \sum C \Delta t \quad \text{Ecuación 1}$$

$$E = \frac{C}{Q} \quad \text{Ecuación 2}$$

La Figura 35 representa la distribución de la edad a la salida E o distribución del tiempo de residencia RTD del fluido para nuestro sistema.

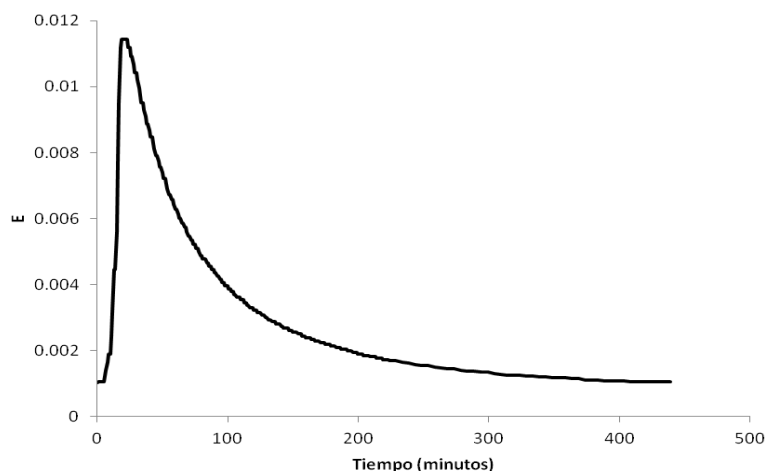


Figura 35. Distribución de la edad a la salida E o distribución del tiempo de residencia RTD del fluido con un pulso de NaOH 0.5 N, en un reactor de tanque agitado con 250 mL de volumen de operación, 300 rpm incubado a 45°C.

Paso 4. Para predecir el funcionamiento del sistema, es decir, calcular la fracción de sustrato no convertida en el reactor, se utilizó la ecuación cinética para el mecanismo Ping Pong Bi Bi con inhibición por etanol, en términos de la conversión (Ecuación 3).

$$\frac{d(1 - X_a)}{dt} = \frac{V_m C_{e_o} (1 - X_a)}{K_{m(\text{COOH})} C_{e_o} \left(1 + \frac{C_{e_o} (1 - X_a)}{K_{i(\text{OH})}}\right) + K_{m(\text{OH})} C_{a_o} + (1 - X_a) C_{a_o} C_{e_o}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde C_{a_o} y C_{e_o} son las concentraciones iniciales de ácido oleico y etanol respectivamente, utilizadas en el reactor operando en flujo continuo y los parámetros cinéticos son los reportados en la Tabla 9.

Paso 5. Se resolvió la Ecuación 3 con ayuda del software POLYMATH 6.0 y los resultados se ajustaron con un polinomio de orden 3, para obtener valores de conversión (X_a) a cada tiempo.

Paso 6. Se calculó la fracción de sustrato no convertida en el reactor mediante la sumatoria de los resultados obtenido en el paso 3 y el paso 5 (Ecuación 4).

$$\sum (1 - X_a) E \Delta t \quad \text{Ecuación 4}$$

Este procedimiento dio como resultado una fracción no convertida en el reactor que corresponde al 21%. Resultado que corresponde con los datos experimentales presentados en la Figura 34, lo que sugiere que la disminución en la conversión con respecto al sistema operando en lote, puede ser ocasionada por formaciones de canalizaciones del flujo o por formación de zonas estancadas o muertas en el reactor que originan una disminución en la eficacia del sistema

(Levenspiel, 1987). Otra posibilidad para la disminución en la conversión es el tiempo que permanecen en contacto el biocatalizador y los sustratos, el tiempo de residencia teórico fue de 125 minutos, sin embargo el tiempo de residencia calculado con las concentraciones a la salida del reactor dividido entre la velocidad calculada con los parámetros cinéticos (tabla 9), resultado de 103 minutos, lo que sugiere un menor tiempo de contacto entre el biocatalizador y los sustratos lo que provocó la disminución en la conversión.

6.9 Síntesis de oleato de etilo en continuo

Para llevar a cabo la síntesis en continuo, se siguió la estrategia propuesta en la esterificación por lotes sucesivos modificando la concentración de etanol (sección 6.7). La primera parte de este nuevo procedimiento consiste en una reacción por lote durante 120 min con una elevada concentración de etanol (250 mM). Como se indicó anteriormente esta primera parte es necesaria para iniciar la reacción de esterificación y al mismo tiempo eliminar los ácido grasos libres provenientes de la hidrólisis del aceite de oliva, durante el proceso de fermentación, principalmente ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Baccouri *et al.*,2008). Posteriormente, se inició la operación en continuo, disminuyendo la concentración de etanol en el flujo de alimentación (100 mM).

En el reactor de 1L, se adicionaron 125 mL de cada sustrato (relación 1:5), se incubaron hasta alcanzar 45°C. Para iniciar la reacción se agregaron 37.5 gramos de biocatalizador; al término de esta etapa, sin hacer modificaciones o reacondicionamiento en el medio de reacción o en el biocatalizador, se inició la

síntesis en continuo. El flujo de entrada de sustratos se fijó en 2 mL/min, con una relación molar 1:2 (50:100 mM).

La Figura 36 muestra los resultados obtenidos con esta nueva estrategia. En la reacción por lote se alcanzó 88% de conversión en 120 min de reacción. Al iniciar la alimentación de sustratos con una menor concentración de etanol, se observó una zona de transición de 150 min, en donde la conversión bajó ligeramente y se incrementó hasta llegar a 97%. A partir de este punto, la conversión se mantuvo constante por 10 h (aproximadamente 5 tiempos de residencia). Marty *et al.* (1997) realizaron un estudio bajo condiciones similares (ácido oleico 50 mM, etanol 100 mM) usando LipozymeTM en un reactor de lecho empacado, con un flujo de 0.2 mL/min. En este estudio a pesar de utilizar una enzima comercial, no se logró mantener constante la conversión, disminuyó de 80 a 36% en un periodo de 30 h. Los autores atribuyeron esta disminución a la producción de agua que se acumuló.

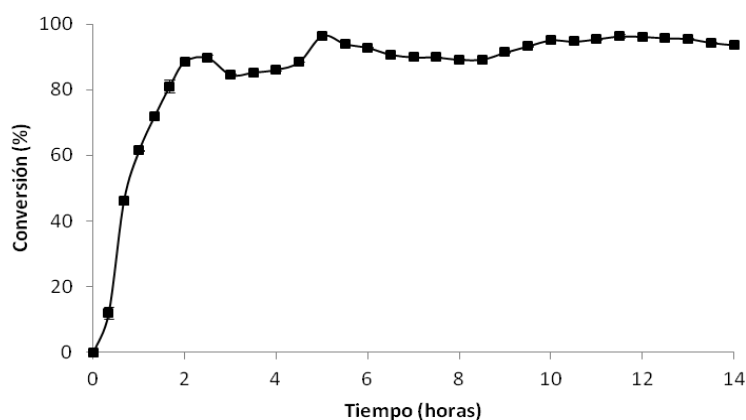


Figura 36. Síntesis de oleato de etilo en continuo en un reactor de tanque agitado. La concentración de sustratos inicial fue ácido oleico 50mM, etanol 250mM. Después de dos h, la concentración de etanol se redujo a 100mM. Biocatalizador 37.5 g. Agitación 300 rpm. Flujo 2 mL/min. Temperatura 45°C.

En nuestro estudio no se observó este efecto; es posible que la concentración de etanol utilizada no provocó efectos inhibitorios y al mismo tiempo fue suficiente para interactuar con el agua producida evitando los efectos adversos de esta. Este efecto positivo de exceso de etanol, ha sido reportado con anterioridad (Serri *et al.*, 2006, Fernandes *et al.*, 2007, Martínez-Ruiz *et al.*, 2008).

6.9.1 Efecto de la velocidad de agitación

La mayoría de los estudios con lipasas inmovilizadas, que catalizan reacciones de esterificación en continuo, utilizan como modelo de estudio el reactor de lecho empacado. Con este sistema se evita el daño mecánico al biocatalizador y en consecuencia la pérdida de actividad. Para evaluar la pérdida de actividad del biocatalizador ocasionada por el daño mecánico, se estudiaron tres velocidades de agitación: 200, 300 y 400 rpm. El inicio de la reacción y la operación en continuo se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (sección 6.9).

Generalmente, al incrementar la velocidad de agitación, se incrementa la conversión de sustratos, debido a un aumento substancial en el área interfacial entre el sustrato y la enzima, mediante la reducción del tamaño de gota (Al-Zuhair *et al.*, 2003, Noor *et al.*, 2003).

Los resultados mostraron conversiones cercanas al 90% para 200 y 300 rpm que permanecen constantes durante 8 h de operación en continuo (Figura 37). Para 400 rpm la conversión disminuyó de 93 a 77% después de 10 h de reacción. Este comportamiento fue similar al reportado por Keng *et al.* (2008). Ellos trabajaron

con un reactor de tanque agitado de 2L en lote, con un impulsor tipo Rushton y Lipozyme RM IM para catalizar la reacción entre el aceite de palma y el alcohol oleico en hexano. Con este impulsor, lograron la mayor conversión (98.5%) a 250 rpm. Sin embargo, al incrementar la velocidad de agitación a 450 rpm, la conversión disminuyó al 80%. La disminución del 18.5% en 5 h de reacción fue similar a la reportada en este estudio (16% en 8 h de operación continua) y pudo ser causada por los efectos de corte causados por el impulsor Rushton a altas velocidades de agitación. Las enzimas inmovilizadas son impulsadas radialmente por el impulsor Rushton contra las paredes del tanque, provocando su rompimiento, especialmente a velocidades de agitación elevadas (Keng *et al.*, 2008).

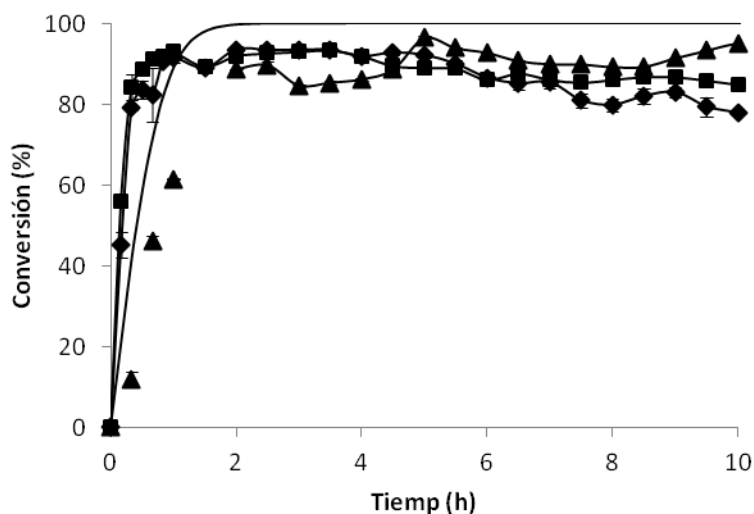


Figura 37. Efecto de la velocidad de agitación sobre la reacción de esterificación en continuo en un reactor de tanque agitado con 250 mL de sustratos. Relación molar de los sustratos iniciales 1:5 y de los sustratos en continuo 1:2 ácido oleico 50 mM, etanol 100 mM. Biocatalizador 37.5 g. Flujo 2 mL/min. Temperatura 45°C. (■) 200 rpm, (▲) 300 rpm, (◆) 400 rpm.

6.9.2 Efecto de la tasa de alimentación sobre la síntesis en continuo de oleato de etilo

Usando el procedimiento descrito en la sección 6.9, se evaluó el efecto de la tasa de alimentación sobre la conversión de ácido oleico. La relación molar que se utilizó en todos los estudios fue de 1:2. Se estudiaron cuatro concentraciones de ácido oleico: 12.5, 25, 50 y 100 mM, para etanol: 25, 50, 100 y 200 mM los flujos de alimentación fueron: 9.03, 4.05, 2.01 y 1.1 mL/min.

La velocidad de flujo está relacionada con el tiempo de residencia. Cuando el tiempo de residencia se incrementa, el contacto entre el biocatalizador y los sustratos es más prolongado, lo cual puede resultar en conversiones elevadas. Los resultados mostraron una mínima diferencia entre las conversiones para las tres primeras concentraciones, 12.5, 25 y 50 mM (Figura 38). En las tres concentraciones, la conversión se mantiene constante arriba del 85% durante 14 h de reacción.

Dadas las características del biocatalizador producido por FMS, es un resultado importante; ya que, permite operar a velocidades de flujo relativamente altas (9.03 mL/min) con alta eficiencia de conversión (85%). Contrario a lo reportado para la producción de biodiesel por isopropanolisis catalizada por Novozym 435, en un reactor de lecho empacado, en donde un aumento en el flujo de 0.1 mL/min a 1.0 mL/min provocó una disminución en la conversión de 80 a menos del 20% (Chang *et al.*, 2009).

Cuando la concentración de ácido oleico fue de 100 mM, se observó una disminución en la conversión a 70% (Figura 38). Esta disminución pudo ser causada por la alta concentración de etanol presente (200mM). Sin embargo, es posible que los sustratos y la enzima no estén en contacto el tiempo suficiente y por lo tanto la conversión sea menor.

Para verificar este punto, sólo en esta concentración (100mM), se realizó una perturbación en la velocidad de alimentación. A las 11 horas de operación el flujo se aumento a 1.5 mL/min y se bajó gradualmente hasta 0.8 mL/min; posteriormente, se ajustó al flujo inicial (1.1mL/min). Como se esperaba, al incrementar el flujo se redujo el tiempo de residencia, lo que provocó una disminución en la conversión del 10%, siendo estos resultados similares a lo reportado en estudios previos (Chen *et al.*,2009).

Al disminuir el flujo, el tiempo de residencia aumentó y permitió obtener niveles de conversión iguales a los obtenidos a concentraciones de sustrato menores (85%). Posteriormente, la conversión se mantuvo en los niveles iniciales (70%). Este resultado mostró que la disminución en la conversión no se debe a la concentración de etanol presente, si no a la velocidad de alimentación de los sustratos que está relacionada con el tiempo de residencia, que al aumentar o disminuir puede modificar la eficiencia de conversión del biocatalizador.

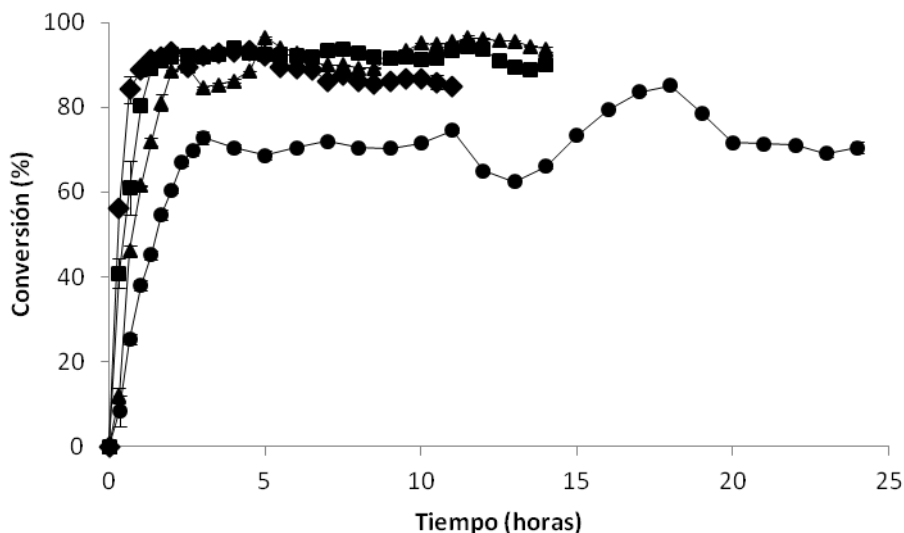


Figura 38. Efecto de la tasa de alimentación sobre la síntesis en continuo en un reactor de tanque agitado con 250 mL de sustratos. Relación molar inicial ácido oleico:etanol es 1:5. Relación molar alimentada en continuo 1:2. Ácido oleico (◆) 12.5 mM, (■) 25 mM, (▲) 50 mM, (●) 100 mM, (-) ajuste con la ecuación cinética. Biocatalizador 37.5 g. Agitación 300 rpm. Temperatura 45°C.

6.9.3 Estabilidad operacional del sistema de síntesis en continuo

Finalmente, se evaluó la estabilidad operacional del sistema operando en continuo, usando una menor relación molar de sustratos a la entrada del reactor de 1:2, con ácido oleico y etanol en 50 y 100mM, un flujo de alimentación de 2 mL/min y una agitación de 300 rpm. La Figura 39 mostró la conversión en un periodo de 25 h. Los niveles de conversión fueron similares a los reportados para lipasas comerciales, catalizando diferentes reacciones operando en continuo en reactores de lecho empacado (Sánchez *et al.*, 2000, Chang *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2005), incluso en algunos casos fue superior (Kittikun *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2000). Sin embargo, el periodo de tiempo que permanece estable la conversión, en la mayoría de estos estudios fue superior al reportado en este trabajo. En este sentido es necesario mencionar que las enzimas comerciales

utilizadas en la mayoría de los estudios, han sido sometidas a exhaustivos estudios de producción, recuperación, purificación e inmovilización que les otorgan características especiales. En nuestro caso el biocatalizador fue producido por FMS, deshidratado con aire seco y aplicado directamente en la reacción de esterificación.

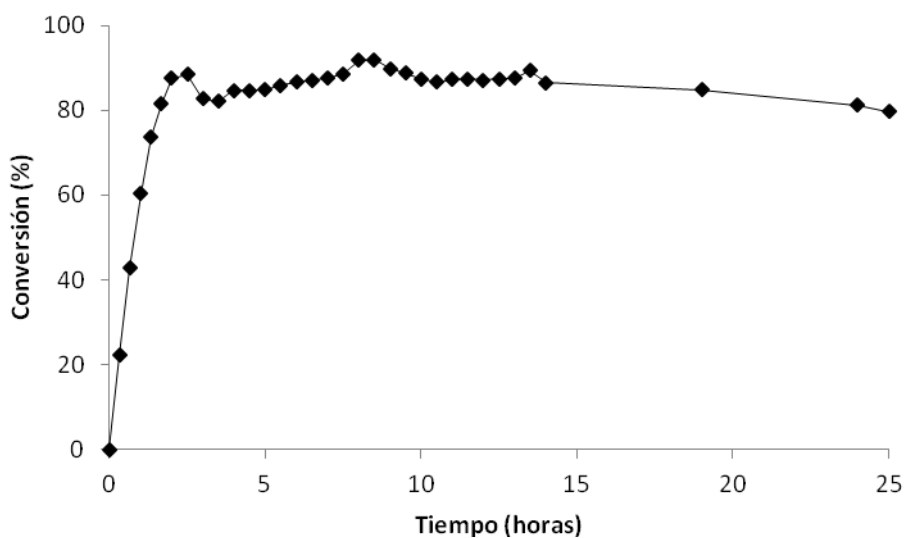


Figura 39. Estabilidad operacional de la reacción de esterificación en continuo en un reactor de tanque agitado con 250 mL de sustratos. Relación molar inicial 1:5, relación molar alimentada en continuo 1:2. Biocatalizador 37.5 g. Agitación 300 rpm. Flujo 2 mL/min. Temperatura 45°C.

7. Conclusiones

7. CONCLUSIONES

General

La fermentación en medio sólido con agrolita como soporte inerte para la producción de lipasas, empleando los hongos *Rhizopus homothallicus* (13a) y *Rhizopus microsporus* (43aIV), permitió obtener biocatalizadores activos y estables en solventes orgánicos. Los biocatalizadores producidos por *Rhizopus microsporus* (43aIV) fueron capaces de mantener conversiones del 90% por más de 25 h de operación en continuo en un reactor de tanque agitado a 300 rpm y 45 °C, evitando de esta manera las etapas típicas de purificación e inmovilización de la enzima.

Particulares

La deshidratación de los sólidos fermentados permitió estabilizar esta matriz porosa para ser utilizada como catalizador en reacciones de transesterificación y esterificación.

Para la reacción de transesterificación, los sustratos (acetato de etilo y alcohol isoamílico) y la fase orgánica (hexano) en la que se llevó a cabo la reacción, no afectaron la estabilidad de la enzima bajo las condiciones de estudio.

De los siete diferentes biocatalizadores estudiados para la síntesis de acetato de isoamilo, el producido por *Rhizopus microsporus* (43aIV), presentó la mejor conversión (80%) con 0.5 g de biocatalizador a 45 °C y 48 h de reacción, con una relación equimolar de sustratos y sus concentraciones de 50 mM.

Para la síntesis de oleato de etilo, el biocatalizador producido por la cepa 43aIV alcanzó el 95% de conversión en un mini reactor con agitación magnética, con 0.5 g de biocatalizador en 60 min de reacción a 45 °C.

Bajo las condiciones de este trabajo el etanol en exceso incrementa la velocidad de reacción y mejora el consumo de ácido oleico, logrando la mayor conversión con relaciones molares de 1:5 (ácido oleico:etanol).

El valor calculado de E_a (37.3 KJ/mol) sugirió que el proceso no estuvo limitado por problemas de transferencia de masa, sino que estuvo controlado por la reacción.

Los parámetros cinéticos calculados ($V_{max}=2.247$ mmol/Lmin, $K_{m(COOH)}= 19.529$ mM, $K_{m(OH)}=101.997$ mM y $K_{i(OH)}= 237.968$ mM) se ajustaron a los valores experimentales con una $R^2=0.94$.

El biocatalizador se pudo reutilizar por ocho ciclos de 60 min cada uno, conservando el 60% de conversión cuando la relación molar de sustratos fue de 1:5.

Se estableció que en lotes sucesivos, el exceso de etanol (1:5) sólo se necesita en la primera reacción, a partir del segundo lote fue suficiente con duplicar la concentración de etanol (1:2), para alcanzar conversiones superiores al 90% durante los cuatro lotes.

En el reactor de 1L operando en lote con 250 mL, se logró un 90% de conversión con 22g de biocatalizador en 60 min de reacción a 45°C y 300 rpm.

El biocatalizador mantuvo el 90% de conversión después de 25 h de operación en continuo en un reactor de tanque agitado, con 37.5 gramos de biocatalizador, 250 mL de volumen operacional, con un flujo de alimentación de 2 mL/min a 45 °C y 300 rpm.

8. Referencias

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, H., Louis Comeau. (2003). Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. **(32)**: 589-595.
- Al-Zuhair, S., Hasan, M., Ramachandran, K.B. (2003). Kinetics hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*. **(38)**: 1155–1163.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Douja Daoud B.M. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* **(109)**: 743–754.
- Bai, Z. H., Zhang, H. X., Qi, H. Y., Peng, X. W., Li, B. J. (2004). Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Technology*. **(95)**: 49-52.
- Balcao, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X., Guisán, J. M. (2001). Structural and functional stabilization of L-asparaginase upon immobilization onto highly activated supports. *Biotechnology Progress*. **(17)**: 537-542.
- Barrios-González, J., y Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. **(2)**: 85-121.
- Barton J.W., Reed E.K., Davison B.H, (1997), Gas-phase enzyme catalysis using immobilized lipase for ester production, *Biotechnology Techniques*. **(11)**: 747–750.

-
- Bauer, A. Garbe, D. Surgurg, H. (1990). Common fragrance and flavor materials. 2nd ed. VCH. New York.
 - Benjamin, S., Pandey, A. (2000). Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43 (5): 453-460.
 - Beys, S.W., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, H.M. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. (40): 321-326.
 - Bhagwat, S.S., Bevinakatti, H.S., Doble, M. (2005). Transesterification of substituted ethanols-modelling studies. *Biochemical Engineering Journal*. (22): 253-259.
 - Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. (1999). Choosing reaction media: water and organic solvents, In-*Hydrolases in organic synthesis: region-and stereoselective biotransformations*, UT Bornscheuer & Kazlauskas RJ (eds), Wiley-VCH, Germany, pp 41.
 - Bornscheuer, T.U., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H. (2002). Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*. 20 (10): 433-437.
 - Bourg-Garros, S., Razafindramboa, N., Pavia, A.. (1998). Optimization of lipase-catalized synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification

- in hexane and solvent-free system medium, *Enzyme and Microbial Technology*. (22): 240-245.
- Büchs, J. (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical and Engineering Journal*. (7): 91-98.
 - Cameron, P.A., Davison, B.H., Frymier, P.D., Barton, J.W. (2002). Direct Transesterification of Gases by “Dry” Immobilized Lipase. *Biotechnology and Bioengineering*. 78 (3):251-256.
 - Cao, L., (2005). Immobilized enzymes: science or art?, *Biocatalysis and Biotransformation*. (9), 217-226.
 - Carta, G., Gainer J.L., Gibson M.E. (1992). Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous reactors. *Enzyme and Microbial Technology*. (14): 904-910.
 - Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. (2000). A Continuous Membrane Bioreactor for Ester Synthesis in Organic Media: II. Modeling of MBR Continuous Operation. *Biotechnology and Bioengineering*. (72): 136-143.
 - Chang, Ch., Jiann-Hwa Ch., Chieh-ming J., Chang, Tsung-Ta W., Chwen-Jen S. (2009). Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnology*. (26): 187-192.

-
- Chen Y., Xiao B., Chang J., Fu Y., Lv P., Wang X. (2009). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*. **(50)**: 668–673.
 - Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M. (1990). Kinetic study of esterification by immobilized lipase in *n*-hexane. *FEBS Letters*. **(276)**: 181–184.
 - Colombie S., Tweddell Russell J., Condoret J.S., Marty A. (1998). Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnology and Bioengineering*. **(60)**: 362-368.
 - Cordova, J., Roussos, S., Baratti, J., Nungaray, J., Loera, O. (2003). Identification of mexican thermophilic and thermotolerant fungal isolates. *Micología Aplicada Internacional*. 15 **(2)**: 37-44.
 - Corona, A., Sáez, D., Agosin, E. (2005). Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. *Process Biochemistry*. **(40)**: 2655-2658.
 - Corzo, G., Revah, S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*. **(70)**: 173-180.
 - Couri, S., Costa, S., Saavedra, G.A., Pereira, S., Augusto, A. C. (2000). Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*. **(36)**: 255-261.
 - Dave, R., Madamwar, D. (2005). Esterification in organic solvents by silica-gel immobilized *Candida rugosa* lipase. In: Larroche C, Pandey A, Dussap

-
- C-G, editors. Current topics on bioprocesses in food industry. New Delhi: Asiatech Press. pp. 71 – 75.
- Destain, J., Roblain, D., Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. 19 (2):105-107.
 - Doelle, H. W. Mitchell, D.A., Rolz, C.E.(1992). Solid Substrate Cultivation. Elsevier Sci. Publ. Ltd;London & New York; p 466.
 - Domínguez de Maria, P., Sinisterra, J.V. (1999). Causes of unreproducibility of *C. rugosa* lipase-catalyzed reactions in slightly hydrated organic media. *Tetrahedron*. (55): 8555-8566.
 - Domínguez de Maria, P., Martínez-Alzamora, F., Pérez Moreno, S., Valero, F., Rúa, M.L., Sánchez-Montero J.M. (2002). Heptyl oleate synthesis as usefull tool to discriminate between lipases, proteases and other hydrolases in crude preparations. *Enzyme and Microbial. Technology*. (31): 283-288.
 - Domínguez, A., Costas, M., Longo, M.A., Sanromán, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*. (25): 1225-1229.
 - D´Sousa, S.F., Kubal, B. S. (2002). A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. (51): 151-159
 - Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. (1998). Lipase catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvent under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*. (22): 212-216.

-
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus niger* species. *Process Biochemistry*. **(38)**: 615-620.
 - Fernandes M.L., Saad E., Meira J., Ramos L., Mitchell D., Krieger N. (2007), Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **(263)**: 8-13
 - Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodríguez, V., Guisan, J.M. (1995). Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme and Microbial Technology*. **(17)**: 517-523
 - Foresti, M.L., Ferreira, M.L. (2005). Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. *Catalysis Today*, 107-108, 23-30.
 - Foresti, M.L., Ferreira, M.L. (2007). Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications, *Enzyme and Microbial Technology*. **(40)**: 769-777
 - Foutch, G.L., Johannes, A.H. (2004). Reactors in process engineering. Edited by Sengupta, A.K., and Marcus, Y., Vol. 16, Marcel Dekker Inc., New York. pp. 1-38.
 - Fuentes, M., Benevides C., Pessela C., Jorgette V., Maquiese, Claudia Ortiz, Rosa L. Segura, Jose M. Palomo, Olga Abian, Rodrigo Torres, Cesar Mateo, Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2004). Reversible and strong

- immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. *Biotechnology Progress*. (20): 1134-1139.
- Gandhi, N., Sawat, S., Joshi, J. (1995), Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol, *Biotechnology Progress*. (11): 282-287.
 - Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, J., Aracil, J. (1999). Enzymatic synthesis of fatty acid esters. Part I. Kinetic approach. *Enzyme and Microbial Technology*. (25): 584-590.
 - Ghamgui, H., Karra-Chaâbouni, M., Bezzine, S., Miled, N., Gargouri, Y. (2006). Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system, *Enzyme and Microbial Technology*, (38): 788-794.
 - Gillies, B., Yamazaki, H., Armstrong, D. W. (1987). Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*. (9): 709-719.
 - Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten M.P. (1987). Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnology and Bioengineering*. (30): 258–66.
 - Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R., Freire, D.M.G. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*. (35): 85-90.
 - Graber, M., Bousquet-Dubouch, M.P., Sousa, N., Lamare, S., Legoy, M.D. (2003). Water plays a different role on activation thermodynamic parameters

of alcoholysis reaction catalyzed by lipase in gaseous and organic media.

Biochimica et Biophysica Acta. (1645): 56-62.

- Gubicza, L., Kabiri-Badr, A., Deoves, E., Belafi-Bako, K. (2000). Large scale enzymatic production of natural flavor esters in organic solvents with continuous water removal, *Journal of Biotechnology*. (84): 193-196.
- H-Kittikun A., Kaewthong W., Cheirsilp, B. (2008). Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. *Biochemical Engineering Journal*. (40): 116–120.
- Habeeb, A.F.S.A., Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (126): 16-26.
- Halling, P.J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 16: 178–205.
- Han J.J., Rhee J.S. (1998). Effect of salt hydrate pairs for water activity control on lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*. 22: 158–64.
- Heidari, H., Ziaee, A., Schaller, J., Amoozegar, M. (2007). Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio sp.* strain AF-2004. *Enzyme and Microbial Technology*. (40): 266-272.
- Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., Hornig, S. (2006). Functional polymers based on dextran. *Advances in Polymer Science*. (205): 199-291.

-
- Hernández-Rodríguez, B., Córdova, J., Bárzana, E., Favela-Torres, E. (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. (61): 136-142.
 - Hazarika, S., Goswami, N., Dutta, N., Hazarika, A. (2002). Ethyl oleate synthesis by *Porcine pancreatic* lipase in organic solvents. *Chemical Engineering Journal*. (85): 61-68.
 - Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (64): 175-186.
 - Hwang, S., Lee, K., Park, J., Min, B., Haam, S., Ahn, I., Jung, J. (2004). Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. *Biochemical Engineering Journal*. (17): 85-90.
 - Jeong, S., Hwang, B.Y., Kim, J., Kim, B.G. (2000). Lipase-catalyzed reaction in the packed-bed reactor with continuous extraction column to overcome a product inhibition. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. (10): 597-604.
 - Keng, P.S., Basri, M., Ariff, A.B., M.B. Rahman, M.B., Rahman, R.N.Z., Salleh, A.B. (2008). Scale-up synthesis of lipase-catalyzed palm esters in stirred- tank reactor. *Bioresource Technology*. (99), 6097–6104.
 - Kim, J., Haam S., Park, D., Ahn, I., Lee, T., Kim, H., Kim, W. (2004). Biocatalytic esterification of β -methylglucoside for synthesis of biocompatible sugar-containing vinyl esters. *Chemical Engineering Journal*. (99): 15–22.

-
- Khmel'nitsky, Y., Rich, O.J. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Current Opinion in Chemical Biology*. (3): 47-53.
 - Krishna, H., Divakar, S., Prapulla, S., Karanth, N. (2001). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehi*. *Journal of Biotechnology*. (87): 193-201.
 - Krishna, H.S., Karanth N.G. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate a kinetic study. *Biochemica et Biophysica Acta*. (1547): 262-267.
 - Kumar, P.K.R. (1987). Microbial production of gibberellic acid. PhD Thesis, Mysore University, Mysore, India.
 - Kwon S.J., Song K.M., Hong W.H., Rhee J.S. (1995). Removal of water produced from lipase-catalyzed esterification in organic solvent by pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*. (46): 1-12.
 - Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1988). Lipase catalized formation of flavor esters. *Biotechnology Letters*. (10): 549-554.
 - Larroche, C., Gros, J.B. (1989). Strategies for spore production by *Penicillium roquefortii* using solid-state fermentation techniques. *Process Biochememistry*. (24): 97-103.
 - Lee Moo-Yeal, Dordick, S. J. (2002). Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology*. (13): 376-384.
 - Levenspiel O.. (1987). Ingeniería de las reacciones químicas. Ediciones Repla, S.A. pp. 277-297.

-
- Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L., Belleville, M. P. (2004). Immobilization of lipase on ceramic membrane: activity and stability. *Journal of Membrane Science*. 161-166.
 - Manjon, A., Iborra, J.L., Arocas, A. (1991). Short-chain flavor esters synthesis by immobilized lipase in organic media. *Biotechnology Letters*. (13): 339-344.
 - Martínez-Ruiz A., García H.S., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres, E. (2008). Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (151): 393-401.
 - Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R. M., Condoret, J. S. (1992). Kinetics of lipase catalyzed esterification in supercritical CO₂. *Biotechnology and Bioengineering*. (39): 273–280.
 - Marty, A., Dossat, V., Condoret, J.S. (1997). Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnology and Bioengineering*. (56): 232-237.
 - Mateos, J.C., Rodríguez, J.A., Roussos, S., Córdova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*. (39): 1042-1050.
 - Mieglo, I., Moreira, M. T., Palma, C., Guisan, J. M., Fernández-Lafuente, R., Feijoo, G., Lema, J. M. (2003). Catalytic properties of immobilized and

- stabilized manganese peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*. **(32)**: 769-775
- Miller, D.A., Prausnitz, J.M., Blanch, H.W. (1991). Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclo-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*. **(13)**: 98-103.
 - Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. **(68)**: 65-135.
 - Monot, F., Borzeix, F., Bardin, M., Vandecasteele, J.P. (1991). Enzymatic esterification in organic media: role of water and organic solvent in kinetics and yield of butyl butyrate synthesis, *Applied Microbiology and Biotechnology*. **(35)**: 759-765.
 - Moo-Young, M., Moriera, A.R., Tengerdy, R.P. (1983). Principles of solid state fermentation. In The filamentous fungi. *Fungal Biotechnology*. **(4)**: 117-144.
 - Nie, K.L., Xie, F., Wang, F., Tan, T.W. (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. **(43)**: 142–147.
 - Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003). Bioreaction Engineering Principles. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. Pp. 62-63.
 - Nielsen, N.S., Yang, T., Xu, X., Jacobsen, C. (2006). Production and oxidative stability of human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chemistry*. **(94)**: 53-60.

-
- Nishio, N., Tai, K., Nagai, S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal Microbiology and Biotechnology*. (8): 263-270.
 - Noor, I.M., Hasan, M., Ramachandran, K.B. (2003). Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*. (39), 13–20.
 - Nunes, M.A.P., Fernandes, P.C.B., Ribeiro, M.H.L. (2013). Microtiter plates versus stirred mini-bioreactors in biocatalysis: A scalable approach. *Bioresource Technology*. (136): 30-40.
 - Oliveira, A.C., Rosa, M.F., Aires–Barros, M.R., Cabral, J.M.S. (2000). Enzymatic esterification of ethanol by an immobilised *Rhizomucor miehei* lipase in a perforated rotating disc bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. (26): 446–450.
 - Ooijkaas, L.P., Weber, F.J., Buitelaar, R.M., Tramper, J., Rinzema, A. (2000). Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*. (18): 356-360.
 - Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-Gonzalez, G. (1988). Water and water activity in solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. (27): 498-503.
 - Paiva, A.L., Balcão, V.M., Malcata, F.X. (2000). Kinetics and mechanisms of reaction catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. (27): 187-204.

-
- Palomo, J.M., Segura, R.L., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. (2004). Improving the activity of lipases from thermophilic organisms at mesophilic temperatures for biotechnology applications. *Biomacromolecules*. (5): 249-254.
 - Pandey, A. (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. (27): 109-117.
 - Pandey A. (1994). Solid-state fermentation: an overview. *Wiley, New Delhi India*: 3-10.
 - Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D.A. (2000). New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. (35): 1153-1169.
 - Pandey, A., Benjamin, S., Carlos R. Soccol, Poonam, N., Krieger, N., Vanete T. Soccol. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology Applied Biochemistry*. (29): 119-131.
 - Pandey, A., Soccol, C.R., Leo, J.A.R., Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation in Biotechnology. *Asiatech Publishers, Inc., New Delhi*. 221.
 - Pang-Yen, H., Guo-Syong, Ch., An-Chong Ch., Hsing-Ya L. (2005). Computational multiple steady states for enzymatic esterification of ethanol and oleic acid in an isothermal CSTR. *BioSystems*. (80): 133–143.
 - Peñaloza, W., Davey, C.L., Kell, D.B., Hedger, J.N. (1991). Real time monitoring of the accretion of *Rhizopus oligosporus* biomass during the solid substrate tempeh fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (7): 248-259.

-
- Pogori, N., Xu, Y., Cheikhoussef, A. (2007). Potential aspects of lipases obtained from *Rhizopus* fungi, *Research Journal of Microbiology*. (2): 101-116.
 - Prapulla, S. G., Karanth, N. G., Engel, K. H., Tressl, R. (1992). Production of 6-pentyl- α -pyrone by *trichoderma viride*. *Flavor and Fragrance Journal*. (7): 231-234.
 - Ramamurthi, S., McCurdy, R. (1994). Lipase-catalyzed esterification of oleic acid and methanol in hexane: a kinetic study. *JAOCS*. (1): 927-930
 - Radzi, S., Basri, M., Salleh, A., Ariff, A., Mohammad, R., Rahman, A., Rahman, R. (2006). Optimisation study of large-scale enzymatic synthesis of oleyl oleate, a liquid wax ester, by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (81): 374-380.
 - Rahman, N.K., Kamaruddin, A.H., Uzir M.H. (2011). Enzymatic synthesis of farnesyl laurate in organic solvent: initial water activity, kinetics mechanism, optimization of continuous operation using packed bed reactor and mass transfer studies. *Bioprocess Biosystems Engineering*. (34): 687–699.
 - Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*. (1), No. 3.
 - Raimbault, M., Alazard, D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. (9): 199-209.

-
- Rao, K.C., Karanth, N.G., Sattur, A.P. (2005). Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*. (40): 2517-2522.
 - Reetz, T.M. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*. (6): 145-150.
 - Rizzi, M., Stylos, P., Reuss, M. (1992). A kinetic study of immobilized lipase catalyzing the synthesis of isoamyl acetate by transesterification in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*. (14): 709-714.
 - Rocha, J., Gil, M., Garcia, F. (1999). Optimization of the enzymatic synthesis of *n*-octyl oleate with immobilized lipases in the absence of solvents, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. (7): 607-612.
 - Rodriguez, J., Mateos, J.C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., Baratti, J. (2006), Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homotallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. (41): 2264-2269.
 - Rohit, S., Yusuf, C., Uttam, C.B. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. (19): 627-662.
 - Romero-Gómez, S.J., Augur, C., Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. (22): 1255-1258.

-
- Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S. (2005). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane, *Enzyme and Microbial Technology*, (37): 42-48.
 - Romero, M.D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A. (2007). A kinetic study of isoamyl acetate by immobilized lipase-catalyzed acetylation in *n*-hexane. *Journal of Biotechnology*. (127): 269-277.
 - Roussos, S., Raimbault, M., Viniegra-Gonzales, G., Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B.K. (1991). Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micología Neotropical Aplicada*. (4): 83-98.
 - Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V. (2005). Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis, *Journal of Biotechnology*. (119): 291-299.
 - Sánchez, A., Ferrer, P., Serrano, A., Pernas, M., Valero, F., Rúa, M.L., (1999). Characterization of the lipase and esterasa multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. (25): 214-223.
 - Sánchez A., Valero F., Lafuente J., Solá C.. (2000). Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilised *Rhizomucor miehei* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*. (27): 157–166.
 - Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., Raimbault, M. (1992). Potential of using a simple fermenter for biomass built

- up, starch hydrolysis and ethanol production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* .(36): 47-61.
- Schmid, R.D., Verger. R. (1998). Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications, *Angewandte Chemie-International Edition*. (37): 1608-1633.
 - Segel, H. (1975). Enzyme Kinetics. In: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems, *New York: Wiley*
 - Sellek, G.A., Chaudhuri, J.B. (1999). Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*. (25):471-482.
 - Serri, N.A., Kamaruddin, A.H., Long W.S. (2006). Studies of reaction parameters on synthesis of citronellyl laurate ester via immobilized *Candida rugosa* lipase in organic media. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. (29): 253–260.
 - Seyhan, T.S., Alptekin, O. (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochemistry*. (39): 2149-2155.
 - Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. (19): 627-662.
 - Shu Yang S., Yan X. (2009). Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by

Rhizopus chinensis: A comparative investigation. *Bioresource Technology*. (100): 1336–1342.

- Thaís F., Salum, Ch., Villeneuve, P., Barea, B., Itsuo Yamamoto, C., Côcco, L.C., Mitchell, D.A., Krieger, N.. (2010). Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry*. (45): 1348–1354.
- Torres, C., Otero, C. (1999). Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols, *Enzyme and Microbial Technology*. (25): 745–752.
- Trani, M., Ergan, F., Andre, G. (1991). Lipase-catalyzed production of wax esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. (68): 20-22.
- Trejo-Hernandez, M.R., Raimbault, M., Roussos, S., Lonsane, B.K. (1992). Potential of solid state fermentation for production of ergot alkaloids. *Letters in Applied Microbiology*. (15): 156-159.
- Trubiano, G., Borio, D., Ferreira, M.L. (2004). Ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase in a solvent-free system. Role of hydrophobic interactions. *Biomacromolecules*. (5): 1832-1840.
- Trubiano, G., Borio, D., Errazu, A. (2007). Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. *Enzyme and Microbial Technology*. (40): 716-722.
- Tsai, S.W., Chiang, C.L. (1991). Kinetics, mechanism, and time course analysis of lipase-catalyzed hydrolysis of high concentration olive oil in AOT-

- isooctane reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*. **(38)**: 1137-1143.
- ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, I. (2002). Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. **(37)**: 637-641.
 - Vakhlu, J., Kour, A. (2006). Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Journal Biotechnology*. **(9)**.
 - Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R. (1993). Water as a competitive inhibitor of lipase catalysed esterification in organic media. *Biotechnology Letters*. **(15)**: 1133–1138.
 - Vázquez–Lima, F., Pyle, D.L., Asenjo, J.A. (1995). Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst: enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. **(46)**: 69–79.
 - Weetall, H.H. (1974). Immobilized enzymes: analytical applications. *Analytical Chemistry*. **(46)**: 602A-604A.
 - Wei, D., Gu, Ch., Song, Q., Su, W. (2003). Enzymatic esterification for glycoside lactate synthesis in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. **(33)**:508–512.
 - Wei S. L., Kamaruddin, A., Subhash B. (2005). Chiral resolution of racemic ibuprofen ester in an enzymatic membrane reactor. *Journal of Membrane Science*. **(247)**: 185–200.

-
- Welsh, F.W., Williams, R.E., Dawson, K.H (1990). Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters, *Journal of Food Science*. (55): 1679-1682.
 - Xu, Y., Wang, D., Mu, X.Q., Zhao, G.A., Zhang, K.Ch. (2002). Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. (18): 29–37.
 - Yadav, G.D., Piyush, S.L. (2003). Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilized lipases. *Biochemical Engineering Journal*. (16). 245-252.
 - Yadav, G., Trivedi, H. (2003). Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of *n*-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enzyme and Microbial Technology*. (32): 783–789.
 - Yu, H., Wu, J., Ching, C.B. (2004). Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution. *Biotechnology Letters*. (26): 629-633.
 - Zaidi, A., Gainer, J., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., Mir, A. (2002). Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in *n*-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. *Journal of Biotechnology*. (93): 209-216.

- Zaks, A., Klivanov, A.M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. (82): 3192-3196.
- Zhu, Y. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethano foam as carrier. *Biotechnology Letters*. (16): 643-648.

Anexos

A-1 TRABAJOS DERIVADOS DE NUESTROS ESTUDIOS

SÍNTESIS DE OLEATO DE ETILO EN SOLVENTES ORGÁNICOS UTILIZANDO LIPASAS AUTOINMOVILIZADAS, en la modalidad de cartel. Presentado en el XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Morelia, Michoacán, junio de 2007.

ORGANIC PHASE SYNTHESIS OF ETHYL OLEATE USING LIPASES PRODUCED BY SOLIDSTATE FERMENTATION. En la modalidad de cartel. Presentado en The International Conference on New Horizons In Biotechnology & 4th BRSI Convention. Tribandrum, India, Noviembre de 2007.

SYNTHESIS OF ETHYL OLEATE IN HEXANE USING LIPASES PRODUCED BY SOLID-STATE FERMENTATION, en la modalidad de cartel. Presentado en el "4th International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries", realizado por la Asociación Mexicana de Ciencias de los Alimentos. Boca del Rio, Veracruz. Diciembre de 2010.

CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE BIOCATALIZADORES CON ACTIVIDAD LIPASA PRODUCIDAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VIII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, realizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Querétaro, Junio de 2011.

SÍNTESIS DE OLEATO DE ETILO EN LOTES SUCESIVOS CATALIZADOS POR LIPASAS PRODUCIDAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO, en la modalidad de cartel. Presentado en el XXXIII Encuentro Nacional y II Congreso Internacional de la AMIDIQ (Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química), San José del Cabo. BCS. Mayo de 2012.

PUBLICACIÓN A PARTIR DE NUESTRO TRABAJO

Antonio Martínez-Ruiz, Hugo Sergio García, Gerardo Saucedo-Castañeda, Ernesto Favela-Torres. (2008). Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (151): 393-401.

Organic Phase Synthesis of Ethyl Oleate Using Lipases Produced by Solid-state Fermentation

Antonio Martínez-Ruiz · Hugo Sergio García ·
Gerardo Saucedo-Castañeda · Ernesto Favela-Torres

Received: 19 December 2007 / Accepted: 10 March 2008 /
Published online: 5 April 2008
© Humana Press 2008

Abstract This paper reports a study of the enzymatic esterification of oleic acid and ethanol. The reaction was catalyzed by lipases produced by solid-state fermentation with *Rhizopus* sp. Olive oil and perlite were used as an inducer and inert support, respectively. Synthesis of ethyl oleate was carried out in a 10-mL batch reactor with magnetic stirring. The effects of substrate ratios, biocatalyst concentration, and temperature on the reaction rate and conversion efficiency were evaluated. The highest reaction rate (1.64 mmol/L min) was reached with an oleic acid/ethanol mol ratio of 1:5 (oleic acid 50 mM:ethanol 250 mM) and 1 g of biocatalyst. Conversions approaching 100% were obtained after 60 min of reaction at 45 °C with *n*-hexane as a solvent. The initial reaction rate increased proportionally with respect to biocatalyst concentration, which suggests that the reaction rate was not controlled by mass transfer. The biocatalyst retained more than 80% of its catalytic activity after 7 months of storage at 4 °C. The results demonstrate that the biocatalyst produced by *Rhizopus* sp. in solid-state fermentation can be successfully used for ethyl oleate synthesis over short reaction periods under conditions when ethanol is in excess.

Keywords Lipases · Solid-state fermentation · Biosynthesis · Organic solvents

Introduction

Esters are important organic compounds with an increasing number of commercial applications [1]. These compounds are widely used for the preparation of aromatics, cosmetics, detergents, flavors, and pharmaceuticals [2]. Esters may also be used as

A. Martínez-Ruiz · G. Saucedo-Castañeda · E. Favela-Torres (✉)
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana—Iztapalapa, Av. San Rafael
Atlixco 186, Col. Vicentina, Mexico City, C.P. 09340, Mexico
e-mail: favela@xanum.uam.mx

H. S. García
Instituto Tecnológico de Veracruz, Calzada Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar,
Veracruz, C.P. 91897, Mexico

plasticizers and lubricants [3]. Ethyl oleate is used as a biological additive, as a plasticizer, and as a hydraulic fluid [4]. Esters from natural sources are not available in large amounts, and they are usually too expensive to be used for commercial applications [5]. Therefore, many of the esters available are produced by either chemical or enzymatic synthesis [6]. Biotechnological production of esters using lipases has received great attention because of the mild reaction conditions (temperature, pH, and pressure) involved, the high degree of purity achieved, and the acceptance of these products in the food industry [7]. Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) naturally catalyze the hydrolysis of triacylglycerides to glycerol and fatty acids [8]. Nevertheless, when these biocatalysts are used in organic solvents with low water content (low a_w), synthetic reactions are favored [9], which offers some important advantages [10]. Lipases are mainly produced by submerged fermentation [11]; however, the use of solid-state fermentation (SSF) for lipase production offers biotechnological advantages [12]. One of the major advantages of SSF for lipase production involves the possibility of utilizing them in biosynthetic processes without any extraction and immobilization prior to their use. This approach involves the use of the fermented solids as biocatalysts in bioreactions under non-conventional conditions (organic solvents or gas phase). In this study, the synthesis of ethyl oleate by a biocatalyst produced by SSF was evaluated. In order to improve the synthesis reaction rate and the conversion efficiency, substrate ratios, temperature, and biocatalyst concentration were evaluated.

Materials and Methods

Microorganism

The fungus *Rhizopus* sp. (strain IRD43aIV) belonging to a collection of thermotolerant strains and isolated at 50 °C from coconut pulp at the state of Colima on the Mexican west coast was used. A preliminary identification of the isolated fungi, based on morphological observations, revealed that this strain could be identified as *Rhizopus* sp. [13]. The strain was maintained in Potato-dextrose-agar (PDA) slants (Bioxon).

Preparation of Inoculum

The spores used to inoculate the SSF medium were produced in 250-mL conical flasks containing 60 mL of PDA medium. After 6 days of incubation at 30 °C, 50 mL of a 0.01% Tween 80 solution was added to the flask, and the suspension was stirred with a magnetic stirrer for 10 min. The spore concentration was estimated by using a Neubauer hematocytometer.

Culture Medium Composition

The composition of the culture medium for lipase production by SSF was [14] (in g/L): urea 4, lactose 5, olive oil 40, K_2HPO_4 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, polyvinyl alcohol 1,6, oligoelement solution 4 mL/L. The pH value was adjusted to 6.5 with 10% HCl (v/v). The composition of the oligoelement solution was (g/L): EDTA 10, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.98, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.81, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.47, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.17, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.29. In order to dissolve the constituents, the pH of this solution was adjusted to pH 4 with 10% HCl. All reagents were J. T. Baker. The culture medium was used without sterilization. The fast

growth rate of this strain, in addition to a heavy inoculum and a low water content (see below), allowed to carry out the culture without microbial contamination.

Lipase Production by SSF

Perlite (Dicalite, México) was used as inert support (IS). The material was milled to obtain a particle size of 0.8–1.19 mm, then, perlite was washed twice with hot tap water and twice with cold distilled water, then, it was dried at 60 °C, and stored under a dry atmosphere. The inoculated culture medium (3×10^7 spores/g IS) was used to impregnate perlite to attain a moisture content of 60%. Twenty grams of this mixture was placed into glass columns (2.0 cm in diameter and 20 cm in length) and incubated at 45 °C in a water bath. An aeration rate of 40 mL/min per column was used.

Production of the Biocatalyst

Two methods were used to prepare the biocatalyst (fermented dry solids): (1) Air-drying: dry air at a flow rate of 500 mL/min at 45 °C was passed through the fermented solids into the fermentation columns over a 24-h period. Moisture content after air-drying was lower than 1% w/w. (2) Freeze-drying: The fermented solids were placed in a laboratory freeze drier (Labconco LYPH-LOCK 6). After 6 h of lyophilization at 5–10 μ m Hg and –50 °C, the fermented solids reached a moisture content lower than 1% w/w. After drying, the biocatalyst was stored at 4 °C away from light.

Esterification of Oleic Acid and Ethanol

The esterification reactions were carried out using *n*-hexane (Baker) as a solvent. Oleic acid (Baker) and anhydrous ethyl alcohol (Técnica Química, México) previously dissolved in *n*-hexane were used as substrates for the esterification reaction. The *n*-hexane dissolves long-chain fatty acids and has been previously used in this type of reaction [15]. The substrates and solvent were previously dehydrated using molecular sieves (Type 4A, Fluka).

The esterification reaction was carried out in a 10-mL reactor with magnetic agitation at 45 °C for 1 h. The reaction mixture (9 mL) containing oleic acid and ethanol was preheated at 45 °C. The reaction was started by the adding 1 g of the biocatalyst. Samples (0.5 mL) were withdrawn at regular intervals. The reaction was stopped by addition of 0.1 mL of 6 M HCl. The residual oleic acid was analyzed with the copper-pyridine reagent, as described above. The substrate conversion (%) was calculated from the oleic acid concentration at the beginning and at the end of the synthesis reaction. All the results were obtained from independent reactions. In some cases, experiments were carried out in triplicate, obtaining a variation coefficient lower than 9.8%.

Analytical Methods

Hydrolytic Lipase Activity

The olive oil emulsion for the enzymatic reaction was prepared as follows: 20 g of commercial olive oil (Carbonell, Spain) was added to 100 mL of a 100 mM Tris–HCl (Bio-Rad) buffer pH 8, containing 10 mM CaCl₂ (Baker), 0.25% polyvinyl alcohol (SIGMA), and 0.3% gum arabic (SIGMA). It was homogenized in an Ultra-Turrax (IKA-WERK) homogenizer at 10,000 rpm for 10 min. The copper acetate-pyridine reagent was

made by dissolving 50 g of copper acetate (Baker) in 1 L distilled water, then the mixture was homogenized for 30 min, and the pH was adjusted to pH 6.1 with pyridine (Baker). To measure the hydrolytic activity of the lipase preparation, 3 mL of preheated (45 °C) olive oil emulsion was mixed with 20 mg of the fermented dried material in 15-mL conical glass tubes (Corning), and the mixture was incubated at 45 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 0.6 mL of 6 M HCl to each tube. After addition of 3 mL of *n*-hexane, the mixture was thoroughly mixed for 1 min and centrifuged at 7,000 rpm for 10 min at 4 °C. From each tube, 2.5 mL of supernatant was added to 0.5 mL of the copper acetate-pyridine reagent. This mixture was homogenized in a vortex for 1 min, and then the absorbance was measured at 715 nm with a UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer Lambda 25). The hydrolytic activity was calculated from the slope of the curve absorbance versus concentration of a standard emulsion containing olive oil emulsified in the Tris-HCl buffer (see above). One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme releasing 1 mmol of oleic acid per minute under the above conditions.

Carbon Dioxide Analysis

Carbon dioxide (CO₂) production was used as an indirect measurement of *Rhizopus* sp. growth. CO₂ concentration in the dry air stream outlet from the fermentation column was monitored using an on-line gas chromatograph (Gow-Mac 580, Gow-Mac Instrumentation Co., Bethlehem, PA, USA) equipped with a thermal conductivity detector and an automatic injector, a gas-separating concentric column (outer column: 6 ft for 1/4 in. packed with activated molecular sieves, inner column: 6 ft for 1/8 in. packed with porous polymer mixture; CTRI, Alltech), and a software integrator program (Chroma Biosystemes, France) [16].

Moisture Content and Water Activity Analysis

The moisture content of the solid medium and the biocatalyst was gravimetrically determined using a moisture analyzer (OHAUS MB45; repeatability SD of 0.015–0.05%). An AQUA-LAB (CX-2) was used to determine the water activity of the fermented solids and the biocatalysts.

Results and Discussion

Production of Lipases

The CO₂ production rate was determined and used as a criterion to monitor and stop the fermentation process. In all cases, the incubation time for lipase production was stopped after the maximum rate of CO₂ production was reached. This procedure allowed the preparation of lipolytic extracts devoid of proteases, which are usually produced at the final stages of fermentation. The production rate of CO₂ reached its maximum value after 20 h of culture, reaching the maximum CO₂ production after 20 h of culture. This time is considerably shorter than the time reported (72 h) for lipase production with *Burkholderia cepacia* [17]. The hydrolytic lipase activity after 20 h of incubation was 75 IU/g IS. This activity represents ~65% of the activity measured in the commercial lipase preparation of Lipozyme RM IM® (Novozymes). Lipases from *Rhizopus* species have gained more attention because some of them exhibit thermostability and good stability in organic

solvents, which, therefore, have a great potential in biocatalysis [18]. For the esterification reactions, the biocatalyst was produced under the above conditions. The residual oleic acid (from olive oil) concentration in the biocatalyst was smaller than 0.14 mmol/g of inert support. This amount of residual oleic acid modifies the ratio of oleic acid/ethanol less than 5%; under these conditions, the esterification reaction modifies neither the substrate conversion nor the esterification rate.

Production of the Biocatalyst

The amount of water contained in reagents and the biocatalyst itself has a great influence on the reaction rate and on substrate conversion in reactions carried out in organic solvents. Enzymes require a small amount of water to maintain their structure, flexibility, and, therefore, their catalytic activity [19–21]. It has been calculated that the moisture content in enzyme-catalyzed reactions in non-polar solvents should range from 0.05% to 1% [22]. The drying methods and storage conditions described in the “Materials and Methods” section allowed us to obtain preparations with moisture content below 1% and water activity (a_w) values from 0.33 to 0.68. At a_w values above 0.68, the esterification rate was strongly (more than 80%) inhibited (data not shown). The hydrolytic activity was 62.3 and 61.5 UI/g IS for products obtained with air- and freeze-drying, respectively. The enzymatic activity losses were 17% and 18% when the fermented solids were air-dried or lyophilized, respectively, than the activity present in the solid fermented material before drying.

Effect of the Substrate Ratio on the Esterification Reaction

To evaluate the effect of the oleic acid/ethanol ratio on the esterification reaction, the oleic acid concentration was kept constant at 50 mM, while the ethanol concentration ranged from 50 to 450 mM. The reaction was started after addition of 1 g of biocatalyst. The highest esterification rate (Fig. 1) was obtained when the oleic acid/ethanol molar ratio was 1:5, which was more than 3.5 times greater than the esterification rate obtained with equimolar concentrations of oleic acid and ethanol. The highest (near 100%) substrate conversion was measured at an oleic acid/ethanol ratio of 1:5 (see Fig. 1). The positive effect of an excess of alcohol on esterification or transesterification reactions has been previously reported [16, 17, 23–27]. Table 1 shows values of conversion for esterification [17, 24] and transesterification [16, 25] reactions in different solvents, using similar

Fig. 1 Effect of the oleic acid/ethanol molar ratio on the initial esterification rate and the substrate conversion. Reaction conditions: oleic acid 50 mM, 60-min reaction at 45 °C

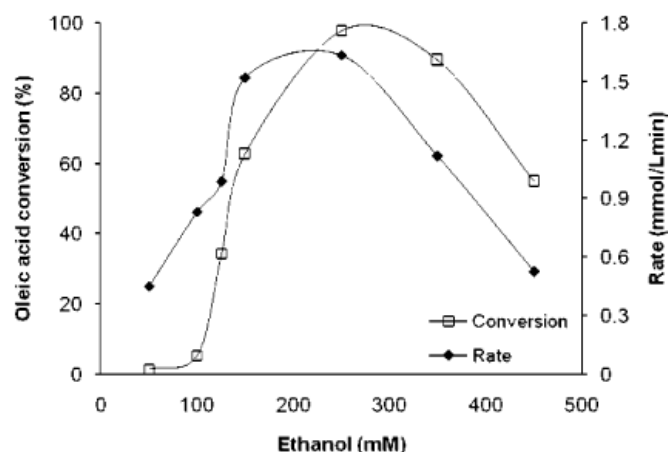


Table 1 Substrate conversion (%) for esterification and transesterification reactions

Substrates	Concentration (mM)	Relation molar	Temperature (°C)	Conversion (%)	Reaction time (h)	Biocatalyst	Reference
Lactic acid/ dodecanol	30	1:5	50	95	48	Novozym 435	[24] ^a
Oleic acid/ethanol	70	1:5	37	94	18	Lipases by SSF	[17] ^b
Anhydride acetic/ isoamyl alcohol	800	1:3	40	100	2	Novozym 435	[16] ^c
Vinyl acetate/ <i>n</i> - octanol	30	1:1	30	82	1.5	Novozym 435	[25] ^b
Oleic acid/ethanol	50	1:5	45	97.8	1	Lipases by SSF	This study ^c

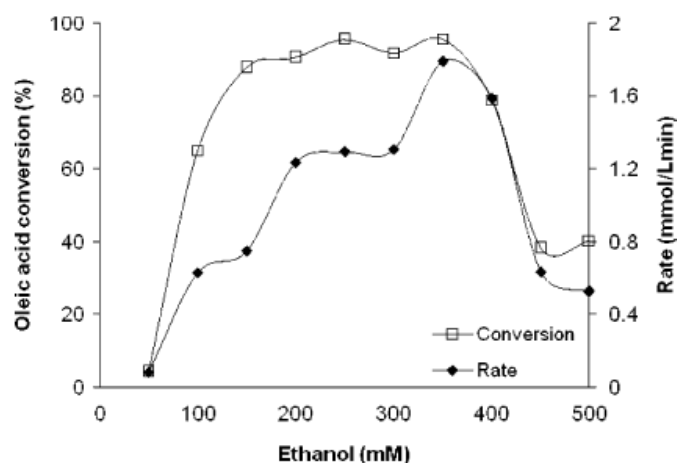
^a In acetonitrile^b In *n*-heptane^c In *n*-hexane

catalysts and lipases produced by SSF and commercial enzymes (Novozym 435). This is compared with the data for the formation of ethyl oleate (shown in this work), which are also included in Table 1. The conversion was greater than 80% in all cases; nevertheless, the reaction time can vary from 60 min up to 48 h, depending on the reaction conditions. It has been suggested that the reaction rate and the extent of conversion are controlled by different variables, such as the source and catalytic activity of the enzyme, the type of reaction, the substrates, and the solvents used, as well as the temperature.

Effect of Substrate Concentration on the Esterification Reaction

In order to evaluate the effect of excess ethanol on the synthesis of ethyl oleate, a series of experiments were performed, keeping the oleic acid/ethanol ratio constant at 1:5, using 0.5 g of the biocatalyst. The studies were carried out in the same reactor at 45 °C. The initial esterification rates as a function of substrate concentration are shown in Fig. 2. The highest rate (1.79 mmol/L min) was obtained with oleic acid and ethanol concentrations of 70 and 350 mM, respectively. Although the highest substrate conversion (95.5%) was

Fig. 2 Effect of substrate concentration on conversion and esterification rate. Reaction conditions: oleic acid/ethanol molar ratio 1:5, 60-min reaction at 45 °C



obtained at the same oleic acid–ethanol concentrations (70–350 mM), substrate conversions greater than 80% were obtained with an oleic acid concentration up to 80 mM (oleic acid/ethanol 80:400; Fig. 2). When ethanol was used at initial concentration greater than 400 mM, the reaction rate and the substrate conversion efficiency diminished more than 60%. Similar results were obtained by Oliveira et al. [28] for the enzymatic esterification of ethanol and oleic acid. The reduction in the esterification rate and substrate conversion at high oleic acid–ethanol concentration may be associated with the high ethanol concentration. Due to its highly hydrophilic nature, ethanol, like acetone, can affect the catalytic activity by causing protein precipitation [29]. Furthermore, it can also act as a competitive inhibitor by blocking the site that is normally destined for acylation [10].

Effect of Biocatalyst Concentration

The effect of biocatalyst concentration on the esterification rates and substrate conversion was evaluated (Fig. 3); biocatalyst concentrations from 0.2 to 1.6 g in 10 mL of the substrate solution were tested. Esterification reactions were carried out as described in “Analytical Methods”. When biocatalyst concentrations above 0.02 g/mL were used, the substrate conversion efficiency was greater than 80% after 60 min of reaction at 45 °C. High conversions (near 100%), even at high biocatalyst concentrations, have been reported in previous studies [1, 3, 23]. These results may be interpreted by considering that the active sites of enzymes used in excess may not be exposed to substrates without contributing significantly to the reaction [3].

Figure 3 also shows the esterification reaction rate as a function of biocatalyst concentration. The nearly linear relationship (linear regression coefficient of 0.93) between these two variables means that the reaction depends upon the concentration of catalyst, as in the basic Michaelis–Menten model, suggesting that the reaction is not controlled by mass transfer. Similar results have been reported in another study [23] and indicate that the reaction may be kinetically controlled.

Effect of Temperature

The effect of the reaction temperature on the substrate conversion was evaluated over a range of 30 °C to 60 °C (Fig. 4). The highest esterification rate was measured when the

Fig. 3 Effect of biocatalyst concentration on esterification rate and substrate conversion efficiency. Reaction conditions: oleic acid 50 mM, ethanol 250 mM, 60-min reaction at 45 °C

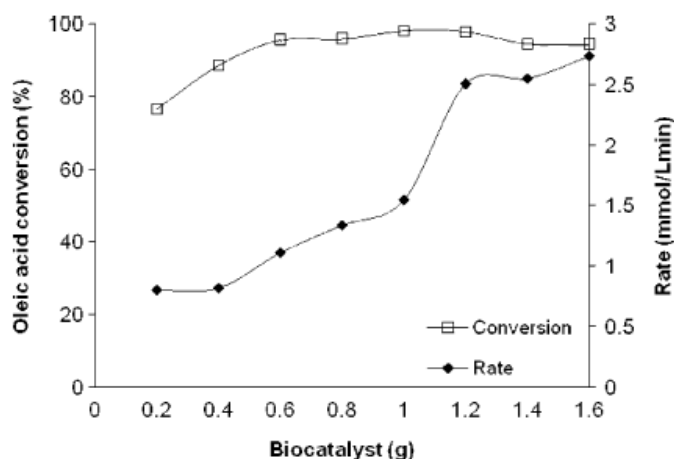
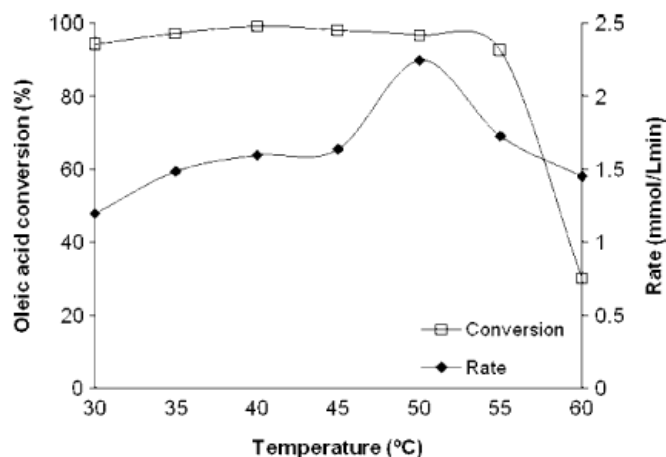


Fig. 4 Effect of temperature on the synthesis of ethyl oleate in hexane. Reaction conditions: 50 mM of oleic acid, 250 mM of ethanol, 1 g of biocatalyst, and an incubation period of 60 min



reaction mixture was incubated at 50 °C. Substrate conversion at temperatures from 30 °C to 55 °C was near to 100%. Incubation at 60 °C had a significant negative effect on substrate conversion efficiency.

The esterification rates obtained at the different temperatures assayed (30 °C to 55 °C) and the equation described by Nielsen et al. [30] were used to estimate the activation energy (37.3 KJ/mol). This activation energy is similar to the reported (38 KJ/mol) for the esterification of oleic acid with oleic alcohol and is typical of biocatalytic processes limited by the reaction rate [10]. Similar studies carried out with a mixture of oleic acid and ethanol demonstrated that the esterification rate was kinetically controlled rather than controlled by mass transfer [7].

Biocatalyst Stability

The stability of the biocatalyst stored in the dark at 4 °C was evaluated. After 7 months, the biocatalyst retained more than 80% of its activity. This fact is important since the biocatalyst produced by SSF was air-dried without any additional treatment to improve its stability. In contrast, the lipase produced by *Rhizopus oryzae* maintained near to 100% of its activity after 235 days of storage once that it was extracted and immobilized on CaCO₃ [31].

Conclusions

The biocatalyst produced by *Rhizopus* sp. in solid-state fermentation was directly used in esterification reactions to synthesize ethyl oleate with high esterification rates and substrate conversion. This approach offers at least two advantages: (a) the use of air-dried solid-state fermented solids, without any additional extraction, purification, or immobilization processes, may allow the development of economically advantageous processes and (b) the biocatalyst obtained by SSF can be used in the sustainable production of products such as biodiesel from vegetable oils. The use of these types of biocatalysts has great potential for non-conventional reactions such as those in organic solvents or in the gas phase. More research will be necessary to explore aspects leading to possible applications that may be used to prepare products of commercial interest.

Acknowledgments This work was supported by the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT). The authors gratefully thank Dr. Jesus A. Cordova Lopez for the *Rhizopus* strain used in this work.

References

1. Foresti, M., Errazu, A., & Ferreira, M. (2005). *Biochemical Engineering Journal*, 25, 69–77.
2. Bauer, A., Garbe, D., & Surgurg, H. (1990). *Common fragrance and flavor materials* (2nd ed.). New York: VCH.
3. Gandhi, N., Sawat, S., & Joshi, J. (1995). *Biotechnology Progress*, 11, 282–287.
4. Hazarika, S., Goswami, N., Dutta, N., & Hazarika, A. (2002). *Chemical Engineering Journal*, 85, 61–68.
5. Radzi, S., Basri, M., Salleh, A., Ariff, A., Mohammad, R., Rahman, A., et al. (2006). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 374–380.
6. Trani, M., Ergan, F., & Andre, G. (1991). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 20–22.
7. Trubiano, G., Borio, D., & Errazu, A. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 716–722.
8. Beys, S., Mitidieri, S., Schrank, A., & Vainstein, H. (2005). *Process Biochemistry*, 40, 321–326.
9. Chowdary, G., Ramesh, M., & Prapulla, S. (2000). *Process Biochemistry*, 36, 331–339.
10. Zaidi, A., Gainer, J., Carta, G., Mrani, A., Kadir, T., Belarbi, Y., et al. (2002). *Journal of Biotechnology*, 93, 209–216.
11. Rohit, S., Yusuf, C., & Uttam, C. (2001). *Biotechnology Advances*, 19, 627–662.
12. Hölker, U., Höfer, M., & Lenz, J. (2004). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 175–186.
13. Mateos, J., Ruiz, K., Rodriguez, J., Cordova, J., & Baratti, J. (2007). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 49, 104–112.
14. Rodriguez, J., Mateos, J., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., et al. (2006). *Process Biochemistry*, 41, 2264–2269.
15. Romero, M., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., & Ghaziaskar, H. (2005). *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 42–48.
16. Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M., Lonsane, B., Navarro, J., Roussos, S., Dufour, D., et al. (1994). *Process Biochemistry*, 29, 13–24.
17. Fernandes, M., Maria, L., Bolzani, S., Meira, A., Joel, P., Ramos, L., et al. (2006). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 263, 8–13.
18. Pogori, N., Xu, Y., & Cheikhoussef, A. (2007). *Research Journal of Microbiology*, 2, 101–116.
19. Rupley, J., Gratton, E., & Careri, G. (1983). *Trends in Biochemical Sciences*, 8, 18–22.
20. Affleck, R., Xu, Z., Suzawa, V., Focht, K., Clark, D., & Dordick, J. (1992). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1100–1104.
21. Broos, J., Visser, A., Engbersen, J., Verboom, W., van Hoek, A., & Reinhoudt, D. (1995). *Journal of the American Chemical Society*, 117, 12657–12663.
22. Bornscheuer, U. (1999). *Hydrolases in organic synthesis* (1st ed.). Weinheim (Federal Republic of Germany): Wiley.
23. Krishna, H., Divakar, S., Prapulla, S., & Karanth, N. (2001). *Journal of Biotechnology*, 87, 193–201.
24. Torres, C., & Otero, C. (1999). *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 745–752.
25. Yadav, G., & Trivedi, H. (2003). *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 783–789.
26. Kim, J., Haam, S., Park, D., Ahn, I., Lee, T., Kim, H., et al. (2004). *Chemical Engineering Journal*, 99, 15–22.
27. Serri, N., Kamaruddin, A., & Long, W. (2006). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29, 253–260.
28. Oliveira, A., Rosa, M., Aires-Barros, M., & Cabral, J. (2001). *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 11, 999–1005.
29. Heidari, H., Ziaee, A., Schaller, J., & Amoozegar, M. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 266–272.
30. Nielsen, J., Villadsen, J., & Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles* pp. 62–63. New York: Kluwer/Plenum.
31. Ghamgui, H., Miled, N., Karra-chaâbouni, M., & Gargouri, Y. (2007). *Biochemical Engineering Journal*, 37, 34–41.