

# **Título de la Tesis: “Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación.”**

**Doctorado en Ingeniería Química**

**Autor: Foresti, María Laura**

**Director: Dra. María Lujan Ferreira**

## **Resumen**

En la presente Tesis se estudia la inmovilización de lipasas de distintas fuentes en materiales alternativos a los utilizados comercialmente. La actividad y estabilidad de los catalizadores preparados (un total de 12) se ensaya en una reacción de esterificación modelo que es la síntesis de etiloleato sin solventes agregados. El objetivo principal de este estudio es la obtención de catalizadores enzimáticos con actividad comparable a la de las lipasas inmovilizadas disponibles comercialmente, pero a un costo menor. Con este objetivo, las lipasas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Candida antarctica B*, se inmovilizan en polipropileno y quitosano. A fin de identificar las condiciones de operación que maximicen la obtención del éster, para cada catalizador preparado se estudia el efecto del contenido acuoso del medio de reacción, la temperatura y la masa de catalizador agregado, en la actividad catalítica desplegada.

Basándose en los objetivos planteados, la presente Tesis se organiza de la siguiente manera:

En el Capítulo 1 – introductorio – se presentan las características principales de la catálisis enzimática, que explican su papel relevante en el pasado y presente de la humanidad. Asimismo, se introduce la necesidad de la inmovilización de enzimas y se presentan los métodos principales para hacerlo. Seguidamente, se describe la acción catalítica y las aplicaciones de las lipasas, y su utilización en la catálisis de reacciones de esterificación de ácidos grasos. Finalmente, se describen los diversos medios de reacción en los que las lipasas son capaces de llevar a cabo su labor catalítica, haciéndose especial hincapié en los medios sin solventes.

En el Capítulo 2 – Experimental - se detallan los materiales y técnicas utilizados en la preparación de los distintos catalizadores, y en el procedimiento de esterificación y análisis de muestras. Asimismo, previo a la exposición de los resultados experimentales obtenidos, se incluye en este capítulo un exhaustivo análisis de la importancia de una correcta toma de muestra en un sistema de dos fases y con reactivos de alta presión de vapor. La técnica optimizada se utiliza en los capítulos subsiguientes.

En el Capítulo 3 – Síntesis catalizada por lipasas comerciales - se presentan los resultados obtenidos en la síntesis de etiloleato catalizada por cinco catalizadores enzimáticos comerciales, en distintas condiciones de temperatura, masa de catalizador y contenido acuoso. El objetivo de este estudio es disponer de una base de comparación para evaluar la performance de los catalizadores inmovilizados preparados. Entre las lipasas comerciales utilizadas se cuentan las lipasas nativas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Candida antarctica B*, y los catalizadores comerciales inmovilizados Novozym 435 y Lipozyme RM IM, basados en las lipasas de *Candida antarctica B* y *Rhizomucor miehei*, respectivamente.

El Capítulo 4 – Inmovilización y caracterización – comienza con la descripción de las técnicas de inmovilización más populares. Seguidamente, se caracterizan los materiales utilizados como soportes de inmovilización de lipasas en esta Tesis, y se describe el protocolo de inmovilización diseñado, poniendo especial énfasis en la importancia de la selección y pretratamiento de las partículas de soporte a utilizar en la inmovilización. Finalmente, se presenta la caracterización de los catalizadores inmovilizados preparados que resultaron más relevantes en cuanto a su actividad y estabilidad en la síntesis de etiloleato.

## **Título de la Tesis: “Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación.”**

**Doctorado en Ingeniería Química**

**Autor: Foresti, María Laura**

**Director: Dra. María Lujan Ferreira**

En el Capítulo 5 – Cuantificación de lipasa – se describen diversos métodos de determinación cuantitativa de lipasa usualmente utilizados en la literatura, basados en mediciones de UV/Visible, análisis elemental, y ensayo de los catalizadores en reacciones de síntesis y de hidrólisis en condiciones estandarizadas. Las técnicas descriptas se ponen en práctica en la cuantificación del contenido de lipasa de los catalizadores preparados en el Capítulo 4, analizándose su aplicabilidad y limitaciones.

En el Capítulo 6 – Síntesis catalizada por lipasas inmovilizadas en polipropileno - los catalizadores inmovilizados en polipropileno en el Capítulo 4, se utilizan en la catálisis de la síntesis de etiloleato en ausencia de solventes. Con el objeto de maximizar la producción de etiloleato, las condiciones de reacción se varían alternativamente (contenido acuoso en el sistema, temperatura de reacción, masa de catalizador agregado, etc). Los resultados se comparan con los obtenidos en el Capítulo 3 (síntesis catalizada por lipasas comerciales) Con el objeto de incrementar la actividad de los catalizadores inmovilizados en polipropileno, en el Capítulo 7 – Activación de lipasas inmovilizadas en polipropileno – se ponen en práctica numerosos pretratamientos tendientes a la activación de los catalizadores inmovilizados. Seguidamente, los pretratamientos que llevan a los mayores incrementos de actividad, se ensayan en la etapa de inmovilización del catalizador, de manera de obtener un catalizador “activado” directamente del proceso de inmovilización.

En el Capítulo 8 – Síntesis catalizada por lipasas inmovilizadas en quitosano - se finaliza la parte experimental de esta Tesis. El capítulo comienza con un estudio exploratorio sobre el efecto del pretratamiento del quitosano con soluciones de glutaraldehído de diversa concentración en la actividad de las lipasas soportadas. Una vez determinados los catalizadores más activos y estables, los mismos se utilizan en la catálisis de la síntesis de etiloleato en ausencia de solventes. Al igual que en el Capítulo 6, se realiza un estudio paramétrico (contenido acuoso, temperatura, masa de catalizador) tendiente a maximizar la producción de etiloleato mediada por los biocatalizadores inmovilizados en quitosano.

En el Capítulo 9 – Modelado molecular – se presentan algunas de las conclusiones de los estudios de modelado molecular realizados por la Dra. Ferreira que permiten explicar y dar fundamento a numerosas observaciones experimentales. El estudio a nivel molecular de las interacciones lipasa-soporte y lipasa-sustratos, se utiliza como una herramienta adicional para comprender algunos de los fenómenos observados en los capítulos anteriores.

En el Capítulo 10 – Modelado cinético – se procede al modelado del reactor de síntesis de etiloleato. A partir de una expresión cinética ampliamente aceptada en la literatura de esterificaciones enzimáticas, se propone un modelo “bifásico” que sea capaz de representar la síntesis del éster en medios en los que coexisten dos fases líquidas. Los datos cinéticos de los Capítulos 6 y 8 se utilizan en el ajuste de parámetros cinéticos. Con base en estudios previos del equilibrio químico y de fases en sistemas bifásicos, se obtiene un modelo cinético apto para representar la producción enzimática de etiloleato en un medio de reacción en el que coexisten dos fases líquidas

Por último, en el Capítulo 11, se presenta una breve discusión general y se sintetizan las conclusiones más relevantes que pueden extraerse de los estudios realizados en esta Tesis. Por último, se establecen posibles estudios futuros derivados del presente trabajo.

**Título de la Tesis: “Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación.”**

**Doctorado en Ingeniería Química**

**Autor: Foresti, María Laura**

**Director: Dra. María Lujan Ferreira**

**Abstract**

The current Thesis is focused on the immobilization of lipases from different sources on alternative materials. The activity and stability of the prepared catalysts (12), are tested in an esterification model reaction which is the synthesis of ethyl oleate in solvent free medium. The main goal of this study is the obtention of enzymatic catalysts with activity similar to immobilized lipases commercially available, but at a lower cost. With this aim, lipases from *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Candida antarctica B*, are immobilized on polypropylene and chitosan powders. In order to identify the operation conditions that maximize ester production, for every catalyst the effect on catalyst activity of the aqueous content of reaction medium, reaction temperature and catalyst mass, is studied.

Based on the stated objectives, the present Thesis is organized as follows:

In Chapter 1 – introductory – the main characteristics of enzymatic catalysis that justify its importance on human history, are presented. The advantages of enzyme immobilization and the main methods of preparation of immobilized catalysts are summarized. Catalytic action and applications of lipases, particularly in the catalysis of fatty acids esterifications are also analyzed. Finally, different reaction media in which lipases may be catalytically active are described, with special emphasis on solvent free media.

In Chapter 2 - Experimental – materials and methods used in catalysts' preparation, esterification reaction, and samples analysis are described. Also, before the experimental results are presented, this chapter includes an exhaustive analysis of the importance of an adequate method to withdraw samples from two-phase systems with reagents of high vapor pressure. The optimized sampling method is used in the subsequent chapters.

In Chapter 3 – Synthesis catalyzed by commercial lipases – results of ethyl oleate synthesis catalyzed by five commercial enzymatic catalysts in different conditions of temperature, mass of catalyst and water content, are presented. The goal of this study is to have a base of comparison to evaluate the performance of the immobilized catalysts prepared in this Thesis. Among commercial lipases used, native lipases from *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Candida antarctica B*, and the immobilized commercial catalysts Novozym 435 and Lipozyme RM IM –based on lipases from *Candida antarctica B* and *Rhizomucor miehei*- are found.

Chapter 4 – Immobilization and characterization – begins with the description of immobilization methods most widely used. Next, materials used as immobilization supports are characterized, and the immobilization protocole is described, with particular attention devoted to the selection and pretreatment of the particles of support that will be used in the immobilization. Finally, characterization of the immobilized catalysts that showed to be most efficient in ethyl oleate synthesis is presented.

In Chapter 5 – Lipase quantification – several methods commonly used to quantify lipase, based on UV/Visible measurements, elemental analysis, and on the assay of immobilized catalysts in synthetic and hydrolytic reactions in standardized conditions, are described. Afterwards, the mentioned techniques are used in the quantification of lipase

**Título de la Tesis: “Estudio de la actividad catalítica de lipasas inmovilizadas en reacciones de esterificación.”**

**Doctorado en Ingeniería Química**

**Autor: Foresti, María Laura**

**Director: Dra. María Lujan Ferreira**

present in the immobilized catalysts prepared in Chapter 4. The applicability and limitations of the various quantification methods described are analyzed.

In Chapter 6 – Synthesis catalyzed by polypropylene-immobilized lipases – lipases immobilized in polypropylene powder presented in Chapter 4, are used in the catalysis of ethyl oleate synthesis in solvent free medium. With the aim of maximizing ethyl oleate production, reaction operating conditions are varied (aqueous content, temperature, mass of added catalyst). Results are then compared with those obtained in Chapter 3 (Synthesis catalyzed by commercial lipases).

In order to increase the activity of polypropylene-immobilized catalysts described in Chapter 6, in Chapter 7– Activation of lipases immobilized on polypropylene – several pretreatments are assayed. Next, pretreatments that lead to highest activity increments are used at the immobilization step, aiming to get an activated catalyst directly from the immobilization procedure.

In Chapter 8 – Synthesis catalyzed by chitosan-immobilized lipases – the presentation of the experimental results of this Thesis is concluded. Chapter 8 begins with an exploratory study of the effect of the pretreatment of chitosan with glutaraldehyde solutions of diverse concentration on the activity of the supported lipases. Once the most active and stable catalysts were identified, they were used in the catalysis of the synthesis of ethyl oleate in absence of solvents. As in Chapter 6, a parametric study (water content, temperature, mass of catalyst) tending to maximize the production of ethyl oleate achieved with the biocatalysts immobilized in chitosan is presented.

In Chapter 9 – Molecular modeling – some conclusions of molecular modeling studies performed by Dra. Ferreira are presented. These studies allow to explain and justify several experimental findings. The study at the molecular level of lipase-support and lipase-substrate interactions, is used as an additional tool to understand some of the phenomena observed in the previous chapters.

In Chapter 10 – Kinetic modeling – the reactor modeling of ethyl oleate production is presented. With a kinetic expression widely accepted in enzymatic esterification literature, a "two-phase" model that is capable of representing ester synthesis in media in which two liquid phases coexist, is proposed. Fitting of kinetic parameters is performed using kinetic data presented in Chapters 6 and 8. With previous studies of both reaction and phase equilibria as starting point, a kinetic model suitable for representing ethyl oleate production in reaction media in which two liquid phases coexist is obtained.

Finally, in Chapter 11, a brief general discussion and the most important conclusions of the work presented in this Thesis are summarized. Finally, future works derived from the present Thesis are proposed.