

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis Doctoral

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS EN
EMULSIONES O/W. APLICACIÓN A
FORMULACIONES DETERGENTES”**

Miguel García Román

Granada, 2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS EN EMULSIONES
O/W. APLICACIÓN A FORMULACIONES DETERGENTES”**

Dirigida por:

Dra. D^a. Encarnación Jurado Alameda

Dr. D. Fernando Camacho Rubio

Dr. D. Germán Luzón González

Miguel García Román

Granada, 2005

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS EN EMULSIONES O/W. APLICACIÓN A FORMULACIONES DETERGENTES

Memoria que presenta el Ingeniero Químico Miguel García Román para aspirar al grado de Doctor en Ingeniería Química,

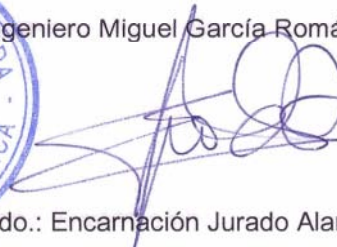
Granada, Septiembre de 2005



Fdo.: Miguel García Román


Dña ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Granada y Directora del Departamento del mismo nombre,

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a formulaciones detergentes" ha sido realizado en este Departamento bajo la dirección de la Dra. Encarnación Jurado Alameda, el Dr. Fernando Camacho Rubio y el Dr. Germán Luzón González, por el Ingeniero Miguel García Román.



Fdo.: Encarnación Jurado Alameda

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dra. D^a. Encarnación Jurado Alameda
catedrática de Ingeniería Química



Dr. D. Fernando Camacho Rubio
Catedrático de Ingeniería Química



Dr. D. Germán Luzón González
Prof. Titular de Ingeniería Química

AGRADECIMIENTOS

A D^ª. Encarnación Jurado Alameda, D. Fernando Camacho Rubio y D. Germán Luzón González, Directores de esta Tesis Doctoral, por su apoyo y disponibilidad continuos, y su acertada dirección que han hecho posible la culminación de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Nela, Alejandro, Juan Francisco, Nadia, Mario, Carlos, Rubén, Mari Carmen y Emilio, que tantos momentos, conversaciones y amistad hemos compartido en este tiempo.

A todos los compañeros del Departamento de Ingeniería Química, por su amabilidad y por prestarme su ayuda siempre que he precisado de ella. En especial a Don Rafael Bailón, por sus siempre interesantes comentarios y sugerencias, y a Rosi y Antonio, por su trato familiar y disponibilidad en todo momento.

A mi familia y amigos, que han vivido de cerca la realización de este trabajo, en sus mejores y peores momentos, y recordando muy especialmente a mi Padre, que aunque no pueda estar aquí, tan feliz se sentirá de ver este trabajo concluido.

A Deisi, por su constante apoyo y cariño, imprescindibles en tantos y tantos momentos.

Finalmente quisiera también agradecer la financiación con la que esta Tesis Doctoral ha podido salir adelante. Concretamente la beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia y los proyectos de investigación 1FD97-0931 y PB98-1293.

A mis padres

A Deisi

INDICE

RESUMEN	1
1. OBJETIVOS	10
2. INTRODUCCIÓN	14
2.1. LAS LIPASAS: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS	15
2.1.1. Definición de lipasa. El fenómeno de la activación interfacial.....	15
2.1.2. Estructura de las lipasas.....	17
2.1.3. Reacciones catalizadas por lipasas.....	18
2.1.4. Especificidad.....	20
2.2. APLICACIONES DE LAS LIPASAS	21
2.2.1. Aplicaciones en hidrólisis.....	22
2.2.2. Aplicaciones en síntesis.....	24
2.3. MÉTODOS PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA	28
2.3.1. Métodos fisicoquímicos.....	29
2.3.2. Métodos inmunológicos.....	33
2.3.3. Elección del método más adecuado.....	33
2.4. ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS	35
2.4.1. Estudios cinéticos en sistemas micelares, monocapas y emulsiones.....	36
2.4.2. Estudios cinéticos en sistemas microacuosos.....	48
2.4.3. Estudios cinéticos en sistemas no dispersos.....	52
2.5. APLICACIÓN DE LAS LIPASAS EN FORMULACIONES DETERGENTES	53
2.5.1. Los detergentes: breve desarrollo histórico.....	53
2.5.2. Principales componentes de las formulaciones detergentes.....	55
2.5.3. Las enzimas como componentes de las formulaciones detergentes.....	57
2.5.4. Desarrollo de las lipasas para detergentes.....	61
2.5.5. Acción de las lipasas en el proceso de lavado.....	65
2.5.6. Perspectivas de futuro de los detergentes enzimáticos.....	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS	75
3.1. ENZIMAS.....	76
3.2. SUSTRATOS.....	77
3.3. TENSIOACTIVOS Y DISPERSANTES.....	78
3.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA.....	80
3.4.1. Reactivos y soluciones utilizadas.....	80
3.4.2. Equipos y material.....	83
3.4.3. Preparación de la emulsión.....	85
3.4.4. Ensayo de actividad.....	86

3.4.5. Cálculo de la actividad enzimática.....	87
3.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD LIPÁSICA.....	87
3.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES POR COLORIMETRÍA....	91
3.4.6. Reactivos.....	91
3.4.7. Equipos y material.....	91
3.4.8. Puesta a punto del método.....	92
3.4.9. Procedimiento experimental.....	95
3.7. EXPERIMENTOS DE DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.....	96
3.7.1. Equipos y material.....	96
3.7.2. Desactivación en condiciones de lavado: procedimiento experimental.	96
3.7.3. Desactivación enzimática con la temperatura en ausencia de agitación: procedimiento experimental.....	97
3.7.4. Desactivación enzimática con la agitación a temperatura ambiente: procedimiento experimental.....	97
3.8. DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE GOTA DE LAS EMULSIONES POR DIFRACCIÓN LÁSER.....	98
3.8.1. Reactivos.....	100
3.8.2. Equipos y material.....	100
3.8.3. Proceso de medida.....	101
3.9. ENSAYOS DE LAVADO.....	104
3.9.1. Reactivos.....	104
3.9.2. Equipos y material.....	105
3.9.3. Procedimiento operatorio.....	106
3.9.4. Análisis espectrofotométrico de la tributirina coloreada.....	107
3.10. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA.....	111
3.10.1. Reactivos.....	112
3.10.2. Equipos y material.....	113
3.10.3. Procedimiento experimental.....	114
3.11. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA DEL PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL.....	118
3.11.1. Reactivos.....	119
3.11.2. Equipos necesarios.....	119
3.11.3. Procedimiento experimental.....	119
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	120
4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIBUTIRINA COMO SUSTRATO.....	122
4.1.1. Influencia de la concentración de enzima.....	123
4.1.2. Influencia de la concentración de sustrato.....	124
4.1.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad	125

lipásica.....	
4.1.4. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	127
4.1.5. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	128
4.1.6. Influencia de los tensioactivos no iónicos Findet 1214N/23, Berol LFG 61 y Glucocon 650 en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.....	129
4.1.7. Influencia del dispersante Cellesh 100 en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.....	131
4.1.8. Influencia de la proteasa Alcalase 2.5L en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.....	132
4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIOLEINA COMO SUSTRATO.....	134
4.2.1. Influencia de la concentración de enzima.....	135
4.2.2. Influencia de la concentración de sustrato.....	136
4.2.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad lipásica.....	137
4.2.4. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	139
4.2.5. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	140
4.2.6. Influencia de la concentración de ácido oleico en la actividad lipásica..	141
4.2.7. Determinación de la actividad lipásica mediante un método colorimétrico.....	142
4.3. ESTUDIO DE LAS EMULSIONES UTILIZADAS PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA MEDIANTE DIFRACCIÓN LÁSER.....	144
4.3.1. Emulsiones de tributirina.....	145
4.3.2. Emulsiones de trioleína.....	147
4.4. ESTABILIDAD Y DESACTIVACIÓN DE LAS LIPASAS ESTUDIADAS.....	148
4.4.1. Estabilidad en condiciones de lavado.....	149
4.4.2. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función de la temperatura.....	158
4.4.3. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función de la velocidad de agitación.....	162
4.4.4. Efecto de la glicina sobre la estabilidad de la enzima Lipolase 100.....	164
4.5. ENSAYOS DE LAVADO.....	168
4.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA CON LIPOLASE 100.....	170
4.6.1. Influencia de la goma arábiga en la hidrólisis de tributirina con Lipolase 100.....	171
4.6.2. Experimentos de hidrólisis a 30°C.....	172
4.6.3. Experimentos de hidrólisis a 40°C.....	180
4.6.4. Experimentos de hidrólisis a 50°C.....	182
4.6.5. Experimentos de hidrólisis a 60°C.....	184
4.7. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS EMULSIONES DURANTE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	185
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	192

5.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIBUTIRINA COMO SUSTRATO.....	193
5.1.1. Influencia de la concentración de enzima.....	194
5.1.2. Influencia de la concentración de sustrato.....	197
5.1.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad.....	198
5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIOLEINA COMO SUSTRATO.....	205
5.2.1. Influencia de la concentración de enzima.....	205
5.2.2. Influencia de la concentración de sustrato.....	208
5.2.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad.....	210
5.2.4. Determinación de la actividad lipásica mediante un método colorimétrico.....	213
5.2.5. Influencia de la concentración de ácido oleico en la emulsión.....	217
5.3. ESTUDIO DE LA DESACTIVACIÓN DE LAS LIPASAS.....	219
5.3.1. Desactivación enzimática en condiciones de lavado.....	220
5.3.2. Estabilidad de la enzima Lipolase 100 a distintas temperaturas.....	226
5.3.3. Estabilidad de la enzima Lipolase 100 en función de la velocidad de agitación.....	228
5.3.4. Efecto protector de la glicina en la estabilidad de las enzimas.....	230
5.4. ESTUDIO DE LA ENZIMA LIPOLASE 100 CON TRIBUTIRINA Y TRIOLEÍNA COMO SUSTRATO.....	233
5.4.1. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	233
5.4.2. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100.....	234
5.4.3. Influencia de los tensioactivos en la estabilidad de la enzima Lipolase 100.....	236
5.4.1. Efecto del agente dispersante Cellesh 100 en la actividad y estabilidad de la enzima.....	238
5.4.2. Efecto de las proteasas en la actividad y estabilidad de la enzima.....	238
5.5. ENSAYOS DE LAVADO.....	240
5.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA EN EMULSIÓN O/W.....	246
5.6.1. Análisis preliminar de los resultados obtenidos.....	246
5.6.2. Mecanismo general del proceso.....	259
5.6.3. Concentración de enlaces éster superficiales.....	260
5.7. DESARROLLO DE MODELOS CINÉTICOS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA EN EMULSIÓN.....	263
5.7.1. Modelo cinético simplificado.....	263
5.7.2. Modelo cinético con saturación interfacial.....	276
5.8. INFLUENCIA DE LOS TENSIOACTIVOS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA.....	299
6. CONCLUSIONES.....	308
NOMENCLATURA	316

ÍNDICE

ANEXOS	321
Anexo I.....	322
Anexo II.....	324
Anexo III.....	327
Anexo IV.....	328
Anexo V.....	329
BIBLIOGRAFÍA	330

RESUMEN

La necesidad de emplear componentes respetuosos con el medio ambiente y con eficacia detergente a bajas temperaturas ha convertido a las enzimas en un ingrediente imprescindible en las formulaciones detergentes. Las lipasas (E.C. 3.1.1.3), capaces de facilitar la eliminación de la suciedad de naturaleza oleosa, son idóneas para este tipo de productos, a pesar de lo cual su uso no está tan extendido como el de proteasas y celulasas, especialmente en los productos para limpieza de superficies duras.

En el presente trabajo se han analizado las propiedades de tres lipasas comerciales de cara a su incorporación en formulaciones detergentes para superficies duras. Las lipasas utilizadas han sido la Lipolase® 100 (L100), la LipoPrime® 50T (LP50), ambas desarrolladas para aplicación en detergentes, y la Novozym® 388 (Nz388), adecuada para aplicaciones de síntesis, todas ellas de la casa Novozymes A/S. También se han llevado a cabo ensayos de lavado de superficies duras con la enzima L100 en un dispositivo de flujo continuo. Por último, el mecanismo de hidrólisis enzimática de tributirina en emulsión O/W mediante la enzima L100 ha sido estudiado.

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS LIPASAS L100, LP50 Y Nz388.

En primer lugar se estudió la actividad de las tres lipasas utilizando dos triglicéridos diferentes como sustrato: uno de cadena corta, tributirina, y otro de cadena larga, trioleína, previamente emulsificados. Para la medida de la actividad se empleó el método del pHstato, basado en la valoración continua de los ácidos grasos liberados en el transcurso de la hidrólisis. La actividad de las tres enzimas, independientemente del sustrato, sigue la siguiente relación:

$$\text{Actividad (L100)} > \text{Actividad (LP50)} > \text{Actividad (Nz388)}$$

Por otro lado, si se comparan los valores de actividad obtenidos con cada sustrato, se observa que las tres enzimas ensayadas resultan más activas sobre tributirina que sobre trioleína. Además en todos los casos la cinética de la hidrólisis de trioleína resulta ser no lineal, lo que parece deberse al efecto inhibitorio del ácido oleico sobre la lipólisis, que se hace más acentuado al aumentar el pH. Este resultado se confirmó al determinar la actividad de la enzima L100 sobre trioleína mediante un método espectrofotométrico, el cual, a diferencia del método del pHstato, es capaz de detectar la totalidad del ácido oleico liberado durante la hidrólisis a valores de pH inferiores a 9.0.

Dado que la lipólisis enzimática en emulsión O/W es una reacción heterogénea en la que la enzima, al ser soluble, sólo tiene acceso a las moléculas de sustrato

situadas en la superficie de las gotas de la fase dispersa, el área interfacial específica de la emulsión es un parámetro crítico en este tipo de sistemas, como la concentración de sustrato lo es en los sistemas homogéneos. Por ello se ha estudiado, utilizando la enzima L100, la influencia de la fracción volumétrica de sustrato, de la técnica de emulsificación empleada (ultrasonidos ó dispersión mecánica a 13000 rpm) y de la estabilidad de la emulsión, en la actividad lipásica. La distribución de tamaños de gota de las emulsiones preparadas ha sido determinada por difracción láser, lo que ha permitido calcular su área interfacial específica.

La actividad de la enzima L100 no aumentó cuando la fracción volumétrica de tributirina o trioleína en la emulsión se incrementó de 0.01 a 0.02. El empleo de ultrasonidos, aunque consigue emulsiones de menor polidispersidad y de mayor área interfacial específica, no supone tampoco un incremento en los valores de actividad, que, en el caso de la tributirina, incluso disminuyen ligeramente. La estabilidad de las emulsiones preparadas por ambas técnicas es elevada, no sufriendo variación del diámetro medio de gota durante al menos 4 horas, por lo que pueden ser utilizadas para la medida de la actividad durante dicho periodo. En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que emulsiones con fracción volumétrica de tributirina o trioleína de 0.01 y obtenidas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.) resultan adecuadas para la medida de la actividad lipásica, durante 4 horas como mínimo.

Se realizaron también ensayos de desactivación en los que las tres enzimas estudiadas fueron sometidas a agitación constante (1000 rpm) a tres temperaturas diferentes (30, 40 y 50°C). En todos los casos la desactivación responde a un modelo parcial de primer orden, y es independiente de la temperatura, lo cual permite calcular una constante de desactivación única para cada enzima, a las tres temperaturas. El valor de dicha constante es mayor para la L100 ($k_d=0.034 \text{ min}^{-1}$) que para las otras dos enzimas (0.017 min^{-1} para LP50 y 0.030 min^{-1} para Nz388). A pesar de ello la enzima L100, al presentar una actividad inicial considerablemente mayor, resulta favorecida respecto a las demás de cara a su empleo como aditivo para detergentes. Por esta razón se estudiaron sus propiedades en mayor detalle.

En primer lugar se llevaron a cabo experimentos de desactivación con la temperatura, en ausencia de agitación y con la agitación a temperatura ambiente, para decidir cual de los dos factores es el responsable de la desactivación de la enzima L100.

La desactivación con la temperatura sigue un modelo de orden 0 y no resulta apreciable a 30°C. En cuanto al efecto de la velocidad de agitación, la desactivación

se ajusta a un modelo de parcial de primer orden, aumentando la constante de desactivación con la velocidad de agitación, parámetro del que la actividad residual no parece depender. En base a este resultado se llega a la conclusión de que la agitación promueve la desactivación al facilitar el intercambio de la enzima entre el seno de la fase acuosa y la interfase aire-agua, donde se desnaturaliza por efecto de la tensión superficial.

A continuación y utilizando también la enzima L100 se ha determinado la influencia de las siguientes variables, todas ellas relevantes de cara a su desempeño en condiciones de lavado, en la actividad de la misma:

- Temperatura: La actividad máxima se da en el intervalo de 40 a 50°C con ambos sustratos. Sin embargo la temperatura no afecta de forma decisiva a la acción de la enzima, que sólo aumenta un 12% al pasar de 30 a 40°C.
- pH: Cuando se utiliza tributirina como sustrato la actividad máxima se alcanza a pH 10.0. Con la trioleína el máximo se da a pH 7.5, decreciendo la actividad bruscamente a continuación, lo que parece relacionado con la inhibición provocada por el ácido oleico.
- Presencia de tensioactivos y dispersantes: Se incubó la enzima y el sustrato durante una hora en presencia de diferentes concentraciones de tres tensioactivos no iónicos comerciales: un alcohol graso etoxilado, Findet 1214N/23 (F1214N/23), un alquilpoliglucósido, GlucoPON 650 (G650) y una mezcla de ambos tipos, Berol LFG 61 (BRL61). En todos los casos la actividad disminuye con la concentración del tensioactivo, de forma total para el F1214N/23 y poco acentuada con el BRL61. La disminución observada con el F1214N/23 y el G650 parece deberse a la interacción de enzima y tensioactivo en la superficie de las gotas del sustrato. Similares resultados se obtienen al incubar enzima y sustrato en presencia del agente dispersante comercial Cellesh 100 (homopolímero del ácido acrílico).
- Presencia de proteasas: Se empleó la proteasa Alcalase® 2.5L (AL2.5) de Novozymes A/S. La actividad de la enzima L100 en presencia de 1.0 g/L de AL2.5 resulta superior que en su ausencia lo que se atribuye a una cierta capacidad lipolítica o al menos esterásica de la proteasa. Cuando la enzima L100 (0.1 g/L) fue incubada durante 5 días en presencia de la AL2.5 (1.0 g/L) se aprecia que al final del periodo de almacenamiento la actividad lipásica se ha reducido en un 80%.

ENSAYOS DE LAVADO

En la siguiente fase de la experimentación se han llevado a cabo ensayos de lavado en un dispositivo de flujo continuo, desarrollado por Jurado-Alameda et al. (2003), el cual permite medir la eficacia detergente de formulaciones detergentes sobre superficies duras.

En nuestro caso se han utilizado cuatro soluciones de limpieza: (1) Tampón fosfato, usada como control; (2) Enzima L100 (0.1 g/L); (3) Tensioactivo aniónico (sal sódica del ácido dodecylbencenosulfónico, LAS) (0.1 g/L) y (4) L100 (0.1 g/L) + LAS (0.1 g/L). La suciedad utilizada fue tributirina coloreada con un colorante específico para permitir su determinación espectrofotométrica.

Los resultados obtenidos muestran que la incorporación de la enzima, incluso en ausencia del tensioactivo, mejora el arrastre de la tributirina desde el sustrato hasta el baño de lavado con respecto al ensayo control, suponiendo un incremento en la detergencia máxima alcanzada de un 42%. Por otro lado la presencia de la enzima trae consigo una más eficaz dispersión de la tributirina en el baño de lavado, lo que reduce la redeposición de la suciedad eliminada del sustrato en las superficies del sistema.

Los ensayos en presencia de tensioactivo (LAS) permitieron obtener altos valores de detergencia, por lo que no fue posible apreciar diferencias significativas debidas a la incorporación de la enzima junto con el tensioactivo.

Se siguió también la evolución de la hidrólisis durante el lavado en presencia de enzima mediante el método del pHstato. La conversión a los 20 minutos fue de 0.165 y 0.175 en ausencia o en presencia de LAS, respectivamente. Este valor es inferior al alcanzado en los ensayos de hidrólisis en condiciones similares, probablemente debido a la menor área interfacial disponible.

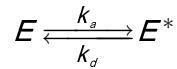
ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA EN EMULSIÓN O/W

Como fase final de la presente investigación se estudió el mecanismo de hidrólisis de la tributirina en emulsión O/W, y se desarrollaron modelos cinéticos adecuados al mismo. El dispositivo utilizado consistió en un reactor discontinuo agitado (700 rpm), y los experimentos se llevaron a cabo a cuatro temperaturas diferentes (30, 40, 50 y 60°C), modificando en cada caso la concentración de enzima y sustrato (fracción volumétrica de tributirina). La distribución de tamaño de gota de las

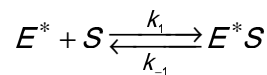
emulsiones empleadas en los experimentos se determinó al principio y al final (20 minutos) de los mismos, lo que permitió calcular en ambos instantes su área interfacial específica.

Para explicar los resultados experimentales obtenidos se han desarrollado dos modelos cinéticos basados en el mismo mecanismo de reacción, que consta de las tres etapas siguientes:

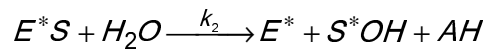
- 1) Adsorción de la enzima en la interfase fase acuosa – fase orgánica:



- 2) Unión de la enzima a un enlace éster hidrolizable superficial y formación del complejo enzima-sustrato:



- 3) Hidrólisis y separación del intermedio formado en los productos y liberación de la enzima activada:



Para el **primer modelo** cinético se considera que la cantidad de enzima adsorbida en la interfase es proporcional a la que existe en la fase acuosa y se encuentra en equilibrio con ésta. La concentración molar de enlaces éster superficiales e hidrolizables se calcula a partir de la fracción de tributirina y del diámetro medio de gota de la emulsión. Cuando la concentración molar de enzima es inferior a la de enlaces éster superficiales, que es lo que ocurre en las condiciones experimentales utilizadas, se llega a la siguiente expresión de la velocidad inicial de reacción:

$$r_0 = \frac{k_2 e_0 c_{S0}}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) + c_{S0}}$$

La ecuación anterior reproduce adecuadamente los resultados experimentales para concentraciones de enzima inferiores a 0.125 g/L y fracciones volumétricas de tributirina iguales o mayores que 0.009, con una desviación relativa inferior al 5%. Fuera de este intervalo se aprecia un fenómeno de saturación con la enzima que la ecuación obtenida no predice.

La aplicación del modelo en su intervalo de aplicabilidad a las diferentes temperaturas ensayadas permite conocer la variación de la constante cinética

elemental k_2 con la temperatura, y obtener por tanto la energía de activación aparente de la hidrólisis enzimática, que resulta 1.2 Kcal/mol, similar a los valores existentes en bibliografía.

Para poder ajustar satisfactoriamente la totalidad de los datos experimentales se ha desarrollado un **segundo modelo** cinético, considerando que la adsorción de la enzima en la interfase responde a una isoterma de Langmuir, de forma que la velocidad de adsorción de enzima será proporcional a la cantidad de enzima libre en la fase acuosa y también al área interfacial libre. Introduciendo esta modificación se llega a la expresión siguiente para la velocidad inicial de reacción, en la que a_T (cm²/L) representa el área interfacial específica total y A_m (cm²/mol) representa el área ocupada por un mol de enzima:

$$r_0 = \frac{k_{ap} e_0}{2 \left(1 + \frac{K_{ap} a_T^2}{\left(\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \sqrt{\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + \frac{4}{K_{ap} a_T^2}} \right)} \right)}$$

La expresión anterior predice adecuadamente todas las velocidades iniciales obtenidas experimentalmente, a las diferentes temperaturas, con una desviación relativa inferior al 5%.

Por esta razón se ha aplicado este segundo modelo para predecir el progreso de la reacción en el tiempo, para lo cual se ha tenido en cuenta que la enzima es 1,3 específica y se ha admitido que durante la primera etapa de la hidrólisis, hasta conversiones del orden de 0.30, no se produce monoglicérido. Además se ha supuesto que la composición de la gota es uniforme entre el seno y la superficie y que su tamaño apenas varía durante la hidrólisis.

Haciendo estas suposiciones se consigue una buena correlación del progreso experimental de la reacción con el teórico cuando se usan bajas concentraciones de enzima. Sin embargo para altas concentraciones de enzima el modelo predice un progreso de la reacción más rápido que el observado en la práctica.

Varias hipótesis se han propuesto para explicar la desviación observada entre los valores predichos por el modelo y los experimentales, llegándose a la conclusión de que posiblemente a altas concentraciones de enzima el diglicérido tiende a acumularse en la superficie de la gota debido a que su velocidad de difusión hacia el interior de la misma no es suficiente. Una aproximación empírica para contemplar este

fenómeno ha sido introducida en el modelo, lo que ha permitido obtener una buena concordancia entre los datos experimentales y los predichos para valores de la conversión inferiores a 0.25.

A partir del ajuste de los datos correspondientes al progreso de la reacción con el tiempo se ha determinado la constante catalítica k_2 y la constante de equilibrio de adsorción de la enzima, K_e , en función de la temperatura. Ajustando dicha variación a las ecuaciones de Arrhenius y Van't Hoff respectivamente se ha determinado la energía de activación de la reacción enzimática (2.4 Kcal/mol) y el calor de adsorción de la enzima (-9.3 Kcal/mol). Este último es superior al de una adsorción física, lo cual implica que la adsorción de la enzima debe implicar algún cambio conformacional de la misma, hecho que actualmente se encuentra plenamente admitido.

Por último se estudió la influencia de los tensioactivos en el mecanismo de hidrólisis enzimática de tributirina. Para ello se emplearon tres tensioactivos no iónicos, Findet 1214N/16 (F1214N/16), F1214N/23 y G650, y uno aniónico, LAS. Los tensioactivos se incubaron con el sustrato, ya emulsificado, previamente a la adición de la enzima.

En el caso del LAS se produce una disminución brusca de la velocidad inicial de hidrólisis, a bajas concentraciones de tensioactivo, recuperándose la velocidad a valores mayores, si bien manteniendo una tendencia decreciente.

Para el F1214N/16 y el G650 el descenso de la velocidad inicial de reacción es suave para concentraciones bajas de tensioactivo (50 mg/L), experimentando a continuación una caída brusca, de forma que para 150 mg/L de tensioactivo la velocidad inicial es prácticamente nula en ambos casos. Con el F1214N/23 no se registró actividad lipásica alguna en el rango de concentraciones de tensioactivo ensayadas.

El descenso de la velocidad inicial en presencia de tensioactivos no iónicos se achaca a la disminución del área interfacial disponible debido a la adsorción del tensioactivo, lo cual ha sido interpretado cuantitativamente con ayuda del segundo modelo cinético propuesto.

Los resultados obtenidos han permitido profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas lipolíticas en sistemas de lavado, las ventajas que éstas aportan y su interacción con diferentes sustancias presentes en los mismos. El modelo cinético propuesto para la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsiones O/W es de interés tanto para la aplicación de las lipasas en formulaciones detergentes

como en aquellas otras aplicaciones que exploten su capacidad hidrolítica, tales como producción de ácidos grasos libres, depuración de efluentes ricos en grasas, etc.

1. OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los proyectos de investigación “Formulaciones de detergentes líquidos específicos para el sector industrial agroalimentario y hostelería” (1FD97-0931), “Preparaciones enzimáticas para la degradación de residuos alimentarios” (PB98-1293) y “Formulaciones específicas de detergentes biodegradables de base enzimática” (Plan Andaluz de investigación, 2003-2004), proyectos realizados en los grupos de investigación de la Junta de Andalucía “Tensioactivos, enzimas y emulsiones” (TEP-212) e “Ingeniería de interfases y tecnología bioquímica” (RNM-332).

La línea fundamental de estos proyectos va dirigida a desarrollar formulaciones de detergentes líquidos industriales, de base enzimática, específicas para diferentes suciedades alimentarias, que sean eficaces, y con las que se eviten o atenúen los efectos nocivos medioambientales y sanitarios derivados del vertido de estos productos a la red fluvial. De la misma forma se pretende una reducción de los costes energéticos mediante la disminución de la temperatura de lavado con dichas formulaciones así como su actuación a pH neutro.

El empleo de enzimas en las formulaciones detergentes, además de su probada eficacia, puede aportar una serie de ventajas como son

- Ahorro de energía al hacer posible lavar a temperaturas mas bajas,
- La reducción o sustitución de otros componentes más nocivos desde el punto de vista medioambiental,
- Son biodegradables, y no presentan riesgos para la vida acuática, además de que no afectan negativamente a los tratamientos de depuración de aguas residuales y pueden ser eliminadas fácilmente.

La incorporación de enzimas lipasas a formulaciones detergentes para el lavado de suciedades grasas, es por tanto uno de los principales objetivos perseguidos.

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3), son enzimas que catalizan preferentemente la hidrólisis de triacilglicéridos hasta ácidos grasos libres y alcoholes, además de otras reacciones que implican ésteres carboxílicos tales como esterificación, acidólisis, interesterificación y alcoholólisis.

Las aplicaciones prácticas de las lipasas son numerosas en cuanto se utilizan para el tratamiento y modificación de grasas y aceites, dando lugar a productos de gran utilidad en alimentación: ácidos grasos libres, ésteres etílicos y triglicéridos para dietas especiales así como monoglicéridos de utilidad como emulgentes. Además

también son empleadas para la obtención de productos farmacéuticos, cosméticos, detergentes, y otros materiales sintéticos orgánicos.

Una de las aplicaciones más importantes de las lipasas es su incorporación a formulaciones de limpieza fundamentalmente de textiles, con objeto de facilitar la eliminación de suciedades de naturaleza grasa tales como sebo, mantequilla, manteca de cerdo, etc. También en la industria láctea las lipasas se usan en la limpieza de membranas e instalaciones.

Sin embargo el uso de las lipasas en formulaciones de limpieza para superficies duras todavía no está generalizado debido fundamentalmente a problemas relacionados con la precipitación de sales cálcicas de los ácidos grasos. Otros problemas importantes que encuentra la industria de detergentes para la incorporación de las lipasas son: (1) la alta variación en el contenido de triglicéridos de las grasas, lo que requiere lipasas con baja especificidad de sustrato, (2) las condiciones duras de lavado (pH =10 – 11; temperaturas de 40 – 60°C) que requieren enzimas estables, y (3) la posible desnaturalización o degradación de las enzimas causada por algunos componentes de los detergentes. Además la presencia conjunta de lipasas y proteasas puede afectar a la estabilidad de las primeras.

La hidrólisis de triglicéridos mediante lipasas constituye un ejemplo característico de una reacción enzimática en fase heterogénea. En este trabajo la hidrólisis enzimática se realiza en emulsiones O/W, esta forma de actuación, aunque más compleja que otros sistemas, es la más adecuada de cara a la aplicación práctica de los resultados, que puedan ser obtenidos, a la acción de las lipasas como componentes de formulaciones detergentes.

Por tanto el desarrollo de formulaciones detergentes que contengan lipasas requiere una profunda investigación que contemple los siguientes aspectos:

- Analizar las características y estabilidad de las emulsiones utilizadas para la hidrólisis enzimática de triglicéridos, y su influencia en dicha reacción.
- Profundizar en el conocimiento del mecanismo de las reacciones de hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsión acuosa, mecanismos sobre los que la bibliografía disponible no es abundante.
- Estudiar el efecto que sobre la actividad y estabilidad de las lipasas ejercen distintos componentes de las formulaciones detergentes como tensioactivos, dispersantes y enzimas proteolíticas.

- Analizar la eficacia detergente de formulaciones tensioactivas que incorporan lipasas.

Todo esto ha llevado a que en la realización de la presente Tesis Doctoral se planteen los siguientes objetivos:

- 1º) Puesta a punto del método de medida de la actividad lipásica, estudiando la influencia de distintas variables, tales como concentración de enzima y sustrato, forma de preparación de la emulsión y la estabilidad de la misma, en la medida de la actividad.
- 2º) Comparación de la actividad de diferentes lipasas comerciales sobre dos triglicéridos diferentes, uno de cadena corta y otro de cadena larga.
- 3º) Estudio de la estabilidad de las lipasas frente a posibles agentes que puedan provocar su desnaturalización como temperatura, agitación mecánica, así como en presencia de tensioactivos, agentes dispersantes y proteasas.
- 4º) Realización de ensayos de lavado para comprobar la eficacia detergente de formulaciones detergentes con lipasas, para la limpieza de superficies duras y suciedades grasas.
- 5º) Desarrollo de modelos cinéticos para la hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsión acuosa O/W.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LAS LIPASAS: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS.

2.1.1. Definición de lipasa. El fenómeno de la activación interfacial.

De acuerdo con la definición de la Comisión de Enzimas de la IUPAC las lipasas (EC 3.1.1.3) son triacilglicerol éster hidrolasas, es decir, enzimas que catalizan de forma natural la hidrólisis de triacilglicéridos. Están presentes en la práctica totalidad de los organismos vivos, desde los microorganismos a los animales superiores, siendo imprescindibles para la asimilación de los lípidos así como también para el almacenamiento y posterior utilización de las grasas que sirven de reserva energética.

Identificadas por primera vez por el microbiólogo C. Eijkmann a principios del siglo XX, sus particulares características fueron ya apuntadas por Schonheyder y Volqvartz (1945), siendo Sarda y Desnuelle (1958) los primeros en estudiarlas en profundidad, definiéndolas en términos cinéticos. Estos últimos investigadores comprobaron que la lipasa pancreática, a diferencia de otras esterases, era especialmente activa cuando el sustrato (emplearon triacetina, un triglicérido parcialmente soluble en agua) se encontraba en forma de emulsión, siendo su actividad escasa o nula sobre el sustrato disuelto (forma monomérica). A este fenómeno, que ya había sido observado con anterioridad, lo denominaron “activación interfacial”, y durante mucho tiempo ha sido considerado como una característica distintiva de las verdaderas lipasas frente a las esterases, las cuales actúan sobre ésteres disueltos.

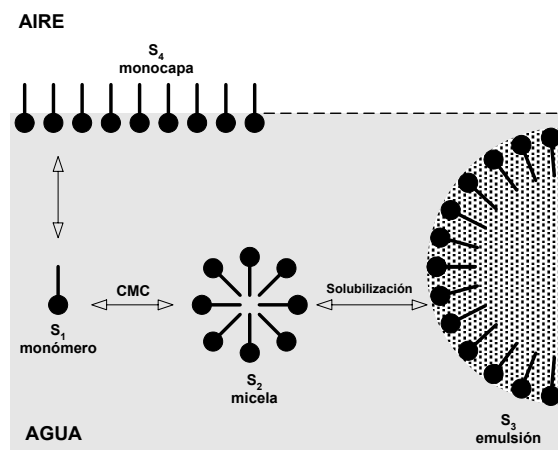


Figura 2.1. Estados de agregación de moléculas de ésteres carboxílicos en medio acuoso: monómeros (S₁), micelas (S₂), emulsión (S₃) y monocapa (S₄). Todas las formas coexisten en equilibrio y constituyen potenciales sustratos (S₁) o supersustratos (S₂, S₃, S₄) para las esterases/lipasas. (reproducido de Ferrato et al., 1997)

Por otro lado Entressangles y Desnuelle (1968) encontraron que la lipasa pancreática no sólo es capaz de actuar sobre sustratos emulsificados, sino también sobre

agregados del sustrato de menor tamaño, tales como micelas, en sistemas isotrópicos. Además hallaron que la velocidad máxima de hidrólisis de triacetina y tripropionina era similar sobre agregados que sobre partículas de estos sustratos. En la Figura 2.1 se representan de forma esquemática los diferentes estados de agregación de moléculas de un éster carboxílico en sistemas acuosos, que son susceptibles de constituir sustratos para esterasas y/o lipasas.

Desnuelle et al. (1960) propusieron que un cambio conformacional de la lipasa estaría asociado al fenómeno de la activación interfacial. Brady et al. (1990), al obtener por primera vez la estructura tridimensional de una lipasa (la de *Mucor miehei*), descubrieron la presencia de un bucle anfifílico en la superficie de la proteína, que cubre el centro activo de la enzima cuando ésta se encuentra en solución acuosa, impidiendo de esa forma el acceso al mismo. Este bucle se conoce como “lid”, palabra inglesa que significa “tapadera”. Estos mismos autores proponen que en la conformación activa de la enzima, dicho bucle anfifílico sufre un reajuste como resultado del cual el centro activo se torna accesible, de lo cual se tienen también evidencias cristalográficas.

Otros investigadores, han encontrado evidencias indirectas de dicho reajuste. Así Stobiecka et al. (1998) registran una variación en la fluorescencia del residuo triptófano-89, situado en el “lid” de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, cuando la enzima pasa de la conformación cerrada (centro activo oculto) a la abierta (centro activo expuesto). Dicha variación se relaciona, según estos autores, con la mayor accesibilidad de dicho residuo debida a la activación interfacial, lo que pone de manifiesto el desplazamiento del “lid”. Neves-Petersen et al. (2001) estudiaron la distribución de aminoácidos polares, débilmente polares y apolares en la superficie de diversas lipasas en función del pH, observando que la región cercana al centro activo es más hidrofóbica cuando las enzimas se encuentran en su conformación abierta.

A pesar de las evidencias tanto estructurales como funcionales a favor del fenómeno de la activación interfacial, lo que parece no resultar tan concluyente es la distinción entre lipasas y esterasas en base a dicho fenómeno. Actualmente se dispone de datos bioquímicos y estructurales de algunas lipasas (como las de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida antarctica B*) que no presentan activación interfacial, es decir son capaces de hidrolizar ésteres disueltos, a pesar de disponer todas ellas de un bucle anfifílico cubriendo su centro activo. Dado que la hidrólisis de sustratos monoméricos por parte de estas enzimas implica la accesibilidad del centro activo sin previa activación interfacial, parece que dicho fenómeno se halla relacionado con los

tiempos de vida respectivos de las formas abiertas y cerradas de las lipasas (Ferrato et al., 1997).

2.1.2. Estructura de las lipasas.

Actualmente se conoce la estructura tridimensional de un gran número de lipasas (Brady et al., 1990; Derewenda et al., 1992a; Derewenda et al., 1994; Lawson et al. 1994) que tienen características estructurales comunes, a pesar de las diferencias en su tamaño, origen y secuencia de aminoácidos. Todas ellas presentan conformaciones del tipo α/β con una lámina β central, compuesta por al menos cinco filamentos paralelos (Schrag y Cygler, 1997). Secuencias peptídicas α -helicoidales flanquean la lámina β central por ambas caras. En la Figura 2.2 se muestra una representación esquemática de la conformación α/β propia de las lipasas.

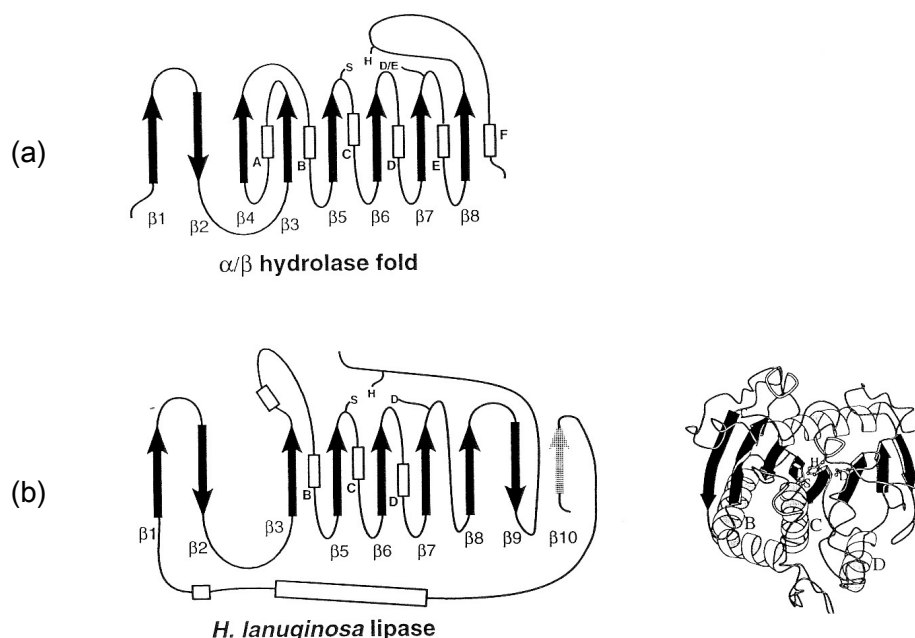


Figura 2.2. (a) Representación esquemática de la conformación canónica α/β que presentan todas las lipasas de estructura tridimensional conocida; (b) Representación esquemática y tridimensional de la estructura de la lipasa de *Humicola lanuginosa*. Cada uno de los filamentos de la lámina β se designa por un número mientras que los tramos correspondientes a hélices α se nombran con una letra. Las letras S, H y D/E indican la localización de los residuos catalíticos: S: Serina; H: Histidina; D/E: Ácido Aspártico/Glutámico (Schrag y Cygler, 1997).

En cuanto al centro activo de estas enzimas, está constituido por la tríada Ser...His...Asp (donde Ser representa al aminoácido serina, His a la histidina y Asp al ácido aspártico). Dicha tríada catalítica está presente en la práctica totalidad de las lipasas (aunque en algunas de ellas el ácido aspártico es sustituido por el glutámico), y es análoga a la encontrada en las serin-proteasas. La pérdida de actividad que se deriva de

la unión del aminoácido serina a un agente inhibidor, revela que dicho aminoácido resulta crucial en la acción catalítica de la enzima (Brady et al., 1990).

En la conformación cerrada e inactiva de la enzima, tanto el centro activo como la zona contigua, involucrada en la unión con el sustrato, se hallan cubiertas por un bucle anfifílico (“lid”). El “lid”, en presencia de una interfase lípido/agua, es capaz de desplazarse de su posición original, dejando expuesto al centro activo y permitiendo la interacción entre la enzima y el sustrato (Derewenda et al., 1992b). El movimiento del “lid” no sólo permite el acceso al centro activo de la enzima, sino que también expone una gran superficie hidrofóbica, al tiempo que parte de la superficie hidrofílica previamente expuesta queda cubierta (Cygler y Schrag, 1997).

2.1.3. Reacciones catalizadas por lipasas.

Como corresponde a su función biológica las lipasas catalizan de forma natural la hidrólisis de ésteres, especialmente triacilglicéridos de cadena larga, para dar monoacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol. Sin embargo son también capaces de catalizar la reacción inversa, es decir esterificación y transesterificación, en ambientes microacuosos. El equilibrio entre la reacción directa (hidrólisis) y la inversa (síntesis) está determinado por la actividad del agua en el medio de reacción.

La reacción de transesterificación puede a su vez clasificarse en alcoholólisis, acidólisis e interesterificación, en función de que tenga lugar entre un éster y un alcohol, un éster y un ácido carboxílico o dos ésteres, respectivamente (Camacho-Páez, 2000; González-Moreno, 2002). En la Tabla 2.1 se resumen de forma esquemática las reacciones catalizadas por lipasas, de forma general y también con un triglicérido como sustrato.

Tabla 2.1. Diferentes reacciones catalizadas por lipasas en sistemas acuosos y no acuosos (los puntos suspensivos indican que la reacción puede proseguir con el resto de grupos de la glicerina).

HIDRÓLISIS: Es la descomposición de un éster en su ácido y alcohol constituyente en presencia de agua.

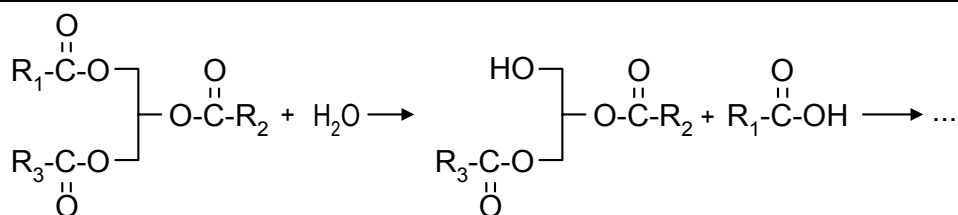
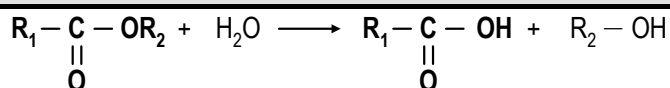
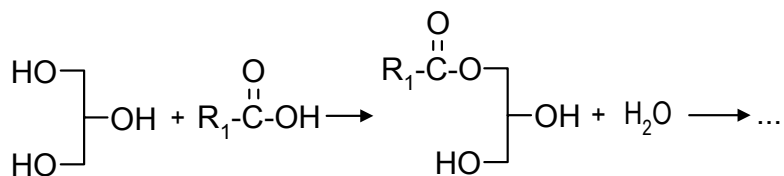
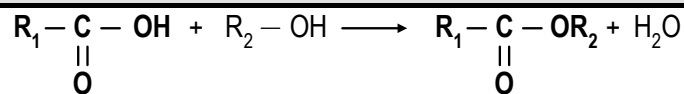
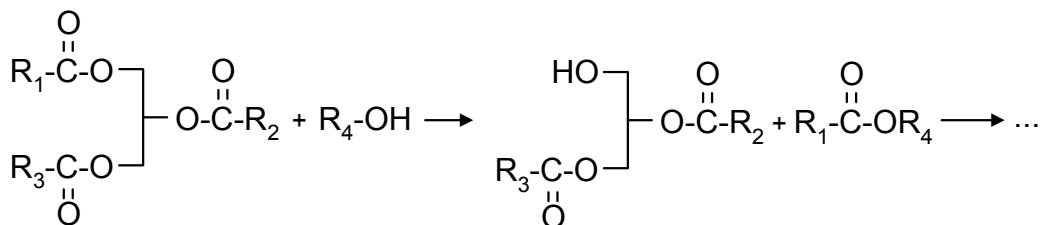
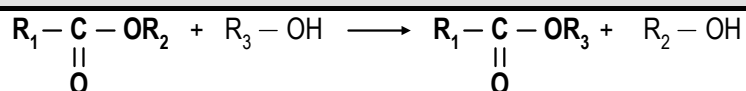


Tabla 2.1 Continuación

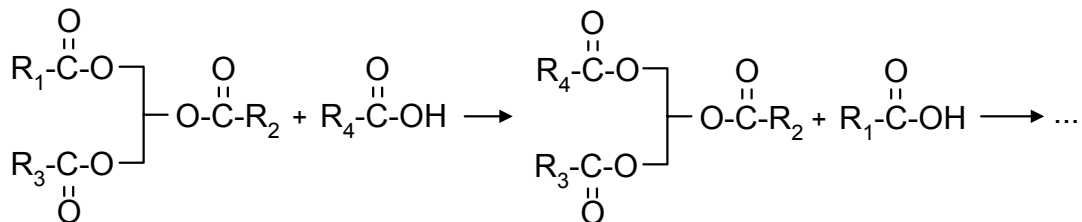
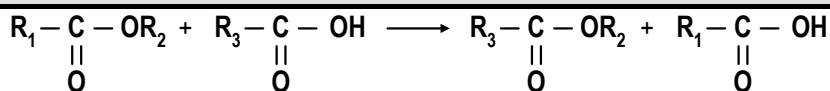
ESTERIFICACIÓN: Es la reacción entre un ácido carboxílico y un alcohol para dar un éster.



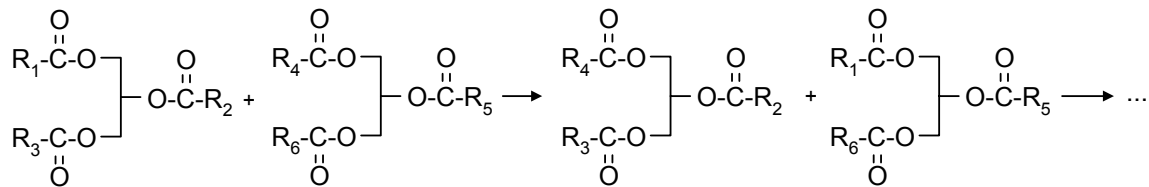
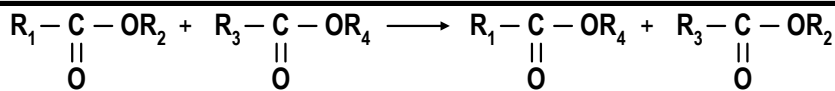
ALCOHÓLISIS: Es la reacción entre un éster y un alcohol produciéndose la sustitución de un grupo alquilo del éster por otro.



ACIDÓLISIS: Es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico, que transcurre con el reemplazo del grupo acilo del éster por el del ácido libre.



INTERESTERIFICACIÓN: Es la reacción entre dos ésteres que intercambian sus grupos acilo.



Además de estas reacciones las lipasas pueden actuar en otras más inusuales, que implican la utilización de sustancias distintas del agua y de los alcoholes como nucleófilos. Entre ellas se encuentra la aminólisis (reacción de un éster con una amina primaria para dar una amida y un alcohol) y la tiotransesterificación (reacción entre un éster y un tiol, en vez de un alcohol, como nucleófilo) (Klivanov, 2001).

Cabe destacar que la actividad de las lipasas suele ser distinta para cada una de las diferentes reacciones que pueden catalizar (Camacho-Páez, 2000).

2.1.4. Especificidad.

La capacidad de las lipasas para actuar de forma selectiva sobre diferentes sustratos viene determinada por las propiedades de la enzima a nivel molecular, la estructura del sustrato y en definitiva por los factores que afecten a la unión enzima – sustrato (Jensen et al., 1983).

En general se distinguen los siguientes tipos de especificidad:

- a) Especificidad posicional o regioespecificidad: Se define como la capacidad de la lipasa para discriminar entre las posiciones externas (1 y 3) y la posición interna (2) del esqueleto de los triglicéridos. Así se puede hablar de lipasas específicas sn-1,3 o específicas sn-2, aunque también existen algunas lipasas no específicas, tales como las de *Candida rugosa* y *Chromobacterium viscosum*. La especificidad sn-1,3 la presenta la lipasa pancreática así como las procedentes de *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, y *Thermomyces* (anteriormente *Humicola*) *lanuginosus*, entre otras (Xu, 2000). Por su parte la especificidad sn-2 resulta muy inusual, habiendo sido descrita para la lipasa de *Geotrichum candidum* (Jensen et al., 1983), si bien esta capacidad parece responder a una preferencia por los ácidos grasos cis-9 insaturados independientemente de su posición.
- b) Especificidad respecto del ácido graso o acilespecificidad: La mayoría de las lipasas son selectivas respecto de un ácido, o más bien, una clase de ácidos grasos, con longitudes de cadena y grados de insaturación definidos. La acilespecificidad viene determinada por la adecuada acomodación de la cadena carbonada del ácido graso en el centro activo de la enzima. Así, la presencia de ramificaciones o insaturaciones y su posición, influye en la actividad lipásica (Miller et al., 1988). En cuanto a la longitud de la cadena algunas lipasas no presentan marcada especificidad por una longitud determinada (*Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus*), mientras que otras hidrolizan más rápidamente ácidos grasos de cadena corta (*Mucor miehei*,

lipasa pancreática) o media-larga (*Rhizopus delemar*, *Pseudomonas fluorescens*) (Xu, 2000).

- c) Estereoespecificidad: Las lipasas son capaces de diferenciar entre moléculas de sustrato enantiómeras, cuando se trata de sustratos quirales, e incluso diferenciar entre las posiciones sn-1 y sn-3 en sustratos proquirales. La práctica totalidad de las lipasas ensayadas sobre triglicéridos proquirales presentan esta propiedad en mayor o menor medida, a excepción de la lipasa pancreática porcina, según Rogalska et al. (1997). Estos autores recopilan la información existente sobre 25 lipasas diferentes, resultando estereoespecificidades sobre sustratos proquirales que oscilan entre 0 y 100% hacia las posiciones sn-1 y sn-3 de la molécula. Así la lipasa de *Mucor miehei* muestra preferencia hacia la posición sn-1 y la cutinasa de *Fusarium solani* lo hace hacia la posición sn-3. Hay casos, como los de la lipasa de *Candida antarctica B*, cuya estereoespecificidad depende del sustrato, siendo sn-1 para trioleína y sn-3 para trioctanoína.

En general la especificidad de las lipasas ha encontrado un buen número de aplicaciones en campos tales como la preparación de lípidos estructurados, resolución de mezclas racémicas y síntesis de compuestos ópticamente activos (Xu, 2000; Klibanov, 2001).

2.2. APLICACIONES DE LAS LIPASAS.

La capacidad de catalizar tanto la reacción directa (hidrólisis) como la inversa (síntesis), incluso con sustratos distintos de los naturales, unida a su gran especificidad, confieren a las lipasas un vastísimo campo de aplicación y unas más que prometedoras perspectivas de crecimiento.

El principal factor limitante que suele presentarse a la hora de utilizar las lipasas en cualquiera de sus posibles aplicaciones es su elevado costo. Sin embargo actualmente existen técnicas que permiten minimizar este problema, y que pueden clasificarse en tres grandes grupos (Villeneuve et al., 2000):

- a) Modificación física: Consiste fundamentalmente en la inmovilización de las enzimas por adsorción física sobre soportes sólidos o mediante su encapsulamiento en materiales insolubles. Hace posible su posterior recuperación al tiempo que incrementa su estabilidad.
- b) Modificación química: Consiste en la formación de enlaces covalentes entre las lipasas y un material insoluble, una matriz polimérica o entre ellas mismas, con el fin

de inmovilizarlas. También se llevan a cabo reacciones selectivas sobre algunos aminoácidos de la enzima para mejorar sus propiedades.

- c) Ingeniería genética: Permite expresar una determinada enzima, cuyas propiedades sean de interés, en un microorganismo cuyo cultivo a gran escala sea favorable, reduciendo así los costes de producción. Por otro lado los recientes avances en tecnología genética hacen posible modificar la secuencia peptídica de la enzima en puntos específicos y así obtener lipasas con propiedades optimizadas para la aplicación pretendida.

Debido a este gran potencial, son numerosas las publicaciones que recopilan las distintas aplicaciones de las lipasas, pretendiendo abarcar la totalidad de sus campos de aplicación (Gandhi, 1997; Pandey et al., 1999; Sharma et al., 2001; Houde et al., 2004) o bien ciñéndose a áreas más específicas (Xu, 2000; Groos et al. 2001; Villeneuve, 2003; Ghanem y Aboul-Eneim, 2005).

Las lipasas pueden ser utilizadas “in situ”, lo que implica inocular y cultivar el microorganismo productor directamente en el medio en que se pretende aplicar la enzima (de esta forma se procede en la industria alimentaria, peletera y en el tratamiento de residuos), o “ex situ”, es decir, utilizando preparaciones comerciales que contienen la lipasa purificada (industria bioquímica y detergencia).

A continuación se realizará un resumen de estas aplicaciones, pretendiendo dar una visión global de la gran variedad de áreas donde las lipasas encuentran aplicación en la actualidad.

2.2.1. Aplicaciones en hidrólisis.

La hidrólisis de lípidos puede tener como objetivo la obtención de ácidos grasos y/o alcoholes, productos de gran interés industrial, o bien la descomposición de la grasa en sí.

En cuanto a la obtención de ácidos grasos libres y alcoholes la hidrólisis enzimática presenta claras ventajas respecto de la hidrólisis química tradicional (proceso Colgate – Emery), ya que ésta emplea temperaturas superiores 250°C y presiones de 30 a 50 atm, mientras que la lipólisis enzimática transcurre a presión ambiental y a 40 – 60°C. Por tanto, el empleo de lipasas implica un gran ahorro, tanto energético como en materiales, constituyendo un proceso mucho más seguro. Además no tienen lugar reacciones secundarias ni se generan productos indeseados, reduciéndose el costo de la posterior

remoción de los mismos. También hace posible obtener ácidos grasos termolábiles que resultarían degradados en el proceso convencional.

Algunas industrias, como “Miyoshi Fat and Oil” (Tokio, Japón) utilizaban, ya en el año 1991, la hidrólisis enzimática mediante lipasas para la producción de ácidos grasos y jabones. Christensen et al. (2003) han patentado un proceso para hidrólisis de triglicéridos empleando para ello una mezcla de dos lipasas diferentes, una de ellas regioespecífica y la otra no, debido al sinergismo existente entre ambas. La reacción se lleva a cabo con las lipasas en forma soluble y en reactores tipo tanque agitado, o bien con las lipasas inmovilizadas y en columnas de relleno. Otros procesos, también patentados, utilizan la lipasa obtenida del ricino en la hidrólisis de sebo animal (Tavss y Eigen, 1988) y del propio aceite de ricino (Yamaguchi et al., 1989), para obtener ácidos grasos libres para la producción de jabón, en el primer caso, y ácido ricinoleico (producto de alto valor añadido) en el segundo.

A escala de laboratorio son muy numerosos los trabajos sobre la utilización de lipasas en la hidrólisis de triglicéridos. Así Kosugi et al. (1988) estudian el uso de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* para la hidrólisis de sebo en un sistema discontinuo tipo tanque agitado. Noor et al. (2003) usan también reactores tanque agitado en discontinuo para llevar a cabo la hidrólisis de aceite de palma con la lipasa SP398 (Novozymes). Otro dispositivo empleado en la hidrólisis de triglicéridos es el reactor de membrana con lipasa inmovilizada, que opera de forma continua. Esta tecnología, que permite un mejor aprovechamiento de la enzima, ha sido utilizada en la hidrólisis de sebo con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Taylor et al., 1986), en la hidrólisis de glicéridos del ácido butírico (grasa láctea) con la lipasa de *Aspergillus niger* (Malcata et al., 1991) y en la hidrólisis de aceite de soja con la lipasa de *Candida rugosa* (Pronk et al., 1988).

La hidrólisis puede llevarse también a cabo en sistemas bifásicos, en los que intervienen disolventes orgánicos. Bilyk et al. (1991) han empleado diferentes lipasas para hidrolizar sebo y aceites vegetales disueltos en n-hexano. Aminas secundarias y terciarias fueron usadas, según los autores, como co-catalizadores. Kang y Rhee (1989) describen la utilización de una lipasa inmovilizada (de *Candida rugosa*) en la hidrólisis de aceite de oliva disuelto en i-octano. Por supuesto, en estos sistemas tiene que existir una cierta cantidad de agua, bien en el propio disolvente o en el soporte de la enzima, para que pueda tener lugar la reacción de hidrólisis. Otra alternativa para llevar a cabo la hidrólisis de triglicéridos en sistemas microacuosos consiste en incluir las lipasas en dominios acuosos del tamaño de nanómetros. Para ello se precisa la adición de un tensioactivo, generalmente el (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio normalmente designado

como AOT. Estos sistemas, que se conocen como micelas inversas, han sido utilizados, a escala de laboratorio, para la hidrólisis de grasa láctea (Chen y Chang, 1993) y aceite de oliva (Han y Rhee, 1986) mediante lipasas, utilizando i-octano como disolvente.

En la industria alimentaria, fundamentalmente en la láctea, las lipasas son imprescindibles para el desarrollo del aroma y sabor típico de productos como queso, mantequilla, chocolate y repostería (Olsen, 2004). La producción de carne con bajo contenido en grasa también se consigue con la ayuda de lipasas (Bailey y Ollis, 1986).

En otras ocasiones lo que se persigue es la degradación de la grasa, al ser ésta un sustancia indeseable en un determinado producto o proceso. Con este fin las lipasas (junto con proteasas) se emplean durante el procesado del cuero para eliminar residuos grasos y pelo (Figurin et al., 1990; Olsen, 2004). La incorporación de las lipasas en formulaciones detergentes también forma parte de este grupo de aplicaciones, si bien, al ser el área en la que se inscriben los objetivos de la presente tesis doctoral, será tratada con más detalle en el apartado 2.5 de esta introducción.

En sistemas de tratamiento de aguas residuales las lipasas se usan para la eliminación de la película grasa que se forma en la superficie de los digestores aerobios e impide la transferencia de oxígeno, así como en la limpieza de tanques y conducciones (Bailey y Ollis, 1986; Christian, 1991). De Felice et al. (1997) han utilizado microorganismos productores de lipasas (*Yarrowia lipolytica*) para el tratamiento de las aguas residuales del proceso de extracción del aceite de oliva, consiguiendo una disminución de la Demanda Química de Oxígeno del 80% en 24 horas. Piras et al. (1994) han patentado un método para la degradación de residuos con alto contenido en poliésteres mediante lipasas.

Otro grupo de aplicaciones que aprovechan la capacidad hidrolítica de las lipasas, está constituido por las de carácter médico, tales como la determinación de triglicéridos y colesterol en muestras de sangre, y farmacéutico/cosmético, como por ejemplo la incorporación de lipasas en formulaciones para conferir volumen al cabello e incluso en medicamentos adelgazantes (Gandhi, 1997).

2.2.2. Aplicaciones en síntesis.

Es en esta área donde se abren más perspectivas para el empleo de las lipasas. Para poder catalizar la reacción de síntesis las lipasas han de trabajar en ambientes microacuosos, pudiendo alcanzarse conversiones cercanas a las termodinámicas. Así la mezcla reaccionante está compuesta por los reactivos y, opcionalmente, un disolvente orgánico.

Las lipasas pueden ser utilizadas para la obtención de ésteres por esterificación de alcoholes y ácidos grasos. Gandhi et al. (1995) estudian el proceso esterificación del ácido láurico con butanol mediante la lipasa de *Mucor miehei*, tanto en forma soluble como inmovilizada, en reactores tipo tanque agitado. Da Silva Crespo et al., (2005) utilizan lipasas de *Pseudomonas sp.* y *Candida rugosa*, inmovilizadas sobre óxido de polietileno, para la esterificación de ácido láurico y n-pentanol en diferentes disolventes orgánicos. Dichos ésteres, y en general los que presentan ácidos grasos de cadena corta y media, son de utilidad como aromatizantes de uso alimentario, en perfumería y cosmética (Gandhi, 1997).

La esterificación catalizada por lipasas puede también conducir a la obtención de polímeros, tales como poliésteres y policarbonatos (Gross et al., 2001). Con respecto a los procesos clásicos de polimerización, la polimerización enzimática mediante lipasas presenta ventajas como: (i) el mayor grado de control sobre la estructura del polímero, debido a la regio y estereoselectividad de estas enzimas, lo que permite sintetizar moléculas capaces de formar nanoestructuras, (ii) la sustitución de los metales pesados usados como catalizadores en la polimerización convencional y (iii) la posibilidad de realizar polimerizaciones muy difíciles o imposibles de llevar a cabo por métodos clásicos. Sin embargo, para pasar de la escala de laboratorio a la industrial, es necesario incrementar la actividad de las lipasas en estos sistemas, lo que permitirá disminuir la cantidad de enzima necesaria, y con ello el elevado gasto que ello supone.

Otros productos de interés que pueden ser obtenidos mediante esterificación catalizada por lipasas son los ésteres de ácidos grasos y azúcares que presentan excelentes propiedades como emulsionantes de uso alimentario (Lortie, 1997). El proceso de obtención de estos ésteres ha sido objeto de varias patentes, entre ellas la de David et al. (1989).

Las reacciones de transesterificación tienen también gran cantidad de aplicaciones, siendo la modificación de grasas y aceites una de las más importantes. Una gran variedad de productos de alto valor añadido pueden ser obtenidos por esta vía, destacando por su importancia los llamados lípidos estructurados, nombre con el que se conocen las grasas modificadas de forma que adquieran propiedades físicas, nutritivas y funcionales que las hagan más adecuadas para uso alimentario. A continuación se citan algunos ejemplos de estas sustancias:

- a) Triglicéridos que presentan ácido palmítico en la posición sn-2 y ácidos insaturados en las posiciones sn-1 y sn-3 pueden ser sintetizados por acidólisis entre la tripalmitina y los ácidos insaturados. Estos triglicéridos presentan la misma estructura

que los encontrados en la leche materna, siendo muy adecuados para la preparación de leche maternizada (Houde et al., 2004).

- b) Triglicéridos con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la posición sn-2 y ácidos de cadena media en las posiciones sn 1 y 3. La digestibilidad de estos triglicéridos es mayor que la de los naturales, sin por ello dejar de aportar ácidos grasos esenciales (Lortie, 1997). Además la presencia de los ácidos poliinsaturados los hace adecuados en la prevención de enfermedades coronarias. La producción por acidólisis de triglicéridos estructurados con ácido caprílico en las posiciones sn 1 y 3 y un ácido poliinsaturado, como el eicosapentaenoico (EPA) o el docosahexaenoico (DHA), en la posición sn-2, ha sido estudiada por Camacho-Páez et al. (2002) y González-Moreno et al. (2005) a partir de aceite de hígado de bacalao o de un aceite comercial rico en EPA, respectivamente. Estos autores utilizan una lipasa comercial 1,3-específica (Lipozyme® IM) y utilizan reactores con tres configuraciones diferentes: reactor tanque agitado discontinuo y reactor de lecho fijo operado tanto en discontinuo (recirculación del producto) como en continuo.
- c) Sustitutivos de la manteca de cacao, la cual está compuesta mayoritariamente por triglicéridos con ácido oleico en la posición sn-2 y ácidos palmítico y esteárico en las otras dos. Las lipasas permiten obtener dichos sustitutivos por interesterificación o acidólisis partiendo de aceites vegetales más baratos, que presenten ácido oleico en la posición sn-2. Ésta es una de las aplicaciones más prometedoras de las lipasas (Xu, 2000).
- d) Productos alternativos a las grasas vegetales hidrogenadas, utilizadas en margarinas así como panadería y repostería. La obtención por vía enzimática evita el problema de la aparición de isómeros trans, que se produce durante el tratamiento de hidrogenación.

En la actualidad existen ya plantas industriales (como las pertenecientes al grupo holandés Lodders Croklaan) en las que se llevan a cabo transesterificaciones catalizadas por lipasas para la modificación de grasas y aceites.

Las lipasas también se utilizan para la obtención de grasas de valor calórico reducido que sirvan como sustitutivo de las grasas naturales, sin reducir apreciablemente sus cualidades sensoriales. Gandhi (1997) y Houde et al. (2004) presentan numerosos ejemplos de productos de este tipo.

A parte de las aplicaciones alimentarias, la estéreo y regioespecificidad de las lipasas las convierte en herramientas muy útiles para la industria farmacéutica. En este

sentido las lipasas son utilizadas para la resolución de mezclas racémicas, por reacción selectiva con uno de los isómeros, lo que permite seleccionar el isómero con mayor actividad terapéutica (con frecuencia esta propiedad varía enormemente de un isómero al otro). Dicha reacción selectiva puede ser de hidrólisis, pero el método más empleado es la transesterificación en medio orgánico (Ghanem y Aboul-Eneim, 2005). Gran cantidad de principios activos de uso terapéutico pueden ser producidos mediante resolución de mezclas racémicas del producto final o de alguno de los intermedios necesarios para su síntesis. Un ejemplo es el ibuprofeno, principio de efectos analgésicos y antiinflamatorios (Houde et al., 2004). Las lipasas son también utilizadas en el proceso de síntesis de vitaminas (Bonrath et al., 2002) y de herbicidas y plaguicidas (Pandey et al., 1999).

Otra prometedora aplicación de las lipasas es la producción de biodiesel (combustible obtenido de fuentes renovables), mediante la conversión de aceites vegetales a ésteres metílicos o de otros alcoholes de cadena corta por alcoholisis en medio orgánico. Iso et al. (2001) utilizan lipasas de diferentes microorganismos inmovilizadas en un soporte inorgánico para catalizar la alcoholisis de triglicéridos con alcoholes de cadena corta (metílico a butílico). Este método permite reutilizar la enzima sin pérdidas de actividad apreciables, lo que resulta imprescindible de cara a su posible aplicación a escala industrial.

La Tabla 2.2 resume las principales aplicaciones de las lipasas, tanto las ya desarrolladas a nivel comercial como las que aún se encuentran en fase de investigación, con las referencias correspondientes.

Tabla 2.2. Principales aplicaciones de las lipasas

Aplicación	Referencias
HIDRÓLISIS	
Producción de ácidos grasos libres y alcoholes	
Sistemas aceite-agua	Noor et al. (2003); Christensen et al. (2003); Malcata et al. (1991); Tavss y Eigen, (1988); Kosugi et al. (1988); Taylor et al. (1986)
Sistemas aceite-disolvente-agua	Chen y Chan (1993); Bilyk et al. (1991); Kang y Rhee (1989); Han y Rhee (1986)
Desarrollo de aromas característicos de productos lácteos, chocolate y repostería. Muchas veces se usan "in vivo"	Olsen (2004)
Formulaciones detergentes para la eliminación de suciedades grasas	Ver Tabla 2.7.

Tabla 2.2 – Principales aplicaciones de las lipasas Continuación

Aplicación	Referencias
HIDRÓLISIS	
Tratamiento de aguas residuales y degradación de residuos	De Felice et al. (1997); Piras et al. (1994); Christian (1991);
Análisis clínicos. Productos farmacéuticos y cosméticos	Ver revisión de Gandhi (1997)
SÍNTESIS	
Obtención de ésteres de cadena corta y media para uso como aromatizantes en alimentación, perfumería y cosmética	Da Silva Crespo et al. (2005); Ghandi et al. (1995)
Obtención de ésteres de ácidos grasos y azúcares, adecuados como emulsionantes alimentarios	Lortie (1997); David et al. (1989)
Producción de lípidos estructurados	González-Moreno (2005); Camacho-Páez (2002); Xu (2000); Lortie (1997);
Resolución de mezclas racémicas	Ghanem y Aboul-Eneim (2005)
Producción de biodiesel	Iso et al. (2001)

2.3. MÉTODOS PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA

La actividad de una enzima se mide normalmente determinando la velocidad de aparición de producto o la de desaparición de reactivo, durante la reacción catalizada por la misma. En muchas ocasiones existen varias técnicas disponibles para medir la actividad de una enzima concreta, dependiendo de factores tales como su grado de adecuación a los objetivos de la investigación, el costo, la disponibilidad de reactivos y equipos y el nivel de sensibilidad pretendido, el decantarse por una u otra (Tipton, 1992).

Actualmente existe una gran variedad de métodos tanto para la detección cualitativa como para la medida de la capacidad hidrolítica de las lipasas. Por otro lado, dado el creciente interés de estas enzimas como herramientas en biotecnología, ensayos concernientes a su regio y estereoespecificidad han sido también desarrollados. Jensen (1983a y 1983b), Beisson et al. (2000) y Gupta et al. (2003) han publicado completas recopilaciones de los diferentes métodos disponibles.

Estos métodos los podemos clasificar en dos grandes grupos:

- a) Métodos físico-químicos, que permiten detectar la actividad lipolítica y cuantificarla.
- b) Métodos inmunológicos, usados para medir la cantidad de lipasas presente, independientemente de su actividad lipolítica.

2.3.1. Métodos fisicoquímicos.

Se trata de registrar la velocidad de desaparición de sustrato o de aparición de producto durante la reacción enzimática.

2.3.1.1. Métodos que registran la desaparición de sustrato.

Entre ellos se encuentran los siguientes:

- I) **Nefelometría y turbidimetría:** Ambas se basan en el proceso de clarificación resultante de la disminución del tamaño de las gotas de grasa emulsificada cuando son hidrolizadas, que se traduce en un descenso en la difusión de la luz por parte de la emulsión. Pueden ser llevados a cabo en fase sólida (placas de agar) o líquida (emulsiones acuosas). En el primero de los casos aparecen zonas clareadas en el agar, cuyo diámetro se puede medir, mientras que en el segundo caso se mide la disminución de la absorbancia de la emulsión con el tiempo. Para su aplicación es necesario que los productos de la lipólisis sean, al menos parcialmente, solubles en agua.
- II) **Métodos tensiométricos:** Pertenecen a este grupo las técnicas que se basan en la variación de las propiedades de la interfase lípido/agua durante la hidrólisis enzimática de los lípidos. Entre los métodos de este grupo que detectan el consumo de sustrato está el denominado "Wilhelmy Plate Method". Consiste en esparcir la grasa a hidrolizar, generalmente sintética ya que los productos de hidrólisis han de ser solubles en agua, sobre una interfase aire-agua formando una monocapa lipídica. Mediante una barrera de teflón se aumenta o disminuye el área ocupada por dicha monocapa, de modo que la presión superficial puede ser controlada, tal y como se muestra en la Figura 2.3. Una solución de lipasas se inyecta en el seno de la fase acuosa (depósito 1), de forma que al ser hidrolizados los lípidos situados en la superficie la presión superficial disminuye y la barrera de teflón ha de moverse para mantenerla constante. Registrando este movimiento en función del tiempo se puede seguir la cinética de la reacción.

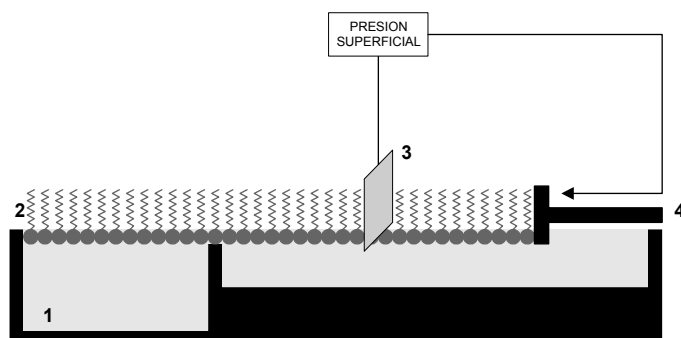


Figura 2.3. Montaje experimental para el seguimiento de la hidrólisis enzimática de monocapas lipídicas (“Wilhelmy Plate Method”). 1. depósito para la solución enzimática; 2. monocapa lipídica; 3. lámina de platino conectada a una microbalanza para la medida de la tensión superficial; 4. barrera de teflón que permite controlar la presión superficial.

III) **Espectroscopía infrarroja:** Se trata de registrar el espectro infrarrojo de la mezcla reaccionante en función del tiempo. Tanto los ésteres como los ácidos grasos libres pueden ser cuantificados en base a sus coeficientes de extinción molar, mediante la ley de Beer. Para que el medio de reacción sea traslúcido, lo que es necesario para la medida espectroscópica, es necesario usar micelas inversas, donde las lipasas están encapsuladas.

2.3.1.2. Métodos que registran la aparición de producto.

La generación de producto puede ser detectada y cuantificada de forma indirecta, a través de los cambios fisicoquímicos inducidos en el medio por la aparición del producto, o directa, por determinación analítica del mismo.

Entre los métodos indirectos los más importantes se basan en la detección y cuantificación del descenso de pH que produce la ionización de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis enzimática de los lípidos. Dentro de estos métodos se distinguen fundamentalmente dos:

I) **Uso de indicadores coloreados:** Se utilizan indicadores de pH que cambian de color según el valor de éste. Puede realizarse en fase líquida, emulsión, o sólida, empleando placas de agar que incorporan el sustrato junto con el indicador. Normalmente estas técnicas tienen fundamentalmente fines cualitativos. Sin embargo, los ensayos en fase sólida permiten la determinación cuantitativa debido a que existe una relación lineal entre el diámetro de las manchas formadas (al cambiar el color del indicador por el descenso del pH) y el logaritmo de la concentración de enzima.

II) **Valoración de los ácidos grasos liberados:** La actividad lipásica se mide sobre una emulsión de triglicéridos (naturales o sintéticos), mediante la neutralización por adición de una base de los ácidos grasos liberados en la reacción hidrolítica, de forma que el pH del medio permanezca constante. Esta técnica, conocida como método del pHstato, es utilizada generalmente como ensayo de referencia. Un esquema simplificado del dispositivo necesario se muestra en la Figura 2.4.

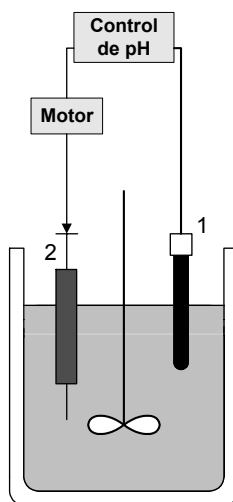


Figura 2.4. Esquema simplificado del dispositivo experimental para la medida de la actividad lipásica por la técnica del pHstato. 1. electrodo de vidrio para la medida del pH; 2. microbureta (dosificación de base).

La detección de los protones liberados durante la reacción de hidrólisis catalizada por las lipasas requiere de la ionización total o al menos parcial de los ácidos grasos libres producidos. Por ello el pH fijado en el medio de reacción debe ser igual o mayor que el pK_a aparente del ácido liberado (Beisson et al., 2000). La tributirina resulta un sustrato muy adecuado para el método del pHstato pues es relativamente fácil de dispersar en agua y el ácido butírico se encuentra disociado casi totalmente a pH 7.0. Sin embargo, algunos autores desaconsejan su uso cuando lo que se pretende es verificar la actividad lipásica de una enzima desconocida, ya que, al ser ligeramente soluble en agua, podrían darse falsos positivos si la enzima posee actividad esterásica (Jensen, 1983).

Además del descenso del pH, ciertas propiedades físicas del medio de reacción, tales como la **conductividad eléctrica o acústica**, se ven alteradas como consecuencia de la liberación de los ácidos grasos, por lo que pueden ser usadas para el seguimiento de la reacción de hidrólisis, y la determinación de la actividad lipolítica.

Otra técnica que se basa en el análisis de propiedades directamente relacionadas con la liberación de productos es el conocido como “**método de la gota de aceite**”. Pertenece al grupo de técnicas tensiométricas y consiste en medir la tensión interfacial aceite/agua en función del tiempo durante la reacción. La medida se realiza mediante el análisis (usando la ecuación de Laplace-Young) del perfil de una gota de aceite suspendida en el medio acuoso en el que se encuentra la enzima.

La determinación directa de los **ácidos grasos** (FFA) liberados al medio de reacción puede llevarse a cabo mediante varias técnicas analíticas. Si los ácidos grasos producto de la reacción enzimática no se pueden determinar directamente, lo que ocurre cuando se utilizan triglicéridos naturales como sustrato, será necesaria una reacción intermedia que nos permita obtener una sustancia cuantificable de forma directa. En otros casos se utilizan triglicéridos o ésteres sintéticos, de forma que los ácidos grasos liberados puedan ser determinados sin necesidad de modificación posterior. Las principales técnicas usadas son:

- I) **Espectrofotometría:** Los ácidos grasos liberados son determinados espectrofotométricamente. Para ello se utilizan sustratos como los ésteres del p-nitrofenol con ácidos grasos de diversas longitudes, ya que el p-nitrofenol, liberado durante la reacción, presenta absorbancia a 410 nm. Los triglicéridos naturales pueden ser usados como sustrato, formando luego sales cúpricas con los ácidos grasos liberados, para poder llevar a cabo su determinación colorimétrica.
- II) **Fluorescencia:** Se puede emplear cuando los ácidos grasos liberados presenten fluorescencia, lo que implica el uso de triglicéridos o ésteres sintéticos. También se aprovecha la interacción de sustancias fluorescentes añadidas al medio de reacción con los ácidos grasos producidos durante la misma, lo que posibilita el seguimiento de la cinética de la hidrólisis enzimática de una mayor variedad de triglicéridos.
- III) **Cromatografía:** Existen varias técnicas cromatográficas para la determinación de ácidos grasos, tanto mediante cromatografía en capa fina, de gases o líquida. Para su adecuada determinación mediante cromatografía gaseosa, es necesario obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La cromatografía líquida (HPLC) permite, gracias al empleo de columnas selectivas sobre moléculas quirales, separar los productos y reactivos de una reacción de hidrólisis enantioselectiva, lo que hace posible caracterizar la enantioselectividad de la enzima.

Los **alcoholes** liberados durante la lipólisis también pueden ser analizados, si bien el análisis del glicerol no se lleva a cabo normalmente, ya que por lo general estas

moléculas no aparecen en los momentos iniciales de la reacción. Lo que sí es más frecuente es el análisis de alcoholes modificados (el sustrato ha de ser por tanto un éster sintético) que sean detectables por colorimetría o fluorescencia. También se han utilizado tioésteres como sustrato, de forma que los tioles liberados pueden ser determinados por técnicas específicas (reactivo de Ellman).

2.3.2. Métodos inmunológicos.

Se trata de ensayos altamente específicos y de elevada sensibilidad, que requieren disponer de anticuerpos adecuados para la enzima a determinar. Son utilizados fundamentalmente para detectar la presencia de una enzima en medios biológicos, independientemente de su capacidad lipolítica.

2.3.3. Elección del método más adecuado.

Dada la gran variedad de técnicas disponibles para medir la actividad lipásica, la elección de la más conveniente dependerá fundamentalmente del objetivo pretendido.

Cuando se trata de caracterizar una nueva enzima, o se dispone de un extracto de un medio biológico de composición no completamente conocida, conviene emplear como sustrato triglicéridos de cadena larga, ya que éstos sólo pueden ser hidrolizados por verdaderas lipasas y no por esterases presentes en el medio.

Cuando se trata de conocer la capacidad hidrolítica de una lipasa, técnicas como la valoración de los ácidos grasos (pHstato) o la determinación espectrofotométrica de los mismos son las más empleadas, eligiendo adecuadamente el sustrato.

Actualmente, el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética permite disponer de un enorme abanico de variantes entre las que se precisa escoger aquella lipasa que presente las propiedades más satisfactorias de acuerdo con la aplicación pretendida. Se precisa para ello de técnicas que, si bien basadas en los principios descritos, sean sensibles, sencillas y de rápida aplicación (Gupta et al., 2003). Este campo se encuentra hoy día en desarrollo.

En la Tabla 2.3 se incluye un resumen comparativo de las técnicas existentes con referencias bibliográficas relativas a su aplicación.

Tabla 2.3. Diferentes métodos para la determinación de la actividad lipásica

Método	Sustrato	Variable analizada	Ventajas	Inconvenientes	Referencias
Nefelometría/Turbidimetría	Tributirina (agar)	Diámetro de las zonas traslúcidas.	Sencillos, sensibles, válidos para detectar actividad en medios biológicos y muestreo.	Sustratos no específicos para lipasas. El método en fase sólida no es adecuado para cuantificar la capacidad hidrolítica.	Lawrence et al., 1967; Von Tigerstrom y Stelmaschuk, 1989
	Tween 20 (solución)	Absorbancia.			
Tensiometría (Wilhelmy Plate Method)	Fosfolípidos, monoglicéridos (monooleína)	Presión superficial de la monocapa lipídica.	Muy sensible. Permite controlar las propiedades interfaciales y medir en continuo.	Complejo dispositivo experimental. Puede no ser representativo de la hidrólisis en condiciones reales.	Verger y de Haas, 1973a; Ivanova et al., 2002.
Espectroscopía infrarroja	Triglicéridos puros o aceites vegetales.	Espectro infrarrojo del medio de reacción	Medida en continuo. Permite usar sustratos específicos de lipasas. Aplicable para estudiar regio y estereoselectividad.	Necesita de complejos instrumentos de medida. Las lipasas son encapsuladas en micelas inversas, que no constituyen su ambiente natural.	Walde y Luisi, 1989
Uso de indicadores coloreados / fluorescentes	Triglicéridos de cadena corta / larga (agar + indicador)	Color / fluorescencia por la acidificación del medio / formación de complejos con los FFA	Sencillo y rápido. Muy útil para muestreo de un gran número de lipasas.	Método fundamentalmente cualitativo. Puede dar falsos positivos (acidificación no debidas a los ácidos grasos).	Lawrence et al., 1967; Christen y Marshall, 1984; Kouker y Jaeger, 1987; Hube et al., 2000;
Valoración de los ácidos grasos liberados (pHstato)	Triglicéridos puros o aceites vegetales.	Cantidad de base añadida para mantener constante el pH del medio de reacción	Fiable y sencillo. Utilizado como ensayo de referencia para actividad y especificidad.	Puede utilizarse en un rango restringido de pH, según el ácido graso liberado. Sensibilidad aceptable, pero no muy alta.	Entressangles y Desnuelle, 1968; Brockman, 1981; Haas et al., 1995; Hoppe y Theimer, 1996;
Conductividad eléctrica / acústica	Triacetina / Trioleína	Conductividad eléctrica / acústica del medio de reacción.	Medida sencilla y en continuo.	Dependencia de la temperatura, sustrato no específico (cond. eléct.). Señal no convertible en concentración de FFA.	Ballot et al., 1982; Ge et al., 1995
Método de la gota de aceite	Triglicéridos puros.	Tensión interfacial aceite/agua (a través del perfil de gota).	Permite conocer la evolución de las propiedades interfaciales. Útil para ensayos cinéticos. Sustratos específicos.	El sustrato y el instrumental deben estar libres de FFA y otras moléculas de carácter tensioactivo. La tens. interf. es muy sensible a factores diversos.	Nury et al., 1987; Flipsen et al., 1996; Labourdenne et al., 1997
Espectrofotometría	Triglicéridos naturales	Absorbancia (en medio de reacción o tras extracción de los productos).	Sencillo. Sustrato adecuado, medida en continuo posible, si el medio de reacción no es turbio.	En general es un ensayo discontinuo y laborioso. Para medida en continuo necesita adición de tensioactivos.	Kwon y Rhee, 1986; Rawlyer y Siegenthaler, 1989; Pencreac'h et al., 2002
	Triglicéridos y ésteres sintéticos (p. ej. del nitrofenol)		Ensayo continuo y sencillo.	Los sustratos no son específicos ni adecuados.	Chemnitius et al., 1992; Pencreac'h y Baratti, 1996; Gupta et al. 2002
Fluorescencia	Triglicéridos naturales Triglicéridos o ésteres sintéticos.	Fluorescencia (en medio de reacción o tras extracción de los productos)	Métodos en general muy sensibles y que pueden realizarse en continuo.	Sustratos muy específicos (sólo los triglic. naturales de <i>Parinari glaberrimum</i> son fluorescentes). El ensayo discontinuo (extracción) es laborioso.	Jette y Ziomek, 1994; Miled et al., 2001; Tsuzuki, et al., 2002
Cromatografía	Triglicéridos puros o aceites vegetales	Los ácidos grasos son determinados cromatográficamente.	Extremadamente sensible (TLC). Muy adecuado en estudios de especificidad.	Muy laborioso. Requiere derivatización de los FFA (GC).	Maurich et al., 1991; Bereuter y Lorbeer, 1995

2.4. ESTUDIO CINÉTICO DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS.

La cinética de la acción de las lipasas ha sido estudiada en diferentes dispositivos y para las distintas reacciones catalizadas por estas enzimas.

Si bien la gran variedad de sistemas en los que las lipasas han sido empleadas hace difícil establecer una clasificación clara de los mismos, en general los dividiremos en tres grandes grupos:

- Sistemas micelares y emulsiones: Aquellos en los que el sustrato (puro o disuelto en algún disolvente orgánico) se encuentra disperso (como micelas o pequeñas gotas) en el seno de una fase acuosa continua, en la cual se encuentra la enzima, o bien la solución acuosa que contiene la enzima es dispersada en la fase oleosa donde se halla el sustrato. También se incluirá en este grupo la hidrólisis de monocapas lipídicas. La reacción catalizada en este caso es la hidrólisis, ya que el exceso de agua impediría llevar a cabo la síntesis de forma favorable.
- Sistemas microacuosos: La mezcla reaccionante está formada por el/los sustratos, que pueden estar o no disueltos en un disolvente orgánico, y la enzima, que es empleada de forma directa (libre o inmovilizada) o bien encapsulada en micelas inversas. En general la cantidad de agua presente en el sistema es muy pequeña. Son adecuados para la reacción de síntesis, si bien son también utilizados para la hidrólisis.
- Sistemas no dispersos: En los que la fase acuosa y la orgánica (sustrato) no tienen contacto directo entre sí, al hallarse separadas por membranas, en las que la enzima se encuentra inmovilizada.

Independientemente del ambiente en que se encuentre la enzima, el mecanismo catalítico actualmente aceptado para describir la acción de lipasas y esterases se centra en el residuo catalítico serina, situado en su centro activo. El átomo de oxígeno presente en la serina actúa como nucleófilo, formando un hemiacetal tetraédrico con el triglicérido. A continuación el enlace éster del hemiacetal es hidrolizado y el diacilglicérido liberado, formándose un complejo acil-enzima. Seguidamente se produce un ataque sobre dicho complejo acil-enzima por parte de un reactivo nucleófilo, que puede ser un diglicérido, un alcohol o agua, obteniéndose finalmente un triglicérido, un éster o un ácido carboxílico respectivamente, y liberándose la enzima (Camacho-Páez, 2000; Neves-Petersen, 2001). Todas estas etapas se esquematizan en la Figura 2.5.

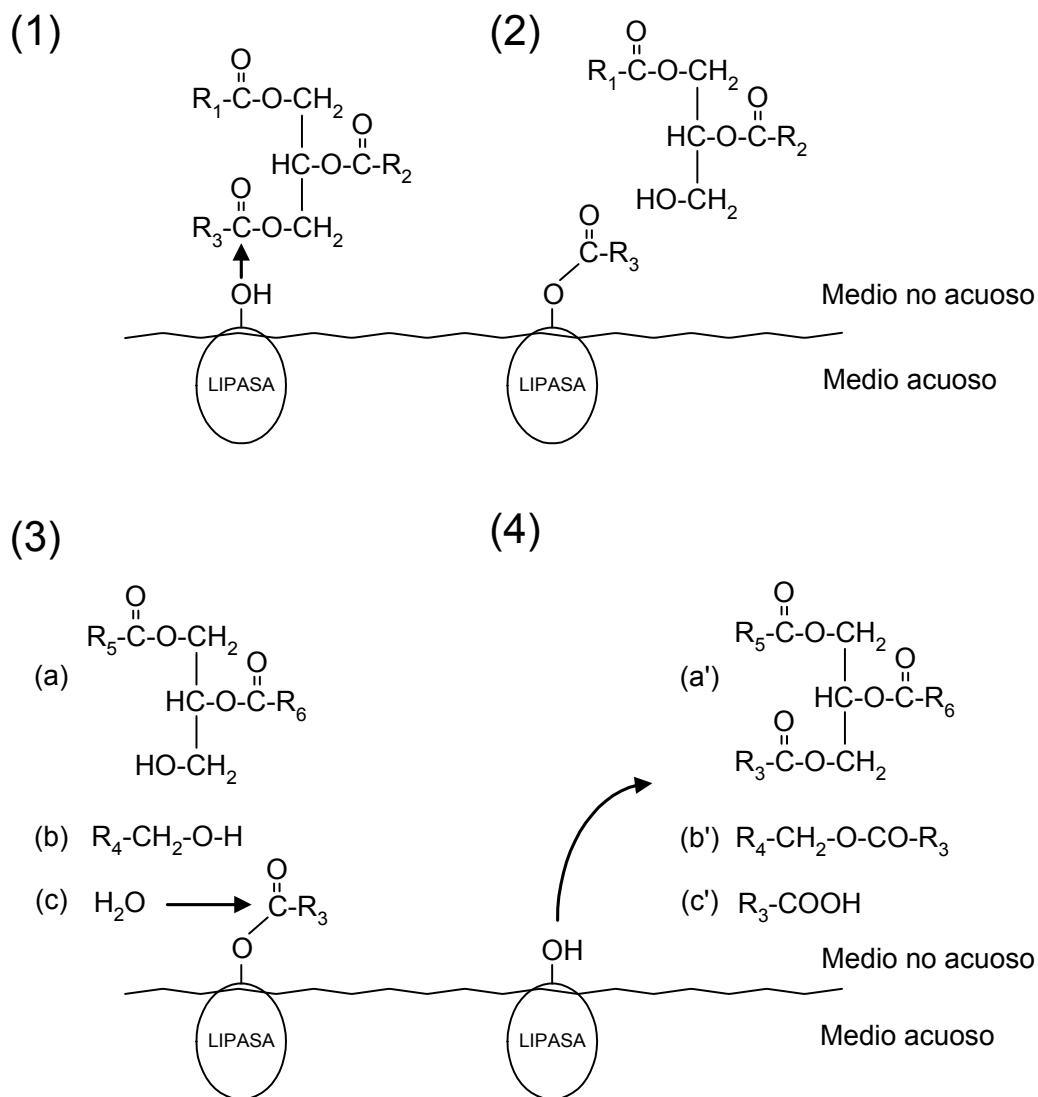


Figura 2.5. Etapas de una reacción catalizada por lipasas: (1) Ataque nucleofílico sobre un átomo de carbono del grupo carbonilo de un triglicérido, (2) formación de un complejo acil-enzima y un alcohol o diglicérido, (3) ataque de reactivos nucleófilos, como un diglicérido (a), un alcohol (b) o agua (c), y (4) liberación de los respectivos productos de los ataques nucleofílicos: un triglicérido (a'), un éster (b') o un ácido carboxílico (c'). Reproducido de Camacho-Páez (2000).

A continuación se realizará una revisión de los mecanismos propuestos, poniendo especial énfasis en la hidrólisis en sistemas micelares y emulsiones.

2.4.1. Estudios cinéticos en sistemas micelares, monocapas y emulsiones.

Esta situación es en la que actúan las lipasas en sistemas naturales (“in vivo”) y por tanto fue el primer sistema en el se estudió la cinética de la hidrólisis enzimática de lípidos constituyendo un ejemplo clásico de cinética enzimática heterogénea.

Benzonana y Desnuelle (1965) realizaron el primer estudio cinético cuantitativo de la lipólisis enzimática. Para ello usaron la lipasa pancreática y estudiaron su acción sobre

emulsiones de triglicéridos de cadena larga estabilizadas con sales biliares. Inicialmente intentaron aplicar la cinética clásica de Michaelis-Menten a la hidrólisis enzimática de los triglicéridos, llegándose a incongruencias como la que muestra la Figura 2.6.a. Tal y como se aprecia en ella cuando se utilizan dos emulsiones de diferente tamaño de gota (áreas interfaciales específicas distintas) la representación de Lineweaver-Burk conduce a la obtención de dos constantes de Michaelis (K_M) diferentes, lo que no tiene sentido por tratarse del mismo sustrato. Este problema se soluciona si en vez de la concentración de sustrato se utiliza el área interfacial de la emulsión, lo que conduce a la obtención de una K_M única, como puede observarse en la Figura 2.6.b.

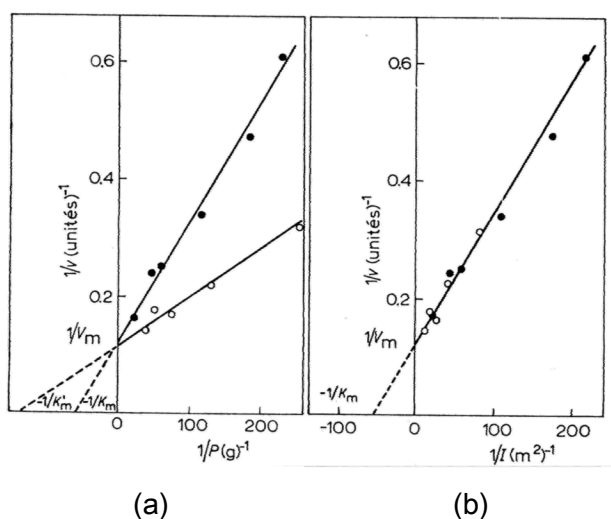
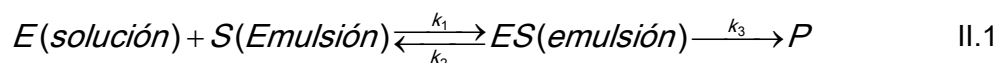


Figura 2.6. Representación de Lineweaver-Burk para la hidrólisis enzimática de un triglicérido emulsificado (Benzonana y Desnuelle, 1965). (a) inversa de la velocidad frente a la inversa de la cantidad (g) de triglicérido; (b) inversa de la velocidad en función de la inversa del área interfacial (m^2) de la emulsión. Los símbolos abiertos corresponden a una emulsión de $2.87 m^2/g$ de área interfacial específica y los cerrados a otra de $0.954 m^2/g$. El volumen total de emulsión fue siempre de 40 mL.

Para explicar este hecho proponen un modelo para el mecanismo de acción de la enzima, que se resume en la ecuación II.1, donde E representa la enzima en solución acuosa, S el sustrato, ES el complejo interfacial enzima-sustrato y P los productos de la reacción.



Aplicando la aproximación de estado estacionario al complejo interfacial enzima sustrato llegan a la siguiente expresión para la velocidad de reacción:

$$r = \frac{k_3 E_0 \left(\frac{I}{A_0} \right)}{\frac{\lambda(k_2 + k_3)}{k_1} + \frac{I}{A_0}} \quad \text{II.2}$$

donde se han introducido el área interfacial de la emulsión (I), el volumen total de la emulsión (A_0), la cantidad total de enzima (E_0) y un parámetro (λ) relacionado con la organización de las moléculas en la interfase.

La ecuación II.2 es formalmente igual a la ecuación de Michaelis-Menten, pero sustituyendo la concentración de sustrato por el área interfacial específica (I/A_0) de la emulsión y permite explicar el comportamiento observado en la Figura 2.6. También aparece el parámetro λ , que afectaría a K_M , pero cuya influencia no se pone de manifiesto en los experimentos realizados, al haberse empleado en todos ellos un mismo tipo de emulsión.

El trabajo de Benzonana y Desnuelle “adapta” el modelo clásico de Michaelis-Menten para el tratamiento de la cinética interfacial, y llega a las siguientes conclusiones:

- El número de moléculas de lipasa adsorbida en la interfase del sustrato es el que determina la velocidad inicial de la reacción.
- La concentración molar de sustrato no es válida cuando éste es insoluble, teniendo que ser sustituida por el área interfacial específica (m^2/L). De esta forma la linealización de Lineweaver-Burk resulta independiente del tamaño de gota y de la cantidad de la emulsión.
- La adsorción interfacial de la lipasa es un proceso reversible y responde a las hipótesis de Langmuir.

Verger et al. (1973b) realizaron un estudio cinético detallado de la acción de distintas enzimas fosfolipasas sobre monocapas fosfolipídicas. Para ello utilizaron un dispositivo diseñado por los propios investigadores (Verger y de Haas, 1973a) consistente en una microbalanza, capaz de detectar cambios en la tensión superficial de una monocapa lipídica, acoplada a una barrera móvil, cuyo desplazamiento permite mantenerla constante (ver Figura 2.3). La existencia de dos compartimentos interconectados permite mantener constante el número de moléculas de sustrato en la monocapa sobre la que actúa la enzima, lo que hace posible obtener cinéticas lineales. Los productos de reacción han de disolverse en la fase acuosa en el momento en que son liberados, lo cual limita la cantidad de sustratos que pueden ser utilizados. El modelo

propuesto por estos autores consiste en las tres etapas representadas por las ecuaciones II.3 a II.5:



En primer lugar la enzima se adsorbe (penetra) de forma reversible en la interfase, formándose el intermedio E^* , que representa una forma activada de la enzima, posiblemente relacionada con un cambio conformacional en la misma, energéticamente más favorable que la especie disuelta. Dicho intermedio se une a una molécula de sustrato, con lo que se forma el complejo enzima sustrato, E^*S , análogo interfacial al de Michaelis-Menten, que finalmente se separa para dar la enzima en su forma activada y los productos de la reacción. La concentración de todas las especies descritas, excepto la de enzima libre, es expresada por unidad de superficie (concentraciones interfaciales). Además, para la aplicación del modelo se supone el área interfacial ocupada por la enzima es despreciable frente al área interfacial total, lo cual sólo puede ser cierto a bajas concentraciones de enzima.

Mediante el tratamiento cinético del modelo llegan a una expresión general válida para la velocidad de reacción tanto en sistemas micelares como en monocapas, en estado estacionario, dada por la ecuación II.6, donde E_0 , I , V y K_m^* representan la concentración total de enzima, el área interfacial total, el volumen total de la emulsión y la constante de Michaelis referida al complejo interfacial enzima-sustrato, respectivamente.

$$r = \frac{k_{cat} E_0 S}{S + K_m^*} \times \frac{S \frac{I}{V}}{S \frac{I}{V} + \frac{k_d}{k_p} \cdot \frac{K_m^* \cdot S}{S + K_m^*}} \quad \text{II.6}$$

La ecuación II.6 recuerda la clásica de Michaelis-Menten, pero las constantes V_{max} y K_M resultan una función compleja de otras constantes y de la concentración interfacial de sustrato, la cual sólo depende de la naturaleza del sustrato y de las características fisicoquímicas de la fase acuosa.

Cuando la hidrólisis se lleva a cabo en monocapas es posible realizar una simplificación de la ecuación II.6, dado que en este caso el número de moléculas activadas y formando parte del complejo de Michaelis ($E^* + E^*S$) es despreciable frente al número de moléculas libres en la subfase acuosa (E). De esta forma la ecuación II.6 se reduce a la II.7.

$$r = \frac{k_{cat} E_0 S}{K_m^* \frac{k_d}{k_p}} \quad \text{II.7}$$

De la ecuación II.7 se desprende que la velocidad de reacción medida mediante la técnica de monocapas depende linealmente de la concentración de enzima en la subfase, lo que se confirma en los resultados experimentales obtenidos.

El tratamiento del modelo sin admitir el estado estacionario de los intermedios, conduce a la obtención de dos tiempos de inducción, τ_1 , asociado al equilibrio de formación del complejo E^* y τ_2 , asociado al equilibrio de formación del intermedio E^*S . Los resultados experimentales obtenidos muestran que, para algunas fosfolipasas como la pancreática, τ_1 es muy superior a τ_2 , es decir, que la penetración de la enzima en la interfase puede ser una etapa limitante, ocurriendo la formación del intermedio E^*S de forma inmediata y comenzando la liberación de productos.

La hidrólisis de fosfolípidos fue también estudiada por Deems et al. (1975) para lo cual utilizaron como sustrato micelas mixtas compuestas por un fosfolípido y un tensioactivo (Tritón X-100). De esta forma la concentración interfacial de sustrato puede ser modificada, variando la relación fosfolípido/tensioactivo. El modelo cinético propuesto por estos autores se diferencia del de Verger et al. (1973b) en que aborda la lipólisis enzimática como una reacción de dos sustratos. El primero de ellos sería la interfase, que actúa como un cofactor, cuya unión con la enzima es necesaria para la reacción enzimática, pero cuyas propiedades no son modificadas en la misma. El otro sustrato es el propio fosfolípido. Las etapas del modelo son las representadas por las ecuaciones II.8 a II.10.



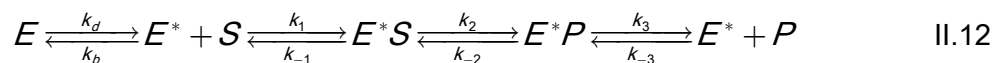
En este caso A representa un “sitio” superficial de la micela donde se enlaza la enzima y B una molécula de fosfolípido. La ecuación cinética obtenida según este modelo se recoge en la ecuación II.11

$$r = \frac{k_3 E_T \cdot A \cdot B}{\left(\frac{k_{-1}}{k_1}\right) \cdot \left(\frac{k_{-2} + k_3}{k_2}\right) + \left(\frac{k_{-2} + k_3}{k_2}\right) \cdot A + A \cdot B} \quad \text{II.11}$$

La ecuación II.11 puede ser linealizada (Lineweaver-Burk) si se mantiene constante “A” (concentración molar de “sitios de enlace” superficiales para la enzima) y se varía “B” (concentración superficial de fosfolípido) o viceversa, lo que permite a los autores obtener las constantes cinéticas.

El problema que surge en este planteamiento es que los valores de “A” y “B” no pueden ser calculados con facilidad, porque ello implica conocer el área de un “sitio de enlace” superficial para la enzima además del área interfacial de las micelas, parámetros que no pueden ser estimados con precisión. Por ello es necesario asumir una serie de simplificaciones, entre las que se encuentra el hecho de que el tamaño de las micelas mixtas es independiente de la concentración de tensioactivo, lo cual resulta no ser cierto, como constatan los propios autores. Además no se sabe con certeza si las moléculas de tensioactivo actúan como un diluyente neutro, sin afinidad alguna por la enzima, o más bien como inhibidores competitivos de la misma (Verger, 1980).

La cinética de la hidrólisis de vesículas fosfolipídicas mediante fosfolipasas de diferentes orígenes ha sido estudiada en profundidad por el grupo de M. K. Jain (Berg et al., 1991 y 1997; Jain et al. 1995), para lo cual proponen un mecanismo muy similar al de Verger et al. (1973b), pero que incluye una etapa más, relativa a la formación y liberación de los productos, tal y como se resume en la ecuación II.12.



Para realizar su estudio cinético, estos autores parten de la base de que la acción de la fosfolipasa sobre las vesículas de sustrato puede ser descrita a partir de dos situaciones extremas, que se esquematizan en la Figura 2.7. En la primera de ellas, denominada modelo “scooting” (palabra inglesa que significa “deslizarse”), la enzima, una vez unida a una vesícula, permanece en ella hasta la hidrólisis completa de las moléculas que constituyen la superficie externa de la misma (lo que implica varios miles de ciclos catalíticos), sin pasar luego a otras vesículas. En la segunda posibilidad, que llaman

modelo “hopping” (que significa “saltar”), la enzima se desorbe después de cada ciclo catalítico o de unos pocos ciclos, pudiendo pasar de una vesícula a otra.

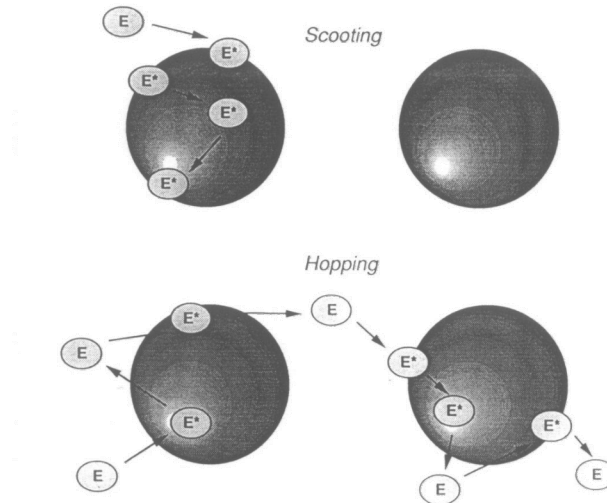


Figura 2.7. Representación esquemática de los dos modos extremos de acción de la Fosfolipasa A₂ sobre vesículas fosfolipídicas, según Jain et al. (1995).

Según el análisis de estos autores, dado que el modelo planteado contiene implícito el formalismo de Michaelis-Menten (lo que puede decirse de la práctica totalidad de las interpretaciones de la catálisis enzimática interfacial) para que éste sea aplicable es preciso que las condiciones en que transcurre la reacción sean asimilables a aquellas que se dan en los sistemas homogéneos. Para asegurar este extremo y teniendo en cuenta que la velocidad con la que la enzima pasa de una vesícula a otra, así como la velocidad de intercambio de sustrato/producto entre las distintas vesículas, no son lo suficientemente elevadas como para aproximarse a las condiciones que se dan en la enzimología en sistemas homogéneos, los autores consideran que la aproximación más factible para estudiar la lipólisis enzimática de vesículas fosfolipídicas es la representada por el modelo “scooting”. Para ello es preciso suponer que no existe intercambio de productos entre los agregados y que la concentración de enzima es muy inferior a la de vesículas, de modo que, como mucho, hay una molécula de enzima por vesícula. Bajo estas condiciones, todas las vesículas que contienen enzima se comportarán, en promedio, de la misma forma en función del tiempo.

Así Berg et al. (1991), fijando unas condiciones experimentales que hagan factibles las limitaciones impuestas por el modelo “scooting”, analizan la cinética de la hidrólisis de vesículas fosfolipídicas mediante fosfolipasa pancreática porcina, tanto para las velocidades iniciales como para el progreso de la reacción en el tiempo, determinando las

constantes cinéticas correspondientes (ecuación II.12). En un trabajo posterior (Berg et al., 1997) estos mismos autores utilizan un sistema en que se verifican las condiciones del modelo "hopping" para estudiar la catálisis enzimática interfacial. De esta forma desarrollan un modelo cinético general para la catálisis enzimática interfacial admitiendo que tanto la enzima, como el sustrato, los productos y los posibles inhibidores se distribuyen entre la fase acuosa y la interfase. Dicho modelo se esquematiza en la Figura 2.8.

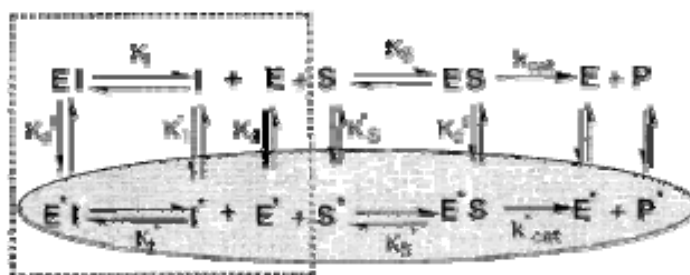


Figura 2.8. Modelo cinético general para la catálisis enzimática interfacial. Las etapas encerradas en la elipse corresponden a la reacción catalítica en la interfase (Berg et al., 1997)

Otro punto de vista es el aportado por Marangoni (1994) el cual desarrolla un modelo que interpreta la adsorción interfacial de la enzima como la unión de una molécula de enzima a un "clúster" de moléculas de sustrato situadas en la interfase, según describe la ecuación II.13.



A partir de esta interpretación y considerando la adsorción/penetración de la enzima en la interfase como la etapa limitante de la lipólisis enzimática, obtiene una ecuación cinética válida para las velocidades iniciales que ajusta satisfactoriamente datos de otros investigadores, obtenidos todos ellos con sustratos parcialmente solubles en agua (triacetina, butirato de metilo, etc.).

La razón de que una gran cantidad de los trabajos realizados sobre la cinética de la hidrólisis enzimática de lípidos, tales como los ya comentados de Verger et al. (1973b), Deems et al. (1975) y Berg et al. (1991, 1997) así algunos más recientes (Ivanova et al., 2002), se hayan realizado con el sustrato en forma de monocapas o micelas (puras o mixtas) estriba en que la caracterización interfacial de estos sistemas es más sencilla y precisa que la de los sistemas emulsificados. Verger (1980) realizó una revisión crítica

sobre los distintos sistemas para estudiar la lipólisis enzimática, donde pone de manifiesto que la velocidad de hidrólisis de una gran variedad de sustratos medida mediante la técnica de monocapas es fácilmente correlacionable con la velocidad medida en emulsión mediante la técnica del pHstato. Cernia et al. (1996) comparan la hidrólisis de triglicéridos en monocapas y en emulsión llegando a la conclusión de que la diferente presión superficial a la que están sometidas las moléculas de sustrato en un sistema y en otro determina las divergencias observadas en la energía de activación de la reacción en cada caso.

En general los estudios realizados sobre monocapas y micelas aportan una información muy valiosa sobre el proceso de lipólisis enzimática, sentando las bases para la interpretación de la cinética del mecanismo de acción interfacial que caracteriza a las lipasas. Cuando el objetivo del trabajo es el diseño y escalado de reactores para la hidrólisis enzimática de triglicéridos, los modelos planteados para sistemas micelares y monocapas pueden ser utilizados, si bien la interpretación de las constantes cinéticas calculadas no es tan inmediata ni su significado físico tan claro como lo es en aquellos sistemas en los que las propiedades interfaciales pueden ser determinadas con precisión. De cualquier forma, numerosos autores asumen las etapas de adsorción de la enzima y reacción enzimática interfacial para describir el comportamiento cinético de reactores con sustrato en emulsión, tal y como se describe en los ejemplos que siguen.

Tsai et al. (1991) propusieron un modelo cinético para la hidrólisis de aceite de oliva disuelto en i-octano mediante lipasa de *Candida rugosa* en un reactor discontinuo mezcla perfecta. Las fases grasa o acuosa (que contiene la enzima) fueron dispersadas una en otra para obtener emulsiones O/W o W/O. Estos autores asumen que la reacción de hidrólisis sigue el modelo de Michaelis-Menten, y que, en todo momento, la concentración interfacial de sustrato es mayor que la de enzima. La concentración interfacial de enzima se supone proporcional a su concentración en la fase acuosa (siendo b_1 la constante de proporcionalidad), mientras que la concentración interfacial de sustrato se considera proporcional a su concentración en la fase orgánica (llamando b_2 a la constante de proporcionalidad). Las ecuaciones cinéticas derivadas de estas asunciones son:

$$r = \frac{r_m(S)_0}{K_m^1 + (S)_0} \quad \text{II.14}$$

$$r_m = \frac{k_2 E_t}{1 + \frac{V_a}{b_1 A}} \quad \text{II.15}$$

$$K_m^1 = \frac{K_m}{b_2} \quad \text{II.16}$$

donde $(S)_0$ es la concentración interfacial de sustrato, E_t la masa total de enzima, V_a el volumen de fase acuosa y A el área interfacial total. Las ecuaciones II.14 a II.16 pueden adaptarse al caso en el que la fase dispersa sea la orgánica o la acuosa. Los autores obtuvieron que la relación entre la velocidad de reacción y la concentración de enzima es lineal hasta una masa total de enzima de 5 mg, intervalo en el cual el modelo puede ser aplicado, al ser b_1 realmente constante. Los valores de las constantes cinéticas r_m y K_m fueron determinados mediante la linealización de Lineweaver-Burk, encontrándose que la velocidad máxima aparente es función de la velocidad de agitación, al depender del área interfacial total (como predice la ecuación II.15) que a su vez depende de ella. La bondad del modelo fue demostrada por los autores, con la única limitación de no ser válido cuando se emplea una cantidad de enzima elevada. Sin embargo esta situación no es conveniente desde el punto de vista práctico, ya que en estas condiciones la enzima, al estar la interfase disponible saturada de ella, no es utilizada eficientemente.

Martinez et al. (1992) aplicaron el modelo desarrollado por Verger et al. (1973b), ecuación II.6, a la hidrólisis enzimática de tributirina mediante la lipasa de *Candida cylindracea* en un reactor discontinuo tipo tanque agitado. Si bien se trata de un estudio limitado a una sola concentración de enzima, los autores consiguieron relacionar la velocidad inicial de reacción con dos variables experimentales medibles de forma directa: la fracción volumétrica de fase grasa y la velocidad de agitación.

Tsai y Chang (1993) desarrollaron también el mecanismo propuesto por Verger et al. (1973b), pero generalizándolo para el estudio de la hidrólisis de lípidos en tres sistemas bifásicos diferentes:

- Emulsiones de la fase grasa (sustrato) en la acuosa, sin adición de un disolvente orgánico.
- Sistemas que incorporan un disolvente orgánico como diluyente del sustrato.
- Sistemas en que se añaden partículas hidrofóbicas como soporte del sustrato.

Para llevar a cabo dicha generalización estos autores definieron de forma pormenorizada todos los parámetros necesarios para una caracterización detallada del sistema, estableciendo a continuación una serie de módulos adimensionales en función de los cuales las ecuaciones cinéticas resultantes son expresadas. Esto les permitió aplicar satisfactoriamente el modelo a datos obtenidos por otros investigadores, todos

ellos de velocidades iniciales de reacción, e incluso explicar algunas situaciones anómalas encontradas en experimentaciones precedentes, que resultan ser casos particulares del modelo propuesto. Una de las ventajas del modelo desarrollado por estos autores es que resulta aplicable tanto a altas como a bajas concentraciones de enzima.

Al-Zuhair et al. (2003, 2004a y 2004b) han aplicado el modelo propuesto por Tsai y Chang (1993) a la hidrólisis de aceite de palma mediante la lipasa de *Candida rugosa* en un reactor tipo tanque agitado. La emulsificación se lleva a cabo mediante la propia agitación del reactor, estimándose el diámetro medio de gota mediante una ecuación empírica (Calderbank, 1958), en función de la fracción volumétrica de sustrato, la velocidad de agitación y la temperatura.

En el primero de los trabajos (Al-Zuhair et al., 2003) el modelo es aplicado a velocidades iniciales de reacción y simplificado para el caso de bajas concentraciones de enzima, por lo que se muestra incapaz de predecir el efecto de saturación de la interfase a altas concentraciones de enzima, que se aprecia en los resultados experimentales. Este inconveniente consigue ser soslayado aplicando el modelo completo (Al-Zuhair et al., 2004a) lo que permite a estos autores ajustar satisfactoriamente sus propios datos así como los de otros investigadores.

Dado que para la interpretación cinética del modelo propuesto se ha supuesto que los intermedios se encuentran en estado estacionario, aproximación por otro lado omnipresente en los análisis cinéticos de la lipólisis enzimática, los autores dedican un tercer trabajo (Al-Zuhair et al., 2004b) a estudiar el comportamiento del sistema en estado no estacionario, pretendiendo confirmar así la validez de esta asunción. Tras un tratamiento análogo al de Verger et al. (1973b) encuentran también dos tiempos de inducción: τ_1 , asociado a la penetración de la enzima en la interfase, y τ_2 , asociado a la formación del complejo enzima-sustrato. Al aplicar el modelo no estacionario a los datos experimentales obtenidos, los tiempos de inducción para la lipólisis en el sistema estudiado resultan ser muy pequeños ($\tau_1 + \tau_2$ del orden de 0.22 min.) y en todo caso τ_2 muy inferior a τ_1 . La aproximación de estado estacionario resulta por tanto válida en las condiciones experimentales utilizadas, correspondientes a un reactor discontinuo adecuadamente agitado, con lo que la etapa controlante del proceso de hidrólisis es la representada por la descomposición del complejo enzima sustrato y la formación de productos.

Jones y Weatherley (2003), estudian la hidrólisis de aceite de oliva mediante lipasa de *Candida rugosa* en un reactor diseñado para obtener dispersiones de la solución enzimática en el seno de la fase oleosa mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Para la interpretación cinética de los resultados utilizan el modelo de Verger et al. (1973b), determinando las constantes cinéticas mediante las linealizaciones de Lineweaver-Burk y Eadi-Hofstee. En todos los casos la interpretación es adecuada mientras se utilicen concentraciones de enzima bajas. En cualquier caso el confinamiento de la enzima en pequeñas gotas puede introducir limitaciones difusionales que no son tenidas en cuenta en el modelo de Verger et al. (1973b).

La ecuación de Michaelis-Menten sigue también siendo utilizada para describir la cinética de hidrólisis de triglicéridos en emulsiones acuosas, incluso en trabajos publicados recientemente, como es el caso del de Wu y Tsai (2004), en el que estudian la cinética de la hidrólisis de tributirina mediante lipasa, y de la revisión teórica hecha por Straathof (2003), que describe el proceso de hidrólisis enzimática en sistemas en los que la enzima se adsorbe en la interfase como la suma de dos etapas: (1) la adsorción de la enzima en la interfase, que obedecería la ley de Langmuir, y (2) la reacción enzimática interfacial que respondería al mecanismo de Michaelis-Menten. Esta última aproximación conduce a resultados similares a los derivados del modelo de Tsai y Chang (1993) y Al-Zuhair et al. (2004a), al predecir la saturación de la interfase por la enzima.

En todos los casos descritos hasta ahora, excepto en aquellos en que se hidrolizan monocapas lipídicas, el sistema consiste en un reactor tipo tanque agitado que opera en discontinuo. Sin embargo, de cara a una utilización más eficiente de la enzima otras posibles configuraciones resultan más atractivas. En este sentido la enzima puede ser inmovilizada sobre algún tipo de soporte, lo que permite trabajar en continuo sin pérdidas apreciables de enzima. Otra alternativa para reutilizar continuamente la enzima consiste en introducir tras el reactor una etapa de filtración mediante membrana que permite retener la enzima y separar de forma continua los productos formados.

Warmuth et al. (1996) estudiaron la hidrólisis de tributirina, previamente emulsificada, en un reactor enzimático de lecho fijo, constituido por un soporte poroso que contiene la enzima adsorbida. El mecanismo propuesto considera la unión de la enzima a la molécula de tributirina con posterior liberación de los ácidos grasos, quedando un intermedio en el que la enzima permanece unida a una molécula de glicerina, que se libera en una etapa posterior. La ecuación cinética derivada de este mecanismo (ecuación II.17) tiene en cuenta el efecto inhibitorio de los productos de la reacción (ácido butírico y glicerina) lo cual permite un ajuste satisfactorio de los datos experimentales, si bien el mecanismo propuesto no parece ajustarse a las etapas generalmente aceptadas y de las que existe evidencia experimental.

$$r = \frac{r_{\max} K_1 c_T}{1 + K_1 c_T + K_3 K_4 c_{FA}^3 c_G + K_4 c_G} \quad \text{II.17}$$

Gan et al. (2000) estudian la hidrólisis de aceite de girasol en emulsión con la lipasa de *Candida rugosa* en un reactor de membrana, pero manteniendo la enzima solubilizada en la fase acuosa de forma que la misión de la membrana es la de separar de forma continua los productos de la reacción. El modelo cinético propuesto difiere bastante de los modelos descritos hasta ahora, ya que consideran la hidrólisis como una reacción de dos sustratos, el triglicérido y el agua, siendo ambos limitantes. Sin embargo los autores no aportan evidencia experimental alguna de que dicho modelo prediga adecuadamente los resultados obtenidos. Lo que sí queda establecido en su trabajo, es que el funcionamiento del reactor estudiado no difiere significativamente de un reactor discontinuo tipo tanque agitado. Este hecho se atribuye a que el único producto de la reacción que atraviesa la membrana es el glicerol, acumulándose los ácidos grasos liberados en la interfase de las gotas oleosas, como sucede en un reactor convencional.

De la revisión realizada de los modelos cinéticos propuestos para la lipólisis enzimática en sistemas micelares y emulsiones O/W se desprende que un abundante trabajo se ha realizado para caracterizar adecuadamente un sistema tan complejo como éste, en el que la cantidad y la calidad de la interfase disponible juegan un papel determinante. El mecanismo del proceso conlleva, en cualquier caso, una previa adsorción de la enzima en la interfase, seguida de las etapas catalíticas propiamente dichas, que seguramente suceden en dos pasos: (1) liberación del diglicérido con la formación de la acil-enzima y (2) posterior hidrólisis de la acil-enzima.

Los modelos propuestos, que consideran en general una sola etapa catalítica con objeto de simplificar el tratamiento cinético, consiguen un adecuado ajuste de los datos de velocidades iniciales de reacción, especialmente cuando se trabaja con bajas concentraciones de enzima, simplificación realizada por numerosos autores. Dada la complejidad del proceso de hidrólisis, en el que las propiedades de la interfase cambian de forma continua con el tiempo, ninguno de los modelos revisados intenta analizar el progreso la reacción en el tiempo.

2.4.2. Estudios cinéticos en sistemas microacuosos.

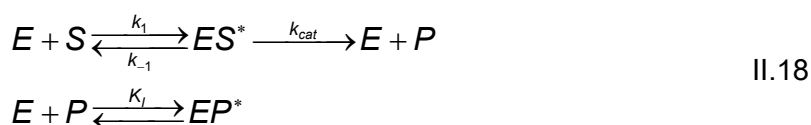
En este caso la fase continua la constituye el sustrato, puro o disuelto en algún disolvente orgánico. La cantidad de agua presente en el sistema es muy pequeña, limitándose en ocasiones a la mínima imprescindible para la estabilidad y actividad de la

enzima. Aunque estos sistemas son más adecuados para reacciones de síntesis algunos investigadores los utilizan para la hidrólisis de triglicéridos.

Un sistema utilizado con frecuencia para la hidrólisis de lípidos mediante lipasas es el conocido como “micelas inversas”. Las enzimas son encapsuladas en dominios acuosos de un tamaño extremadamente pequeño (≈ 3 nm), que las protegen del ambiente apolar circundante evitando su desnaturalización. Para la formación de estos “nanodominios” es necesaria la presencia de tensioactivo en el medio, generalmente el (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT). Estos sistemas resultan ideales para la hidrólisis de grasa y aceites, ya que presentan una enorme área interfacial, además de constituir soluciones homogéneas y ópticamente transparentes (Han y Rhee, 1986). En cuanto a la cinética de la hidrólisis enzimática de lípidos con lipasas en micelas inversas, se utiliza en general la ecuación de Michaelis-Menten para describir los datos experimentales, ya que el sistema se comporta como uno homogéneo.

Han y Rhee (1986) han estudiado la hidrólisis de aceite de oliva mediante lipasa de *Candida rugosa* encapsulada en micelas inversas, utilizando i-octano como disolvente y AOT. La variación de la velocidad inicial de reacción con la concentración de sustrato se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten, lo que permite a los autores el cálculo de las constantes cinéticas mediante la linealización de Lineweaver-Burk. La relación molar agua-tensioactivo influye de forma determinante en la velocidad de hidrólisis, existiendo un valor óptimo para la misma, ya que si es demasiado baja puede producirse desnaturalización de la enzima con la consiguiente disminución de la velocidad, mientras que si es demasiado alta disminuye la solubilidad del lípido en el nanodominio acuoso que contiene la enzima.

Tsai y Chiang (1991) han realizado el estudio cinético de la hidrólisis enzimática de aceite de oliva en las mismas condiciones que Han y Rhee (1986), pero con una relación molar agua-tensioactivo constante. Estos autores encuentran un importante efecto inhibitor del ácido oleico formado, lo que les lleva a proponer el mecanismo esquematizado en la ecuación II.18, en el que el ácido oleico (P) actúa como un inhibidor competitivo, representando EP* el complejo interfacial “muerto” de la enzima con el ácido oleico.



La ecuación cinética derivada del mecanismo expuesto, correspondiente a la de una inhibición competitiva por producto, se muestra adecuada para la predicción de los resultados experimentales para las velocidades iniciales de reacción. Los autores también aplican el modelo para la evolución de la velocidad de reacción en el tiempo, lo que conduce a ajustes satisfactorios sólo para bajas concentraciones de sustrato. Esta desviación puede atribuirse, según los autores, al elevado consumo de agua a altas concentraciones de sustrato, que reduce la relación molar agua-tensioactivo fijada inicialmente, así como al efecto inhibitor de los productos de reacción. Prazeres et al. (1993), al estudiar el mismo sistema, llegan a la conclusión de que el rápido decrecimiento de la velocidad de hidrólisis observado por Tsai y Chiang (1991) no puede deberse exclusivamente a la disminución del contenido en agua de las micelas, ya que también tiene lugar cuando el agua no es un reactivo limitante. En vez de esto proponen un mecanismo consistente en una inhibición no lineal por producto, considerando que hasta tres moléculas de ácido oleico pueden unirse a la enzima. Este modelo permite interpretar el progreso de la reacción con el tiempo incluso a altas concentraciones de sustrato.

A pesar de que el modelo de Michaelis-Menten ha sido y sigue siendo utilizado para la interpretación cinética de la hidrólisis de triglicéridos mediante lipasas encapsuladas en micelas inversas (Hossain et al., 1996; Talukder et al., 2004), en general la encapsulación de enzimas en micelas inversas da lugar a sistemas extremadamente complejos y de naturaleza dinámica, en los que existe intercambio de componentes de una micela a otra así como entre las micelas y la fase orgánica. Además resulta muy difícil caracterizar el ambiente que la lipasa “experimenta” en el interior de la micela que la contiene, y conocer las concentraciones efectivas de sustrato. Por ello las constantes cinéticas determinadas en estos sistemas dependen de las propiedades de los mismos (especialmente de la razón agua-tensioactivo) y difieren de las obtenidas cuando la enzima actúa en solución acuosa sobre un sustrato emulsificado (Carvalho y Cabral, 2000). Debido a esta complejidad, diversos modelos han sido propuestos para la interpretación mecanística de las reacciones que tienen lugar en micelas inversas (Bru et al., 1995; Carvalho y Cabral, 2000), cuya descripción se sale de los objetivos pretendidos en esta introducción.

Tal y como se ha indicado los sistemas microacuosos son ideales para llevar a cabo reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas. La reacción de esterificación es la inversa de la de hidrólisis, y las reacciones de transesterificación (acidólisis, alcoholólisis e interesterificación) pueden considerarse como reacciones compuestas de sucesivas hidrólisis y esterificaciones, por lo que el mecanismo y cinética

de dichas reacciones puede estudiarse analizando separadamente el mecanismo de las reacciones de hidrólisis y esterificación, que responde en cualquier caso a la secuencia de etapas esquematizadas en la Figura 2.5.

Normalmente la técnica experimental utilizada para llevar a cabo las reacciones de síntesis con lipasas consiste en incorporar las enzimas, libres o inmovilizadas, al medio constituido por la mezcla de los sustratos, en presencia o no de un disolvente orgánico. El descubrimiento de que las lipasas permanecen activas, e incluso mejoran su estabilidad térmica en estos sistemas es relativamente reciente (Zaks y Klibanov, 1984) habiendo abierto las puertas a un nuevo campo en la enzimología. De cualquier forma siempre es necesaria una mínima cantidad de agua para que la enzima mantenga su conformación activa sin sufrir desnaturalización.

Los modelos más aceptados para reacciones de síntesis en medios orgánicos microacuosos catalizadas por lipasas son los desarrollados para reacciones de dos sustratos, que implican la formación de complejos enzima-sustrato multimoleculares. Estos mecanismos pertenecen a dos clases fundamentalmente, los denominados “ping-pong”, que se caracterizan por la liberación de uno o más productos entre la incorporación de uno y otro sustrato al centro activo de la enzima, y los conocidos como secuenciales, de acuerdo con los cuales los dos sustratos han de unirse a la enzima antes que la liberación de producto alguno tenga lugar.

Chulalaksananukul et al. (1990) han estudiado la esterificación de ácido oleico con etanol en n-hexano mediante una lipasa inmovilizada de *Mucor miehei*. El mecanismo propuesto por estos autores es de tipo “ping-pong”, con inhibición competitiva por parte del etanol.

Para reacciones de transesterificación también resultan adecuados los mecanismos del tipo “ping-pong”, si bien las múltiples entradas y salidas de reactivos y productos los convierte en mecanismos híbridos de elevada complejidad (Reyes y Hill, 1994; Torres et al., 2005). Sin embargo, el uso de modelos que engloben los diferentes componentes del sistema en unos pocos grupos representativos, puede ser suficiente para obtener ecuaciones cinéticas que describan satisfactoriamente el comportamiento de estos sistemas. Camacho-Páez et al. (2003) utilizan un modelo cinético simple, basado en ecuaciones de primer orden con respecto a cada reactivo, para describir la acidólisis de la trioleína con ácido caprílico mediante una lipasa inmovilizada en un reactor tipo tanque agitado. El modelo propuesto asume que no se produce reacción alguna en la posición sn-2 del triglicérido y que las dos posiciones restantes son equivalentes, sin considerar la naturaleza proquiral del sustrato. A pesar de ello describe satisfactoriamente los

resultados obtenidos, siendo útil para obtener información sobre el comportamiento general del sistema. En otro trabajo (González-Moreno, 2004) estos mismos autores proponen para la acidólisis de un aceite comercial rico en EPA con ácido caprílico, un modelo cinético empírico basado en la desviación respecto de las condiciones de equilibrio (fuerza impulsora). Aunque dicho modelo estrictamente sólo es válido en las condiciones en que ha sido obtenido, permite el escalado de la producción del triglicérido estructurado.

2.4.3. Estudios cinéticos en sistemas no dispersos.

En estos casos una membrana, donde la enzima se encuentra inmovilizada, separa la fase acuosa de la orgánica (sustrato), por lo que ambas no tienen contacto directo. La membrana puede ser hidrofóbica o hidrofílica. En el caso de que sea hidrofóbica la fase lipídica puede atravesarla pero no el agua, con lo que la enzima se inmoviliza en el lado de la membrana en contacto con el agua. Cuando la membrana es hidrofílica sólo es permeable a la fase acuosa, inmovilizándose la enzima en el lado que se encuentra en contacto con el lípido (Pronk et al., 1988).

Malcata et al. (1991) han estudiado la hidrólisis de grasa láctea (mantequilla fundida) en un reactor de membrana, con una lipasa (*Aspergillus niger*) inmovilizada sobre ella. El reactor consiste en dos membranas situadas una frente a otra de forma que la fase grasa (sin adición de disolvente orgánico alguno) circula por la parte externa de ambas mientras que una solución tampón lo hace en el espacio comprendido entre ellas. El mecanismo cinético propuesto contempla la unión de una molécula de sustrato a la enzima, formándose el complejo enzima-sustrato, que posteriormente se separa para dar los productos y regenerar la enzima, con lo que la ecuación de velocidad derivada del mismo es la de Michaelis-Menten, aunque referida al área de la membrana.

Guit et al. (1991) utilizan también un reactor de membrana con lipasa inmovilizada, aunque en este caso se trata de una configuración del tipo “fibra hueca”, de modo que el sustrato, que es triacetina pura o disuelta en tolueno, circula por el exterior de las fibras de la membrana (carcasa del reactor) mientras que una solución tampón circula por el interior (lumen) de las fibras. Si bien no proponen un mecanismo para la reacción enzimática los autores utilizan la ecuación de Michaelis-Menten para estudiar los efectos de la cantidad de enzima inmovilizada en el reactor así como de la variación de la concentración de triacetina sobre la velocidad de reacción.

En general cabe destacar que en ambos sistemas la etapa de adsorción de la enzima en la interfase sustrato-agua no ha de ser considerada, ya que lo que realmente

tiene lugar es el transporte de una molécula de sustrato desde el seno de la fase lipídica hasta el centro activo de la enzima. Una vez eliminadas las limitaciones derivadas de la transferencia de materia, que cobran en estos sistemas especial importancia, la reacción puede ser descrita mediante el mecanismo de Michaelis-Menten.

2.5. APLICACIÓN DE LAS LIPASAS EN FORMULACIONES DETERGENTES.

2.5.1. Los detergentes: breve desarrollo histórico.

La palabra detergente designa a las formulaciones complejas cuyo objetivo es la eliminación de la suciedad adherida a la superficie de objetos y a la piel de los seres vivos. La aportación de los detergentes al desarrollo de la historia de la humanidad ha sido crucial, al permitir el desarrollo de hábitos higiénicos que conllevan un descenso en la incidencia de las enfermedades.

En la Tabla 2.4 se resume la evolución histórica de los detergentes, que puede considerarse que comienza con la introducción del jabón, primera sustancia utilizada por la humanidad con fines detergentes, cuya preparación es descrita por primera vez en las tablas sumerias de Lagas (siglo XXII AC), en lo que constituye el primer ejemplo de reacción química de la que se tiene registro. En un primer momento el jabón era preparado mezclando grasa vegetal o animal y cenizas de madera, hasta que los árabes en el siglo VII comenzaron a utilizar cal viva como componente alcalino en sustitución de las cenizas de madera. Esto permitió obtener jabones de mejor calidad, cuyo uso se expandió principalmente en los países del área mediterránea. Otro importante hito en la fabricación y utilización de jabones lo marca el desarrollo del proceso Leblanc para la obtención de carbonato sódico e hidróxido sódico, a finales del siglo XVIII, lo que permitió la obtención a escala industrial de un jabón sódico a precio moderado. El jabón dejaba así de ser un artículo de lujo, generalizándose su uso en todas las clases sociales, con la consiguiente mejora de las condiciones higiénicas.

Quedaban sin embargo algunos problemas por resolver, principalmente la baja eficacia del jabón en aguas duras y su alcalinidad, cuya solución surgirá en el año 1928 con el desarrollo de la primera sustancia sintética con propiedades detergentes, la cual consistía en un alcohol graso sulfatado. El primer detergente sintético formulado con sulfatos de alcoholes grasos, con propiedades superiores al jabón, fue introducido en el mercado por *Henkel* en Alemania en 1932, y por *Procter & Gamble* en EEUU en 1933. Otras sustancias sintéticas con propiedades detergentes han ido apareciendo desde ese momento, entre las que destacan los sulfonatos de alquilbenceno, y más concretamente

el tetrapropilbenzeno sulfonato, que en 1959 satisfacía el 65% de la demanda de detergentes en el mercado mundial. Sin embargo la escasa biodegradabilidad de esta sustancia, debido a la presencia de carbonos terciarios, motivó su sustitución en Europa y Estados Unidos a partir de 1960 por alquilbenzeno sulfonatos lineales, altamente biodegradables.

Tabla 2.4 Desarrollo histórico de los productos detergentes (adaptado de Van Ee, 1997)

Periodo Histórico	Nivel de desarrollo de los productos detergentes
Antes del 2100 AC	No existe constancia de productos específicamente desarrollados. El lavado se realiza por acción mecánica, posiblemente con ayuda de limos fluviales o cenizas de madera.
2100 AC	Tablas de Lagas (Sumeria). Primer registro documental de la preparación de jabón a partir de aceite de oliva y cenizas.
1000 AC	Jabón preparado a partir de grasa animal y natrón (carbonato sódico) en Egipto.
700	Los árabes utilizan cal viva en vez de cenizas en la preparación de jabón, mejorando su calidad. Se incorporan fragancias.
1700	Obtención de jabones sódicos baratos gracias al proceso Leblanc. El uso del jabón se populariza.
1900	Incorporación al jabón de silicatos y productos blanqueantes como el perborato. La nueva formulación (primera formulación detergente comercial) es comercializada en Alemania bajo el nombre de "Persil" (Henkel).
1928	Desarrollo de la primera sustancia tensioactiva sintética, los sulfatos de alcoholes grasos, como sustituto del jabón.
1928 – presente	Nuevas sustancias tensioactivas van siendo desarrolladas al objeto de mejorar las propiedades de las anteriores desde el punto de vista de su eficacia detergente, impacto ambiental, factores económicos, etc. Se incorpora una gran variedad de componentes (coadyuvantes, blanqueantes, aditivos) en las formulaciones para incrementar su eficacia.

Actualmente la demanda global está cubierta por menos de diez tipos de tensioactivos, siendo los alquilbenzeno sulfonatos lineales (LAS), los sulfonatos de alcoholes grasos (FAS), los étersulfatos de alcoholes grasos (FAES), los alcoholes grasos etoxilados (FAEO) y los jabones, los que ocupan las primeras posiciones (Altmajer-Vaz, 2004).

2.5.2. Principales componentes de las formulaciones detergentes.

Los **tensioactivos** son el principal componente y el ingrediente activo de las formulaciones detergentes. Se considera como tensioactivo toda aquella sustancia que en disolución disminuye la tensión superficial del líquido, para lo cual su molécula ha de constar de dos partes bien diferenciadas:

- Una cadena hidrófoba, generalmente formada por un número de átomos de carbono superior a 8.
- Uno o varios grupos polares que contrarrestan la hidrofobicidad de la cadena apolar.

En función de la naturaleza del grupo o grupos polares los tensioactivos se clasifican en cuatro grandes grupos:

- 1) **Aniónicos:** El grupo polar se ioniza en solución acuosa adquiriendo carga negativa. Se encuentran presentes en la práctica totalidad de las formulaciones detergentes debido a sus excelentes propiedades detergentes y humectantes. Entre ellos destaca el ácido dodecibencenosulfónico lineal (LAS), que comprende más del 40% de todos los tensioactivos utilizados en la actualidad (Scott y Jones, 2000). Otros importantes grupos de tensioactivos aniónicos son los jabones y los alquilsulfatos.
- 2) **Catiónicos:** Su grupo polar desarrolla carga positiva en solución acuosa. Los más frecuentes son las sales de amonio cuaternario. Tienen escasas propiedades detergentes y espumantes, pero gran afinidad por la piel y el cabello, por lo que se usan en formulaciones como acondicionadores y suavizantes.
- 3) **No iónicos:** No se ionizan cuando se disuelven en agua. Su hidrofiliidad proviene de la hidratación de los grupos polares presentes en su molécula (grupos etoxi, éteres amina o amida). Han ido ganando importancia en los últimos 40 años hasta alcanzar el 35% del mercado mundial que les corresponde hoy en día (Fernández et al., 2004). Por lo general son buenos agentes humectantes y emulsionantes y de poder espumante reducido. Entre ellos se encuentran los alcoholes y los ácidos grasos etoxilados, los alquilpoliglucósidos y las alcanolamidas.
- 4) **Anfóteros:** Poseen dos o más grupos funcionales con capacidad para disociarse en solución acuosa, originando iones positivos o negativos en función del pH del medio. Presentan una baja sensibilidad a la dureza del agua y buenas propiedades humectantes y espumantes, además de ser compatibles con piel y mucosas. Pertenecen a este grupo las betaínas y los ácidos alquilaminocarboxílicos.

Otra serie de sustancias forman también parte de dichas formulaciones, desempeñando funciones diversas. Entre ellas cabe destacar las siguientes:

- **Coadyuvantes o “builders”:** Generalmente son sales inorgánicas que protegen o mejoran la eficacia detergente del tensioactivo. Para ello realizan tres funciones principales: (a) reducir la dureza del agua, retirando iones calcio y magnesio del medio, (b) actuar como emulsionante de la grasa y partículas sólidas y (c) proporcionar la alcalinidad necesaria para el lavado. Uno de los coadyuvantes más empleados es el tripolifosfato sódico, que actúa como agente secuestrante y emulsionante, si bien trae consigo problemas medioambientales al provocar eutrofización en los ecosistemas acuáticos. Por esta razón está siendo sustituido por zeolitas, silicatos sódicos y ácidos policarboxílicos entre otros.
- **Blanqueantes:** Son poderosos agentes oxidantes cuya función es eliminar las manchas más persistentes. Los principales son el perborato sódico y el hipoclorito sódico (lejía).
- **Aditivos:** Se añaden en pequeñas cantidades para mejorar la eficacia del detergente. Entre ellos tenemos:
 - *Agentes antirredeposición:* Impiden que la suciedad eliminada de la superficie a lavar se redeposite en la misma o en las superficies internas del dispositivo de lavado. Pueden actuar mejorando la estabilidad de la dispersión de la suciedad en el agua de lavado o protegiendo la superficie lavada, cuando se trata de un tejido, adsorbiéndose en ella.
 - *Estabilizantes de los blanqueantes:* Impiden la descomposición prematura de los blanqueantes, que se produce en presencia de metales pesados. Se usan fosfonatos y EDTA.
 - *Enzimas:* Catalizan la descomposición de suciedades específicas. Las más utilizadas son las proteasas, amilasas y lipasas.
 - *Controladores de espuma:* Potencian o disminuyen la formación de espuma, en función del efecto deseado.
 - *Inhibidores de la corrosión:* Evitan la corrosión de los componentes metálicos de las máquinas de lavado. Se usan silicatos sódicos a bajas concentraciones.
 - *Suavizantes:* Confieren a los tejidos un tacto más agradable. Se usan sales de amonio cuaternario.

- *Blanqueantes ópticos:* Son sustancias que absorben la radiación ultravioleta invisible y la emiten en forma de luz visible correspondiente a la parte azul del espectro. De esta forma intensifican la sensación de blancura, enmascarando tonos amarillentos y manchas no eliminadas completamente. Se trata de compuestos fluorescentes (derivados diaminoestilbendisulfónicos).
 - *Perfumes y colorantes.*
- **Cargas y auxiliares de formulación:** Las cargas son sales inorgánicas inertes, como el sulfato sódico, cuya misión es ajustar el nivel de ingredientes activos a la dosis recomendada, además de evitar el apelmazamiento del detergente, mejorar las propiedades de escurrido y evitar la formación de polvo. Los auxiliares de formulación se usan en detergentes líquidos para mejorar la solubilidad y miscibilidad de los demás componentes de la formulación así como controlar su fluidez.

2.5.3. Las enzimas como componentes de las formulaciones detergentes.

La idea de incorporar enzimas en los detergentes hay que atribuírsela al alemán Otto Röhm, que en 1913 patentó el uso de proteasas pancreáticas en formulaciones detergentes para prelavado a fin de mejorar su capacidad de eliminar manchas proteináceas resistentes (Röhm, 1913). “Burnus”, el primer detergente enzimático de estas características, fue comercializado en 1914. Sin embargo su uso no pasó de ser moderado, debido por un lado a la pobre disponibilidad de las enzimas pancreáticas, que tenían que ser extraídas de la propia glándula, y por otro al hecho de que estas enzimas, tripsina y quimiotripsina, no son especialmente activas en condiciones alcalinas.

Estas limitaciones fueron superadas a finales de los años 50 y principios de los 60 del pasado siglo, al surgir las primeras proteasas bacterianas producidas a escala industrial. Se trataba de serín proteasas alcalinas procedentes de *Bacillus licheniformis*, fabricadas por Novo-Nordisk (Dinamarca) bajo el nombre de Alcalase® y por Gist-Brocades (Holanda) bajo el nombre de Maxatase®. Al ser enzimas adaptadas a las condiciones de lavado su acogida fue excelente apareciendo numerosos detergentes que las incorporaban. “Bio-40”, producido por Schnyder (Suiza, 1959) y “Biotex” fabricado por Korman y Schulte (Holanda, 1963) fueron los primeros.

Las ventas de enzimas para detergentes crecieron enormemente en el periodo 1965 – 1970, tal como se aprecia en la Figura 2.9, pero sufrieron un serio revés en la década de los 70, debido a que se dieron casos de asma alérgica producidos por inhalación de los preparados enzimáticos en polvo. El problema se solucionó fabricando los preparados enzimáticos como granulados, con lo que las ventas de enzimas para detergentes se

recuperaron y han crecido de forma continua desde entonces, como se refleja en la misma Figura 2.9.

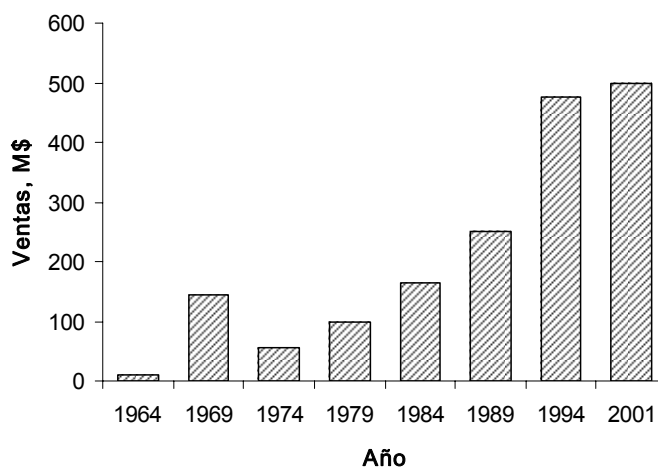


Figura 2.9. Evolución de las ventas de enzimas para detergentes (Van Ee, 1997; Novozymes, 2004)

A esta evolución al alza de las ventas de enzimas contribuyen las nuevas tendencias de la industria de detergentes que vienen impuestas por la búsqueda de componentes con bajo impacto ambiental y por la necesidad de disminuir la temperatura de lavado, como consecuencia fundamentalmente de la crisis energética de finales de los años 70.

Esto obligó por un lado a encontrar proteasas más eficaces a temperaturas moderadas (40 – 60°C), lo que se consigue a principios de los años 80, así como a desarrollar nuevas enzimas que contribuyan a incrementar la eficacia detergente en las nuevas condiciones de lavado. Así, las amilasas, que hidrolizan carbohidratos como almidón y chocolate, las lipasas, capaces de eliminar manchas de grasa y aceite, y las celulasas, que contribuyen a mantener en buen estado las fibras del tejido mediante reacciones selectivas, han sido incorporadas gradualmente a las formulaciones detergentes para usos diversos:

- Detergentes domésticos para lavado ropa,
- Detergentes domésticos para lavavajillas automáticos, y
- Detergentes de uso industrial y para hostelería.

En la Tabla 2.5 se recopilan las diversas enzimas disponibles actualmente como aditivo para detergentes, y se ofrece información relativa a las mismas.

INTRODUCCIÓN

A la vista de los datos recopilados en la Tabla 2.5 queda claro que dos importantes empresas se reparten el mercado mundial de enzimas para detergentes: Novozymes (anteriormente denominada Novo-Nordisk) y Genencor International, lo cual se aprecia también claramente en la Figura 2.10, donde se refleja el porcentaje de mercado de cada una de las compañías productoras de enzimas para detergentes en 1995. Otra importante empresa productora de enzimas fue Gist-Brocades (Holanda), hoy absorbida por la multinacional holandesa DSM, que no continua ofreciendo sus enzimas para detergentes. Por su parte Solvay Enzymes fue adquirida por Genencor International en 1996.

Tabla 2.5. Principales enzimas comerciales para detergentes disponibles en el mercado en 2005.

Nombre comercial	Origen	Fabricante	Características
Proteasas			
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes (1963)	Primera proteasa bacteriana para detergentes. Eficaz a pH alcalino.
Esperase	<i>Bacillus halodurans</i>	Novozymes (1974)	Más eficaz a pH alcalino que Alcalase
Savinase	<i>Bacillus clausii</i>	Novozymes (1982)	Más eficaz a baja temperatura que Alcalase y Esperase. Mejor relación costo/rendimiento.
Everlase	<i>Bacillus clausii</i>	Novozymes (1997)	Variante de Savinase, con una resistencia mejorada a lejías y oxidantes.
Purafect	<i>Bacillus lentus</i>	Genencor Int. (1985)	Proteasa alcalina
Purafect OX	<i>Bacillus sp</i>	Genencor Int. (1994)	Resistente a lejías y agentes oxidantes.
Purafect Prime	<i>Bacillus amyloiquefaciens</i>	Genencor Int. (2005)	Actividad mejorada a bajas temperaturas (20-40°C)
Amilasas			
Termamyl	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes (~1970)	Amilasa con resistencia mejorada a altas temperaturas y pH.
Duramyl	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozymes (1995)	Variante de Termamyl más resistente a la oxidación.
Purastar ST	<i>Bacillus licheniformis</i>	Genencor Int. (1985)	Amilasa con resistencia mejorada a altas temperaturas y pH.
Purastar OxAm	<i>Bacillus licheniformis</i>	Genencor Int. (1985)	Variante de Purastar ST más resistente a la oxidación
Lipasas			
Lipolase	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes (1987)	Primera lipasa comercial para detergentes. Resistente a los tensioactivos.
Lipolase Ultra	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes (1995)	Variante de Lipolase más eficaz a bajas temperaturas.
LipoPrime	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes (1998)	Variante de Lipolase más efectiva en el primer lavado, bajo condiciones europeas.
Lipex	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes (2002)	Lipasa efectiva en el primer lavado y a temperaturas bajas (20°C).
Celulasas			
Celluzyme	<i>Humicola insolens</i>	Novozymes (~1980)	Primera celulasa comercial para detergentes. Constituida por una mezcla de celulasas, su eficacia no compensaba su alto costo.
Carezyme	<i>Humicola insolens</i> EG V	Novozymes (1992)	Versión mejorada de Celluzyme, que contiene sólo la celulasa más activa presente en la mezcla original.
Puradax	<i>Bacillus</i> (BCE103)	Genencor Int. (1998)	Celulasa alcalina ideada para el cuidado de las fibras textiles.

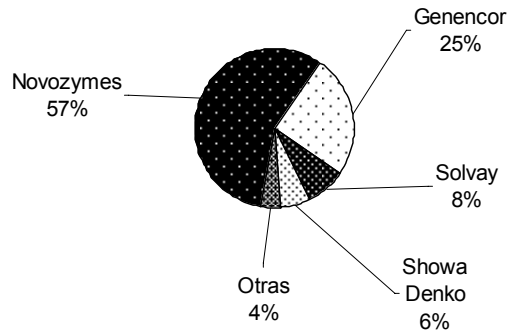


Figura 2.10 Porcentaje de mercado de las grandes compañías productoras de enzimas para detergentes en 1995. (Houston, 1997)

Actualmente las proteasas son con diferencia las enzimas más utilizadas en formulaciones detergentes, seguidas por celulasas, lipasas y amilasas, tal y como se refleja en la Tabla 2.6 donde se muestra el volumen de ventas de cada tipo de enzimas en diferentes mercados mundiales en 1995.

Tabla 2.6 Volumen de ventas (millones de dólares) de los distintos tipos de enzimas para detergentes en los diferentes mercados mundiales en 1995. (Houston, 1997).

	Total	Proteasas	Lipasas	Celulasas	Amilasas
Estados Unidos	140	80	10	40	10
Europa Occidental	185	100	20	45	20
Japón	65	30	15	20	-
Otros	125	110	10	5	-
Importancia relativa		62.1%	10.7%	21.4%	5.8%

En la actualidad las enzimas se han consolidado como un importante aditivo de las formulaciones detergentes, debido a tres hechos fundamentales:

- Incrementan la eficacia detergente a bajas temperaturas y pH moderado, condiciones de lavado que viene impuestas por razones energéticas y ambientales.
- Son altamente biodegradables y no presentan por tanto un impacto negativo en los ecosistemas acuáticos
- Permiten una acción específica contra ciertas manchas especialmente resistentes (lápiz de labios, café, sangre, etc.)

2.5.4. Desarrollo de las lipasas para detergentes.

Aunque los extractos pancreáticos utilizados por Röhm en 1913 contenían lipasas, el mayor impulso a la utilización de estas enzimas en los detergentes vino de la mano de factores medioambientales y energéticos que llevaron, sobre todo a partir de los años 70 del pasado siglo, a reducir la cantidad de fosfatos presentes en las formulaciones como coadyuvantes, y a disminuir la temperatura de lavado. Además el uso creciente de las fibras sintéticas requiere también realizar el lavado a menor temperatura. En estas condiciones los detergentes clásicos pierden afectividad, por lo que se necesita desarrollar ingredientes que, siendo adecuados desde el punto de vista medioambiental, refuercen la acción detergente. Las lipasas reúnen estas características.

La primera lipasa comercial concebida y desarrollada para su uso en detergentes no estuvo disponible en el mercado hasta 1988, año en el que Novo-Nordisk introdujo la enzima "Lipolase" (Huge-Jensen, 1988). Su microorganismo de origen es el hongo *Thermomyces lanuginosus*, aunque para su producción a gran escala el gen correspondiente fue expresado en el *Apergillus oryzae*. De esta forma se consiguió una producción aceptable de la enzima por fermentación sumergida, lo que hizo posible disminuir los costes y comercializarla. Ya en ese mismo año la enzima fue incorporada en el detergente comercial "Hi Top" (Lion, Japón).

Durante los años 90 la investigación y comercialización, en algunos casos, de lipasas para detergentes creció enormemente, lo que se tradujo en un elevado número de patentes y lanzamientos comerciales. Así, en el año 1994 las lipasas "Lumafast" (Genencor Int.) y "Lipomax" (Gist-Brocades), ambas procedentes de bacterias del género *Pseudomonas* fueron introducidas en el mercado¹.

Por su parte Novozymes ha perfeccionado su producto original "Lipolase", mediante técnicas de ingeniería genética, lo que le ha permitido desarrollar tres nuevas lipasas: "Lipolase Ultra" (1995), "LipoPrime" (1998) y "Lipex" (2002), con propiedades mejoradas en cuanto a su eficacia a bajas temperaturas y efectividad en el primer ciclo de lavado (Vind et al., 2000; Fuglsang et al., 2002). Otras lipasas adecuadas como aditivos para detergentes han sido también descubiertas y en algunos casos mejoradas mediante ingeniería genética por Novozymes, si bien no comercializadas como tales. Entre ellas se encuentran las lipasas de ciertos hongos del género *Absidia* (Gormsen et al, 1996) y las derivadas de bacterias del género *Pseudomonas* (Enomoto y Riisgaard, 1987; Ishida et al., 1998).

¹ Ninguna de estas dos lipasas comerciales se encuentra actualmente (año 2005) disponibles.

La compañía japonesa Showa Denko ha seleccionado y mejorado genéticamente una serie de lipasas procedentes de microorganismos de los géneros *Pseudomonas* (Sakai et al., 1995) y *Candida* (Nishioka et al., 1990). La lipasa procedente de *Pseudomonas* tiene una estabilidad aceptable frente a tensioactivos y proteasas, si bien su temperatura óptima es ligeramente alta (55-65°C) para ser efectiva en las condiciones de lavado usuales en la actualidad.

No sólo las empresas dedicadas al desarrollo de enzimas, sino también las grandes productoras de detergentes han dirigido sus esfuerzos al desarrollo de lipasas con esta finalidad. Así Unilever ha patentado el proceso de producción de la lipasa de *Pseudomonas glumae* que es adecuada como aditivo en formulaciones detergentes (Bos et al., 1998). La cutinasa de *Fusarium solani pisi*, ha sido también objeto de estudio de cara a su utilización en productos detergentes por parte de los laboratorios de Unilever. Esta enzima, que hidroliza de forma natural la cutina (entramado de ácidos grasos esterificados con alcoholes grasos, que ejerce una función protectora sobre las hojas y tallos de las plantas), no es realmente una lipasa, aunque su centro activo es similar. Además la modificación de su secuencia de aminoácidos de forma que la hidrofobicidad de su superficie se incremente, permite mejorar su actividad lipolítica y por tanto su eficacia en el lavado (Egmond et al., 1994).

Procter and Gamble ha estudiado la aplicación de la lipasa de *Pleurotus sapidus* para el tratamiento de manchas que contengan caroteno. Dicho tratamiento debe ir acompañado de un lavado con detergente convencional o con una enzima capaz de hidrolizar carotenoides (como una peroxidasa), para la completa eliminación de este tipo de suciedad, que es especialmente resistente (Zorn et al., 2004).

Las publicaciones relativas a la descripción de lipasas útiles para la eliminación de suciedades grasas no se limitan a las patentes, sino que también se han publicado en revistas científicas trabajos sobre la idoneidad de diferentes lipasas para este fin.

Fujii et al. (1986) emplearon la lipasa de *Candida cylindracea* para la limpieza de piezas de algodón ensuciadas con aceite de oliva. Para ello realizaron ensayos de lavado con soluciones de la enzima sin y con tensioactivos, tanto aniónicos como no iónicos. En las condiciones óptimas (2 Unidades Lipasa, 37°C y 10 minutos de lavado) la presencia de la enzima supone un incremento de la eficacia detergente del 15 al 20%, en función del tensioactivo usado, respecto a las soluciones de lavado que sólo contiene tensioactivo. La temperatura óptima de lavado corresponde a aquella a la que la enzima presenta una actividad máxima.

En otro trabajo (Tatara et al., 1985) estos mismos autores analizan la idoneidad de 8 lipasas diferentes para su empleo en formulaciones detergentes. Para ello determinan una serie de propiedades de las lipasas estudiadas, tales como los parámetros cinéticos de la hidrólisis (velocidad máxima, ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten, y grado de hidrólisis), el efecto del pH y de la temperatura en la actividad enzimática y la especificidad posicional, para en base a ellas decidir cuál sería la idónea como aditivo para detergentes. La lipasa de *Candida cylindracea* es la que presenta propiedades más favorables desde el punto de vista cinético y además su actividad es menos dependiente de la temperatura. También la lipasa de *Mucor* sp presenta propiedades satisfactorias, especialmente su escasa dependencia del pH del medio.

Xia et al. (1996) han estudiado la activación/inhibición de la lipasa de *Penicillium cyclopium* en presencia de diversos tensioactivos (aniónicos y no iónicos) y también de sales inorgánicas utilizadas como coadyuvantes en formulaciones detergentes. Si bien más adelante nos referiremos a estos resultados, cabe destacar que estos autores, en ensayos de lavado realizados a 35°C con formulaciones con y sin la enzima encuentran un incremento en la detergencia del 20% en presencia de la enzima. Este incremento es comparable al obtenido con la enzima Lipolase (Novo-Nordisk) en las mismas condiciones, por lo que los autores sostienen que la lipasa estudiada es susceptible de incrementar la eficacia de los detergentes sintéticos.

Hemachander y Puvanakrishnan (2000) han evaluado la eficacia de diversos detergentes comerciales (Ariel® y Surf Ultra®) de cara a la eliminación de suciedad oleosa de tejidos de algodón en ausencia o en presencia de la lipasa de *Ralstonia pickettii*. Para ello han optimizado las condiciones de lavado en cuanto a temperatura, concentración de detergente y de enzima y tiempo de lavado, encontrando unos valores óptimos de 40°C, 0.6%, 100 UL y 20 minutos respectivamente. En estas condiciones la incorporación de la enzima supone un incremento de la eficacia detergente del 24-27%, con respecto al producto comercial sin enzima.

Las condiciones óptimas para la producción de la lipasa de *Burkholderia* (antes *Pseudomonas*) *cepacia* han sido investigadas por Rathi et al. (2001). Además los autores evaluaron la estabilidad de esta enzima frente a aditivos comunes en los detergentes. Es de destacar su resistencia a los agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno, perborato sódico e hipoclorito sódico) así como a las proteasas, que son superiores a los de la enzima comercial Lipolase en idénticas condiciones.

Otro hecho que refleja el creciente uso de las lipasas como aditivos para detergentes es el elevado número de patentes de productos detergentes para diversos

usos que incorporan estas enzimas (Tabla 2.7). De hecho la mayor parte de la producción de lipasas se destina hoy día a la industria de los detergentes (Houde et al., 2004).

Tabla 2.7. Patentes de productos detergentes para diversos usos que contienen lipasas

Aplicación	Solicitante	Lipasas utilizadas	Referencia
Detergentes para el lavado automático de artículos textiles.	PROCTER & GAMBLE (EEUU)	<i>Humicola lanuginosa</i>	Lappas et al., 1999
	COLGATE PALMOLIVE (EEUU)	Lipasa fúngica	Beagle et al., 1997
	HENKEL KGaA (Alemania)	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Kottwitz et al., 1995
	UNILEVER (Gran Bretaña)	<i>Humicola lanuginosa</i>	Donker, 1991
Limpieza de prendas delicadas (lana, seda)	DAE WOO ELECTRONICS (Korea)	No disponible	Bae y Min, 1996
Detergentes para lavavajillas automáticos	KAO CORP. (Japón)	No disponible	Tanaka e Ide, 1999
	PROCTER & GAMBLE (EEUU)	<i>Pseudomonas pseudolacaligenes</i>	De Smet et al., 1998
	BEROL NOBEL AB (Suecia)	<i>Humicola lanuginosa</i>	Bertilsson y Cassel, 1994
	UNILEVER (Holanda)	<i>Chromobacterium viscosum</i> ;	Van Dijk, 1988
Detergente para lavado manual de vajilla	PROCTER & GAMBLE (EEUU)	<i>Pseudomonas pseudolacaligenes</i>	Goldstein, 1995
Higiene personal	LION CORP. (Japón)	No disponible	Mori et al., 2001
	XIAN CHIYUAN (China)	No disponible	Xian y Luo, 1999
	RAVIZZA SPA (Italia)	Lipasa fúngica	Verga et al., 1984
Limpieza de lentes de contacto	ROHTO PHARMA (Japón)	No disponible	Koike et al., 2000
	SEIKO EPSON CORP. (Japón)	No disponible	Iwadare, 1995
Limpieza de tuberías y desagües	KAY CHEMICAL (EEUU)	<i>Candida cylindracea</i> entre otras	Ahmed et al., 1999
Tratamiento de algodón para uso médico	PIAO AND GROUP (China)	No disponible	Wang et al, 2004
Pretratamiento de superficies	CLOROX (EEUU)	<i>Pseudomonas putida</i>	Anderson et al., 1992

Es necesario también resaltar que, a pesar de la extensa literatura existente al respecto, la mayoría de las publicaciones científicas que analizan la eficacia detergente de las lipasas se refieren a la limpieza de artículos textiles y no a superficies duras. La carencia hasta la fecha de métodos estándar para evaluar la eficacia detergente sobre superficies duras (Jurado-Alameda et al., 2003) y la menor implantación de las lipasas en las formulaciones para este fin, en comparación con las formulaciones para limpieza de textiles, explican este hecho.

2.5.5. Acción de las lipasas en el proceso de lavado.

Debido a que la suciedad de naturaleza lipídica, ya sea grasa animal, vegetal, corporal o procedente de cosméticos, es la más difícil de eliminar de las superficies a las que se halla adherida, la introducción de lipasas en los detergentes constituye en principio una aplicación muy prometedora. Además, al tratarse de biocatalizadores, son activas en dosis pequeñas y no son consumidas en la reacción de hidrólisis, por lo que continúan actuando durante todo el proceso de lavado (Wolff and Showell, 1997), propiedades ambas excelentes para un agente detergente.

El papel de las lipasas en el proceso de lavado consiste en hidrolizar los triglicéridos presentes en la suciedad grasa, produciendo diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, todos ellos más solubles en agua que el triglicérido original, incluso a temperaturas por debajo de su punto de fusión. Esta mayor solubilidad permite que la suciedad grasa sea más fácilmente eliminada, incluso con agua fría. Por otro lado la mayoría de las sustancias liberadas durante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos (ácidos grasos, mono y diglicéridos) tienen cierto carácter tensioactivo, lo que contribuye a la eliminación y solubilización de la suciedad original.

Sin embargo en condiciones de lavado reales el desempeño de las lipasas no es tan satisfactorio como cabría esperar. Algunos autores (Aaslyng et al., 1991) e incluso los mismos fabricantes de las enzimas (Novozymes, 2003) encuentran que la eficacia de las lipasas durante el primer ciclo de lavado no es la esperada. Las razones de este comportamiento se encuentran en la influencia que ciertas variables propias del proceso de lavado (temperatura, pH, concentración y naturaleza de los tensioactivos utilizados, etc.) ejercen sobre la acción de las lipasas. A continuación se discutirá separadamente el efecto de cada uno de estos factores.

2.5.5.1. Efecto de la temperatura sobre la acción de las lipasas en el lavado

La eliminación de suciedades grasas in situ por acción de las lipasas es extremadamente dependiente de la temperatura, ya que la temperatura afecta por un lado al estado de agregación de la grasa y por otro a la actividad de la enzima.

El estado físico de la suciedad grasa varía en función de la temperatura de forma diferente según se trate de grasas saturadas (fundamentalmente las de origen animal) o insaturadas (de origen vegetal). Las primeras son sólidas a temperatura ambiente, siendo hidrolizadas por las lipasas mucho más lentamente que si se encontraran en estado líquido.

La actividad lipásica aumenta con la temperatura (Tatara et al., 1985) alcanzando el óptimo en el intervalo comprendido entre 30 y 55°C, según la enzima de que se trate. La mayor contribución a la eliminación de suciedad la realizan las enzimas a su temperatura de actuación óptima, como en el caso de la lipasa de *Candida cylindracea*, que presenta una temperatura óptima de 37°C, temperatura a la cual su efecto detergente es más significativo, tal y como se aprecia en la Figura 2.11 (Fujii et al., 1986).

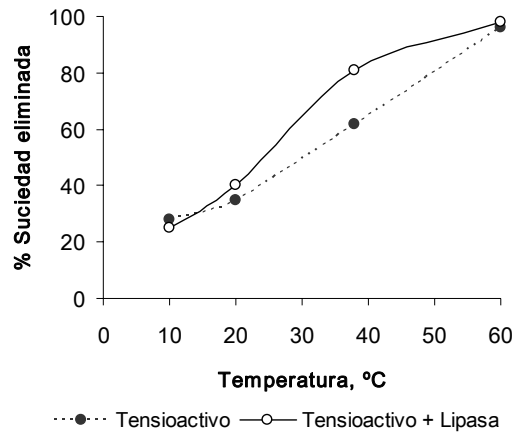


Figura 2.11. Porcentaje de suciedad (aceite de oliva) eliminado en función de la temperatura de lavado mediante una solución de tensioactivo con y sin la lipasa de *Candida cylindracea* (adaptado de Fujii et al., 1986).

Las lipasas comerciales de Novozymes alcanzan su máxima actividad entre 30 y 40°C, si bien conservan una actividad superior al 50% de la máxima entre 20 y 50°C (Novozymes, 2003).

La lipasa de *Burkholderia cepacia*, propuesta para su utilización en formulaciones detergentes por Rathi et al. (2001), es una excepción a la norma descrita, ya que resulta extraordinariamente estable a temperaturas elevadas, alcanzando su temperatura óptima a 90°C (Rathi et al., 2000).

A la vista de los datos anteriores se puede concluir que las lipasas hoy disponibles están preparadas para actuar de forma óptima a temperaturas de alrededor de 40°C. Sin embargo la tendencia que se está imponiendo a nivel mundial es la de lavar con agua a temperatura ambiente, lo que implica normalmente 20°C, pero que pueden llegar a ser menos dependiendo del lugar y la época del año. En tales condiciones la efectividad de las actuales lipasas se ve severamente afectada. Por tanto es preciso incrementar la actividad de las lipasas a temperaturas bajas (10-20°C), de forma que las dosis necesarias de las mismas se mantengan lo suficientemente bajas como para ser rentable

su utilización. Esto podrá alcanzarse gracias a la ingeniería genética, al uso de lipasas procedentes de microorganismos psicrófilos o a la combinación de ambas técnicas (Wolff and Showell, 1997).

2.5.5.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de las lipasas

Normalmente las lipasas son más eficientes a pH alcalino debido a la mejor solubilización de los productos de hidrólisis formados. Por otro lado el pH afecta a la actividad enzimática, de forma diferenciada según la enzima de que se trate. Las lipasas comerciales de Novozymes (Novozymes, 2003) y la de *Burkholderia cepacia* (Rathi et al., 2001) tienen un pH óptimo de alrededor de 10 – 11. La lipasa de *Candida cylindracea* es sin embargo más activa a pH cercano al neutro (Fujii et al., 1986).

En cualquier caso, dado que el lavado de textiles y superficies duras suele realizarse a pH más bien alcalino, este aspecto no parece suponer un problema para la actuación de las lipasas.

2.5.5.3. Efecto de los tensioactivos sobre la actividad y estabilidad de las lipasas

Es bien conocido que los tensioactivos pueden influir en la actividad y estabilidad de las enzimas. Numerosos estudios han abordado estos aspectos en el campo de las lipasas para detergentes.

Kawase et al. (1985) determinaron la actividad residual de 6 lipasas diferentes (entre ellas las de *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum* y *Pseudomonas* sp) tras ser incubadas en presencia de tensioactivos (no iónicos y aniónicos) y a diferente pH (método A). También realizaron los mismos experimentos pero incubando previamente el sustrato, en vez de la lipasa, con el tensioactivo (método B). Los resultados obtenidos usando el método B mostraron que la actividad lipásica decrecía de forma lineal para todas las lipasas estudiadas al aumentar la concentración de tensioactivo. Las medidas cinéticas indicaron que la inhibición se debe probablemente a la variación de las propiedades interfaciales del sustrato a causa de la adsorción del tensioactivo. Cuando el método A fue utilizado la variación de la actividad lipásica resultó ser diferente en función del tensioactivo en cuestión:

- Tensioactivos no iónicos: Activan a todas las lipasas estudiadas, alcanzándose una actividad máxima a una cierta concentración de tensioactivo.
- Tensioactivos aniónicos: Su efecto depende de la lipasa. Las lipasas de *Candida* y *Pseudomonas* son fuertemente inhibidas. La actividad de la lipasa de

Chromobacterium aumenta y conserva el valor máximo alcanzado en un amplio rango de concentración del tensioactivo.

Otro aspecto interesante que estos autores encuentran es que la inhibición de la actividad lipásica por los tensioactivos aniónicos puede evitarse añadiendo tensioactivos no iónicos.

Resultados similares son obtenidos por Fujii et al. (1986) al medir la eliminación de aceite de tejidos de algodón mediante la lipasa de *Candida cylindracea*. Aunque la incorporación de la enzima siempre mejora la cantidad de suciedad eliminada en comparación con soluciones que sólo contienen el tensioactivo, la lipasa resulta más efectiva con los tensioactivos no iónicos que con los aniónicos.

Hemachander y Puvanakrishnan (2000) también encuentran que la actividad y estabilidad de la lipasa de *Ralstonia pickettii* se ven severamente afectadas por el dodecil sulfato sódico (SDS), que es un tensioactivo aniónico, mientras que el Triton X-100, que es no iónico, activa dicha enzima. Rathi et al. (2001) obtienen el mismo resultado con ambos tensioactivos y la lipasa de *Burkholderia cepacia* e incluso con la enzima comercial Lipolase (Novozymes), que usan a efectos comparativos.

Si bien los tensioactivos aniónicos parecen ser generalmente los más inhibitorios, dicha capacidad varía de uno a otro. Así el alquilbencensulfonato lineal (LAS) resulta un inhibidor más potente que el SDS, que incluso, a bajas concentraciones, puede activar la lipasa de *Penicillium cyclopium* (Xia et al., 1996).

Helistö y Korpela (1998) realizaron un estudio muy completo de los efectos de una amplia gama de detergentes en la actividad lipásica, incubando previamente la enzima y el tensioactivo y midiendo a continuación la actividad de aquélla mediante el método del para-nitrofenil butirato (pNB). Si bien sus resultados no son esencialmente diferentes de los obtenidos por otros autores, encuentran una cierta dependencia del efecto del tensioactivo según la lipasa sea de origen procariótico o eucariótico. Aunque a bajas concentraciones de tensioactivo se produce siempre una activación, cualquiera que sea la enzima y el tensioactivo, las lipasas eucarióticas son más fuertemente inhibidas por concentraciones crecientes de tensioactivos aniónicos y no iónicos. Además estos autores afirman que no parece existir una correlación clara entre la CMC de los tensioactivos aniónicos y no iónicos y la activación/inhibición de las lipasas.

Una posible causa del efecto inhibitorio de los tensioactivos aniónicos la apuntan Xia et al. (1996) que sugieren la formación de un complejo enzima-tensioactivo. A bajas concentraciones de tensioactivo la interacción se produciría entre los grupos hidrófilos del

tensioactivo y ciertos grupos superficiales de la enzima. Este complejo sería catalíticamente más activo que la enzima, lo que explicaría la activación. Sin embargo, al ir aumentando la concentración de tensioactivo los grupos hidrófobos del mismo penetran en el interior de la estructura de la enzima, provocando su desnaturalización. En el caso del LAS, la presencia del grupo bencénico, que puede participar en reacciones de sustitución electrofílica, lo convierte en un poderoso agente desnaturalizante.

A pesar de todo, la interferencia lipasa-tensioactivo no ha de enfocarse sólo desde el punto de vista de la formación de complejos entre ambos. Hay que considerar que para ejercer su acción catalítica la enzima ha de adsorberse en la interfase grasa-agua, tendencia que también presenta el tensioactivo. Por tanto podría establecerse un equilibrio competitivo entre ambos. Un interesante estudio en este sentido lo realizaron Skagerlind et al. (1995). Estos autores midieron el desplazamiento de diferentes tensioactivos adsorbidos sobre gotas de i-octano en una emulsión O/W por acción de la lipasa de *Rhizomucor miehei* y viceversa. También determinaron la actividad de la lipasa sobre emulsiones de orto-nitrofenil palmitato estabilizadas con los distintos tensioactivos. Llegan a la conclusión de que la interacción de la lipasa con las gotas de la emulsión depende de:

- La carga del tensioactivo: La lipasa interacciona más intensamente con interfases cargadas positivamente y muy poco con las cargadas negativamente. Con los tensioactivos no iónicos parece haber adsorción, pues hay actividad lipásica.
- La densidad de carga: Si la presión superficial es baja la lipasa se adsorbe en la interfase sin importar la carga (positiva o negativa). Cuando aumenta la presión superficial la presencia de cargas negativas provoca la desorción de la enzima.

Aaslyng et al. (1991) atribuyen a la inhibición de la enzima en presencia de los tensioactivos el hecho de que las lipasas no resulten especialmente efectivas durante el primer ciclo de lavado, aunque sí durante los posteriores ciclos. Según estos autores la lipasa es inhibida por el tensioactivo durante el primer ciclo, por lo que su actividad disminuye. Sin embargo la enzima queda adsorbida sobre la suciedad y es capaz de realizar su acción hidrolítica durante el periodo de secado, siendo su actividad óptima cuando la concentración de agua es del 25%. Los productos de la hidrólisis son así eliminados en los siguientes lavados. Cabe sin embargo pensar que los aspectos cinéticos de la lipólisis están también detrás de este comportamiento.

A la vista de estos datos hay que concluir que la interacción lipasa-tensioactivo es un fenómeno complejo, que viene en general determinado por la naturaleza del

tensioactivo (aniónico, catiónico o no iónico) y por su concentración en el medio, y es diferente de una lipasa a otra. Por tanto para maximizar la eficacia de los detergentes que contienen lipasas dos estrategias pueden utilizarse:

- Optimizar el sistema lipasa-tensioactivo utilizado en el producto a desarrollar, para obtener la mayor eficacia detergente posible.
- Desarrollar lipasas más resistentes a la desnaturalización causada por los tensioactivos, para lo que se recurre a técnicas de ingeniería de proteínas. Mediante dichas técnicas se puede modificar la estructura primaria de la enzima de forma que se reduzca su afinidad por las moléculas de tensioactivo.

2.5.5.4. Efecto de otros componentes de los detergentes sobre la actividad y estabilidad de las lipasas

A diferencia de lo que sucede con los tensioactivos no son muchos los trabajos que estudian el efecto de coadyuvantes y de otros aditivos presentes en los detergentes sobre la actividad y estabilidad de las lipasas.

Xia et al. (1996) han estudiado los efectos de diversas sales, entre ellas los fosfatos, en la actividad de la lipasa de *Penicillium cyclopium*. Los resultados varían según la sal de que se trate:

- Las sales neutras, como el cloruro y el sulfato sódico, que son usadas como cargas en las formulaciones detergentes, estimulan a bajas concentraciones la acción de la lipasa. Este efecto puede estar relacionado con la desolvatación de la interfase grasa-agua, que facilita el contacto enzima-interfase, así como con la adsorción del anión o catión correspondiente en la interfase, que puede promover la adsorción de la propia lipasa. Skagerlind et al. (1995) encuentran un efecto parecido al estudiar la adsorción de la lipasa de *Rhizomucor miehei* sobre gotas de grasa en presencia de tensioactivo.
- Los fosfatos, como el tripolifosfato sódico, usados como coadyuvantes, presentan un ligero efecto inhibitorio. Sus múltiples cargas negativas parecen ser la causa. Por otro lado, todos los coadyuvantes, debido a su alta capacidad secuestrante de iones calcio, afectan negativamente a la acción de ciertas lipasas, como las de *Pseudomonas*, debido a que el calcio contribuye a estabilizar la estructura tridimensional de estas enzimas (Misset, 1997).

- El carbonato y el silicato sódico ejercen también un efecto inhibitorio, más acusado en el caso del carbonato. La precipitación de los iones calcio presentes en el medio explica este efecto.
- Por último las sales cálcicas refuerzan la actividad lipásica, lo que resulta lógico teniendo en cuenta que el calcio es un cofactor necesario para la acción de bastantes lipasas.

Otros componentes de los detergentes que son susceptibles de afectar a la estabilidad de las lipasas, son los compuestos blanqueantes y las proteasas.

Los agentes blanqueantes por su alta capacidad oxidante pueden atacar a las moléculas proteicas provocando su descomposición o al menos la pérdida de su funcionalidad. Ya que ciertos aminoácidos, como la metionina, la cisteína y en general los que presentan grupos aromáticos son especialmente sensibles a la oxidación, la presencia de los mismos en la superficie externa de la enzima hará que ésta ofrezca poca resistencia a ser oxidada. Para abordar este problema pueden buscarse lipasas que no presenten dichos aminoácidos en su estructura primaria o bien sustituirlos por otros similares pero más resistentes a la oxidación, usando técnicas de ingeniería de proteínas (Misset, 1997).

La presencia de proteasas entre los componentes de un detergente puede causar la descomposición de las otras enzimas presentes también en el mismo. Para mejorar la resistencia de las lipasas frente a las proteasas se recurre normalmente a la ingeniería de proteínas. En primer lugar se determinan los puntos de la secuencia de aminoácidos de la lipasa donde la proteasa realiza su acción hidrolítica, ya que ésta no se produce nunca al azar. Los aminoácidos presentes en la vecindad de dichos puntos son sustituidos por otros, de forma que la proteasa deja de mostrar preferencia por ellos. Esta técnica permitió obtener variantes de la lipasa de *Pseudomonas glumae* más resistentes a la proteólisis que la enzima original (Misset, 1997).

2.5.5.5. Aspectos cinéticos del lavado con lipasas

Los aspectos cinéticos de la lipólisis enzimática juegan un papel importante en la eficacia detergente de estas enzimas. Aun en ausencia de agentes inhibidores, para poder desarrollar su función las lipasas necesitan adsorberse sobre el sustrato e hidrolizar una cierta fracción del mismo. Dicha fracción puede en principio ser pequeña, ya que los productos de hidrólisis tienen, como se ha indicado, cierta capacidad tensioactiva y colaboran en el lavado.

Debido a esto un ciclo de lavado corto puede no ser suficiente para que la enzima ejerza su acción, teniendo en cuenta que la temperatura puede ser baja y ciertas sustancias inhibidoras estarán presentes en el medio. Las observaciones de Aaslyng et al. (1991) apuntan en esta dirección, si bien estos autores también encuentran que la reducción de la actividad del agua durante el secado posterior al primer ciclo de lavado, influye positivamente en la acción de las lipasas. Fujii et al. (1986) al estudiar la influencia del tiempo de lavado en la cantidad de suciedad eliminada por la lipasa de *Candida cylindracea* hallan que el efecto de la lipasa es más significativo a medida que se incrementa el tiempo de lavado.

Por otro lado la práctica consistente en realizar un pretratamiento con la solución de enzima y detergente, procediendo posteriormente al lavado con esa misma solución detergente, puede suponer un importante beneficio de cara a la actuación de las lipasas, al incrementar el tiempo de acción de éstas.

La Figura 2.12 refleja la importancia relativa de estos aspectos en la eficacia del lavado mediante detergentes con lipasas.

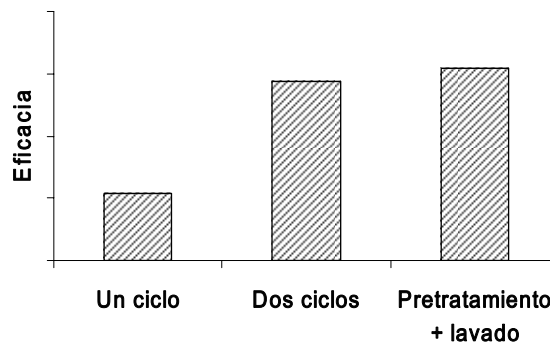


Figura 2.12. Eficacia relativa en la eliminación de suciedad grasa mediante un detergente con lipasa según se realice el lavado en un ciclo, dos ciclos o en un ciclo con pretratamiento (Wolf y Showell, 1997).

Aumentar la eficacia de las lipasas durante el primer ciclo de lavado es uno de los principales objetivos de las empresas fabricantes de enzimas para detergentes. Así Novo-Nordisk utiliza como principal reclamo para sus lipasas comerciales LipoPrime y Lipex su mejorada eficacia en un solo ciclo.

2.5.6. Perspectivas de futuro de los detergentes enzimáticos.

Las perspectivas de futuro de los aditivos enzimáticos para detergentes vendrán dadas por las tendencias imperantes en la industria de detergentes, las cuales podrían resumirse en los siguientes puntos:

- Imposiciones medioambientales: Reducción del consumo energético, usando menores temperaturas de lavado y ciclos de lavado más cortos, así como menor cantidad de agua. Empleo de productos biodegradables y, en general, de bajo impacto sobre los ecosistemas acuáticos.
- Requerimientos de higiene y seguridad: La menor temperatura de lavado hará necesario el empleo de sustancias germicidas en las formulaciones. Todos los componentes deberán ser seguros tanto para el operario que trabaja en la fabricación como para el consumidor final.
- Apertura a nuevos mercados: Fundamentalmente los de países en desarrollo, donde tradicionalmente se lava a bajas temperaturas y se emplean bajas concentraciones de detergente.
- Importancia creciente del cuidado de las fibras textiles: Se buscan tecnologías que aseguren no sólo la eliminación de la suciedad, sino también que minimicen el deterioro de los materiales lavados (color, resistencia, etc.)

En la Tabla 2.8 se analizan las consecuencias de las anteriores tendencias en el desarrollo y utilización de las enzimas para detergentes.

Tabla 2.8 Perspectivas futuras de las enzimas para detergentes

Tendencia de la industria de detergentes	Consecuencia en el campo de las enzimas para detergentes.
Restricciones medioambientales	Enzimas con eficacia mejorada a bajas temperaturas y corto tiempo de acción.
Seguridad e higiene	Enzimas con baja alergenidad, así como con actividad antimicrobiana
Nuevos mercados	Los pequeños fabricantes incorporarán enzimas (fundamentalmente proteasas) en sus formulaciones
Cuidado de las fibras	Proteasas que no dañen lana y seda. Celulasas para mejorar el aspecto de fibras dañadas.

Hay que destacar también el importante papel que la ingeniería de proteínas está teniendo y tendrá en el futuro para el desarrollo de enzimas “a medida”, especialmente adaptadas a las necesidades concretas de la industria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ENZIMAS.

Se han utilizado 3 enzimas lipolíticas diferentes, todas ellas de origen fúngico, suministradas por la casa Novozymes (Dinamarca): Lipolase 100 L EX, LipoPrime 50T y Novozym 388. Sus características, aportadas por el fabricante, se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Características de las lipasas utilizadas (datos suministrados por el fabricante).

	Lipolase 100 L EX	LipoPrime 50T	Novozym 388
Presentación	Líquido claro	Granulado	Líquido oscuro
Origen	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i> ⁽¹⁾	<i>Mucor miehei</i>
Microorganismo productor	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Peso Molecular	31 – 32 kDa	31 – 32 kDa	-
Actividad declarada (LU)	1×10^5	5×10^4	2×10^4
pH óptimo	10.0 – 10.5	10.0 – 10.5	7.5
Temperatura óptima	30 – 40°C	30 – 40°C	40°C
Aplicación	Detergentes	Detergentes	Hidrólisis y esterificación

(1) LipoPrime es una variante de Lipolase obtenida mediante ingeniería de proteínas

Las tres lipasas utilizadas son 1,3 – específicas, es decir, hidrolizan los enlaces éster en las posiciones sn-1 y sn-3 de la glicerina. El centro activo de todas ellas está constituido por la tríada serina – histidina – ácido aspártico.

Para el estudio de la influencia de las proteasas en la actividad y estabilidad de las lipasas se ha empleado la proteasa alcalina Alcalase 2.5L, cuyas características se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Características de la enzima Alcalase 2.5L (datos suministrados por el fabricante).

Presentación:	Líquido marrón oscuro.
Origen:	<i>Bacillus licheniformis</i>
Microorganismo en que es producida:	el mismo
Peso Molecular:	27.3 kDa
Temperatura óptima	60°C
pH óptimo:	7.5 – 9.5
Aplicaciones:	Detergentes.

En la determinación de la actividad lipásica se emplea una dilución del preparado enzimático comercial, sin previa purificación del mismo, en una solución tampón de

glicina (0.1M) o fosfato diácido de potasio (0.5mM). Se prepara en primer lugar una solución madre, de 10 ó 25 g/L, y posteriormente, por dilución de la misma, se obtienen las soluciones enzimáticas empleadas en los ensayos de actividad. En el caso de las soluciones madre preparadas con tampón glicina la dilución de las mismas se realiza con agua Milli-Q, mientras que las preparadas con tampón fosfato se diluyen en este mismo tampón.

Para la preparación de la solución madre se añade la cantidad de enzima necesaria a un volumen adecuado de solución tampón y se agita a 500 rpm durante 15 minutos procurando que no se incorpore aire. Posteriormente se añade solución tampón hasta el volumen final establecido (normalmente 100 ó 250 mL). La solución madre inicial se diluye hasta la concentración de ensayo solamente antes de efectuar el ensayo de actividad correspondiente.

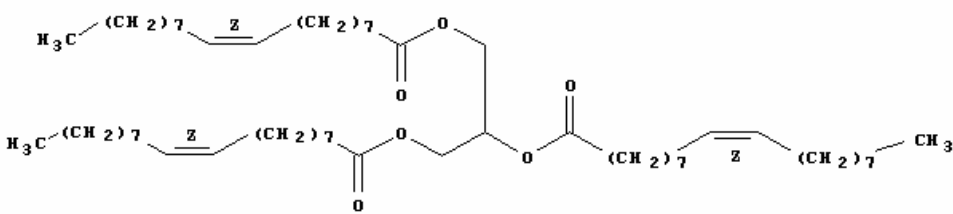
3.2. SUSTRATOS.

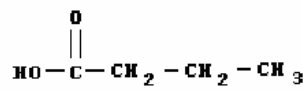
Se emplearon como sustratos dos triglicéridos diferentes, el triglicérido del ácido oleico, o trioleína (65% mín., grado técnico, Sigma), y el del ácido butírico o tributirina (99%, Sigma), que fueron empleados sin posterior purificación. Las propiedades fisicoquímicas más importantes de ambos triglicéridos se resumen en la Tabla 3.3. Se ha incluido también información relativa a sus ácidos grasos constitutivos, el oleico y el butírico, de particular importancia para la presente investigación.

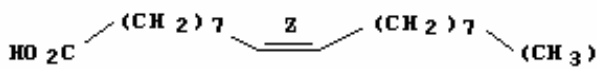
Tabla 3.3. Fórmula y propiedades fisicoquímicas de la tributirina y la trioleína y de sus ácidos grasos constitutivos.

TRIBUTIRINA	
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{O} - \text{C} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{O} \end{array} $	
Peso molecular:	302.363
Punto de fusión ⁽¹⁾ :	-75°C (1 atm)
Punto de ebullición ⁽¹⁾ :	307.5°C (1 atm)
Densidad, g/cm ³ ⁽¹⁾ :	1.0350 (20°C)
Solubilidad ⁽²⁾ :	escasamente soluble en agua
Log P ⁽³⁾ :	2.95±0.26

Tabla 3.3. – Continuación

TRIOLEÍNA	
	
Peso molecular:	885.432
Punto de fusión ⁽¹⁾ :	-4°C (1 atm)
Punto de ebullición ^{(1) / (3)} :	237°C (0.024 atm) / 819.0±55.0 °C (1 atm)
Densidad, g/cm ³ ⁽¹⁾ :	0.915 (15°C)
Solubilidad ⁽¹⁾ :	insoluble en agua
Log P ⁽³⁾ :	23.71±0.28

ÁCIDO BUTÍRICO	
	
Peso molecular:	88.106
Solubilidad ⁽¹⁾ :	miscible en agua
Log P ⁽³⁾ :	0.78±0.18
pK _a ⁽¹⁾ :	4.83 (25°C)

ÁCIDO OLEICO	
	
Peso molecular	282.462
Solubilidad ⁽¹⁾ :	insoluble en agua
Log P ⁽³⁾ :	7.70±0.20
pK _a	-

⁽¹⁾ CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84^o edición, 2003 – 2004.

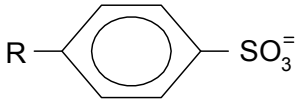
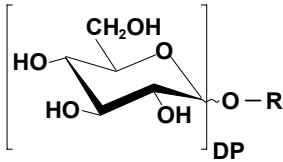
⁽²⁾ Ferrato et al., 1997

⁽³⁾ Calculado mediante "Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2004 ACD/Labs)"

3.3. TENSIOACTIVOS Y DISPERSANTES

Los tensioactivos elegidos para su estudio son de tipo aniónico (sulfonato de alquilo lineal) y no iónico (alcoholes grasos etoxilados y alquilpoliglucósidos). Todas las muestras de tensioactivo empleadas fueron de tipo comercial, no habiendo sido sometidas a posterior purificación previa a su uso. En la Tabla 3.4 se enumeran los tensioactivos utilizados y se recogen algunas de sus propiedades más relevantes:

Tabla 3.4. Descripción y principales propiedades de los tensioactivos utilizados.

ANIÓNICOS			
LAS			
Naturaleza química:	Sulfonato de alquilo lineal		
Fórmula general:			
Fabricante:	KAO Corporation (Japón)		
Longitud de la cadena alquílica (R):	C-12		
CMC (30°C) ¹ :	1.018 g/L	PM:	-
		HLB:	-
NO IÓNICOS			
FINDET 1214N/23			
Naturaleza química:	Alcohol graso etoxilado		
Fórmula General:	$R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$		
Fabricante:	KAO Corporation (Japón)		
Longitud de la cadena alquílica (R):	C-12 70% y C-14 30%		
Número promedio de moles de óxido de etileno (n):	11		
CMC (30°C) ¹ :	0.021 g/L	PM ² :	370.4
		HLB ³ :	10.4
FINDET 1214N/16			
Naturaleza química:	Alcohol graso etoxilado		
Fabricante:	KAO Corporation (Japón)		
Longitud de la cadena alquílica (R):	C-12 70% y C-14 30%		
Número promedio de moles de óxido de etileno (n):	4		
CMC (30°C):	-	PM ² :	382.8 Da
		HLB ³ :	11.9
GLUCOPON 650			
Naturaleza química:	Alquilpoliglucósido		
Fórmula General:			
Fabricante:	Henkel (Alemania)		
Longitud de la cadena alquílica (R):	C-8 a C-14		
Grado de polimerización (DP):	1.5		
CMC (30°C) ¹ :	0.073 g/L	PM ² :	382.8 Da
		HLB ³ :	11.9
BEROL LFG 61			
Naturaleza química:	Mezcla de alquilpoliglucósidos y alcoholes grasos etoxilados en proporciones no declaradas.		
Fabricante:	Akzo-Nobel (Holanda)		
CMC (30°C):	-	PM:	-
		HLB:	-

¹Martínez-Gallegos, 2005; ²Sabahi, 2004; ³Altmajer-Vaz, 2004

Se ha estudiado también la influencia de los dispersantes, utilizando para ello el polímero comercial CELLESH 100, suministrado por KAO Corporation. Se trata de un homopolímero de la sal sódica del ácido acrílico. Su fórmula molecular así como algunas de sus características técnicas se reflejan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Características del CELLESH 100 (datos aportados por el fabricante).

Fórmula molecular	
$\left[\text{CH}_2 - \underset{\text{COONa}}{\text{CH}} \right]_n$	
Carácter:	Aniónico
Peso molecular (aprox.):	1500
pH (sol. acuosa 5%):	8.0 – 9.0
Viscosidad (mPa·s):	20°C 100 - 300

3.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA

Para la medida de la actividad de las lipasas estudiadas se ha utilizado la técnica del pHstato que consiste en la valoración continua de los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos en forma de emulsión O/W. Este método se ha escogido puesto que ofrece una serie de ventajas, entre las que cabe destacar:

- Permite seguir el curso de la reacción de forma continua, sencilla y económica.
- Su aplicación es menos laboriosa que la de otras técnicas instrumentales complejas, tales como la cromatografía, que por otro lado, tampoco permiten medir en continuo.

Para cada experimento se obtiene una curva de valoración, que refleja el volumen de agente valorante (NaOH) que es necesario añadir para mantener constante el pH del medio de reacción en función del tiempo. A partir de estos datos se puede determinar la actividad enzimática. La actividad se ha expresado en unidades internacionales (LU, del inglés "*Lipase Unit*") por unidad de masa de enzima, representando 1 LU la cantidad de lipasa que libera un micromol de ácido graso por minuto en las condiciones de ensayo (Novo-Nordisk, 1991).

3.4.1. Reactivos y soluciones utilizadas.

Se han empleado los siguientes:

– *Reactivo de emulsificación:*

Su misión es asegurar la formación de una emulsión acuosa suficientemente estable de la grasa a hidrolizar. Tiene como principal agente activo la goma arábiga (6 g/L) suministrada por Merck. El resto de componentes de los que consta se enumeran a continuación:

1. Cloruro sódico (NaCl), químicamente puro, suministrado por Panreac (Barcelona, España), 17.90 g/L.
2. Fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄), químicamente puro, suministrado por Panreac, 0.410 g/L
3. Glicerina (C₃H₈O₃), químicamente pura, suministrada por Panreac, 540 mL/L
4. Agua desmineralizada, calidad Milli-Q® (Millipore Corp.) con resistividad de 18.2 MΩ-cm.

– *Solución de hidróxido sódico (NaOH), 0.05:*

Su función es la de neutralizar los ácidos grasos liberados en la reacción de hidrólisis, manteniendo constante el pH del medio durante la misma, así como fijar el pH de la emulsión antes de la adición de la enzima. Para su preparación 2.0 g de NaOH (calidad para análisis, Merck, Alemania) se disuelven en 1 L de agua desmineralizada (calidad Milli-Q). Antes de su uso se contrasta con ácido benzoico, y se renueva cada mes.

El contraste se realiza en condiciones similares a aquellas en las que posteriormente se desarrollará la medida de la actividad. Como patrón primario se emplea ácido benzoico, realizándose la valoración sobre una emulsión del mismo sustrato que vaya a ser empleado en los posteriores experimentos, preparada de forma análoga que en éstos (ver apartado 3.4.3). El procedimiento se puede resumir en las siguientes etapas:

- 1) Se toman 15 mL de la emulsión de sustrato y se colocan en el reactor, y éste a su vez dentro del baño termostatzado, hasta que se alcance la temperatura de ensayo.
- 2) Se fija el pH requerido (7.00 en todos los casos) mediante el valorador automático en modo SET (ver apartado 3.4.2).
- 3) Se añade 1 mL de solución de ácido benzoico de 1.2 g/L (aprox.) de concentración.

- 4) Nuevamente, con el sistema de valoración en modo SET, se añade la cantidad de solución de NaOH necesaria para recuperar el pH inicial (7.0), registrándose el volumen añadido.
- 5) Se repite el proceso hasta en nueve ocasiones, tomándose el volumen medio.

Para calcular la normalidad contrastada del hidróxido sódico se emplea la ecuación III.1.

$$N_{NaOH} = \frac{C_{ben} \cdot V_{ben}}{PE_{ben} \cdot V_{NaOH}} \quad \text{III.1}$$

donde:

N_{NaOH} , es la normalidad contrastada de la solución de hidróxido sódico

C_{ben} , es la concentración de la solución de ácido benzoico utilizada, en g/L

V_{ben} , es el volumen de benzoico añadido en cada determinación, en mL

PE_{ben} , es el peso equivalente del ácido benzoico, 122.12 g/eq

V_{NaOH} , es el volumen medio de valorante consumido, en mL

- *Solución de ácido benzoico ($C_7H_6O_2$), 1.2 g/L:*

Servirá como patrón primario para el contraste del hidróxido sódico. Para su preparación se utilizó ácido benzoico, calidad “para análisis”, suministrado por Panreac.

- *Solución tampón de glicina, 0.1 M, pH = 10.8 :*

Se utiliza para la preparación de la solución madre de enzima a partir del preparado comercial. La casa Novo-Nordisk recomienda su uso para liberar mayor actividad enzimática del producto comercial (Novo-Nordisk, 1991). Para su preparación se pesan 7.5 g de glicina (calidad para análisis, Panreac), y se disuelven en agua desmineralizada (800 mL aprox.), calidad Milli-Q. A continuación se añaden 3.8 g de NaOH (calidad para análisis, Merck), enrasándose finalmente a 1 L. Antes de su uso se debe ajustar el pH a 10.8 ± 0.1 con NaOH 0.1 N ó con la propia glicina.

- *Solución tampón de fosfato, 0.5 mM, pH = 7.0 :*

Se usa para preparar la solución madre enzimática a partir del preparado comercial así como para las posteriores diluciones de ésta. Se prepara disolviendo 2.983 g de

cloruro sódico (químicamente puro, Panreac) y 0.068 g de fosfato diácido de potasio (químicamente puro, Panreac) en un litro de agua desmineralizada (Milli-Q) y ajustando posteriormente su pH a 7.0 por adición de NaOH 0.05 N.

3.4.2. Equipos y material.

Para llevar a cabo la medida de la actividad enzimática mediante la técnica del pHstato se ha utilizado el valorador automático 718 STAT Titrino (Metrohm, Suiza). Este equipo permite trabajar en dos modos diferentes:

- **Modo SET:** Se trata de una valoración a punto final, es decir, se añade agente valorante hasta alcanzar el pH final deseado.
- **Modo STAT:** Permite mantener el pH del medio en un valor constante especificado. Es el que se utiliza durante la reacción de hidrólisis.

El equipo de valoración utilizado es capaz de dosificar a una velocidad máxima de 30 ó 60 mL/min y presenta un volumen mínimo de dosificación de 1 ó 2 μ L, en función de la capacidad de la bureta que se le acople (10 ó 20 mL respectivamente).

Para conseguir que los resultados obtenidos sean válidos para el posterior cálculo de la actividad, hay que asegurar que la dosificación sea continua y que la velocidad de adición de valorante sea la adecuada, pues de lo contrario se producirán situaciones indeseables como las siguientes:

- Cuando se trabaja en modo STAT si la velocidad de dosificación es demasiado baja el pH del medio siempre estará por debajo del valor pretendido (caso de dosificarse una base). Por el contrario, si la velocidad es demasiado elevada, se producirá la alternancia de periodos en los que se dosifica a alta velocidad con periodos en los que no se dosifica en absoluto, lo que da lugar a una característica curva de adición escalonada, como la representada en la Figura 3.1.
- Trabajando en modo SET una velocidad demasiado baja alargará innecesariamente la valoración, mientras que una velocidad elevada puede ocasionar que el valor final prefijado sea traspasado, lo que nos imposibilitará fijar el pH requerido mediante el equipo.

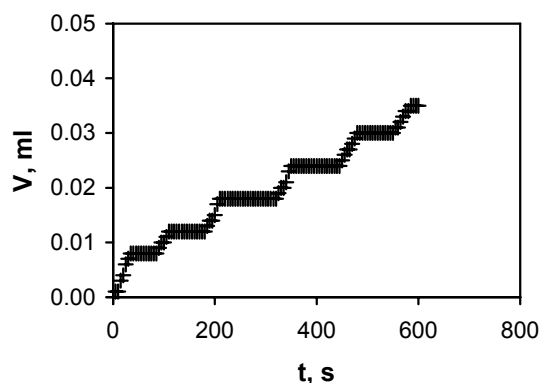


Figura 3.1. Curva de adición de valorante en modo STAT con velocidad de dosificación elevada.

Las variables de operación que se pueden ajustar para conseguir una dosificación adecuada son tres: la velocidad máxima y mínima de adición y la gama de regulación, que es el intervalo de pH fuera del cual se dosifica de forma continua.

Los valores adecuados de estos tres parámetros varían en función de las condiciones concretas del experimento que se trate, así como del modo de funcionamiento (SET ó STAT). Para los ensayos de actividad enzimática se han utilizado los valores siguientes:

- Gama de regulación: 0.01
- Velocidad máxima de adición: 0.05 a 0.15 mL/min.
- Velocidad mínima: 5 a 15 μ L/min.

Un baño termostático (modelo Tectron, Selecta, España) ha sido empleado para mantener constante la temperatura en el medio de reacción durante la hidrólisis y un agitador magnético (Selecta) se utilizó para proporcionar la agitación adecuada en el medio de reacción. Como reactor se utiliza un vaso de 25 mL de capacidad.

Para la preparación de las emulsiones utilizadas en la medida de la actividad lipásica se emplearon los equipos que se describen a continuación:

- Equipo para dispersión/emulsificación mecánica UltraTurrax T 25 Basic de la casa Ika-Werke (Alemania). En la Figura 3.2 se ha incluido una representación del equipo. Dispone de una unidad de accionamiento (1) y un cabezal de dispersión (2) intercambiable. Dicho cabezal está constituido por un elemento fijo (estator) y otro móvil (rotor) que gira a gran velocidad en el interior del primero. La mezcla a dispersar se aspira axialmente y es sometida a grandes esfuerzos de cizalla en el espacio comprendido entre rotor y estator, lo que asegura la adecuada dispersión de una fase

en otra (el triglicérido en agua, en nuestro caso). La unidad de accionamiento utilizada cuenta con un selector de velocidad que permite escoger entre 11000 y 24000 rpm

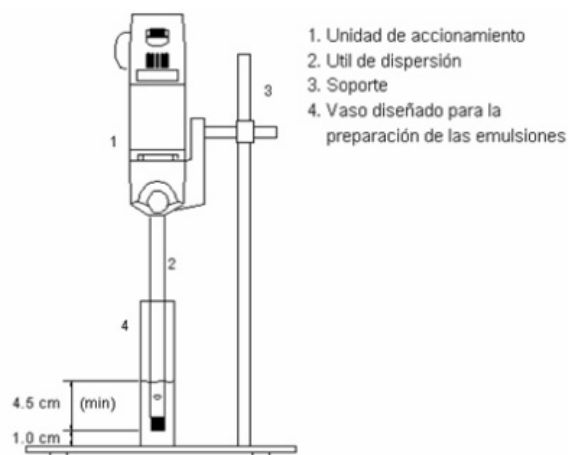


Figura 3.2. Equipo para obtención de dispersiones o emulsiones por agitación mecánica Ultra-Turrax T 25 Basic de la casa Ika-Werke.

- Vasos de vidrio para la preparación de emulsiones. Estos vasos se han dimensionado según las especificaciones del UltraTurrax T 25, de modo que el cabezal de dispersión quede siempre cubierto por una altura mínima de líquido de 5.5 cm y se mantenga a 1.0 cm del fondo. (ver Figura 3.2):
 - Para 60 mL de emulsión: diámetro 3.5 cm. y altura 15 cm.
 - Para 120 mL de emulsión: diámetro 5.0 cm. y altura 15 cm.
- Equipo de ultrasonidos modelo VIRSONIC 300, de la casa VIRTIS (Estados Unidos), compuesto por un generador y el correspondiente convertidor o sonda. En este caso las emulsiones se preparan en vasos de precipitados de 100 ó 250 mL, según su volumen total.

3.4.3. Preparación de la emulsión.

Para obtener las emulsiones se han usado tanto los ultrasonidos como la dispersión mecánica (UltraTurrax 13000 rpm). El procedimiento utilizado consta de las siguientes etapas:

- 1) En el vaso adecuado, según la cantidad de emulsión a preparar, se dosifican las cantidades de cada uno de los componentes que se especifican en la Tabla 3.6. Las

emulsiones se han preparado con un 1% en volumen de fase grasa excepto cuando se analiza el efecto de esta variable.

Tabla 3.6. Composición de las emulsiones empleadas en los ensayos de actividad.

Componente	Cantidad
Triglicérido	1% (v/v) ⁽¹⁾
Reactivo de emulsificación	1 mL por cada 6 mL de emulsión
Agua (calidad Milli-Q)	Hasta completar el volumen total

⁽¹⁾ Excepto cuando se estudia la influencia de la concentración de sustrato

- 2) Durante 1 minuto se aplican ultrasonidos a un 60% de potencia o bien se agita a 13000 rpm con el UltraTurrax. El tiempo de tratamiento se ha modificado sólo para comprobar el efecto de esta variable en la actividad lipásica.
- 3) Una vez preparada la emulsión se mantiene agitada de forma suave y procurando no introducir aire en la misma. A los diez minutos, tiempo suficiente para la eliminación del aire incorporado durante la preparación, ya puede iniciarse la hidrólisis enzimática.

3.4.4. Ensayo de actividad.

Para la determinación de la actividad lipásica se sigue la metodología que se describe a continuación:

- 1) 15 mL de la emulsión del sustrato se colocan en el reactor, y este a su vez inmerso en el baño termostático, el cual se sitúa sobre una placa agitadora (700 rpm).
- 2) Se espera el tiempo necesario hasta que la emulsión alcance la temperatura fijada para el experimento, que fue siempre de 30°C, excepto cuando se estudiaba el efecto de esta variable.
- 3) Al objeto de fijar en el medio de reacción el pH de ensayo se trabaja con el valorador automático en el modo SET, de forma que se alcance el pH deseado para llevar a cabo la reacción enzimática, el cual fue siempre de 7.00 excepto cuando se estudia su efecto sobre la actividad enzimática.
- 4) Se coloca el valorador en el modo STAT y se inicia la reacción agregando 1 mL de solución de la enzima a ensayar. El pH del medio se mantiene constante por adición continua de NaOH 0.05N.
- 5) El volumen de agente valorante añadido se registra durante 10 minutos.

3.4.5. Cálculo de la actividad enzimática.

A partir de la curva de valoración obtenida es posible calcular la actividad enzimática, para lo que se utiliza el criterio propuesto en el método analítico suministrado por el fabricante de las enzimas (Novo-Nordisk, 1991). Este criterio calcula la velocidad de hidrólisis a partir de la pendiente de la curva de valoración en el intervalo comprendido entre 180 y 480 segundos, del total de 600 durante los que se sigue la reacción. El valor obtenido representará la velocidad inicial siempre que el volumen de base añadido sea una función lineal del tiempo durante los primeros 480 segundos de reacción. Para que esto sea así es recomendable utilizar una concentración de enzima en torno a 1.0 UL/mL.

Para cualquiera de los dos sustratos utilizados, se define la Unidad Lipasa (LU) como la cantidad de enzima capaz de liberar un micromol por minuto del ácido graso correspondiente (butírico u oleico).

Así, una vez calculada la velocidad de hidrólisis, la actividad se calculará por medio de la ecuación III.2.

$$A = \frac{v \cdot N_{NaOH} \cdot 10^6}{e_{exp}} \quad \text{III.2}$$

donde:

A , es la actividad de la enzima, expresada en Unidades Lipasa por gramo del preparado comercial (LU/g)

v , es la velocidad media de adición de NaOH en el intervalo comprendido entre 180 y 480 segundos, que es igual a la pendiente de la curva de valoración en dicho intervalo, en mL/min.

N_{NaOH} , la normalidad del agente valorante, NaOH, adecuadamente contrastada.

e_{exp} , es la concentración de la solución enzimática que se añade (1 mL) a la emulsión del sustrato (15 mL) para iniciar la reacción de hidrólisis, en g/L.

3.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES EN LA ACTIVIDAD LIPÁSICA.

La actividad enzimática se ha estudiado para las diferentes enzimas y sustratos utilizados, analizando la influencia sobre la misma de las siguientes variables:

- Concentración de enzima (e_{exp}).

- Concentración de sustrato. Llamaremos α_{exp} a la fracción volumétrica de sustrato (tributirina o trioleína) en la emulsión antes de la incorporación de la enzima.
- Temperatura
- pH
- Técnica de emulsificación
- Estabilidad de la emulsión

En las Tabla 3.7 y Tabla 3.8 se resumen los distintos experimentos realizados con tributirina y trioleína como sustrato respectivamente, junto con las condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 3.7. Resumen de los ensayos de actividad realizados con TRIBUTIRINA como sustrato.

Variable estudiada	Enzima	e_{exp} , g/L	α_{exp} , v/v	Temperatura, °C	pH	Método de emulsificación
e_{exp}	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Lipolase 100	0.10	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Lipolase 100	10.0	0.01	30	7.0	UltraTurrax
α_{exp}	Lipolase 100	0.05	0.01	30	7.0	UltraTurrax
α_{exp}	Lipolase 100	0.05	0.02	30	7.0	UltraTurrax
Temperatura	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
Temperatura	Lipolase 100	0.01	0.01	40	7.0	Ultrasonidos
Temperatura	Lipolase 100	0.01	0.01	50	7.0	Ultrasonidos
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	6.5	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.5	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	8.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	8.5	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	9.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	9.5	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	10.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	10.5	UltraTurrax
Téc. emulsif.	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
Téc. emulsif.	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	UltraTurrax
Estab. emuls.	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
e_{exp}	LipoPrime 50T	0.03	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Novozym 388	0.05	0.01	30	7.0	UltraTurrax

Tabla 3.8. Resumen de los ensayos de actividad realizados con TRIOLEÍNA como sustrato.

Variable estudiada	Enzima	e_{exp} , g/L	α_{exp} , v/v	Temperatura, °C	pH	Método de emulsificación
e_{exp}	Lipolase 100	0.05	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Lipolase 100	0.10	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	UltraTurrax
α_{exp}	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	UltraTurrax
α_{exp}	Lipolase 100	2.50	0.02	30	7.0	UltraTurrax
Temperatura	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
Temperatura	Lipolase 100	2.50	0.01	40	7.0	Ultrasonidos
Temperatura	Lipolase 100	2.50	0.01	50	7.0	Ultrasonidos
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	7.5	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	8.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	9.0	UltraTurrax
pH	Lipolase 100	0.01	0.01	30	9.5	UltraTurrax
Téc. emulsif.	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
Téc. emulsif.	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	UltraTurrax
Estab. emuls.	Lipolase 100	2.50	0.01	30	7.0	Ultrasonidos
e_{exp}	LipoPrime 50T	5.00	0.01	30	7.0	UltraTurrax
e_{exp}	Novozym 388	10.0	0.01	30	7.0	UltraTurrax

Por otro lado, utilizando la enzima Lipolase 100 y tributirina como sustrato, se ha analizado también la influencia en la actividad y estabilidad de dicha lipasa de ciertas sustancias comunes en las formulaciones detergentes, tales como tensioactivos, dispersantes y proteasas. El procedimiento experimental utilizado se describe a continuación:

- **Influencia de los tensioactivos:** Se planificaron experimentos en los que la enzima 100 se incubó durante una hora en presencia de distintas cantidades de los siguientes tensioactivos: Findet 1214N/23, GlucoPON 650 y Berol LFG 61. Se realizó también un ensayo control en ausencia de tensioactivo. El procedimiento seguido fue el siguiente:
 - 1) Se prepararon soluciones de los tensioactivos a ensayar en agua desmineralizada (Milli-Q) ajustando su pH a 7.00, por adición de HCl 0.01 N ó NaOH 0.05 N.
 - 2) En un matraz aforado se mezclaron la solución madre de enzima y la solución del tensioactivo, enrasándose posteriormente con solución tampón de fosfato. La concentración final de enzima tras enrasar fue siempre de 0.01 g/L, variándose la del tensioactivo.
 - 3) La solución así preparada se mantiene en reposo y a temperatura ambiente durante una hora, realizándose a continuación tres ensayos de actividad consecutivos.

Los experimentos realizados y las condiciones experimentales utilizadas se resumen en la Tabla 3.9. Todos ellos se realizaron a 30°C, pH 7.0 y empleando UltraTurrax en la preparación de las emulsiones.

Tabla 3.9. Ensayos para estudiar la influencia de diferentes tensioactivos en la actividad de la enzima Lipolase 100 y con tributirina como sustrato.

Tensioactivo utilizado	Concentración de tensioactivo	e_{exp} , g/L	α_{exp} , v/v
Findet1214N/23	10 mg/L	0.01	0.01
Glucopon 650	10 mg/L	0.01	0.01
Glucopon 650	50 mg/L	0.01	0.01
Glucopon 650	100 mg/L	0.01	0.01
Glucopon 650	250 mg/L	0.01	0.01
Berol LFG 61	50 mg/L	0.01	0.01
Berol LFG 61	100 mg/L	0.01	0.01
Berol LFG 61	500 mg/L	0.01	0.01
Berol LFG 61	1000 mg/L	0.01	0.01

- **Influencia del dispersante Cellesh 100:** Se midió la actividad de enzima Lipolase 100 tras ser incubada durante una hora en presencia 0.1 g/L del mismo. El mismo procedimiento se llevó a cabo pero incubando la emulsión con la misma cantidad de Cellesh 100. Transcurrido este tiempo se efectuaron tres ensayos de actividad consecutivos. Los experimentos se llevaron a cabo a 30°C, pH 7.0 y con emulsiones de tributirina preparadas mediante UltraTurrax. Las concentraciones de enzima y sustrato fueron de 0.01 g/L y 0.01 (fracción v/v) respectivamente.
- **Influencia de la proteasa Alcalase 2.5L:** Para estudiar la influencia de la proteasa en la actividad lipásica se añadieron al medio de reacción 0.5 mL de solución de la enzima Lipolase 100 (0.02 g/L) y otros 0.5 mL de solución de la proteasa Alcalase 2.5L (aprox. 32 g/L, de modo que la concentración final sea de 1 g/L en proteasa). Se efectuaron también ensayos análogos pero sin tributirina, para estudiar la hidrólisis de la lipasa, y ensayos sin adición de lipasa, para estudiar el posible efecto lipolítico de la proteasa. Los ensayos de actividad se efectuaron a 30°C, pH 7.0 y con emulsiones de tributirina obtenidas mediante UltraTurrax.

Por otro lado, para estudiar la estabilidad de la lipasa en presencia de proteasas, se planificaron experimentos en los que se determinó la actividad de una solución de Lipolase 100 con distintas concentraciones de proteasa al comienzo y al

final de un periodo de almacenamiento de 5 días a 25°C. Las condiciones experimentales utilizadas se resumen en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Experimentos para estudiar la estabilidad de la enzima Lipolase 100 durante su almacenamiento en presencia de proteasas.

Condiciones de almacenamiento		Condiciones de ensayo			
Concentración de Lipolase 100	Concentración de Alcalase 2.5L	Concentración de Lipolase 100	Concentración de Alcalase 2.5L	pH	Temp., °C
0.10 g/L	0.01 g/L	0.01 g/L	0.001 g/L	7.0	30
0.10 g/L	0.10 g/L	0.01 g/L	0.010 g/L	7.0	30
0.10 g/L	10.0 g/L	0.01 g/L	1.0 g/L	7.0	30

3.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES POR COLORIMETRÍA.

Como técnica alternativa para seguir la hidrólisis enzimática de la trioleína y calcular la actividad de la enzima sobre este sustrato, se ha adaptado el método colorimétrico propuesto por Kwon y Rhee (1986), consistente en la determinación espectrofotométrica de la sal cúprica del ácido oleico. A continuación se detallan los reactivos y equipos necesarios así como la metodología seguida para su puesta punto y aplicación.

3.4.6. Reactivos.

Además de los necesarios para efectuar la hidrólisis enzimática, se emplearon los siguientes:

- Acetato de cobre (II) 1-hidrato ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), de calidad para análisis, suministrado por Panreac.
- Piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), de calidad para síntesis, suministrada por Panreac.
- Ácido clorhídrico (HCl) 6 N, obtenido por dilución de una solución madre de 37% de riqueza y 1.19 g/cm^3 de densidad (a 15°C) de calidad para análisis, suministrada por Panreac.
- iso-Octano (C_8H_{18}), de calidad para análisis instrumental, suministrado por Panreac.
- Ácido oleico ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), calidad purísimo, suministrado por Panreac.

3.4.7. Equipos y material.

La determinación espectrofotométrica de la sal cúprica del ácido oleico se realizó en un espectrofotómetro ultravioleta/visible modelo Helios α , de la casa Spectronic Unicam

(Reino Unido), capaz de medir en un intervalo de longitudes de onda de 190 a 1100 nm, con una resolución de 1nm.

Un agitador tipo vórtex, modelo Eurolab, de la casa Merck, se utilizó para la extracción del ácido oleico desde la emulsión acuosa con el iso-octano como disolvente.

Para mantener un baño de agua en ebullición donde calentar las muestras a fin de conseguir la desactivación de la enzima, se utilizó una placa calefactora (Agimatic-N, Selecta).

3.4.8. Puesta a punto del método.

Para la obtención de la recta de calibrado se prepararon disoluciones de ácido oleico en i-octano de distinta concentración por dilución de una solución madre inicial. La sal cúprica del ácido oleico se obtuvo haciendo reaccionar 5 mL de la solución de ácido oleico en i-octano con 1 mL de un reactivo constituido por una solución acuosa al 5% (p/v) de acetato cúprico cuyo pH se ajusta previamente a 6.1 por adición de piridina. La reacción se lleva a cabo agitando en el dispositivo vórtex durante 1 minuto.

A continuación se separó la fase orgánica y se determinó espectrofotométricamente la sal cúprica formada, obteniéndose los resultados que se recogen en la Tabla 3.11. La ecuación III.3 muestra la recta patrón obtenida por regresión lineal de los datos anteriores.

Tabla 3.11. Recta patrón para la determinación colorimétrica del ácido oleico.

C_{ol} (mmol/L)	Absorbancia	Desviación estándar
0.00	0.038	0.006
0.71	0.119	0.002
0.80	0.118	0.008
1.00	0.145	0.010
1.42	0.204	0.006
1.60	0.221	0.017
2.00	0.260	0.012
2.12	0.289	0.006
2.40	0.307	0.016
2.83	0.371	0.008
3.20	0.396	0.014
3.54	0.452	0.013
4.00	0.482	0.017
4.25	0.535	0.002
6.00	0.695	0.019
8.00	0.908	0.022
10.0	1.125	0.023

$$Ab = 0.1092 \cdot C_{oi} + 0.0450$$

III.3

Siendo Ab la absorbancia y C_{oi} la concentración de ácido oleico en mmol/L. El coeficiente de determinación (R^2) fue de 0.997.

Dado que el método colorimétrico puede ser empleado para seguir la hidrólisis enzimática de la trioleína durante los ensayos de actividad así como durante los experimentos de lavado, interesa conocer la posible interferencia de ciertos componentes presentes en el medio de reacción en la determinación espectrofotométrica del ácido oleico. En concreto se ha verificado la influencia de la goma arábica (G.A.) y del tensioactivo alquilpoliglucósido GlucoPON 650 (G650), este último en presencia o ausencia de antiespumante (polipropilenglicol), en la lectura espectrofotométrica final. Para ello se obtuvieron rectas patrón en las que distintas cantidades de ácido oleico, previamente disuelto en i-octano, se agitaron junto con una disolución del compuesto a ensayar en el dispositivo vórtex durante 1 minuto. Dicha agitación se llevó a cabo tanto en caliente como a temperatura ambiente. Los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen para cada una de dichas rectas se compararon con los de la recta patrón de referencia, ecuación III.3, mediante un test de contraste de hipótesis a un nivel de confianza del 95%. Los resultados del test se incluyen en Tabla 3.12. Para cada recta patrón se refleja el valor de la pendiente (b), la ordenada en el origen (a) y el coeficiente de determinación (R^2).

Tabla 3.12. Test de contraste de hipótesis para verificar posibles interferencias en la determinación colorimétrica del ácido oleico.

Medio	Extracción	b	a	R ²	test sobre:	
					b	a
Agua MilliQ	Caliente	0.1096	0.04267	0.99997	(0)	(0)
G. A. (1 g/L)	Caliente	0.1113	0.06883	0.99201	(0)	(0)
G. A. (1 g/L)	T ^a amb.	0.1097	0.04150	0.99998	(0)	(0)
G650 (1 g/L)	Caliente	****	****	****	****	****
G650 (1 g/L)	T ^a amb.	0.1094	0.04300	0.99984	(0)	(0)
G650 (1 g/L) + Antiespumante (0.01%)	Caliente	****	****	****	****	****
G650 (1 g/L) + Antiespumante (0.01%)	T ^a amb.	0.1104	0.04733	0.99961	(0)	(0)

(0) No existen diferencias significativas con los parámetros de referencia

****: No fue posible la extracción por formación de una emulsión estable.

Los resultados de los test de contraste de hipótesis demuestran que, de realizarse la extracción en frío, no existen diferencias significativas entre los valores de la pendiente y la ordenada de las rectas patrón obtenidas en presencia de los posibles interferentes y los valores de referencia, lo que también se observa claramente en la Figura 3.3, donde se comparan las rectas patrón obtenidas realizando la extracción a temperatura ambiente con la de referencia. Por tanto se puede afirmar que ni la goma arábica ni el Glucocon 650 interfieren en la determinación colorimétrica del ácido oleico.

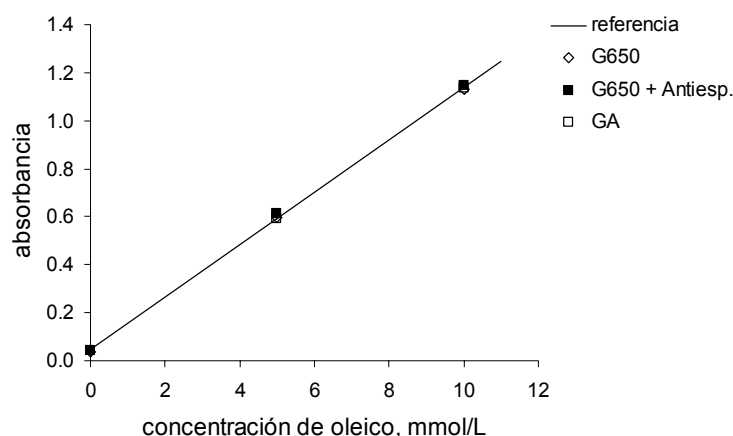


Figura 3.3. Comparación de las rectas patrón obtenidas mediante extracción en frío con la de recta de referencia

Sin embargo, un fenómeno que se presenta repetidamente cuando se lleva a cabo la agitación en caliente es la formación de una emulsión estable del i-octano en la fase acuosa o viceversa, que impide la posterior separación. Este efecto no es atenuado por la incorporación de antiespumante. Incluso cuando dicha separación es posible, como en el caso de la goma arábica, se obtiene una fase orgánica ligeramente turbia, lo que se pone de manifiesto en el valor superior de la ordenada en el origen, que a pesar de ello no resulta significativamente diferente del valor de referencia. Por tanto, antes que interferencias en la determinación espectrofotométrica por parte de goma arábica y el tensioactivo ensayado, pueden existir interferencias en la extracción cuando esta se realiza en caliente.

Por último, también como paso previo a la aplicación del método se ha optimizado el proceso de extracción del ácido oleico presente en las muestras. Para ello se ha estudiado la influencia de la temperatura a la que se lleva a cabo la extracción y del tiempo de agitación así como al posible efecto adverso de la goma arábica, sobre la eficacia del proceso extractivo.

Con este fin, se emulsionó una cantidad conocida de ácido oleico en agua desmineralizada con goma arábica (1 g/L) como estabilizante, procediéndose posteriormente a su separación y cuantificación, calculándose la cantidad de ácido recuperada. El proceso de extracción se llevó a cabo tanto a temperatura ambiente como en caliente y empleando distintos tiempos de agitación. El porcentaje recuperado y la desviación estándar para cada caso se recogen en la Tabla 3.13, donde se aprecia que la extracción en caliente resulta más efectiva, a igual tiempo de agitación. Sin embargo, como se ha indicado, la extracción en caliente no resulta deseable pues la separación de las fases tras la extracción resulta más difícil, especialmente en presencia de tensioactivo. La extracción a temperatura ambiente durante 5 minutos no presenta este problema y puede considerarse completa. Por esta razón se ha decidido realizar la extracción a temperatura ambiente, agitando durante 5 minutos.

Tabla 3.13. Recuperación del ácido oleico según el procedimiento de extracción.

Método de extracción	C_{oM} , mmol/L	Ab	C_{oR} , mmol/L	Re, %
Agitación a T ^a amb., 1 minuto	5.021	0.413	3.370	67 ± 5
Agitación a T ^a amb., 2 minutos	5.021	0.522	4.372	87 ± 7
Agitación a T ^a amb., 5 minutos	5.009	0.584	4.934	99 ± 5
Agitación en caliente, 2 minutos	5.021	0.567	4.781	95.2 ± 0.4

C_{oM} es la concentración, conocida, de ácido oleico en la muestra.

Ab es la absorbancia promedio de las muestras número de réplicas (n) ≥ 3.

C_{oR} es la concentración de ácido oleico promedio recuperada.

Re es el porcentaje de recuperación promedio ± la desviación estándar.

3.4.9. Procedimiento experimental.

Teniendo en cuenta las anteriores conclusiones, para la cuantificación mediante el método colorimétrico del ácido oleico liberado durante la hidrólisis enzimática de la trioleína se siguen los siguientes pasos:

- 1) El contenido del reactor donde se está produciendo la hidrólisis enzimática (aprox. 16 mL) se trasvasa a un tubo de vidrio provisto de cierre, al que se añaden 0.5 mL de HCl 6 N y 15 mL de i-octano. La adición del ácido clorhídrico ayuda a detener la reacción y facilita la extracción posterior del ácido oleico.
- 2) La mezcla se lleva a ebullición en un baño de agua durante 10 minutos, lo que asegura la desactivación enzimática.
- 3) Tras su enfriamiento se extrae el ácido oleico por agitación durante 5 minutos en un dispositivo tipo vórtex.

- 4) Se deja reposar durante 15 minutos como mínimo tras lo cual se trasvasan dos alícuotas de 5 mL de la fase orgánica a tubos de ensayo.
- 5) En dichos tubos se añade 1 mL de solución de acetato cúprico (pH 6.1) y se agita nuevamente en vórtex (1.5 minutos), de modo que se forme la sal cúprica del ácido oleico.
- 6) Se deja reposar y se mide la absorbancia de la fase orgánica en el espectrofotómetro a 715 nm.

3.7. EXPERIMENTOS DE DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.

Los fenómenos de desactivación enzimática condicionan en gran medida la eficacia de las enzimas en las condiciones reales de uso. Por ello se han realizado experimentos para estudiar la estabilidad de las enzimas lipolíticas utilizadas en la presente investigación. A continuación se describen tanto los equipos como la metodología empleada en la realización de dichos experimentos.

Todas las medidas de actividad a las que se hace referencia en este apartado se realizaron a pH 7.0 y 30°C sobre emulsiones de tributirina (1%) preparadas por dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.), excepto las descritas en el apartado 3.7.2. que fueron realizadas sobre emulsiones preparadas mediante ultrasonidos (60%, 1 min.).

3.7.1. Equipos y material.

Además de los equipos utilizados para la medida de la actividad lipásica se utilizaron los siguientes:

- Agitador magnético con plato independiente sumergible e indicador digital de la velocidad de agitación (Agimatic-Rev-W, Selecta).
- Baño termostático (Clifton, Reino Unido) con sistema de agitación propio.

3.7.2. Desactivación en condiciones de lavado: procedimiento experimental.

Dado el objetivo de la presente investigación, es de particular interés conocer la estabilidad de las enzimas frente a la desactivación en condiciones similares a aquellas que se dan en un ciclo convencional de lavado, en el que la enzima se encuentra en un medio dinámico y a temperaturas de hasta 50°C. Para simular dicha situación se sometió a las enzimas a agitación (1000 rpm) en el interior de un baño termostático a diferentes temperaturas (30, 40 y 50°C). De esta forma se estudia el efecto combinado de ambos factores, temperatura y esfuerzo mecánico, sobre la actividad enzimática.

Los experimentos se realizaron como se describe a continuación:

- 1) La solución de enzima (50 mL, con la misma concentración de enzima que la empleada en el ensayo de actividad) se dispone en un vaso de vidrio de 8.1 cm de altura y 4.4 cm de diámetro interno y provisto de cierre, el cual se introduce a su vez en el interior del baño termostático a la temperatura fijada para el experimento.
- 2) Gracias a la placa agitadora sumergible se fija una velocidad de 1000 rpm. Como elemento agitador se usa un imán de 2.3 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro.
- 3) Se realizan medidas de actividad a diferentes tiempos, incluido un ensayo control a tiempo 0.

Todos los ensayos de actividad se realizan con la misma emulsión, preparada inicialmente.

3.7.3. Desactivación enzimática con la temperatura en ausencia de agitación: procedimiento experimental.

La solución de enzima a ensayar, con la misma concentración que la utilizada para el ensayo de actividad, se mantuvo en el baño termostático, a la temperatura fijada para el experimento, dentro de un tubo de vidrio cerrado y sin agitación alguna. A intervalos de tiempo fijos se realizan ensayos de actividad. Como control se realiza un ensayo inicial (tiempo 0). Todas las medidas se realizan con la misma emulsión del sustrato empleada inicialmente.

3.7.4. Desactivación enzimática con la agitación a temperatura ambiente: procedimiento experimental.

La metodología experimental para estudiar el efecto de la agitación mecánica en la desactivación enzimática se puede sintetizar en las siguientes etapas:

- 1) Se introducen 50 mL de la solución de enzima a ensayar, con la misma concentración que la utilizada en el ensayo de actividad, en un vaso de vidrio de 8.1 cm de altura y 4.4 cm de diámetro interno, provisto de cierre. Como elemento agitador se usa un imán de 2.3 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro.
- 2) A temperatura ambiente y con ayuda del agitador magnético provisto de selector de velocidad se fijan velocidades de agitación entre 300 y 900 rpm.
- 3) Se realizan medidas de actividad en función del tiempo, incluido un ensayo control a tiempo 0.

Todas las medidas se realizan con la misma emulsión empleada inicialmente. Para estudiar el efecto estabilizador de la glicina se efectuaron experimentos similares pero tras un tiempo fijo de agitación de 1.5 horas.

Todos los experimentos que se han llevado a cabo para el estudio de la actividad enzimática, junto con las condiciones en que han sido realizados, se resumen en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Resumen de los experimentos de desactivación enzimática.

Enzima	Velocidad de agitación	Temperatura	Tampón
Desactivación en Condiciones de Lavado			
Lipolase 100	1000 rpm	30°C	Fosfato
Lipolase 100	1000 rpm	40°C	Fosfato
Lipolase 100	1000 rpm	50°C	Fosfato
LipoPrime 50T	1000 rpm	30°C	Fosfato
LipoPrime 50T	1000 rpm	40°C	Fosfato
LipoPrime 50T	1000 rpm	50°C	Fosfato
Novozym 388	1000 rpm	30°C	Fosfato
Novozym 388	1000 rpm	40°C	Fosfato
Novozym 388	1000 rpm	50°C	Fosfato
Desactivación con la Temperatura			
Lipolase 100	0 rpm	30°C	Fosfato
Lipolase 100	0 rpm	40°C	Fosfato
Lipolase 100	0 rpm	50°C	Fosfato y Glicina
Lipolase 100	0 rpm	60°C	Fosfato y Glicina
Desactivación con la Agitación			
Lipolase 100	300 rpm	25°C	Fosfato
Lipolase 100	400 rpm	25°C	Glicina
Lipolase 100	500 rpm	25°C	Fosfato
Lipolase 100	700 rpm	25°C	Fosfato
Lipolase 100	750 rpm	25°C	Glicina
Lipolase 100	900 rpm	25°C	Fosfato/Glicina
Lipolase 100	1000 rpm	25°C	Glicina
Lipolase 100	1200 rpm	25°C	Glicina

3.8. DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE GOTA DE LAS EMULSIONES POR DIFRACCIÓN LÁSER.

Uno de los parámetros que influyen de forma más determinante en la hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsión acuosa, es la distribución de tamaños de gota de la emulsión, o más en concreto, su área interfacial específica, que viene determinada por dicha distribución de tamaños. Cuanto mayor sea el área interfacial de la emulsión, mayor será la superficie del triglicérido que queda expuesta a la enzima, lo cual favorece la acción de ésta. Por esta razón para estudiar la actividad lipásica así como la cinética de

la hidrólisis enzimática de triglicéridos, resulta de gran utilidad conocer la distribución de tamaños de gota de las emulsiones, así como el área interfacial de las mismas.

Las medidas de distribuciones de tamaño realizadas para caracterizar las emulsiones utilizadas en los ensayos de actividad y en los experimentos de hidrólisis se resumen en las Tablas Tabla 3.15 y Tabla 3.16 respectivamente. Las distribuciones de tamaño de las emulsiones utilizadas en los experimentos de hidrólisis se determinaron antes y después de la reacción, para de esa forma conocer como afecta la hidrólisis enzimática al área interfacial de la emulsión.

Tabla 3.15. Caracterización de las emulsiones utilizadas en los ensayos de actividad enzimática sobre tributirina y trioleína.

Variable estudiada	Sustrato	α_{exp} , v/v	Método de emulsificación
Concentración de sustrato	Tributirina	0.01	UltraTurrax
Concentración de sustrato	Tributirina	0.05	UltraTurrax
Concentración de sustrato	Trioleína	0.01	UltraTurrax
Concentración de sustrato	Trioleína	0.05	UltraTurrax
Técnica de emulsificación	Tributirina	0.01	UltraTurrax
Técnica de emulsificación	Tributirina	0.01	Ultrasonidos
Técnica de emulsificación	Trioleína	0.01	UltraTurrax
Técnica de emulsificación	Trioleína	0.01	Ultrasonidos
Estabilidad de la emulsión (0 – 4 h)	Tributirina	0.01	UltraTurrax
Estabilidad de la emulsión (0 – 3 h)	Trioleína	0.01	UltraTurrax

Tabla 3.16. Caracterización de las emulsiones utilizadas en los experimentos de hidrólisis de tributirina.

Temperatura	α_{exp} , v/v	Tensioactivo
30°C	0.0025	–
30°C	0.050	–
30°C	0.075	–
30°C	0.010	–
30°C	0.010	Findet1214N/23
30°C	0.010	Findet1214N/16
30°C	0.010	Glucopon 650
30°C	0.010	LAS
30°C	0.020	–
30°C	0.030	–
40°C	0.010	–
40°C	0.020	–
40°C	0.050	–
50°C	0.010	–
50°C	0.020	–
50°C	0.050	–
60°C	0.010	–
60°C	0.020	–
60°C	0.050	–

A continuación se describe el método utilizado para la determinación de las distribuciones de tamaño.

3.8.1. Reactivos.

Los dos triglicéridos estudiados (trioleína y tributirina) y el reactivo de emulsificación con goma arábica se han empleado en la preparación de las emulsiones.

3.8.2. Equipos y material.

A parte del material y los equipos necesarios para la preparación de las emulsiones (apartado 3.4.2), para la determinación de la distribución de tamaños de gota se ha utilizado el COULTER LS230, basado en la tecnología de difracción de luz láser y suministrado por la casa BECKMAN COULTER. El equipo dispone de un láser de 750 nm de longitud de onda y es capaz de detectar partículas o gotas de diámetro comprendido entre 0.04 y 2000 μm . Dado que para partículas de menos de 0.4 μm la difracción láser no resulta eficaz, cuenta además con un sistema adicional de detección basado en la difracción de luz polarizada (PIDS), adecuado para estos tamaños.

En la Figura 3.4 se ha representado un esquema del *COULTER LS230* donde se pueden apreciar las partes principales del equipo, que se enumeran a continuación (los números se corresponden con los de la figura):

1. Generador del haz de luz láser (750 nm).
2. Generadores de luz monocromática polarizada (PIDS).
3. Celda de medida por difracción láser.
4. Celda de medida y sistema de detección de la luz polarizada.
5. Haz de luz láser difractado.
6. Detectores para la luz láser difractada.
7. Depósito para adición de la muestra. El fluido de transporte, agua de la red, penetra de forma continua en el mismo durante el ciclo de limpieza. Durante el ciclo de medida la entrada de fluido de transporte queda cerrada.
8. Bomba centrífuga que impulsa el fluido de transporte hacia el sistema de medida.
9. Carcasa que aísla la parte óptica del equipo.
10. Ordenador personal (registro y análisis de datos).

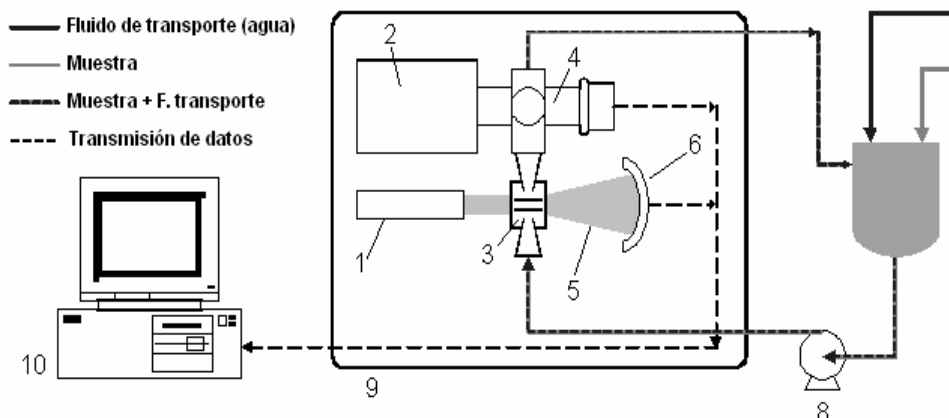


Figura 3.4. Esquema del COULTER LS230.

La muestra, que es añadida en cantidad suficiente al depósito externo (7), se diluye en el fluido de transporte, que en todos los casos es agua de la red. Dicho fluido es impulsado por la bomba (8) hacia el interior del módulo óptico y una vez allí circula por el interior de la celda de medida (3), que es atravesada por el haz láser, el cual se difracta por efecto de las partículas o gotas en suspensión. La luz difractada (5) llega a los detectores (6) dispuestos de forma que cubren los posibles ángulos. A continuación el fluido de transporte con la muestra pasa a la celda del sistema PIDS (4) donde es iluminado por tres haces de luz monocromática (tres longitudes de onda diferentes) polarizados en el plano vertical y horizontal.

Mediante un ordenador personal (10) se registran los datos proporcionados por el equipo, es decir, la intensidad de luz difractada por canal (ángulo) y se convierten en distribuciones de tamaño de gota, empleando para ello el modelo óptico de Fraunhofer o Mie. Los datos de difracción láser y del sistema PIDS se analizan en conjunto para dar un resultado único.

Además de la gestión del equipo y del registro de los resultados, el programa informático suministrado con el *COULTER LS230* permite la determinación de los parámetros estadísticos de la distribución, como por ejemplo el diámetro medio de Sauter, de particular interés en la interpretación cinética de la lipólisis enzimática.

3.8.3. Proceso de medida.

La determinación de la distribución de tamaños de gota se ha realizado según la metodología que se describe a continuación:

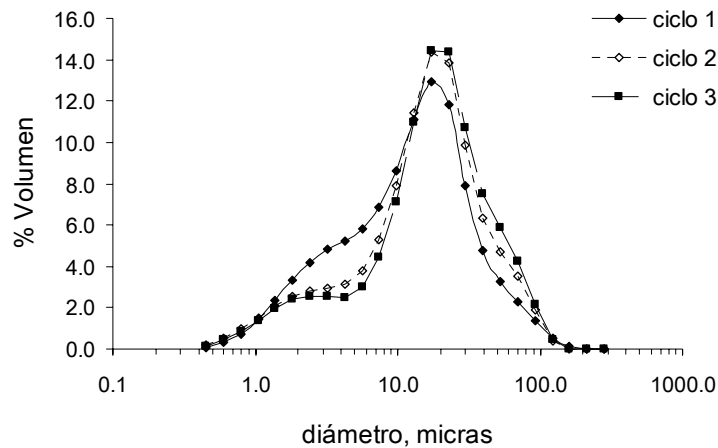
- 1) Una vez obtenida la emulsión se mantiene suavemente agitada durante al menos 10 minutos, de forma que el aire incorporado durante su preparación sea eliminado.

2) Se inicia el ciclo de medida, que comprende los siguientes pasos:

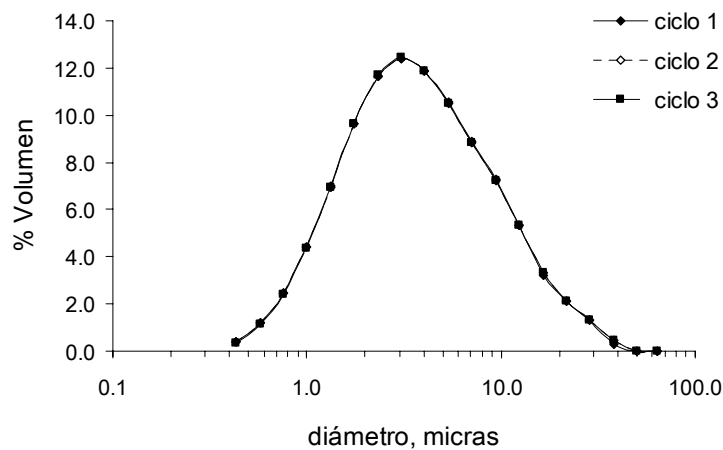
- i) Medida del ruido eléctrico (señal emitida con el láser apagado) de los detectores, de forma que luego pueda ser sustraída a la señal que emitan los detectores cuando el haz de luz láser incida sobre ellos.
- ii) Alineamiento del haz láser para que permita una medida fina del ángulo de difracción.
- iii) Medida de la señal debida al fluido de transporte (blanco), partículas de polvo sobre la lente, etc., que luego debe ser sustraída también de la señal producida por la muestra.
- iv) Medida de la cantidad de muestra requerida. Se adiciona la muestra (emulsión) al equipo, el cual informa cuando cuenta con cantidad suficiente. En general se precisan aproximadamente 15 mL para una emulsión al 1% v/v, sobre un total de 1.7 L de fluido de transporte (capacidad del sistema). Si se añade poca muestra la relación señal/ruido será demasiado baja, mientras que si se adiciona una cantidad elevada, la luz difractada por una partícula puede ser nuevamente difractada por otra, lo que imposibilita la interpretación de los resultados.
- v) Medida del patrón de difracción originado por la muestra y registro de los resultados. A continuación se aplica el modelo óptico adecuado y se obtiene la distribución de tamaños de gota correspondiente. El software suministrado con el equipo utiliza los modelos de Fraunhofer y Mie, si bien la aplicación de éste último requiere conocer el índice de refracción de la fase dispersa.
- vi) Ciclo de limpieza: El equipo va incorporando fluido de transporte limpio y desechando el que contiene la muestra. El proceso se mantiene hasta que la señal recibida por los detectores retorna a valores similares a los obtenidos en ausencia de muestra.

Todas las medidas realizadas con el COULTER LS230 requieren una importante dilución de la muestra. Al tratarse de emulsiones dicha dilución puede provocar una importante desestabilización de las mismas, obteniéndose entonces resultados erróneos.

En la Figura 3.5 se ha representado la evolución de la distribución de tamaños de gota de dos emulsiones, una de ellas de tributirina (1% v/v) y la otra de trioleína (1% v/v), a lo largo de tres ciclos de medida consecutivos. El primero de ellos se inicia en el mismo momento de incorporar la muestra al sistema y los dos restantes a continuación de éste. La duración de cada ciclo es de 60 segundos.



(a)



(b)

Figura 3.5. Evolución de la distribución de tamaños de gota de emulsiones de tributirina (a) y trioleína (b) durante tres ciclos de medida consecutivos (60 s cada uno).

En el caso de la trioleína no hay variación apreciable en la distribución de tamaños de gota, lo que pone de manifiesto que la emulsión permanece estable durante los tres ciclos de medida.

Con la tributirina por el contrario la situación es diferente, ya que la emulsión experimenta un proceso de desestabilización de un ciclo de medida al siguiente, lo que se puede apreciar en la variación de la distribución de tamaños de gota. El porcentaje volumétrico de gotas de menor tamaño (de 1.5 a 11.5 μm) disminuye, al tiempo que el de gotas mayores (20 a 100 μm) aumenta, lo que parece reflejar un fenómeno de agregación o coalescencia, o incluso de disolución de las gotas menores. Por esta razón convendría usar ciclos de medida de menos de 60 segundos con las emulsiones de tributirina. Sin

embargo, para que la señal registrada sea representativa de la muestra, la duración del ciclo de medida no debe ser inferior a 60 segundos.

De esta forma se adoptó la decisión de emplear ciclos de 60 segundos para ambos triglicéridos. En el caso de la trioleína se efectuaron tres ciclos consecutivos, tomando el valor medio de los tres, mientras que para la tributirina se realizaron igualmente tres ciclos, pero se consideró como representativo solamente el primero de ellos.

3.9. ENSAYOS DE LAVADO.

Como etapa final del estudio de la aplicación de la enzima Lipolase 100 en formulaciones detergentes se han realizado experimentos para estudiar la eficacia y el mecanismo de acción de dicha lipasa en condiciones prácticas de lavado.

3.9.1. Reactivos

Como suciedad se ha empleado tributirina (99%, Sigma), pero adicionándole un 0.05% (p/p) de colorante soluble en grasa (Colorante Naranja para grasa, Ravetlat Aromatics). Dicho colorante puede ser determinado por espectrofotometría, lo que nos permitirá cuantificar la cantidad de tributirina eliminada del sustrato durante el ciclo de limpieza y calcular la detergencia.

El i-octano (para análisis instrumental, Panreac) fue utilizado para la extracción de la tributirina coloreada desde la solución acuosa de lavado. La reacción de hidrólisis de la tributirina se sigue por el método del pHstato, adicionando al medio una solución 0.5 N de NaOH (para análisis, Merck) para mantener constante el pH del mismo. Como baño de lavado se emplearon cuatro soluciones diferentes:

- Solución tampón de fosfato, pH = 7.0
- Solución de 0.1 g/L de la enzima Lipolase 100 en tampón fosfato
- Solución de 0.1 g/L del tensioactivo aniónico dodecibencenosulfonato sódico lineal (LAS), también en tampón fosfato. Las propiedades de este tensioactivo se recogen en la Tabla 3.4.
- Solución de Lipolase 100 (0.1 g/L) y LAS (0.1 g/L) en tampón fosfato.

A fin de facilitar la extracción de la grasa en presencia de tensioactivo se incrementó la fuerza iónica del medio por adición de NaCl (químicamente puro, Panreac).

3.9.2. Equipos y material.

El dispositivo empleado para la realización de los ensayos de lavado es el denominado Baño-Sustrato-Flujo, BSF, (Jurado-Alameda et al., 2003) que permite modificar los distintos elementos implicados en el proceso de limpieza: el baño de lavado, el binomio sustrato/suciedad y las condiciones hidrodinámicas. Un esquema del mismo se presenta en la Figura 3.6.

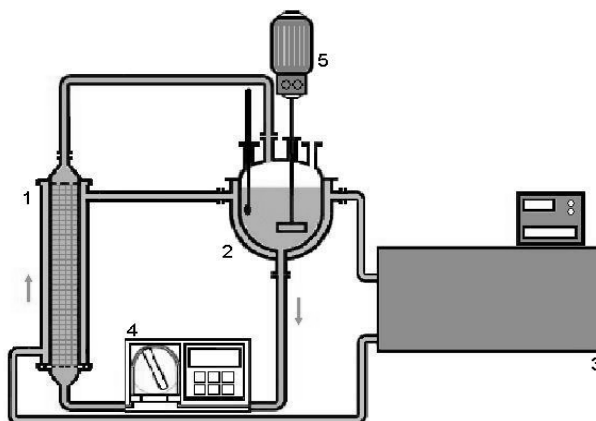


Figura 3.6. Esquema del dispositivo Baño-Sustrato-Flujo (BSF) (Jurado et al., 2003).

El sustrato, consistente en esferas de vidrio de 3 mm de diámetro, una vez recubierto por contacto directo con la suciedad a ensayar, se coloca en el interior de la columna (1), de aproximadamente 70 mL de capacidad. El baño de lavado, formado por una solución acuosa de enzima y/o tensioactivo se dispone en el tanque encamisado (2), de 450 mL de capacidad, siendo homogeneizado en todo momento con la ayuda del agitador de ancla (5). La bomba peristáltica (4) impulsa la solución de limpieza en sentido ascendente hacia el interior de la columna que contiene el sustrato y la suciedad. De esta forma el material oleoso inicialmente dispuesto sobre el sustrato va siendo eliminado de éste e incorporado al baño de lavado. A través de las bocas situadas sobre el tanque (2) se tomaron muestras del baño de lavado que fueron a continuación analizadas para así conocer la cantidad de suciedad presente en el mismo en cada momento. El conjunto de la columna (1) y el tanque (2) se mantiene a temperatura constante con la ayuda del baño termostático (3). Los distintos elementos del sistema se encuentran unidos entre sí mediante conexiones de silicona.

El valorador automático 718 STAT Titrimo (Metrohm) se empleó para el seguimiento de la reacción de hidrólisis enzimática. Un agitador tipo vórtex (modelo Eurolab, Merck)

se utilizó para llevar a cabo la extracción de la tributirina y el colorante desde la fase acuosa a la orgánica. Una centrífuga modelo Centromix (Selecta) fue empleada para decantar los restos en suspensión que quedan tras la extracción en presencia de NaCl. La determinación espectrofotométrica de la tributirina coloreada se realizó con la ayuda del espectrofotómetro U/V Helios α (Spectronic Unicam).

3.9.3. Procedimiento operatorio.

Los ensayos de lavado desarrollados en el sistema BSF se han seguido mediante la determinación de tres variables diferentes:

- La cantidad de suciedad eliminada del sustrato e incorporada al baño de lavado en función del tiempo, lo que permite evaluar la detergencia en cada momento del lavado.
- El progreso de la reacción de hidrólisis enzimática de la tributirina, que se ha seguido gracias al método del pHstato, valorando de forma continua el ácido butírico liberado durante el proceso.
- La cantidad de suciedad que permanece adherida al sustrato, que se ha medido al término del ensayo (10 minutos), a partir de lo cual es posible obtener un valor final de la detergencia referida al sustrato.

El procedimiento experimental seguido se resume en las etapas siguientes:

- 1) Se añaden 550 mL de solución tampón de fosfato al tanque del sistema BSF y se mantienen circulando y con la agitación conectada (300 rpm) hasta que alcancen la temperatura de ensayo (30°C).
- 2) Se pesan aproximadamente 64.6 g de esferas de vidrio y se añaden sobre 7.0 g (aproximadamente) de tributirina coloreada, pesados a parte, homogeneizando la mezcla lo mejor posible.
- 3) Una vez atemperada la solución de lavado se lleva su pH a 7.00 y se adiciona la cantidad necesaria de enzima y/o tensioactivo para fijar las concentraciones deseadas.
- 4) Se introduce en la columna del sistema BSF la mezcla sustrato-suciedad.
- 5) El ciclo de lavado se inicia poniendo en marcha la bomba y el agitador, considerándose el instante inicial aquél en el que la solución de lavado retorna al tanque agitado tras atravesar la columna del sustrato por primera vez. En ese

momento se conecta el valorador automático para mantener constante el pH del medio por adición de base.

- 6) Se toman muestras de 4 mL del baño a los siguientes tiempos: 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0 y 20.0 minutos. Tras tomar la última de ellas se extrae el sustrato de la columna para su posterior enjuague con i-octano, a fin de recuperar la suciedad que haya permanecido adherida al mismo.
- 7) En el caso de que el medio acuoso contuviera tensioactivo se añade a cada muestra la cantidad de NaCl necesaria para formar una solución saturada.
- 8) Se procede a la extracción de la tributirina mediante i-octano (4 mL) por agitación en vórtex durante un minuto.
- 9) Tras la extracción se recupera la fase orgánica (al menos 3 mL) y, en caso de que se haya añadido NaCl, se procede a su centrifugación durante 10 minutos a 6000 rpm
- 10) Se mide en el espectrofotómetro a 465 nm en tubos de ensayo adecuados, calculando de esta forma la cantidad de tributirina presente en el baño en diferentes momentos del lavado, o en el sustrato al final del mismo.

Para el cálculo de la eficacia detergente o detergencia se emplea la ecuación III.4 donde $m_b(t)$ representa la cantidad de tributirina existente en el baño de lavado en un instante determinado y $m_s(0)$ la cantidad de tributirina colocada inicialmente sobre el sustrato. La detergencia se ha calculado también al final del ensayo de lavado pero a partir de la suciedad que permanece adherida al sustrato en dicho momento, $m_s(f)$, usando para ello la ecuación III.5.

$$De = \frac{m_b(t)}{m_s(0)} \times 100 \quad \text{III.4}$$

$$De = 100 - \frac{m_s(f)}{m_s(0)} \times 100 \quad \text{III.5}$$

3.9.4. Análisis espectrofotométrico de la tributirina coloreada.

Ha sido necesaria una puesta a punto del método espectrofotométrico para su posterior aplicación en la determinación de la cantidad de suciedad eliminada del sustrato durante el proceso de lavado.

En primer lugar se ha realizado un barrido determinando la absorbancia de una solución de tributirina coloreada (0.05% p/p de colorante) en i-octano (7.0 y 12.0 g/L) a distintas longitudes de onda. También se realizó la misma operación sobre tributirina pura. Los resultados se representan en la Figura 3.7, que recoge el intervalo de longitudes de onda entre 350 y 550 nm, donde aparecen los máximos de absorbancia debidos al colorante.

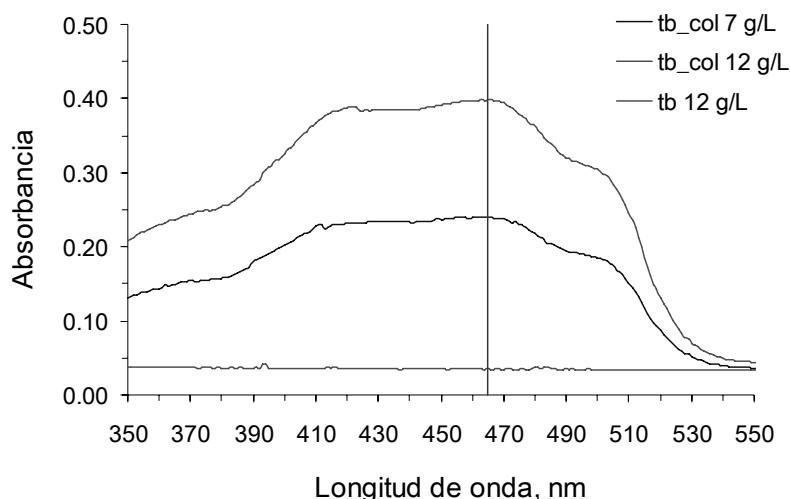


Figura 3.7. Barrido de longitud de onda para soluciones de tributirina coloreada (tb_col) y tributirina pura (tb) en i-octano. La línea vertical la longitud de onda escogida.

La variación de la absorbancia con la longitud de onda recogida en la Figura 3.7 revela un máximo debido a la presencia del colorante (no aparece para tributirina pura) a longitudes de onda de entre 460 y 470 nm. A la vista de este resultado se ha decidido utilizar una longitud de onda de 465 nm para la determinación espectrofotométrica de la tb_col. Esta decisión se apoya fundamentalmente en dos razones:

- No existe apenas variación de la absorbancia en el intervalo de 460 a 470 nm, lo que ayuda a minimizar errores debidos a la resolución del monocromador (± 1 nm).
- El valor de absorbancia registrado (0.240 y 0.398 para 7 g/L y 12 g/L de tb_col respectivamente) es suficiente para la cuantificación, dado que además la concentración máxima prevista de tb_col en el i-octano tras la extracción es de 15 g/L

Una vez escogida la longitud de onda adecuada se procedió a la elaboración de la recta patrón correspondiente. Para ello se prepararon disoluciones de tributirina coloreada en i-octano de diferente concentración, a partir de una solución madre inicial, y

se midió la absorbancia de cada una de ellas. Siempre que se prepara una nueva cantidad de tributirina colorada se obtiene una nueva recta de calibrado. En la Tabla 3.17 se presentan los datos correspondientes a una de las rectas obtenidas, que consta de siete puntos y tres réplicas de cada uno. La medida se efectuó en tubos de ensayo adecuados para mediciones espectrofotométricas. La ecuación III.6 es la de la recta patrón correspondiente, con un coeficiente de correlación igual a 0.996. C_{tb_col} designa la concentración de tributirina coloreada, en g/L.

Tabla 3.17. Recta patrón para la determinación colorimétrica de la tributirina coloreada.

C_{tb_col} (g/L)	Absorbancia	Desviación estándar
0.0	0.045	0.0049
2.0	0.089	0.0025
5.0	0.147	0.0031
7.0	0.195	0.0059
10.0	0.259	0.0081
12.0	0.294	0.0071
15.0	0.349	0.0065

$$Ab = 0.0204 \cdot C_{tb_col} + 0.0478 \quad \text{III.6}$$

Dado que la extracción de la tributirina se lleva a cabo desde una solución acuosa que contiene enzima (Lipolase 100) y tensioactivo (LAS), es necesario descartar la posible interferencia de estas sustancias en el valor de la absorbancia. Para ello se han elaborado rectas de calibrado en las que una cantidad conocida de tributirina coloreada se añade sobre agua desmineralizada o sobre una solución acuosa de Lipolase 100 (0.1 g/L) y LAS (0.1 g/L), extrayéndose posteriormente con i-octano mediante agitación en vórtex durante un minuto a velocidad máxima. A fin de facilitar la extracción en presencia del tensioactivo se añade NaCl a la fase acuosa hasta formar una solución saturada. Tras el proceso de agitación se toma una cierta cantidad de la fase orgánica y se centrifuga (5900 rpm, 10 min.) para eliminar restos en suspensión debidos al NaCl.

Tabla 3.18. Test de contraste de hipótesis para estudiar la posible interferencia de enzima y tensioactivos en la determinación espectrofotométrica de Tb_col.

Extracción	b	a	R ²	test sobre:	
				b	a
Desde agua desmineralizada	0.0204	0.0439	0.999	(0)	(1)
Desde solución acuosa de Lipolase 100 y LAS	0.0204	0.0422	0.999	(0)	(1)

(0) No existen diferencias significativas con los parámetros de referencia

(1) Existen diferencias significativas con los parámetros de referencia

En la Tabla 3.18 se comparan mediante un test de contraste de hipótesis la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a) de las dos rectas obtenidas con extracción con los de la recta patrón de referencia (ecuación III.6). Los test aplicados confirman la igualdad de las pendientes, aunque aparecen diferencias significativas entre los valores de la ordenada de cada recta y los de la recta de referencia. Sin embargo, si se comparan las ordenadas de ambas rectas con extracción entre sí, mediante un nuevo test estadístico, no aparecen diferencias significativas. Por tanto se puede descartar la interferencia del tensioactivo o de la enzima. La misma conclusión se extrae a partir de la Figura 3.8 donde se representan las dos rectas de calibrado con extracción y la de referencia. Las diferencias observadas en las ordenadas pueden estar relacionadas con el lote de tubos de medida utilizado en cada caso.

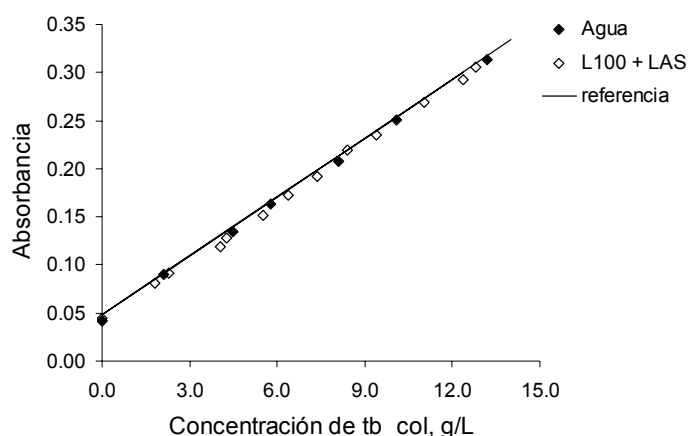


Figura 3.8. Rectas patrón para la determinación de tributirina coloreada sin extracción (referencia) y con extracción (agua ó Lipolase 100 + LAS)

Descartada la posible interferencia de la enzima Lipolase 100 y el tensioactivo comercial LAS queda por estudiar la eficacia del proceso de extracción de la tributirina

mediante el i-octano. Para ello una cantidad conocida de tributirina coloreada se emulsionó en una solución acuosa de Lipolase 100 (0.1 g/L) y LAS (0.1 g/L) mediante agitación en vórtex (0.5 min.). A continuación se añadió NaCl a la fase acuosa hasta formar una solución saturada y se extrajo con i-octano mediante agitación en vórtex (1 min.). Fueron realizadas un total de seis réplicas, obteniéndose una recuperación (porcentaje de tributirina recuperado respecto del total) promedio de 95.8%, con una desviación estándar de 0.8%. En la Figura 3.9 se ha representado la cantidad de tributirina no recuperada respecto del total inicial emulsionado. Se aprecia que la cantidad no recuperada es prácticamente independiente de la cantidad inicial que se coloque, e igual a 1.68 mg de promedio. Esto puede deberse a que una cantidad constante de colorante, con o sin tributirina, queda solubilizado en la fase acuosa.

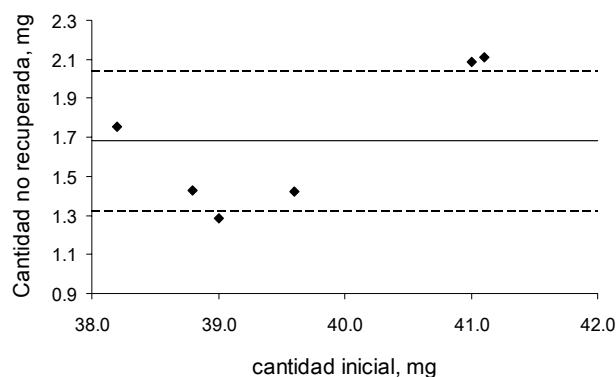


Figura 3.9. Cantidad de tributirina no recuperada en función de la cantidad inicial. Se ha representado la media y la desviación estándar.

De esta forma será necesario aplicar un factor de corrección a la cantidad de tributirina determinada espectrofotométricamente, ya que no toda ella es recuperada, sino solamente un 95.8%.

3.10. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA

Para el estudio cinético de la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsión O/W se han realizado experimentos con la enzima Lipolase 100 en los que se ha modificado la concentración de ésta (0.01 a 25.0 g/L), la fracción volumétrica de tributirina en la emulsión (0.0025 a 0.05) y la temperatura de reacción (30 a 60°C), siendo el pH en todos ellos constante e igual a 7.00. También se ha estudiado la influencia de los tensioactivos en la hidrólisis enzimática, para lo cual se incubó la emulsión del sustrato, una vez

obtenida, con distintas concentraciones de cuatro tensioactivos diferentes, uno aniónico (LAS) y tres no iónicos (Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 y Glucocon 650), cuyas características se muestran en la Tabla 3.4.

La Tabla 3.19 muestra un resumen de los experimentos de hidrólisis realizados y las correspondientes condiciones experimentales.

Tabla 3.19. Experimentos realizados para el estudio cinético de la hidrólisis enzimática de tributirina, tanto en ausencia como en presencia de tensioactivos.

Temperatura, °C	Concentración de enzima (e_{exp}), g/L	Concentración de sustrato (α_{exp}), fracción v/v	Tensioactivo (concentración, mg/L)
30	0.01 – 25.0	0.0025 – 0.050	–
40	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050	–
50	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050	–
60	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050	–
30	1.0	0.01	LAS (20 – 500)
30	1.0	0.01	Findet1214N/23 (50)
30	1.0	0.01	Findet1214N/16 (50 – 200)
30	1.0	0.01	Glucocon (50 – 200)

A continuación se detallan los reactivos y el material utilizado, describiéndose también el procedimiento experimental.

3.10.1. Reactivos.

Se trata de los mismos necesarios para la medida de la actividad enzimática, con las salvedades que se indican a continuación:

- Enzimas: se emplea solamente la Lipolase 100.
- Sustrato: únicamente se usa la tributirina (99%, Sigma)
- Reactivos auxiliares: No se emplea la solución tampón de glicina, sino sólo la de fosfato. Por lo demás cabe realizar las siguientes precisiones:
 - *Reactivo de emulsificación:* De igual composición que el empleado en los ensayos de actividad pero con mayor cantidad de goma arábica (30 g/L en vez de 6 g/L).
 - *Solución de hidróxido sódico:* La concentración de la misma varía en función de la concentración de enzima, es decir de la velocidad de reacción. Oscila entre 0.05 y 1 N.
 - *Solución de ácido benzoico:* Su concentración depende de la de la solución de hidróxido sódico a contrastar, variando entre 1.2 y 2.8 g/L.

3.10.2. Equipos y material

Para la preparación de las emulsiones se emplea exclusivamente la herramienta de dispersión UltraTurrax T-25 (Ika-Werke) ya descrita, junto con los vasos diseñados para tal fin.

Para llevar a cabo el seguimiento de la reacción de hidrólisis se ha empleado un montaje experimental, que se esquematiza en la Figura 3.10 y que consta de los siguientes elementos (los números entre paréntesis corresponden a los de la figura):

- Agitador magnético (1) provisto de plato independiente inmerso en el baño termostático, que permite fijar la velocidad de agitación deseada (modelo Agimatic-Rev-W, Selecta).
- Baño termostático (3) con su correspondiente termostato (2) para mantener constante la temperatura en el medio de reacción.
- Sistema automático de valoración, 718 STAT TITRINO (Metrohm), que consta de los siguientes elementos:
 - Depósito (4.1.) para el agente valorante,
 - Bureta automática (4.2.) de 10 ó 20 mL,
 - Dosificador (4.3.) acoplado a la bureta,
 - Sonda (4.4.) para la medida de la temperatura,
 - Electrodo de vidrio (4.5.) para la medida del pH

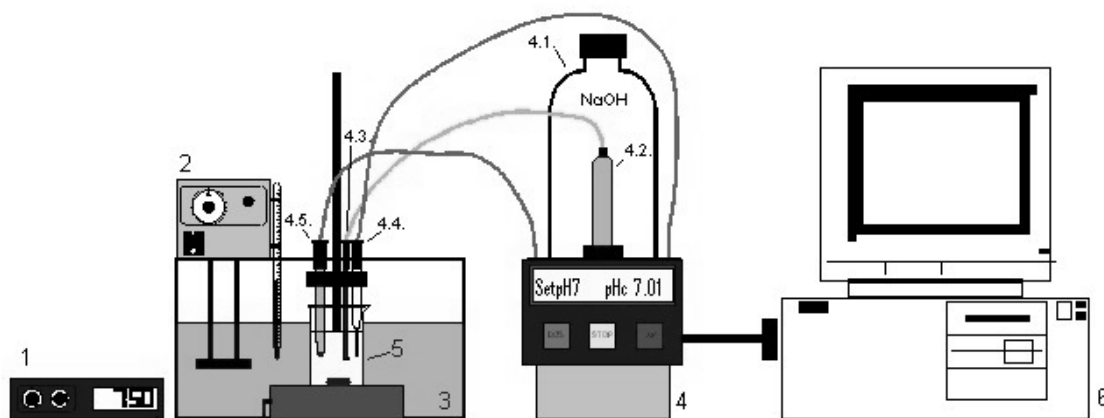


Figura 3.10. Montaje experimental para la medida de la velocidad de hidrólisis.

- Reactor (5) consistente en un vaso de vidrio de 6 cm de altura y 2.4 cm de diámetro interno, con una capacidad máxima de 25 mL. En su interior se dispone un elemento

agitador magnético de 2.3 cm de longitud y 0.8 cm de diámetro. El conjunto se coloca inmerso en el baño termostatzado.

- Ordenador personal (6) que permite registrar los datos obtenidos durante la valoración.

Para asegurar la adecuada dosificación de agente valorante (NaOH) en todo el intervalo de concentraciones de enzima utilizadas, los parámetros de control del valorador automático han sido ajustados en función de dicha variable, dentro de los intervalos que se especifican a continuación:

- Gama de regulación: 0.05 a 0.20
- Velocidad máxima de adición: 0.01 a 30 mL/min.
- Velocidad mínima: 0.01 a 300 μ L/min.

Por otro lado, dado que la velocidad de reacción varía durante el progreso de la misma, es preciso ir reajustando los parámetros anteriores durante el tiempo que se sigue la reacción, lo cual debe hacerse de forma manual.

3.10.3. Procedimiento experimental.

3.10.3.1. Preparación de la emulsión.

Las emulsiones han sido todas ellas obtenidas mediante dispersión mecánica a 13000 rpm durante 1 min. Al objeto de hacer la preparación lo más reproducible posible, se ha utilizado una fracción volumétrica de tributirina fija e igual a 0.05, diluyéndola posteriormente hasta la concentración de ensayo. El reactivo de emulsificación utilizado contiene 30 g/L de goma arábica, a fin de fijar en la emulsión una relación goma arábica – tributirina de 0.1 gramos por mililitro de fase orgánica.

3.10.3.2. Preparación de la solución de enzima.

En todos los casos se parte del preparado enzimático comercial sin purificación previa del mismo. Para diluirlo hasta la concentración de ensayo se emplea exclusivamente el tampón fosfato.

3.10.3.3. Contraste del agente valorante.

Se sigue el mismo procedimiento descrito para los ensayos de actividad enzimática, con la particularidad de que debido a las diferentes concentraciones de NaOH utilizadas

la concentración de ácido benzoico tuvo que ser modificada, como se indica en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Concentración adecuada de la solución patrón de ácido benzoico según la normalidad aproximada del hidróxido sódico a contrastar.

Normalidad aproximada del NaOH a contrastar	Concentración del ácido benzoico empleado, g/L
0.05	1.20
0.10	1.20
0.50	2.80
1.0	2.80

3.10.3.4. Procedimiento para la hidrólisis enzimática.

El procedimiento seguido para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de la tributirina consta de las siguientes etapas:

- 1) Se diluye la emulsión madre hasta la concentración de ensayo con tampón fosfato.
- 2) Se toman 15 mL de la emulsión y se colocan en el reactor.
- 3) El reactor se dispone sobre el sistema de agitación, inmerso en el baño termostático, y se mantiene agitado (700 rpm) hasta que la emulsión alcance la temperatura fijada para el experimento.
- 4) Se fija el pH buscado en la emulsión trabajando con el valorador automático en modo SET.
- 5) Con el valorador en el modo STAT se inicia la reacción agregando 1 mL de solución de la enzima a ensayar.
- 6) Se sigue la reacción durante 20 minutos registrándose la cantidad de valorante añadida en función del tiempo, con lo que se obtiene la curva de valoración correspondiente.

3.10.3.5. Cálculo de la velocidad inicial de reacción.

Para calcular las velocidades iniciales de reacción a partir de la curva de valoración se han ensayado 3 criterios diferentes, escogiéndose posteriormente el más adecuado de ellos.

En el criterio 1 se ha evaluado la velocidad inicial a partir de la pendiente de la curva de hidrólisis (volumen de NaOH frente a tiempo) en el intervalo de 180 a 480 segundos. Este es el mismo criterio que se utilizó en los ensayos de actividad.

El criterio 2, estima la pendiente de la curva de hidrólisis en los momentos iniciales de la reacción. Para ello se parte del instante inicial (tiempo 0) y se va incorporando un número creciente de puntos experimentales, realizando sucesivos ajustes a líneas rectas por el método de los mínimos cuadrados, hasta que el valor de la pendiente de dichas rectas comienza a disminuir (Haas et al., 1995). La máxima pendiente de las obtenidas se considera la velocidad inicial de reacción. Dicho cálculo se ha realizado en nuestro caso mediante un programa en MatLab® (incluido en el Anexo I).

En el criterio 3 el cálculo de la velocidad se lleva a cabo ajustando la curva de hidrólisis a polinomios de 3^{er} ó 4^o orden y calculando su derivada a tiempo 0. El número de puntos considerados en el ajuste se va incrementando hasta que la derivada a tiempo 0 de dos polinomios consecutivos difiera en menos del 0.5%. Al igual que en el caso anterior, un programa en MatLab®, que se incluye en el Anexo II, ha sido preparado para llevar a cabo este cálculo.

En la Tabla 3.21 se indican las velocidades calculadas de acuerdo con los diferentes criterios, usando emulsiones con una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 y soluciones enzimáticas de diferente concentración. Cada valor es la media de tres réplicas y se indica también el coeficiente de variación de las mismas.

Tabla 3.21. Velocidades iniciales de hidrólisis obtenidas según los diferentes criterios empleados.

e_{exp} , g/L	Criterio 1		Criterio 2		Criterio 3	
	V_{ini} , $\mu\text{mol}/\text{min}$	C.V., %	V_{ini} , $\mu\text{mol}/\text{min}$	C.V., %	V_{ini} , $\mu\text{mol}/\text{min}$	C.V., %
0.05	4.99	3.73	5.54	4.05	5.62	4.48
0.1	9.71	1.49	12.12	5.07	12.34	8.61
1.0	29.29	14.56	101.94	2.02	112.86	4.62
10.0	12.78	1.57	419.67	4.48	443.16	11.72

e_{exp} , concentración de la solución de enzima (Lipolase 100) empleada (g/L).

V_{ini} , velocidad inicial de reacción en $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ácido butírico.

C.V., coeficiente de variación, calculado como $(\text{desv. estándar}/\text{media}) \cdot 100$

El criterio 1 es el de más sencilla aplicación y el que provoca una menor dispersión a bajas concentraciones de enzima. Sin embargo, cuando se usan concentraciones de

enzima elevadas, no representa adecuadamente la velocidad inicial de reacción, debido a que la velocidad decrece rápidamente durante los instantes iniciales, como se aprecia claramente en la Figura 3.11. Por ello la velocidad inicial calculada de acuerdo con este criterio parece alcanzar un máximo y decrecer, como se muestra en la Tabla 3.21.

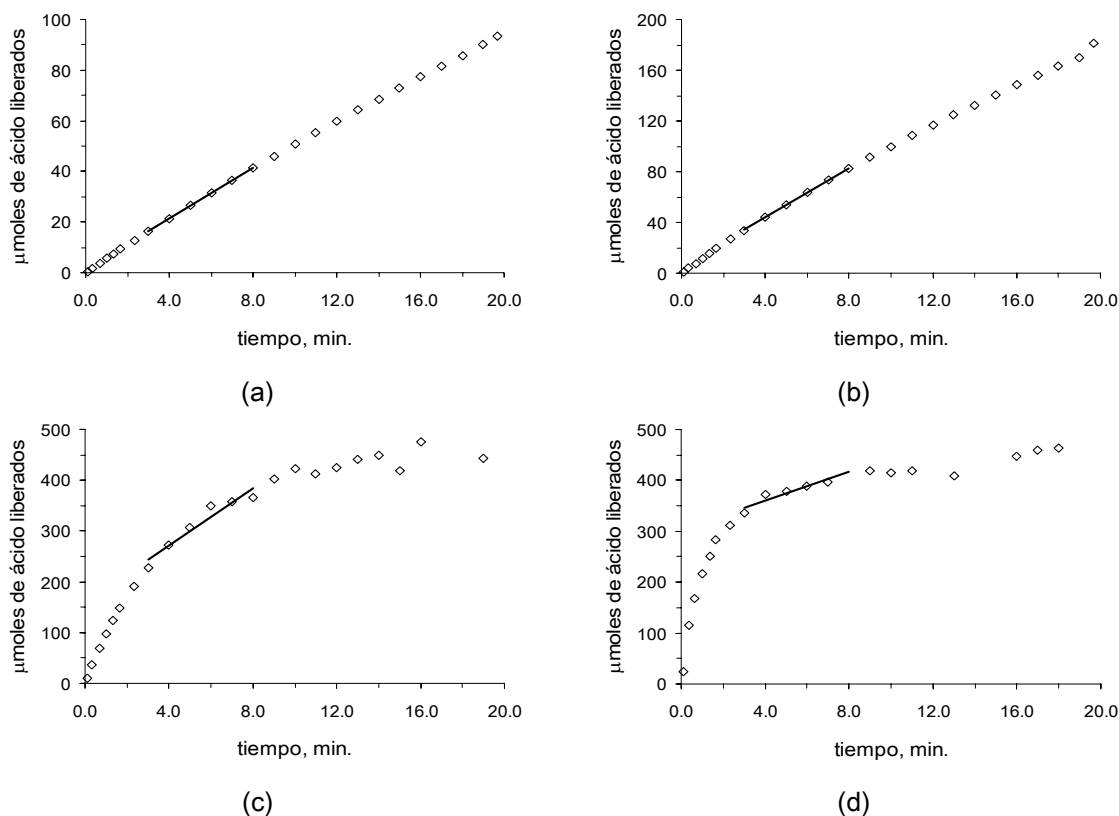


Figura 3.11. Variación de la pendiente calculada según el criterio 1 (línea continua) en función de la concentración de enzima utilizada en el experimento: (a) 0.05 g/L; (b) 0.10 g/L; (c) 1.0 g/L; (d) 10.0 g/L

Este problema desaparece cuando se aplican los criterios 2 y 3, ya que ambos representan la velocidad inicial de reacción, la cual aumenta con la concentración de enzima, hasta alcanzar un valor máximo, pero en ningún caso decrece. Por la tanto hay que descartar el criterio 1, con lo que queda elegir entre el 2 y el 3. Para ello se ha de considerar que:

- La dispersión de las velocidades calculadas por el criterio 2 sobre el mismo conjunto de réplicas es menor que la que presentan las velocidades calculadas según el criterio 3.
- A concentraciones de enzima elevadas la velocidad inicial calculada según el criterio 3 representa la pendiente de la recta que une los dos o tres primeros puntos

experimentales, como se observa en la Figura 3.12. El criterio 2 consigue promediar mejor la pendiente de los primeros puntos, lo que explica además la menor dispersión de los resultados obtenidos.

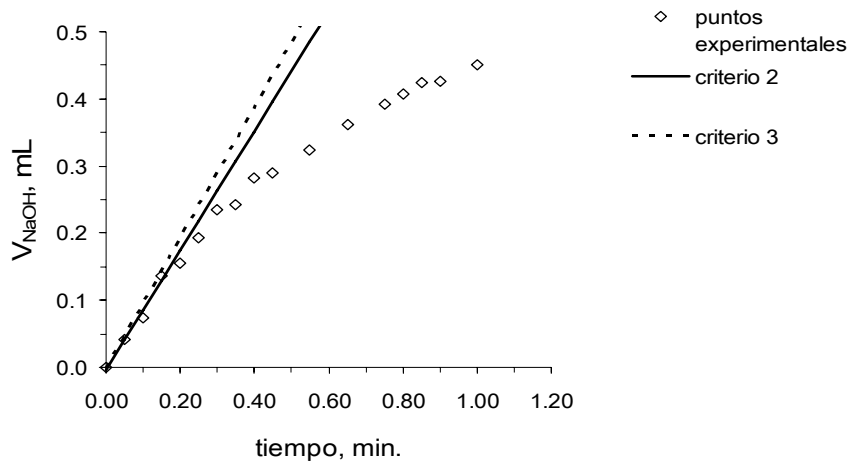


Figura 3.12. Comparación de las velocidades iniciales determinadas según los criterios 2 y 3 para una concentración de enzima de 10 g/L

Aplicando el criterio 2 se obtiene la velocidad de reacción como una variable extensiva, siendo preciso expresarla como una variable intensiva, es decir, por unidad de volumen de la mezcla reaccionante. Para ello se ha de utilizar la ecuación III.7, donde se ha tenido en cuenta que el volumen inicial del sistema es de 16 mL (15 mL de emulsión + 1 mL de la solución de enzima).

$$r_0 = \frac{v_{ini}}{9.6 \times 10^5}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{L} \cdot \text{s}} \quad \text{III.7}$$

Siendo:

r_0 es la velocidad inicial de reacción expresada como variable intensiva, mol/(L·s)

v_{ini} es la velocidad inicial de reacción expresada como variable extensiva, $\mu\text{mol}/\text{min}$.

3.11.DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA DEL PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL

Para una adecuada interpretación de los resultados cinéticos de la hidrólisis enzimática de tributirina es conveniente conocer la cantidad de enzima activa presente en el preparado enzimático comercial suministrado por la casa Novozymes. Se ha procedido

para ello a estimar la cantidad de proteína presente mediante una gravimetría. Dicha cantidad no representa directamente la enzima activa, pero nos permitirá estimar un valor máximo de la concentración molar de enzima.

A continuación se detallan los reactivos y equipos empleados así como la metodología experimental.

3.11.1. Reactivos.

Para la precipitación de la proteína desde el preparado enzimático comercial se emplea acetona, químicamente pura, suministrada por Panreac.

3.11.2. Equipos necesarios.

La precipitación de la proteína se lleva a cabo en viales tipo “Ependorf” de 1.5 mL. Un agitador tipo Vortex (modelo Eurolab de la casa Merck) se utilizó para mezclar el preparado enzimático comercial con la acetona. La separación del precipitado del líquido sobrenadante se lleva a cabo en una centrífuga modelo CENTROMIX de la casa Selecta. Para la desecación del precipitado se utiliza una estufa también de Selecta.

3.11.3. Procedimiento experimental.

- 1) En un vial vacío y seco se deposita una cantidad conocida del preparado enzimático comercial, a la que se añaden 0.5 mL de acetona, agitándose a continuación en un dispositivo vórtex.
- 2) El precipitado se separa por centrifugación, 6000 rpm, 30 min., lo que conduce a la obtención de un precipitado compacto (pellet) que contiene la proteína.
- 3) Una vez eliminado el sobrenadante se deseca el pellet formado en una estufa a 60°C hasta pesada constante (48 horas).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. Contenido en proteína del preparado enzimático comercial de la enzima Lipolase 100.

Peso del preparado comercial, g	Peso de proteína tras separación y desecación, g	Contenido de proteína, %
0.1219	$3.30 \cdot 10^{-3}$	2.71
0.2695	$8.50 \cdot 10^{-3}$	3.15
0.3012	$9.10 \cdot 10^{-3}$	3.02
0.2783	$8.80 \cdot 10^{-3}$	3.16

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

En esta sección se incluyen los resultados primarios obtenidos en los diferentes experimentos realizados, así como las variables calculadas directamente a partir de ellos, tales como la actividad lipásica, la velocidad inicial de reacción o la detergencia. Los resultados expuestos se han clasificado en cuatro grandes bloques, en función del objetivo perseguido en los diferentes experimentos:

- I. Estudio comparativo de la actividad de las enzimas Lipolase 100, LipoPrime 50T y Novozym 388 utilizando tributirina y trioleína como sustratos. Se estudia también la influencia en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100 de diferentes variables: temperatura, pH, técnica de emulsificación del sustrato, estabilidad de la emulsión y presencia de tensioactivos, dispersantes y proteasas en el medio. La distribución de tamaños de gota de las emulsiones utilizadas se ha determinado por difracción láser. Los resultados se muestran en los apartados 4.1 a 4.3.
- II. Análisis de la estabilidad de las tres enzimas en condiciones de lavado y estudio de la desactivación de la enzima Lipolase 100 con la temperatura y la agitación. Los resultados correspondientes se presentan en el apartado 4.4.
- III. Ensayos de lavado de superficies duras empleando diferentes soluciones de limpieza con la enzima Lipolase 100, cuyos resultados se incluyen en el apartado 4.5
- IV. Estudio cinético de la hidrólisis de tributirina en emulsión O/W utilizando la enzima Lipolase 100. Se ha analizado también la distribución de tamaños de las emulsiones antes y después de la hidrólisis. Los resultados obtenidos se recogen en los apartados 4.6 y 4.7.

Los resultados se han organizado en forma de tablas, en cuyo encabezado se hacen constar las condiciones, tales como temperatura, pH, concentración de enzima y sustrato y método de emulsificación, en las que el experimento fue realizado. En la Tabla 4.1 se recogen los valores de aquellas variables que se mantuvieron constantes en todos los experimentos realizados, excepto cuando se estudio su efecto sobre la actividad.

Tabla 4.1. Condiciones experimentales comunes en todos los experimentos realizados

	Ensayos de actividad	Experimentos cinéticos
Concentración de goma arábiga en la emulsión:	1.0 g por litro de emulsión	0.1 g por mL de fase grasa
Tiempo de tratamiento por Ultrasonidos o UltraTurrax	1 min.	1 min.
Tampón empleado en la dilución del preparado enzimático:	Fosfato 0.5 mM	Fosfato 0.5 mM

4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIBUTIRINA COMO SUSTRATO.

Las tablas de resultados recogen las curvas de valoración obtenidas, es decir, los equivalentes de ácido neutralizados en función del tiempo, durante la hidrólisis enzimática. La actividad lipásica, calculada a partir de la pendiente de la curva de valoración entre 180 y 480 segundos, se ha incluido en la parte final de cada tabla. Los valores de los equivalentes de ácido para cada tiempo de reacción representan el promedio de los obtenidos en cada una de las réplicas. Sin embargo, se presentan los valores de actividad individuales para cada una de ellas.

Para iniciar la reacción de hidrólisis se añade 1 mL de solución enzimática sobre 15 mL de la emulsión del sustrato. Se denominará e_{exp} (g/L) a la concentración de enzima en dicha solución y α_{exp} a la fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión, antes de añadir la enzima.

En el apartado 4.1.1 se muestra la influencia de la concentración de las distintas lipasas estudiadas en su actividad, lo que permite comparar las actividades de cada una de ellas sobre tributirina.

En los apartados sucesivos (4.1.2 a 4.1.7) se presentan los resultados correspondientes a la influencia en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100 de las variables que se relacionan a continuación:

- Concentración de sustrato (fracción volumétrica de tributirina en la emulsión): 4.1.2
- Características de la emulsión (método de preparación y estabilidad): 4.1.3
- Temperatura: 4.1.4
- pH: 4.1.5
- Tensioactivos: 4.1.6
- Dispersante Cellesh 100: 4.1.7
- Proteasas: 4.1.8

4.1.2. Influencia de la concentración de sustrato

Los experimentos de hidrólisis realizados con dos fracciones volumétricas (α_{exp}) distintas de tributirina en la emulsión y utilizando la enzima Lipolase 100 se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Influencia de la fracción volumétrica de tributirina en la medida de la actividad de la enzima Lipolase 100

T=30°C pH=7.0 $e_{exp}=0.05$ g/L
 Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	α_{exp}	
	0.01	0.02
	$\mu\text{eq valorados}$	$\mu\text{eq valorados}$
5	0.5	0.7
10	0.9	1.3
15	1.3	1.6
20	1.7	2.0
25	2.1	2.7
30	2.6	2.9
40	3.8	4.0
50	4.7	4.7
60	5.6	5.5
70	6.5	6.5
80	7.4	7.5
90	8.3	8.3
100	9.3	9.2
120	11.1	11.0
150	13.8	13.7
180	16.4	16.2
210	18.9	18.8
240	21.3	21.1
270	23.9	23.5
300	26.6	26.0
360	31.6	30.9
420	36.3	35.8
480	41.2	40.3
540	46.0	44.9
600	50.6	49.6
Actividad, UL/g		
	101193	94796
	95579	98271
	102514	98704

4.1.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad lipásica

En la Tabla 4.4 se presentan las curvas de hidrólisis obtenidas con emulsiones de tributirina preparadas por ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1min.). También se ha investigado la influencia del tiempo de sonicación (Tabla 4.5) y de la estabilidad de la emulsión (Tabla 4.6).

Tabla 4.4 Influencia del método de emulsificación en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre tributirina

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=0.01 g/L
α_{exp}=0.01

tiempo, s	método de emulsificación	
	Ultrasonidos	UltraTurrax
	μeq valorados	μeq valorados
5	0.17	0.15
10	0.40	0.34
15	0.63	0.50
20	0.79	0.60
25	0.69	0.69
30	0.85	0.78
40	0.99	0.94
50	1.10	1.12
60	1.27	1.25
70	1.33	1.47
80	1.55	1.59
90	1.68	1.78
100	1.84	1.91
120	2.09	2.22
150	2.55	2.71
180	2.98	3.23
210	3.39	3.70
240	3.79	4.13
270	4.26	4.68
300	4.67	5.15
360	5.55	6.08
420	6.43	7.14
480	7.21	8.01
540	7.96	8.84
600	8.88	10.44
Actividad, UL/g		
	86290	93212
	86367	95015
	86900	103404
	81674	94262
	83240	99275
		95584
		104139
		91470

Tabla 4.5 Influencia del tiempo de sonicación en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre tributirina

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=0.01 g/L
α_{exp}=0.01 Emulsificación: Ultrasonidos

tiempo, s	tiempo de sonicación		
	0.5 min.	1.0 min.	10 min
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.20	0.16	0.16
10	0.41	0.40	0.38
15	0.59	0.64	0.54
20	0.66	0.59	0.66
25	0.77	0.66	0.74
30	0.86	0.78	0.84
40	0.99	0.94	0.94
50	1.21	1.08	1.11
60	1.28	1.20	1.32
70	1.47	1.30	1.38
80	1.56	1.47	1.61
90	1.75	1.62	1.76
100	1.84	1.83	1.93
120	2.18	2.10	2.25
150	2.58	2.51	2.70
180	3.05	2.95	3.13
210	3.52	3.46	3.59
240	3.90	3.79	4.05
270	4.25	4.27	4.45
300	4.74	4.74	4.97
360	5.62	5.59	5.90
420	6.61	6.43	6.72
480	7.39	7.38	7.41
540	8.27	8.18	8.42
600	9.11	9.00	9.35
Actividad, UL/g			
	91638	86290	89708
	89865	85028	86624
	82365	87705	91451
	82616	86367	
	86823	89213	
	85911	85446	

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.6 Influencia del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre tributirina

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.01$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo desde preparación de la emulsión					
	0 min.	20 min.	40 min.	60 min.	180 min.	240 min.
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.15	0.17	0.15	0.20	0.10	0.20
10	0.40	0.42	0.40	0.40	0.30	0.42
15	0.62			0.59	0.49	0.59
20			0.59	0.64		0.59
25	0.69	0.64	0.64	0.69	0.74	0.69
30	0.77	0.74			0.79	0.77
40	0.94	0.94	0.94		0.94	0.94
50	1.06	1.09	1.06	1.04		1.09
60	1.24	1.14	1.19	1.19	1.29	1.26
70	1.33	1.24	1.33	1.29	1.38	1.38
80	1.47	1.48	1.43	1.38	1.53	1.58
90	1.61	1.63	1.63			1.68
100	1.79	1.88	1.73	1.68	1.88	1.85
120	2.06	2.17	2.03	1.93	2.18	2.08
150	2.48	2.52	2.42			2.67
180	2.93	2.87	2.96		3.02	2.97
210	3.36	3.56	3.41		3.41	3.46
240	3.73	3.71	3.85	3.61	3.86	3.93
270	4.24	4.15	4.30	3.96	4.35	4.25
300	4.65	4.74	4.74	4.40		4.65
360	5.52	5.48	5.63	5.19	5.64	5.74
420	6.38	6.45	6.42		6.48	6.60
480	7.18	7.51		6.82		7.22
540	7.89	8.40	8.08	7.61	8.16	8.36
600	8.86	9.02	8.97	8.50	9.05	9.20
Actividad, UL/g						
	86290	85028	87705			
	86367	89213	85446			
	81674			81077		86457
	86556				86384	90591

4.1.4. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100.

Se ha estudiado su efecto usando tributirina como sustrato y para el intervalo de temperaturas 30 – 50°C. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7 Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre tributirina.

pH=7.0 e_{exp}=0.01 g/L
 $\alpha_{exp}=0.01$ Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	Temperatura		
	30°C	40°C	50°C
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
6	0.23	0.21	0.26
9	0.36	0.33	0.36
15	0.60	0.60	0.62
21		0.62	0.68
24		0.62	0.70
30	0.78	0.75	0.83
39	0.88	0.88	0.94
51	1.09	1.09	1.20
60	1.25		1.46
69	1.40	1.33	1.40
81	1.61	1.51	1.66
90	1.68	1.82	
99	1.79		2.18
120	2.03	2.13	2.37
150	2.76	2.81	2.70
180	3.17	3.38	3.54
210	3.64	3.85	3.87
240	4.11	3.95	4.42
270	4.47	4.94	4.91
300	5.15		5.15
360	5.82	6.12	6.45
420	6.79	7.07	7.49
480	7.70	7.75	8.32
540	8.81	9.65	8.89
600	9.62	10.04	10.24
Actividad, UL/g			
	96916		109401
	97774	107065	95221
	89164	104907	95684

RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1.5. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100.

Los resultados correspondientes a la influencia del pH usando tributirina como sustrato se incluyen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100 con tributirina como sustrato.

		T= 30°C					e _{exp} =0.01 g/L			
		α _{exp} =0.01					Emulsificación: UltraTurrax			
		pH								
		6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5
t, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.10	0.14	0.15	0.05	0.05	0.17	0.19	0.19	0.19	0.19
10	0.23	0.32	0.29	0.15	0.15	0.36	0.39	0.40	0.39	0.39
15	0.34	0.48	0.41	0.29	0.29	0.49	0.58	0.59	0.58	0.58
20	0.44	0.59	0.58	0.39	0.39	0.61	0.83	0.79	0.78	0.78
25	0.52	0.64	0.58	0.53	0.53	0.97	1.02	0.98	0.97	0.97
30	0.62	0.74	0.73	0.63	0.63	0.63	1.22	1.20	1.17	1.17
40	0.78	0.90	0.97	0.87	0.68	1.02	1.46	1.62	1.60	1.60
50	0.85	1.10	1.02	0.97	0.92	1.17	1.65	2.01	1.99	1.99
60	1.07	1.22	1.31		1.07	1.51	1.90	2.35	2.38	2.38
70	1.07	1.44	1.39	1.31	1.26	1.41	2.04	2.62	2.77	2.77
80	1.31	1.54	1.51			1.51	2.28	2.88	3.21	3.21
90	1.35	1.70	1.70	1.60	1.60	1.75	2.48	3.13	3.60	3.60
100	1.70	1.87	1.75		1.75	1.99	2.72	3.37	3.89	3.89
120	1.75	2.18	2.19	2.14	2.04	2.45	3.11	3.86	4.47	4.47
150	2.16	2.65	2.60	2.58	2.62	3.04	3.84	4.61	5.35	5.35
180	2.64	3.16	3.01	3.11	3.11	3.60	4.47	5.38	6.12	6.12
210	3.08	3.62	3.50	3.60	3.65	4.18	5.15	6.08	6.95	6.95
240	3.72	4.07	4.03	4.08	4.08	4.74	5.78	6.85	7.87	7.87
270	3.97	4.59	4.33	4.57	4.67			7.56	8.70	8.70
300	4.41	5.07	4.81	5.06	5.15	5.88	7.05	8.31	9.53	9.53
360	5.52	6.03	5.81	6.08	6.17	6.95	8.46	9.74	11.13	11.13
420	6.16	7.01	6.71	7.00	7.19	8.07	9.72	11.20	12.88	12.88
480	7.01	7.91	7.68	7.97	8.22	9.21	10.94	12.62	14.63	14.63
540	8.22	8.77	8.65	8.99	9.19	10.35	12.25	14.09	16.38	16.38
600	8.76	10.23	9.53			11.47	13.42	15.56	18.23	18.23
Actividad, UL/g										
	86520	95584	91449	93480	97612	107968	120456	133746	124874	
	95185	97701	92316			107021		126191		
	81990	93212						139111		
		95015						124615		
		91470						131290		
		103404								
		94262								

4.1.6. Influencia de los tensioactivos no iónicos Findet 1214N/23, Berol LFG 61 y Glucopton 650 en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.

Los resultados para el tensioactivo Findet 1214N/23 no se presentan porque la actividad lipásica fue nula cuando la enzima se incubó en su presencia. Las curvas de valoración a diferentes concentraciones de los demás tensioactivos se recogen en las Tablas 4.9 y 4.10. La actividad se midió en todos los casos tras incubar la enzima durante una hora con el tensioactivo y utilizando tributirina como sustrato.

Tabla 4.9. Influencia del tensioactivo Berol LFG 61, incubado junto con la enzima, en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100 con tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Concentración de Berol LFG 61					
	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	
5	0.15	0.15	0.12	0.13	0.12	
10	0.30	0.32	0.28	0.32	0.28	
15	0.23	0.37	0.34	0.47	0.42	
20	0.38	0.48	0.39	0.55	0.40	
25	0.50	0.62	0.50	0.55	0.53	
30	0.58	0.67	0.57	0.72	0.60	
40	0.80	0.85	0.75	0.87	0.77	
50	0.97	1.08	0.97	1.02	0.97	
60	1.20	1.25	1.18	1.22	1.13	
70	1.35	1.48	1.29	1.35	1.25	
80	1.60	1.70	1.48	1.50	1.45	
90	1.77	1.86	1.70	1.76	1.60	
100	1.97	2.10	1.88	1.85	1.80	
120	2.37	2.45	2.27	2.20	2.13	
150	2.96	3.12	2.86	2.83	2.67	
180	3.66	3.71	3.41	3.36	3.15	
210	4.21	4.31	4.05	3.90	3.67	
240	4.81	4.91	4.65	4.45	4.12	
270	5.39	5.54	5.31	5.02	4.71	
300	6.01	6.17	5.71	5.49	5.24	
360	7.23	7.36	6.85	6.59	6.33	
420	8.38	8.52	7.85	7.68	7.34	
480	9.52	9.72	9.09	8.72	8.42	
540	10.77	10.87	10.18	9.79	9.64	
600	11.87		11.01			
Actividad, UL/g						
	116174	122176	113626	107447	107055	
	121691	120659	121167	109271	105574	
	120427	119862	118688	108535	101653	

Tabla 4.10. Influencia del tensioactivo GlucoPON 650, incubado junto con la enzima, en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100 con tributirina como sustrato.

tiempo, s	Concentración de GlucoPON 650				
	0 mg/L	10 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	250 mg/L
	µeq valorados	µeq valorados	µeq valorados	µeq valorados	µeq valorados
5	0.15	0.13	0.13	0.12	0.17
10	0.30	0.30	0.30	0.27	0.35
15	0.23	0.27	0.30	0.25	0.50
20	0.38	0.43	0.37	0.35	0.65
25	0.50	0.52	0.48	0.40	0.85
30	0.58	0.58	0.50	0.52	1.00
40	0.80	0.80	0.68	0.67	1.25
50	0.97	0.95	0.85	0.80	1.47
60	1.20	1.10	1.02	0.95	
70	1.35	1.27	1.10	1.10	1.70
80	1.60	1.50	1.32	1.30	1.60
90	1.77	1.65	1.43	1.42	2.05
100	1.97	1.83		1.67	2.15
120	2.37	2.20	1.91	0.92	2.12
150	2.96	2.76	2.37	2.43	2.35
180	3.66	3.27	2.93	2.98	2.30
210	4.21	3.86	3.40	3.45	
240	4.81	4.60	3.88	3.95	2.90
270	5.39	5.12	4.40	4.46	3.07
300	6.01	5.58	4.90	4.95	3.55
360	7.23	6.71	5.86	5.99	3.60
420	8.38	7.83	6.77	6.99	4.25
480	9.52	9.14	7.81	7.99	4.60
540	10.77	10.06	8.81	8.97	
600	11.87				
Actividad, UL/g					
	116174	109031	98513	100288	31549
	121691	113955	97901	102323	36319
	120427	117595	97564	100368	

4.1.7. Influencia del dispersante Cellesh 100 en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.

El efecto del agente dispersante Cellesh 100 sobre la actividad enzimática ha sido estudiado incubando tanto la enzima como el sustrato con una cantidad fija del mismo. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.11.

Tabla 4.11. Influencia del dispersante Cellesh 100, incubado junto con la enzima y el sustrato, en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100 con tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C pH=7.0 $e_{exp}=0.01$ g/L		
	Emulsificación: UltraTurrax		
	Concentración de Cellesh 100		
	0 mg/L	100 mg/L - enzima	100 mg/L - sustrato
tiempo, s	$\mu\text{eq valorados}$	$\mu\text{eq valorados}$	$\mu\text{eq valorados}$
5	0.13	0.13	0.08
10	0.30	0.32	0.20
15	0.35	0.52	0.30
20	0.38	0.70	0.35
25	0.50	0.88	0.43
30	0.58	1.03	0.50
40	0.80	1.17	0.50
50	0.97	1.35	0.67
60	1.20	1.50	0.82
70	1.35	1.74	0.94
80	1.60	1.89	1.12
90	1.77	2.09	1.27
100	1.97	2.30	1.35
120	2.37	2.59	1.65
150	2.96	3.14	2.08
180	3.66	3.67	2.59
210	4.21	4.21	3.04
240	4.81	4.74	3.52
270	5.39	5.28	3.99
300	6.01	5.84	4.42
360	7.23	6.90	5.33
420	8.38	7.95	6.19
480	9.52	8.98	7.08
540	10.77	10.05	8.00
600	11.87		8.97
Actividad, UL/g			
	116174	106240	88373
	121691	106962	88662
	120427	107394	93459

4.1.8. Influencia de la proteasa Alcalase 2.5L en la actividad y estabilidad de la enzima Lipolase 100.

La actividad de la enzima Lipolase 100 se midió fijando una concentración de Alcalase 2.5L en el medio de reacción de 1.0 g/L. Se realizaron también ensayos de actividad en ausencia de lipasa y de tributirina. Los resultados se recogen en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Influencia de la proteasa Alcalase 2.5L en la actividad de la enzima Lipolase 100. Medidas efectuadas usando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
Concentración de Alcalase 2.5L en el medio de reacción						
	Lipolase 100	Lipolase 100 + Alcalase 2.5L (1.0 g/L)	Alcalase 2.5L (1.0 g/L)	Lipolase 100 + Alcalase 2.5L (1.0 g/L) SIN TRIBUTIRINA		
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados		
5	0.16	0.23	0.15	0.00		
10	0.32	0.46	0.31	0.00		
15	0.58	0.70	0.47	0.00		
20	0.49	0.94	0.63	0.00		
25	0.71	1.16	0.79	0.00		
30	0.70	1.40	0.94	0.00		
40	0.85	1.86	1.28	0.00		
50	1.14	2.32	1.60	0.00		
60	1.31	2.66	1.82	0.00		
70	1.48	2.97	1.95	0.00		
80	1.59	3.23	2.12	0.00		
90	1.73	3.51	2.33	0.00		
100	1.88	3.81	2.33	0.00		
120	2.16	4.38	2.69	0.03		
150	2.71	5.31	3.10	0.03		
180	3.24	6.20	3.45	0.10		
210	3.74	7.09	4.02	0.10		
240	4.25	7.98	4.28	0.13		
270	4.80	8.85	5.01	0.16		
300	5.30	9.73	5.37	0.19		
360	6.61	11.40	6.21	0.24		
420	7.33	13.13	7.08	0.32		
480	8.33	14.86	7.85	0.39		
540	9.12	16.62	9.30	0.42		
600	10.04	18.41	10.33			
Actividad, UL/g						
	104139	168569	28.4	-		
	105196	168563	27.9	-		
	95913	173883	27.1	-		
		178043		-		
		176072		-		
		169643		-		

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Para estudiar la estabilidad de la enzima Lipolase 100 en presencia de la proteasa Alcalase 2.5L se incubó la primera (0.10 g/L) durante cinco días en presencia de distintas concentraciones de la segunda, midiéndose la actividad lipásica al principio y al final del periodo, con tributirina como sustrato. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.13.

Tabla 4.13. Estabilidad de la enzima Lipolase (0.1 g/L) en presencia de distintas concentraciones de la proteasa Alcalase 2.5L

pH=7.0		T=30°C							
		e _{exp} =0.01 g/L				α _{exp} =0.01			
		Concentración de Alcalase 2.5L							
		Primer día				Quinto día			
		0 g/l	0.01 g/L	0.10 g/L	1.0 g/L	0 g/l	0.01 g/L	0.10 g/L	1.0 g/L
t, s		μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5		0.08	0.05	0.05	0.19	0.10	0.15	0.19	0.19
10		0.28	0.24	0.29	0.39	0.32	0.34	0.39	
15		0.46	0.44	0.49		0.53			
20		0.49			0.53	0.49	0.44		
25		0.55	0.53	0.53		0.60		0.49	
30		0.68	0.68		0.68	0.68	0.58	0.63	
40		0.78	0.73	0.83	0.83	0.83	0.73	0.68	
50		0.95	0.92	0.92			0.88		0.34
60		1.02		1.12	1.17	1.12		1.02	
70		1.26	1.26			1.25		1.07	
80		1.39	1.31	1.41	1.46	1.38		1.22	0.44
90		1.51	1.51	1.51	1.60	1.56	1.41		
100		1.60		1.70	1.75	1.60	1.51	1.46	
120		1.95	1.90	1.99	2.04	1.99			0.53
150		2.29	2.38	2.43		2.40			
180		2.84	2.72	2.87	2.92	2.82		2.53	
210		3.14	3.21	3.36		3.28		2.92	
240		3.55	3.70			3.65	3.36	3.31	0.88
270		4.05			4.28	4.17	3.79	3.74	
300		4.35	4.57	4.72	4.77	4.60	4.23	4.13	
360		5.23	5.45	5.64	5.69	5.59	5.06	4.91	
420		6.05	6.32	6.57		6.32	5.93		
480		6.91		7.44	7.49	7.28	6.71	6.47	
540		7.96	8.12	8.36	8.41	8.12	7.54	7.25	
600		8.75	9.05	9.24					
		Actividad, UL/g							
		92108	89253	92209	92069	91103	82735	79443	14539
		87941				86287			
		80958				91063			

4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIOLEINA COMO SUSTRATO.

A continuación se presentan los resultados de los ensayos de actividad realizados con trioleína como sustrato. El cálculo de la actividad se ha realizado a partir de la pendiente de la curva de hidrólisis entre 180 y 480 segundos, como en el caso de la tributirina.

En primer lugar se ha estudiado la influencia de la concentración de enzima, utilizando las enzimas Lipolase 100, LipoPrime 50T y Novozym 388, lo que ha permitido comparar la actividad de las mismas con trioleína como sustrato (apartado 4.2.1).

A continuación, y ya con la enzima Lipolase 100, se ha investigado la influencia sobre su actividad de las siguientes variables:

- Concentración de sustrato (fracción volumétrica de trioleína en la emulsión): 4.2.2
- Características de la emulsión (método de preparación y estabilidad): 4.2.3
- Temperatura: 4.2.4
- pH: 4.2.5
- Concentración de ácido oleico en el medio de reacción: 4.2.6

A pH 7.0, al que se han realizado las medidas de actividad, el ácido oleico no se encuentra totalmente disociado, lo que no ocurre hasta un pH en torno a 9.5. Por esta razón la valoración del ácido oleico generado durante la hidrólisis, y por tanto su detección mediante el método del pHstato, no es completa a pH 7.0.

Para subsanar este inconveniente se ha empleado un método alternativo, capaz de detectar la totalidad del ácido oleico presente en el medio, basado en la determinación colorimétrica de las sales cúpricas de dicho ácido. Los resultados obtenidos mediante este método se recogen en el apartado 4.2.7.

4.2.1. Influencia de la concentración de enzima

Los resultados obtenidos con las tres lipasas utilizadas se recogen en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Influencia de la concentración de enzima en la medida de la actividad lipásica con trioleína como sustrato

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C			pH = 7.00	
	Emulsificación: UltraTurrax				
	Θ_{exp}				
	Lipolase 100		LipoPrime	Novozym	
	0.05 g/L	0.10 g/L	2.5 g/L	5.0g/L	10.0 g/L
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.04	0.08	0.14	0.07	0.15
10	0.09	0.15	0.35	0.13	0.34
15	0.12		0.57	0.20	0.54
20	0.23	0.30	0.78	0.24	0.76
25			0.98	0.34	
30	0.35	0.44	1.11		
40			1.41		0.88
50	0.40	0.51	1.71	0.37	1.07
60		0.50	2.03	0.29	1.20
70		0.58	2.25	0.46	1.46
80	0.43	0.61	2.52		1.32
90		0.62	2.77		1.42
100		0.68	3.09	0.49	1.85
120	0.48	0.71	3.50	0.66	2.10
150			4.24	0.83	2.30
180		0.91	4.80	1.12	
210	0.61		5.25	1.17	3.17
240		1.09	5.70	1.22	3.32
270	0.70	1.17	6.17	1.45	3.47
300	0.75	1.26	6.69	1.63	3.93
360	0.83		7.33		4.35
420		1.62	8.02	2.37	5.32
480			8.70	2.63	5.81
540	1.11	1.89	9.42	3.12	5.72
600	1.15	2.18	10.44		6.21
Actividad, UL/g					
	1690	1897	323	92.2	56.7
	1688	1847	318	68.5	62.1
	1597	1719	324	76.1	
			336	67.7	
			314		
			316		
			311		
			327		
			315		
			315		

4.2.2. Influencia de la concentración de sustrato

En la Tabla 4.15 se presentan las curvas de hidrólisis obtenidas con la enzima Lipolase 100 y dos fracciones volumétricas de trioleína diferentes.

Tabla 4.15 Influencia de la fracción volumétrica de trioleína en la medida de la actividad de la enzima Lipolase 100

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=2.5 g/L
Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	α _{exp}	
	0.01	0.02
	μeq valorados	μeq valorados
5	0.47	0.66
10	0.86	1.06
15	1.61	1.84
20	2.39	2.58
25	2.76	2.96
30	3.54	3.74
40	4.73	4.51
50	5.56	5.39
60	5.98	6.01
70	6.60	
80	7.54	7.18
90	7.80	7.54
100	8.20	7.90
120	9.15	9.10
150	9.83	10.02
180		10.97
210	11.70	11.49
240	12.48	12.17
270	12.82	13.31
300	13.88	13.57
360	15.24	15.76
420		
480	16.98	16.85
540	17.54	17.16
600	18.80	18.67
Actividad, UL/g		
	489	544
	457	481
	429	451

4.2.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad lipásica

Se ha estudiado la influencia de la técnica de emulsificación y de la estabilidad de la emulsión en la actividad lipásica. Los resultados se incluyen en las Tablas 4.16 y 4.17.

Tabla 4.16 Influencia del método de emulsificación en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=2.5 g/L
 α_{exp}=0.01

tiempo, s	método de emulsificación	
	Ultrasonidos μeq valorados	UltraTurrax μeq valorados
5	0.20	0.15
10	0.49	0.37
15	0.71	0.58
20	0.97	0.80
25	1.17	0.98
30	1.37	1.14
40	1.75	1.44
50	2.11	1.75
60	2.45	2.03
70	2.78	2.31
80	3.12	2.58
90	3.44	2.83
100	3.64	3.09
120	4.16	3.59
150	4.97	4.24
180	5.50	4.80
210	6.11	5.35
240	6.75	5.83
270	7.48	6.27
300	7.78	6.69
360	8.87	7.46
420	10.13	8.15
480	9.96	8.85
540	11.28	9.42
600	10.47	10.44
Actividad, UL/g		
	347	323
	313	318
	374	324
	389	336
	398	315
	408	316
	337	311
		327
		315
		315

Tabla 4.17 Influencia del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína

$\alpha_{exp}=0.01$					
T=30°C pH=7.0 $e_{exp}=2.5$ g/L					
Emulsificación: Ultrasonidos					
Tiempo desde preparación emulsión					
	0 min	30 min	60 min	120 min	240 min
tiempo, s	μ eq valorados	μ eq valorados	μ eq valorados	μ eq valorados	μ eq valorados
5	0.31	0.26	0.23	0.10	0.20
10	0.63	0.62	0.53	0.35	0.51
15	0.81	0.98	0.84	0.60	0.81
20	1.10	1.29	1.11	0.85	0.89
25	1.31	1.44	1.42	1.09	1.21
30	1.46	1.65	1.59	1.34	1.47
40	1.76	1.96	1.95	1.84	1.82
50	2.02	2.21	2.30	2.34	2.17
60	2.30	2.52	2.48	2.64	2.48
70	2.57	2.83	2.78	2.93	2.73
80	2.85	3.09	3.04	3.28	3.18
90	3.10	3.29	3.28	3.58	3.26
100	3.34	3.55	3.58	3.88	3.54
120	3.78	4.01	4.13	4.43	4.17
150	4.41	4.68	4.78	5.17	4.75
180	4.98	5.35	5.47	5.87	5.43
210	5.38	5.87	6.07	6.46	6.22
240	6.09		6.50	7.06	6.60
270	6.60		6.95	7.56	7.31
300	7.05		7.41	8.10	7.51
360	7.83		8.55	9.00	8.13
420	9.10	8.95	9.05	9.79	9.35
480	9.27	9.72		10.54	10.14
540		10.44	10.79	11.29	10.44
600	10.60	11.16	10.39		10.80
Actividad, UL/g					
	347	351			
	315		323		305
	376		372	379	355

4.2.4. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100.

Se ha estudiado el efecto de la temperatura usando trioleína como sustrato y para el intervalo de temperaturas 30 – 50°C. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18 Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína.

pH=7.0 e_{exp}=2.5 g/L
 $\alpha_{exp}=0.01$ Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	Temperatura		
	30°C	40°C	50°C
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.47	0.96	0.65
10	0.86	1.59	1.01
15	1.61	2.89	1.79
20	2.39	4.16	2.83
25	2.76	4.84	3.48
30	3.54	5.38	4.78
40	4.73	6.36	5.25
50	5.56	7.28	8.29
60	5.98	8.11	9.59
70	6.60	8.68	10.04
80	7.54	9.20	
90	7.80	9.67	
100	8.20	10.14	12.06
120	9.15	11.34	12.69
150	9.83	12.27	14.20
180		13.18	15.24
210	11.70	14.09	15.76
240	12.48		
270	12.82	15.55	
300	13.88		18.88
360	15.24		
420		19.50	20.54
480	16.98	19.81	21.63
540	17.54	20.59	
600	18.80	21.94	24.21
	Actividad, UL/g		
	489	568	604
	457	521	545
	429	506	

4.2.5. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100.

Los resultados correspondientes a la influencia del pH usando tanto trioleína como tributirina como sustrato se incluyen en las Tabla 4.19.

Tabla 4.19. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100 con trioleína como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C		$e_{exp} = 2.5 \text{ g/L}$		
	Emulsificación: UltraTurrax				
	pH				
	7.0	7.5	8.0	9.0	9.5
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.07	0.37	0.51	0.49	0.34
10	0.29	1.08	0.81		
15	0.51	1.34	1.66	1.08	
20	0.71	1.96	2.49	1.69	1.22
25	0.90	2.59	3.19	1.96	1.42
30	1.10	3.03	3.88	1.91	1.52
40	1.42	5.03	5.43	2.25	1.61
50	1.71	5.72	7.09		1.81
60	2.00	6.43	7.33		
70	2.27	6.92	8.29		1.91
80	2.57	7.41	8.67	2.59	1.96
90	2.84	7.80	8.93		
100	3.13	8.21	9.22		2.00
120	3.62	8.92	9.63		
150	4.28	9.87	10.53	2.69	
180	4.89	11.05	10.69		
210	5.45	11.19	11.51		2.25
240	5.91	12.37	10.61		
270	6.33	13.08	12.22	2.88	
300	6.75	13.81	11.19		
360	7.53	15.08	12.63		
420	8.19	16.08	12.22	3.03	
480	8.82	17.60	13.64		
540	9.34	18.79	14.09		
600			14.47	3.37	2.79
Actividad, UL/g					
	315	553	255	30	33
	315	548	220	36	
			222		

4.2.6. Influencia de la concentración de ácido oleico en la actividad lipásica

Las Tablas 4.20 y 4.21 presentan las curvas de hidrólisis de trioleína obtenidas en presencia de dos concentraciones de ácido oleico en el medio y a dos valores de pH.

Tabla 4.20 Influencia de la concentración de ácido oleico en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína a pH 7.0

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=2.5 g/L
 α_{exp}=0.01 Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	Concentración de ácido oleico		
	0 mM	1.0 mM	3.5 mM
5	0.13	0.18	0.13
10	0.33	0.37	0.33
15	0.54	0.56	0.54
20	0.73		0.73
25	0.98	0.61	0.94
30	0.96	0.73	1.06
40	1.25	0.83	1.30
50	1.48	1.01	1.50
60	1.81		1.63
70	1.92	1.29	1.85
80	2.16	1.51	2.02
90	2.37	1.66	2.15
100	2.68	1.76	2.42
120	3.06	2.15	2.63
150	3.71	2.63	3.02
180	4.22	2.98	3.42
210	4.59	3.22	3.85
240	4.83	3.66	4.03
270	5.45	3.90	4.29
300	6.00	4.24	4.64
360	6.29	4.85	5.27
420	7.27	5.46	5.78
480	7.84	6.10	
540	8.44	6.49	6.68
600			
Actividad, UL/g			
	303	258	239
	301	254	229
	306	252	226

Tabla 4.21 Influencia de la concentración de ácido oleico en la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína a pH 8.0

T=30°C pH=8.0 e_{exp}=2.5 g/L
 α_{exp}=0.01 Emulsificación: UltraTurrax

tiempo, s	Concentración de ácido oleico		
	0 mM	1.0 mM	3.5 mM
5	0.51	0.12	0.26
10	0.81	1.13	1.03
15	1.66		1.64
20	2.49		1.83
25	3.19	1.83	2.12
30	3.88	2.12	2.50
40	5.43	2.55	3.18
50	7.09	3.08	3.74
60	7.33	3.22	4.28
70	8.29	3.90	4.79
80	8.67	4.07	5.18
90	8.93	4.28	5.56
100	9.22	4.64	5.90
120	9.63	5.12	6.52
150	10.53	6.11	7.31
180	10.69	6.21	7.89
210	11.51	7.26	8.35
240		7.26	9.00
270	12.22	8.27	
300		8.71	9.64
360	12.63		10.44
420	12.22	10.05	
480	13.64	10.75	11.31
540	14.09	11.16	11.76
600	14.47	12.03	12.17
Actividad, UL/g			
	255	321	276
	220	365	276
	222		286

4.2.7. Determinación de la actividad lipásica mediante un método colorimétrico

La concentración de ácido oleico en el medio durante la reacción de hidrólisis de la trioleína se ha seguido simultáneamente mediante el método del pHstato y por determinación colorimétrica del ácido, a valores de pH entre 7.0 y 10.0.

Las Tablas 4.22 a 4.27 muestran los equivalentes de ácido detectados a distintos tiempos de reacción y valores de pH según cada uno de los métodos.

Tabla 4.22. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína con Lipolase 100 a pH 7.0.

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=7.0 $e_{exp}= 2.5 \text{ g/L}$
Emulsificación: UltraTurrax

Tiempo de reacción, min	pHstato		colorimetría	
	Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
Blanco	0.000	0.0	0.081	4.9
Blanco	0.000	0.0	0.090	6.2
Blanco	0.000	0.0	0.087	5.8
3.0	0.090	4.5	0.442	54.5
3.0	0.080	4.0	0.424	52.1
3.0	0.086	4.3	0.430	52.9
5.5	0.138	6.9	0.609	77.5
5.5	0.125	6.2	0.552	69.6
5.5	0.126	6.3	0.540	68.0
8.0	0.172	8.5	0.666	85.3
8.0	0.162	8.0	0.625	79.7
8.0	0.164	8.1	0.634	80.9
10.0	0.192	9.5	0.736	94.9
10.0	0.173	8.6	0.680	87.2
10.0	0.167	8.3	0.698	89.7

Tabla 4.23. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína con Lipolase 100 a pH 7.5

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=7.5 $e_{exp}= 2.5 \text{ g/L}$
Emulsificación: UltraTurrax

Tiempo de reacción, min	pHstato		colorimetría	
	Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
Blanco	0.000	0.0	0.087	5.7
5.5	0.271	13.5	0.570	72.1
5.5	0.244	12.1	0.535	67.3
8.0	0.315	15.6	0.630	80.4
10.0	0.380	18.9	0.727	93.7
10.0	0.365	18.1	0.698	89.7

Tabla 4.24. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína con Lipolase 100 a pH 8.0

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=8.0 $e_{exp}= 2.5 \text{ g/L}$
 Emulsificación: UltraTurrax

Tiempo de reacción, min	pHstato		colorimetría	
	Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
Blanco	0.000	0.0	0.081	4.9
Blanco	0.000	0.0	0.089	6.0
3.0	0.201	10.0	0.316	35.0
8.0	0.281	13.9	0.403	46.3
10.0	0.308	15.3	0.438	50.8
10.0	0.311	15.4	0.425	49.1

Tabla 4.25. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína a pH 9.0

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=9.0 $e_{exp}= -$
 Emulsificación: UltraTurrax

Enzima	Tiempo, min	pHstato		colorimetría	
		Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
-	Blanco	0.000	0.0	0.087	5.8
Lipolase 100 (2.5 g/L)	3.0	0.046	2.3	0.112	9.2
Lipolase 100 (15 g/L)	3.0	0.087	4.3	0.123	10.7
LipoPrime 50T (5 g/L)	3.0	0.520	25.8	0.343	40.9
Lipolase 100 (15 g/L)	5.5	0.101	5.0	0.132	12.0
LipoPrime 50T (5 g/L)	5.5	0.752	37.4	0.435	53.6
Lipolase 100 (2.5 g/L)	10.0	0.069	3.4	0.116	9.8
Lipolase 100 (15 g/L)	10.0	0.128	6.4	0.136	12.5
LipoPrime 50T (5 g/L)	10.0	1.018	50.6	0.532	66.9

Tabla 4.26. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína con LipoPrime 50T a pH 9.5

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=9.5 $e_{exp}= 5.0$ g/L
Emulsificación: UltraTurrax

Tiempo de ensayo, min	pHstato		colorimetría	
	Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
Blanco	0.000	0.0	0.086	5.6
5.5	1.012	49.2	0.491	61.3
8.0	1.258	61.3	0.558	70.5
10.0	1.351	65.9	0.571	72.3
10.0	1.397	68.1	0.579	73.4

Tabla 4.27. Determinación del ácido oleico mediante la técnica del pHstato y por colorimetría durante la hidrólisis de trioleína con LipoPrime 50T a pH 10.0

$\alpha_{exp}=0.01$ T=30°C pH=9.5 $e_{exp}= 4.0$ g/L
Emulsificación: UltraTurrax

Tiempo de ensayo, min	pHstato		colorimetría	
	Vol. final NaOH, mL	μmol oleico	Absorbancia	μmol oleico
Blanco	0.000	0.0	0.086	5.6
3.0	0.574	28.5	0.272	31.2
5.5	0.860	42.7	0.397	48.4
10.0	1.262	62.7	0.526	66.1
10.0	1.223	60.7	0.533	67.0

4.3. ESTUDIO DE LAS EMULSIONES UTILIZADAS PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA MEDIANTE DIFRACCIÓN LÁSER.

La distribución de tamaños de gota de las emulsiones de tributirina y trioleína utilizadas para la medida de la actividad lipásica ha sido determinada por difracción láser, para estudiar la influencia sobre la misma de la fracción volumétrica de fase grasa, de la técnica de emulsificación y del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión.

En las Tablas 4.28 a 4.33 se presentan las distribuciones de tamaño obtenidas en cada caso (diámetro medio del intervalo frente al porcentaje de área superficial

correspondiente). Como parámetro característico se indica también el diámetro de Sauter de cada emulsión, basado en la relación volumen/superficie de la misma, y que es calculado mediante el software de medida a partir de la distribución de tamaños.

4.3.1. Emulsiones de tributirina

Tabla 4.28 Influencia de la fracción volumétrica de tributirina en la distribución de tamaños de gota de la emulsión.

Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	α_{exp}	
	0.01	0.05
	% Área superficial	% Área superficial
0.33	$4.37 \cdot 10^{-2}$	0.00
0.43	1.07	3.13
0.57	3.35	6.88
0.76	6.21	9.40
1.00	8.90	10.7
1.32	10.6	10.5
1.75	10.9	8.87
2.31	9.90	6.50
3.06	8.39	4.37
4.05	7.08	3.33
5.35	6.37	3.59
7.08	6.15	4.79
9.37	6.10	6.23
12.40	5.75	7.14
16.40	4.56	6.43
21.69	2.65	4.07
28.70	1.07	1.88
37.97	$4.30 \cdot 10^{-1}$	$9.80 \cdot 10^{-1}$
50.22	$2.24 \cdot 10^{-1}$	$6.10 \cdot 10^{-1}$
66.44	$1.31 \cdot 10^{-1}$	$3.57 \cdot 10^{-1}$
87.90	$7.70 \cdot 10^{-2}$	$1.70 \cdot 10^{-1}$
116.3	$2.75 \cdot 10^{-2}$	$4.83 \cdot 10^{-2}$
153.8	$7.50 \cdot 10^{-3}$	$1.27 \cdot 10^{-2}$
203.5	$8.94 \cdot 10^{-4}$	$1.43 \cdot 10^{-3}$
	Diámetro de Sauter, μm	
	5.415	6.550

Tabla 4.29 Influencia del método de emulsificación en la distribución de tamaños de gota de una emulsión de tributirina.

$\alpha_{\text{exp}} = 0.01$

Diámetro, μm	Método emulsificación	
	Ultrasonidos	UltraTurrax
	% Área superficial	% Área superficial
0.27	0.00	$7.00 \cdot 10^{-5}$
0.36	0.00	$1.94 \cdot 10^{-1}$
0.47	$9.86 \cdot 10^{-2}$	1.74
0.63	3.59	4.28
0.83	11.5	7.16
1.10	19.2	9.62
1.45	22.3	10.9
1.92	19.4	10.7
2.54	12.9	9.42
3.36	6.50	7.90
4.44	2.55	6.77
5.88	$9.20 \cdot 10^{-1}$	6.26
7.78	$4.40 \cdot 10^{-1}$	6.13
10.29	$3.47 \cdot 10^{-1}$	6.05
13.61	$1.37 \cdot 10^{-1}$	5.46
18.00	$4.40 \cdot 10^{-2}$	3.97
23.81	$5.60 \cdot 10^{-2}$	2.02
31.50	$1.53 \cdot 10^{-2}$	$7.70 \cdot 10^{-1}$
41.68	$6.30 \cdot 10^{-3}$	$3.41 \cdot 10^{-1}$
55.13	$6.24 \cdot 10^{-3}$	$1.83 \cdot 10^{-1}$
72.94	$5.50 \cdot 10^{-5}$	$1.13 \cdot 10^{-1}$
96.49	0.00	$5.80 \cdot 10^{-2}$
127.6	0.00	$1.82 \cdot 10^{-2}$
168.9	0.00	$4.45 \cdot 10^{-3}$
223.4	0.00	$2.46 \cdot 10^{-4}$
	Diámetro de Sauter, μm	
	1.852	5.415

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.30 Distribución de tamaños de gota de una emulsión de tributirina en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

$\alpha_{exp}=0.01$ Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	Tiempo desde preparación emulsión			
	0 min	60 min	120 min	240 min
	% Área superficial	% Área superficial	% Área superficial	% Área superficial
0.43	1.15	1.12	$6.80 \cdot 10^{-1}$	1.25
0.57	3.01	2.95	2.11	3.15
0.76	5.39	5.22	4.50	5.38
1.00	7.93	7.69	7.40	7.73
1.32	9.97	9.76	10.0	9.68
1.75	10.9	10.8	11.5	10.6
2.31	10.7	10.8	11.6	10.7
3.06	9.90	10.2	10.9	10.1
4.05	9.09	9.40	9.81	9.40
5.35	8.47	8.67	8.79	8.75
7.08	7.80	7.87	7.75	7.94
9.37	6.72	6.69	6.46	6.73
12.40	4.87	4.85	4.60	4.81
16.40	2.51	2.54	2.37	2.44
21.69	$7.60 \cdot 10^{-1}$	$8.00 \cdot 10^{-1}$	$8.00 \cdot 10^{-1}$	$7.10 \cdot 10^{-1}$
28.70	$2.62 \cdot 10^{-1}$	$2.54 \cdot 10^{-1}$	$3.10 \cdot 10^{-1}$	$2.19 \cdot 10^{-1}$
37.97	$2.02 \cdot 10^{-1}$	$1.89 \cdot 10^{-1}$	$2.10 \cdot 10^{-1}$	$1.86 \cdot 10^{-1}$
50.22	$9.80 \cdot 10^{-2}$	$7.90 \cdot 10^{-2}$	$9.40 \cdot 10^{-2}$	$8.60 \cdot 10^{-2}$
66.44	$8.10 \cdot 10^{-2}$	$3.03 \cdot 10^{-2}$	$4.60 \cdot 10^{-2}$	$4.10 \cdot 10^{-2}$
87.90	$8.70 \cdot 10^{-2}$	$2.99 \cdot 10^{-2}$	$3.60 \cdot 10^{-2}$	$4.70 \cdot 10^{-2}$
116.3	$6.20 \cdot 10^{-2}$	$3.16 \cdot 10^{-2}$	$4.30 \cdot 10^{-2}$	$4.20 \cdot 10^{-2}$
153.8	$5.70 \cdot 10^{-2}$	$1.46 \cdot 10^{-2}$	$4.50 \cdot 10^{-2}$	$1.62 \cdot 10^{-2}$
203.5	$2.07 \cdot 10^{-2}$	$7.11 \cdot 10^{-4}$	$1.10 \cdot 10^{-2}$	$6.33 \cdot 10^{-4}$
269.2	$4.29 \cdot 10^{-4}$	0.00	$1.14 \cdot 10^{-4}$	0.00
	Diámetro de Sauter, μm			
	4.718	4.515	4.615	4.509

4.3.2. Emulsiones de trioleína

Tabla 4.31 Influencia de la fracción volumétrica de trioleína en la distribución de tamaños de gota de la emulsión.

Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	α_{exp}	
	0.01 % Área superficial	0.05 % Área superficial
0.43	1.95	4.24
0.57	4.77	8.78
0.76	7.90	11.0
1.00	11.1	11.7
1.32	13.6	11.4
1.75	14.5	10.4
2.31	13.5	8.88
3.06	11.1	7.12
4.05	8.18	5.51
5.35	5.61	4.31
7.08	3.65	3.53
9.37	2.27	3.06
12.40	1.25	2.67
16.40	$5.30 \cdot 10^{-1}$	2.16
21.69	$1.64 \cdot 10^{-1}$	1.50
28.70	$3.97 \cdot 10^{-2}$	$7.50 \cdot 10^{-1}$
37.97	$1.50 \cdot 10^{-2}$	$3.70 \cdot 10^{-1}$
50.22	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$3.30 \cdot 10^{-1}$
66.44	$1.00 \cdot 10^{-6}$	$4.50 \cdot 10^{-1}$
87.90	0.00	$7.20 \cdot 10^{-1}$
116.3	0.00	$7.20 \cdot 10^{-1}$
153.8	0.00	$2.68 \cdot 10^{-1}$
203.5	0.00	$1.54 \cdot 10^{-2}$
Diámetro de Sauter, μm		
	2.679	5.758

Tabla 4.32 Influencia del método de emulsificación en la distribución de tamaños de gota de una emulsión de trioleína.

$\alpha_{\text{exp}} = 0.01$

Diámetro, μm	Método emulsificación	
	Ultrasonidos % Área superficial	UltraTurrax % Área superficial
0.25	$8.50 \cdot 10^{-3}$	0.00
0.33	1.73	0.00
0.43	8.01	1.95
0.57	13.7	4.77
0.76	16.9	7.90
1.00	17.3	11.1
1.32	15.4	13.6
1.75	12.2	14.5
2.31	8.16	13.5
3.06	4.33	11.1
4.05	1.79	8.18
5.35	$5.06 \cdot 10^{-1}$	5.61
7.08	$2.96 \cdot 10^{-2}$	3.65
9.37	0.00	2.27
12.40	0.00	1.25
16.40	0.00	$5.30 \cdot 10^{-1}$
21.69	0.00	$1.64 \cdot 10^{-1}$
28.70	0.00	$3.97 \cdot 10^{-2}$
37.97	0.00	$1.50 \cdot 10^{-2}$
50.22	0.00	$1.78 \cdot 10^{-3}$
66.44	0.00	$1.00 \cdot 10^{-6}$
Diámetro de Sauter, μm		
	1.254	2.679

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.33 Distribución de tamaños de gota de una emulsión de trioleína en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

$\alpha_{exp} = 0.01$

Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	Tiempo desde preparación de la emulsión				
	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
	% Área superficial	% Área superficial	% Área superficial	% Área superficial	% Área superficial
0.43	1.95	2.01	2.07	1.93	1.95
0.57	4.77	4.89	5.00	4.74	4.77
0.76	7.90	8.03	8.12	7.91	7.93
1.00	11.1	11.2	11.2	11.2	11.2
1.32	13.6	13.6	13.6	13.8	13.7
1.75	14.5	14.5	14.3	14.7	14.6
2.31	13.5	13.4	13.3	13.6	13.5
3.06	11.1	11.0	10.8	11.1	11.0
4.05	8.18	8.08	8.02	8.10	8.00
5.35	5.61	5.52	5.49	5.40	5.32
7.08	3.65	3.56	3.59	3.36	3.36
9.37	2.27	2.20	2.24	2.01	2.09
12.40	1.25	1.21	1.25	1.13	1.26
16.40	$5.30 \cdot 10^{-1}$	$5.30 \cdot 10^{-1}$	$5.80 \cdot 10^{-1}$	$6.00 \cdot 10^{-1}$	$6.90 \cdot 10^{-1}$
21.69	$1.64 \cdot 10^{-1}$	$1.96 \cdot 10^{-1}$	$2.25 \cdot 10^{-1}$	$3.21 \cdot 10^{-1}$	$3.13 \cdot 10^{-1}$
28.70	$3.97 \cdot 10^{-2}$	$4.91 \cdot 10^{-2}$	$7.60 \cdot 10^{-2}$	$1.30 \cdot 10^{-1}$	$1.07 \cdot 10^{-1}$
37.97	$1.50 \cdot 10^{-2}$	$1.53 \cdot 10^{-2}$	$2.36 \cdot 10^{-2}$	$3.75 \cdot 10^{-2}$	$3.12 \cdot 10^{-2}$
50.22	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$8.20 \cdot 10^{-3}$	$8.90 \cdot 10^{-3}$	$1.19 \cdot 10^{-2}$	$1.17 \cdot 10^{-2}$
66.44	$1.00 \cdot 10^{-6}$	$6.20 \cdot 10^{-3}$	$9.10 \cdot 10^{-3}$	$1.05 \cdot 10^{-2}$	$1.43 \cdot 10^{-2}$
87.90	0.00	$1.37 \cdot 10^{-2}$	$1.40 \cdot 10^{-2}$	$1.86 \cdot 10^{-2}$	$2.07 \cdot 10^{-2}$
116.3	0.00	$1.70 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-2}$	$2.14 \cdot 10^{-2}$	$2.70 \cdot 10^{-2}$
153.8	0.00	$3.89 \cdot 10^{-3}$	$3.53 \cdot 10^{-3}$	$4.94 \cdot 10^{-3}$	$1.06 \cdot 10^{-2}$
203.5	0.00	$1.40 \cdot 10^{-5}$	$1.40 \cdot 10^{-5}$	$1.80 \cdot 10^{-5}$	$2.02 \cdot 10^{-4}$
	Diámetro de Sauter, μm				
	2.679	2.705	2.729	2.755	2.790

4.4. ESTABILIDAD Y DESACTIVACIÓN DE LAS LIPASAS ESTUDIADAS.

La desactivación de las tres lipasas utilizadas ha sido estudiada en condiciones similares a las de lavado: sometidas a una velocidad constante de agitación a diferentes temperaturas. Los resultados se incluyen en el apartado 4.4.1.

Además, con la enzima Lipolase 100 se han llevado a cabo experimentos para estudiar la desactivación de la misma a diversas temperaturas en ausencia de agitación (apartado 4.4.2) y a diferentes velocidades de agitación y temperatura ambiente (apartado 4.4.3). Estos experimentos se han realizado también en presencia de glicina para comprobar el efecto estabilizador de la misma (apartado 4.4.4).

En todos los casos el sustrato elegido para llevar a cabo los experimentos fue la tributirina.

4.4.1. Estabilidad en condiciones de lavado.

4.4.1.1. Enzima Lipolase 100

Las Tablas 4.34 a 4.36 presentan las curvas de valoración obtenidas en función del tiempo de conservación de la enzima en las siguientes condiciones: 1000 rpm y temperaturas de 30, 40 y 50°C.

Tabla 4.34. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 30°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

T=30°C		pH=7.0		e _{exp} =0.01 g/L		Emulsificación: Ultrasonidos		
α _{exp} =0.01		Tiempo de conservación						
	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	120 min	240 min	300 min
t, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.22	0.10	0.15	0.10	0.15	0.15	0.08	0.12
10	0.49	0.33	0.36	0.26	0.33	0.31	0.20	0.27
15	0.59	0.54		0.46			0.31	0.20
20	0.76							0.30
25	0.82	0.46			0.41	0.36		0.40
30		0.60	0.51		0.48	0.41		0.44
40	1.09	0.57					0.46	
50	1.11	1.04		0.51	0.64	0.46		0.49
60	1.28	1.09	0.72				0.51	
70	1.34	0.82				0.62		0.59
80	1.54	1.10	0.87	0.67				
90	1.69	1.48			0.72	0.72		
100	1.80						0.59	
120	2.03	1.18	1.18	0.93	0.87		0.64	0.74
150	2.50	1.81	1.39	1.08		1.03		
180	2.97	2.52	1.59		1.33			
210	3.35	2.97	1.80	1.39				
240	3.96	2.74	2.06	1.59	1.54			1.09
270	4.19	2.99	2.26	1.75			1.39	
300	4.72	4.00			1.80	1.85		
360	5.44	4.75		2.21	2.27		1.75	
420	6.29		3.40			2.52		
480	7.10	5.07	3.81	2.93		2.93		
540	7.94	5.65	4.32	3.24		3.29		
600	8.78	6.23	4.78	3.55	3.48	3.70	2.55	2.37
Actividad, UL/g								
	86900				31474		19478	19746
	86556	71052						21056
	79183	47776	44716	33703	31973	34880	26566	

Tabla 4.35. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 40°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$					
T = 40°C pH = 7.0 $e_{exp} = 0.01$ g/L					
Emulsificación: Ultrasonidos					
Tiempo de conservación					
	0 min	20 min	60 min	120 min	210 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.18	0.13	0.10	0.10	0.08
10	0.40	0.30	0.23	0.20	0.18
15	0.60	0.30	0.35	0.30	0.35
20	0.83	0.53	0.50	0.43	0.33
25	0.95	0.65	0.35	0.50	0.40
30	0.98	0.70	0.45	0.50	0.25
40	1.20	0.80		0.65	
50	1.35	0.93	0.70	0.75	0.40
60	1.45	1.05	0.65	0.80	0.60
70	1.65	1.15		0.65	0.80
80	1.80	1.25	0.70	0.83	
90	1.98	1.40	0.80		
100	2.13	1.50	0.88	1.00	
120	2.43	1.75		1.15	
150	2.88	2.08	1.30	1.05	1.20
180	3.35	2.43	1.45		
210	3.83	2.78	1.58	1.65	1.45
240	4.35	3.13	1.83		
270	4.70	3.40			
300	5.23	3.78	1.90		1.75
360	6.18	4.45	2.95	2.50	
420	7.15	5.05		2.18	
480	7.98	5.80	3.90		2.55
540	8.88	6.45	3.80		2.80
600	9.78	7.15	4.25	2.95	2.25
Actividad, UL/g					
	93034	67357	47534	35791	25301
	90034	66377	30814	13284	10351

Tabla 4.36. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 50°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 50°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
	0 min	30 min	120 min	150 min	180 min	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.13	0.10	0.05	0.05	0.05	
10	0.30	0.23	0.15	0.00	0.25	
15	0.46	0.30	0.18	0.10		
20	0.56	0.40	0.23	0.15	0.25	
25	0.66	0.55	0.20	0.20		
30	0.76	0.65	0.26	0.26		
40	1.00	0.68			0.25	
50	1.25	1.01	0.41	0.41		
60	1.45	2.15	0.51			
70	1.70	0.61	0.51		0.25	
80	1.80		0.61	0.56		
90	1.95	0.66				
100	1.69	0.77	0.61		0.35	
120	2.30					
150	2.70		0.82			
180	2.85		0.82		0.40	
210	3.23	3.50	0.87	1.07		
240	3.75				0.45	
270	3.87	3.70	1.18			
300					0.50	
360				1.53		
420	5.41		1.59		0.65	
480	5.92	2.40	1.74	1.89	0.65	
540	6.50	4.40				
600	7.03	3.73	1.97	2.20	0.80	
Actividad, UL/g						
	59669	17064			5376	
	63242	26089	17556	17597		

4.4.1.2. Enzima LipoPrime 50T

Las Tablas 4.37 a 4.39 presentan las curvas de valoración obtenidas para distintos tiempos de conservación de la enzima en las condiciones siguientes: 1000 rpm y temperaturas de 30, 40 y 50°C.

Tabla 4.37. Desactivación de la enzima LipoPrime 50T en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 30°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.03$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	240 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.20	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10
10	0.45		0.15	0.15	0.15	0.15
15	0.65	0.15	0.25	0.25	0.25	0.25
20	0.75		0.30	0.30	0.30	0.35
25	0.80		0.40		0.40	0.40
30			0.50		0.50	
40	1.00			0.45		0.50
50	1.05		0.60		0.65	0.00
60	1.25	0.45				0.55
70	1.35	0.55				
80	1.45	0.60	0.80		0.75	
90		0.00	0.90			0.65
100	1.70	0.75	0.95			0.75
120	1.90	0.90	1.15	0.80		
150	2.25	1.15	1.40	1.05		0.95
180		1.40	1.70	1.20		1.05
210	3.10	1.65	1.90			
240	3.45		2.15	1.60	1.50	
270	3.85		2.40			1.50
300	4.25	2.45	2.55		1.80	
360	5.10	3.05	3.15		2.15	1.95
420	5.90		3.70	2.80	2.50	2.30
480	6.75	4.25	4.20	3.30		
540	7.60	4.80	4.75	3.75	3.30	3.00
600	8.45	5.40	5.35	4.20	3.70	3.40
	Actividad, UL/g					
	27331	18726	16957	13926	11430	10534

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.38. Desactivación de la enzima LipoPrime 50T en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 40°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=40°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.03$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
tiempo, s	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.15	0.15	0.10	0.05	0.10	0.05
10	0.35	0.35	0.25	0.15	0.15	0.15
15		0.50	0.40	0.20	0.25	0.25
20				0.30	0.30	0.30
25		0.60			0.35	0.40
30	0.55		0.55		0.40	
40	0.70			0.40		
50	0.80	0.85	0.70	0.50		0.55
60	0.95		0.80	0.55	0.50	
70	1.05	1.05	0.90		0.55	
80	1.15		0.95	0.70		
90	1.35				0.60	
100	1.45	1.35	1.10	0.80		0.70
120		1.50		0.90		0.85
150	1.95	1.85	1.60			1.00
180		2.15	1.80	1.35		1.15
210		2.50	2.20	1.55		1.35
240	3.20	2.85	2.45		1.50	1.50
270	3.60	3.20	2.80	2.05	1.75	1.70
300	4.05				2.00	1.95
360	4.85	4.25	3.80	2.85	2.45	2.35
420	5.70	4.95	4.50		2.90	2.75
480	6.60	5.70	5.20	3.85		3.20
540	7.35	6.45	5.90	4.45	3.85	3.70
600	8.35	7.25	6.55	5.05	4.30	4.15
Actividad, UL/g						
	35036	23818	22128	16924	15517	13752

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.39. Desactivación de la enzima LipoPrime 50T en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 50°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=50°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.03$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	270 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.10	0.10	0.10	0.10	0.05	0.05
10	0.20	0.23	0.20	0.20	0.15	0.15
15	0.35	0.35	0.35		0.25	0.20
20	0.45	0.48	0.45	0.30	0.30	0.30
25	0.60	0.60		0.35		
30	0.70	0.70	0.55	0.40		
40	0.95	0.88		0.45	0.40	
50	1.10	1.00	0.65	0.55	0.45	
60	1.20	1.10		0.65	0.50	
70	1.35	1.23	0.85	0.70		
80	1.45	1.33	0.95	0.00	0.60	0.50
90	1.55	1.43	1.05	0.75	0.65	
100	1.65	1.53	1.15	0.85	0.75	0.55
120	1.90	1.75		1.00	0.85	
150	2.30	2.10	1.60	1.30		0.85
180	2.60	2.40		1.60		
210		2.55	2.25	1.75	1.45	1.25
240		2.90		2.10		1.60
270	3.80	3.50	2.95	2.40	1.90	
300					2.15	1.80
360		4.25	3.85	3.30		2.20
420	5.75	5.75		3.85	3.15	2.65
480		5.65	5.05	4.55	3.70	3.10
540	7.35	6.85	5.85		4.20	3.55
600	8.10	7.58	6.45	5.75	4.80	4.00
Actividad, UL/g						
	35942	24503	20673	20142	16607	13310

4.4.1.3. Enzima Novozym 388

Las Tablas 4.40 a 4.42 presentan las curvas de valoración obtenidas para distintos tiempos de conservación de la enzima en las siguientes condiciones: 1000 rpm y temperaturas de 30, 40 y 50°C.

Tabla 4.40. Desactivación de la enzima Novozym 388 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 30°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.05$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
	0 min	20 min	40 min	60 min	120 min	240 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.20	0.10	0.15	0.15	0.05	0.10
10	0.40	0.25	0.30	0.25	0.15	0.15
15	0.60	0.45	0.45	0.40	0.30	0.25
20	0.80	0.60	0.50	0.50	0.40	0.35
25	1.00	0.70	0.55			0.40
30	1.10	0.75	0.60	0.65		0.50
40	1.20	0.90	0.75	0.80	0.50	
50	1.35		0.85	0.90		
60	1.60	1.05	0.95	0.95	0.65	
70	1.75	1.25	1.05	1.10	0.70	0.65
80	1.91	1.40	1.20	1.15		
90	2.11		0.00	1.25		0.80
100	2.31	1.70	1.40	1.35		0.85
120	2.61	1.96	1.65	1.55	1.00	1.05
150	3.06	2.36	1.96		1.20	1.20
180	3.61		2.31	2.16		
210		3.11	2.66	2.46		
240	4.66	3.51	3.01		1.70	
270	5.16			3.01		
300	5.67	4.26	3.66	3.26		
360	6.72	5.11		3.86		2.41
420	7.72	5.92	4.96	4.46		2.81
480	8.72	6.67	5.67	5.06	3.31	3.21
540	9.68	7.42	6.32		3.71	3.56
600	10.63	8.12	7.02	6.17	4.16	3.86
Actividad, UL/g						
	20198	15745	13335	11660	7947	7292

Tabla 4.41. Desactivación de la enzima Novozym 388 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 40°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=40°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.05$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
	0 min	20 min	40 min	60 min	120 min	180 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.15	0.05	0.05	0.15	0.15	0.10
10	0.40	0.25	0.25	0.30	0.35	0.20
15	0.60	0.45	0.40	0.50	0.50	0.35
20			0.50		0.65	0.45
25	0.75	0.55	0.55	0.65	0.85	0.60
30	0.95		0.60	0.75		0.70
40	1.10	0.80	0.70		1.00	0.80
50	1.35	0.90	0.80		1.20	
60	1.50	1.10	1.00	1.05	1.25	0.95
70	1.65	1.20	1.10	1.15		1.05
80	1.91	1.35	1.20	1.25	1.40	1.20
90	2.11	1.45	1.30	1.35	1.50	
100	2.26		1.45	1.45	1.70	1.35
120	2.66	1.91	1.70	1.65		1.50
150	3.26	2.26	2.11	1.96		1.86
180	3.81	2.71	2.46	2.31	2.51	
210	4.36	3.16	2.81		2.86	
240	4.86	3.56	3.16	2.96	3.16	
270	5.46	3.91	3.51	3.31		3.06
300	6.02	4.36	3.86			
360	7.12	5.16	4.56	4.21	4.26	3.91
420	8.17	5.92	5.26	4.81	5.11	4.66
480	9.18	6.72		5.41	5.77	5.26
540	10.23	7.42	6.57		6.37	5.92
600	11.28	8.22	7.22	6.67	7.02	6.52
Actividad, UL/g						
	21560	15851	13922	12491	12838	12497

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.42. Desactivación de la enzima Novozym 388 en condiciones similares a las de lavado (1000 rpm, 50°C). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=50°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.05$ g/L	
	Emulsificación: Ultrasonidos					
	Tiempo de conservación					
tiempo, s	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.05	0.10	0.10	0.10	0.05	0.10
10	0.25	0.25	0.25	0.20	0.15	0.20
15	0.50	0.40	0.40	0.35	0.20	0.35
20	0.55	0.55	0.55	0.45	0.30	0.45
25	0.65	0.60	0.60	0.60	0.40	0.55
30	0.70	0.65	0.65	0.65	0.55	
40	0.90	0.75	0.75	0.75		
50	1.15	0.00	0.85	0.85		
60	1.35	1.10	1.00		1.00	
70	1.50	1.20	1.10	1.10		
80	1.65	1.30		1.15	1.15	
90	1.86	1.45	1.30	1.30	1.20	
100		1.60	1.45			0.85
120		1.86	1.65	1.60	1.45	0.95
150	2.91	2.21	1.96	1.91		
180	3.36		2.31	2.16	1.96	1.25
210	3.91	2.91		2.41	2.21	
240	4.36	3.21	2.91	2.66	2.41	1.55
270	4.81	3.56	3.11	2.91		
300	5.21	3.81	3.36	3.16	2.86	
360				3.66		2.21
420	6.72	4.91	4.31		3.76	
480	7.37	5.47	4.81	4.46	4.16	2.76
540	8.02		5.21			
600		6.32	5.52	5.21	4.91	3.41
Actividad, UL/g						
	16151	11408	9821	9422	8953	6334

4.4.2. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función de la temperatura.

Las Tablas 4.43 a 4.46 muestran las curvas de valoración en función del tiempo de conservación de la enzima a temperaturas comprendidas entre 30 y 60°C, en ausencia de agitación.

Tabla 4.43. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 30°C en ausencia de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$		T = 30°C pH = 7.0 $e_{exp} = 0.01$ g/L				
		Emulsificación: UltraTurrax				
		Tiempo de conservación				
		0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.21	0.19	0.25	0.21	0.25	
10	0.35	0.33	0.37	0.35	0.37	
15	0.47	0.42		0.63	0.47	
20	0.58	0.58	0.53	0.58	0.55	
25		0.61	0.61	0.65	0.63	
30	0.77	0.79	0.68		0.74	
40	0.90	0.84		0.74	0.88	
50	1.11	1.08	1.05	0.95	1.05	
60	1.26	1.26	1.26	1.37	1.19	
70	1.49	1.37	1.37	1.29	1.32	
80	1.69	1.63	1.61	1.56	1.53	
90	1.86	1.63	1.76		1.66	
100	2.03	1.87	1.84	1.81	1.81	
120	2.42	2.13	2.27	1.95	2.11	
150	2.74	2.72	2.65	2.74		
180	3.46	3.16	3.11	3.06	3.03	
210	4.14	3.72	3.51	3.85	3.50	
240		4.23	3.97	4.37	4.11	
270	5.14	4.74	4.40	4.48	4.45	
300	5.48	5.08	4.99	4.95	5.00	
360	6.51	6.22	5.48	6.37		
420	7.81	7.32	6.88	7.14	6.74	
480	8.85	8.53	7.66	7.85	7.69	
540	10.19	9.14		9.01	9.01	
600	10.94	10.18	9.66	9.61	9.55	
		Actividad, UL/g				
	107430	95549	88846	87912	88800	
	101096	100188	98090	96552	93960	
	115257	104147	98427	100091	98076	

Tabla 4.44. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 40°C en ausencia de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Tiempo de conservación					
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.25	0.23	0.23	0.25	0.25	
10	0.37	0.37	0.39	0.35	0.37	
15			0.47			
20	0.65	0.60	0.58	0.56	0.53	
25	0.68	0.67	0.66	0.68	0.58	
30	0.74	0.68	0.79	0.68	0.68	
40	0.95	0.91	0.84	1.00	0.79	
50	1.18	1.13	1.05	1.16	0.97	
60	1.34	1.24	1.21	1.26	1.13	
70	1.53	1.53	1.37	1.37	1.25	
80	1.76	1.61	1.55			
90	1.92	1.82	1.69	1.79	1.53	
100	2.05	1.92	1.84	1.79	1.69	
120	2.42	2.16	2.16	1.95	2.00	
150	2.99	2.66	2.62		2.42	
180	3.48	3.21	3.11		2.95	
210	4.06	3.58	3.69	3.27	3.21	
240	4.64	4.25	4.16	3.93	3.66	
270	5.18	4.71	4.69	4.53	4.32	
300	5.72	5.16	5.04	5.06	4.74	
360	6.81	6.48	6.04	5.74	5.48	
420	7.85	7.22	6.90			
480	8.93	8.27	7.69	7.61	7.22	
540	10.06	8.85	8.53	8.62	7.90	
600	11.08	10.20	9.90	9.54	9.01	
	Actividad, UL/g					
	108333	100544	93060	87896	85577	
	109561	95783	98917	96521	90190	
	108309	103364	98699	96282	89222	

Tabla 4.45. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 50°C en ausencia de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Tiempo de conservación					
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.23	0.26	0.26	0.26	0.25	
10	0.39	0.37	0.37	0.37	0.39	
15	0.53	0.58	0.53		0.63	
20	0.68	0.63	0.63	0.63	0.63	
25	0.74	0.71		0.68	0.68	
30	0.83	0.83	0.79	0.82	0.76	
40		0.97	0.97	0.92	0.90	
50	1.21	1.18		1.08	1.08	
60	1.37	1.37		1.21	1.21	
70	1.58	1.50	1.53	1.32	1.34	
80	1.74	1.74	1.69	1.53	1.58	
90	1.90	1.90	1.84	1.71	1.70	
100	2.05	2.05	1.98	1.84	1.82	
120	2.40	2.32	2.30	2.25	2.21	
150	2.99	2.86	2.83	2.70	2.63	
180	3.69	3.37	3.34	3.27	3.03	
210	4.19	3.90	3.79	3.63	3.50	
240	4.58	4.48	4.21	4.20	4.00	
270	5.03	5.00	4.85	4.79	4.46	
300	5.37	5.46	5.35	5.27	4.95	
360	7.01	6.27	6.44	6.48	5.87	
420	7.38	7.51	7.45	7.27	6.80	
480	8.94	8.67	8.59	7.95	7.69	
540	9.77	9.59	9.40	9.08	8.64	
600	11.03	10.52	10.48	10.04	9.59	
	Actividad, UL/g					
	113579	103138	101603	102537	92452	
	109654	106849	103552	96707	94191	
	100496	99732	103976	96375	92773	

Tabla 4.46. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 60°C en ausencia de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T = 30°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Tiempo de conservación					
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.25	0.25	0.26	0.25	0.25	
10	0.37	0.37	0.37	0.37	0.40	
15	0.63	0.63	0.53	0.63		
20	0.68	0.63	0.56	0.55	0.58	
25	0.84	0.79	0.68	0.74	0.53	
30	0.91		0.68	0.84	0.63	
40	1.11	1.00		0.95	0.74	
50	1.24	1.19	0.92	0.97	1.00	
60	1.32	1.32		1.48	1.05	
70	1.48	1.45	1.42	1.69	1.16	
80	1.82	1.69	1.58	1.51		
90	2.00	1.76		1.48		
100	2.16	1.95	1.71	1.76		
120	2.58	2.28	2.00	1.84	1.90	
150	3.21	2.74	2.56	2.55	1.74	
180	3.66	3.16	3.06	3.08	2.00	
210	4.06	3.87	3.62	3.00	2.82	
240	4.76	4.21	3.98	4.00	2.95	
270	5.14	4.74	4.58	4.20	3.06	
300	5.90	5.14	4.93	4.62	3.63	
360	6.99	6.22		5.74	4.32	
420	8.09	7.20	6.69	7.64	4.95	
480	9.17	8.15		6.64	5.69	
540	10.22	9.11		9.69	6.36	
600	11.29	10.06	9.38	8.92	7.04	
	Actividad, UL/g					
	109275	102249	97244	103927	78146	
	117652	90927	91588	79454	66072	
	104471	102066	88059	76779	57133	

4.4.3. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función de la velocidad de agitación.

La Tabla 4.47 muestra las curvas de valoración en función del tiempo de permanencia de la enzima sometida a agitación a velocidades entre 300 y 900 rpm y a temperatura ambiente.

Tabla 4.47. Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función del tiempo de conservación a distintas velocidades de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

		T = 30°C				pH = 7.0				e _{exp} = 0.01 g/L			
		α _{exp} = 0.01				Emulsificación: UltraTurrax							
		300 rpm				500 rpm							
		0 min.	15 min.	45 min.	75 min.	0 min	15 min.	45 min.	75 min.				
t, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados				
5	0.23	0.21	0.21	0.16	0.23	0.26	0.16	0.26					
10	0.38	0.36	0.31	0.31	0.38	0.36	0.31	0.42					
15	0.57				0.57								
20		0.47	0.47	0.42									
25	0.68				0.68	0.52	0.42	0.42					
30	0.81	0.57			0.81								
40	0.91		0.57	0.52	0.91								
50	1.12	0.83			1.12	0.78							
60	1.25			0.68	1.25		0.68	0.52					
70	1.40		1.04		1.40	1.04							
80	1.66			0.83	1.66	1.09	0.88						
90	1.69				1.69			0.68					
100	1.87	1.51	1.25	0.88	1.87	1.30							
120	2.29	1.72			2.29		1.09	0.83					
150	2.81				2.81	1.92		0.99					
180	3.17	2.44			3.17	2.18		1.14					
210	3.71		2.44	1.77	3.71		1.77						
240	4.18		2.70		4.18	2.86							
270	4.76	3.54			4.76								
300	5.28	3.95		2.44	5.28		2.44	1.77					
360	6.08	4.68		2.91	6.08		2.91						
420	7.33	5.46			7.33	4.89	3.28	2.29					
480	8.32		5.25		8.32								
540	9.05	7.02	5.88		9.05		4.21						
600	9.98	7.75	6.60	4.68	9.98	6.86	4.73	3.33					
Actividad, UL/g													
	106059	75741	63456	43436	106059	66947	44210	31201					
	96916				96916								
	97774				97774								

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.47. – Continuación - Desactivación de la enzima Lipolase 100 en función del tiempo de conservación a distintas velocidades de agitación. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

T = 30°C		pH = 7.0				e _{exp} = 0.01 g/L			
α _{exp} = 0.01		700 rpm				900 rpm			
t, s	0 min.	15 min.	45 min.	75 min.	0 min.	15 min.	45 min.	75 min.	
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	
5	0.23	0.26	0.26	0.26	0.23	0.26	0.26	0.16	
10	0.38	0.42	0.42	0.36	0.38	0.42	0.36	0.31	
15	0.57			0.52	0.57				
20									
25	0.68				0.68				
30	0.81	0.62	0.47		0.81	0.52		0.42	
40	0.91		0.62	0.57	0.91		0.57		
50	1.12		0.78		1.12				
60	1.25	0.99		0.62	1.25	0.88	0.68	0.78	
70	1.40		0.99		1.40		0.83		
80	1.66			0.88	1.66				
90	1.69	1.20	1.25		1.69	1.14	0.94	0.83	
100	1.87				1.87				
120	2.29		1.61	1.09	2.29	1.35	1.20	1.14	
150	2.81	2.03			2.81				
180	3.17		2.39	1.46	3.17	1.92	1.66	1.51	
210	3.71				3.71				
240	4.18	3.07	3.17	1.87	4.18	2.50	2.08	1.98	
270	4.76		3.59		4.76		2.39	2.24	
300	5.28			2.29	5.28			2.50	
360	6.08	4.42			6.08	3.64			
420	7.33		5.51	3.07	7.33	4.16	3.64	3.43	
480	8.32	5.98	6.29	3.48	8.32		4.16	3.85	
540	9.05	6.71	7.12		9.05	5.46			
600	9.98	7.38		4.37	9.98	6.03	5.30	4.84	
	Actividad, UL/g								
	106059	72230	78841	39328	106059	57841	50165	46343	
	96916				96916				
	97774				97774				

4.4.4. Efecto de la glicina sobre la estabilidad de la enzima Lipolase 100.

En todos los experimentos destinados a estudiar la capacidad estabilizante de la glicina se empleó, en vez de tampón fosfato, una solución tampón de dicho aminoácido (0.1 M) para preparar la dilución del preparado enzimática comercial. La influencia que el empleo de dicho tampón tiene sobre la actividad enzimática se recoge en la Tabla 4.48.

Tabla 4.48 Influencia del tampón utilizado en la dilución de la enzima Lipolase 100 en su actividad. Se ha usado tributirina como sustrato.

T=30°C pH=7.0 e _{exp} =2.5 g/L		
α _{exp} =0.01 Emulsificación: UltraTurrax		
Solución tampón		
	Fosfato (0.5 mM)	Glicina (0.1 M)
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados
5	0.13	0.12
10	0.32	0.26
15	0.51	0.31
20	0.56	0.38
25	0.66	0.50
30	0.74	0.58
40	0.90	0.78
50	1.12	0.94
60	1.22	1.14
70	1.46	1.31
80	1.57	1.52
90	1.75	1.69
100	1.92	1.85
120	2.25	2.23
150	2.70	2.84
180	3.23	3.39
210	3.74	3.93
240	4.18	4.45
270	4.71	5.04
300	5.20	5.64
360	6.12	6.70
420	7.21	7.83
480	8.17	8.92
540	9.00	9.82
600	10.36	11.21
Actividad, UL/g		
	93212	115791
	95015	113096
	103404	107465
	94262	107322
	100899	106653
	100217	109066
	99275	105890
	101164	113289
	104139	108829
		116174

RESULTADOS EXPERIMENTALES

En las Tablas 4.49 y 4.50 se recogen las curvas de hidrólisis obtenidas en función del tiempo de conservación de la enzima a 50 y 60°C respectivamente y usando tampón de glicina en la preparación y conservación de la enzima.

Tabla 4.49. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 50°C sin agitación y en presencia de glicina (0.1 M). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$					
T = 30°C pH = 7.0 $e_{exp} = 0.01$ g/L					
Emulsificación: UltraTurrax					
Tiempo de conservación					
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.05	0.08	0.15	0.10	0.05
10	0.23	0.21	0.33	0.28	0.15
15	0.36	0.36		0.26	0.26
20	0.36	0.41	0.46	0.39	0.36
25	0.51	0.46	0.57	0.46	0.44
30	0.62	0.59	0.72	0.57	0.67
40	0.77	0.75	0.88	0.77	0.67
50	0.93	0.95	0.98	0.93	0.95
60	1.16	1.08	1.24	1.11	1.13
70	1.39	1.31	1.42	1.24	1.34
80	1.57	1.52	1.54	1.49	1.54
90	1.70	1.60	1.75	1.65	1.75
100	1.91	1.91	1.91	1.85	1.96
120	2.27	2.19	2.29	2.24	2.34
150	2.81	2.81	2.88	2.78	2.99
180	3.40	3.30	3.42	3.30	3.60
210	3.94	3.89	3.99	3.84	4.20
240	4.48	4.40	4.58	4.38	4.79
270	5.07	4.99	5.17	4.94	5.43
300	5.64	5.51	5.66	5.48	6.05
360	6.72	6.59	6.85	6.59	7.21
420	7.75	7.83	7.90	7.62	8.39
480	8.86	8.70	8.99	8.55	9.63
540	9.96	10.04	10.07	9.58	10.81
600					
Actividad, UL/g					
	105890	106469	111769	109929	114421
	113289	112071	110547	107139	127466

Tabla 4.50. Desactivación de la enzima Lipolase 100 a 60°C sin agitación y en presencia de glicina (0.1 M). La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp} = 0.01$					
T = 30°C		pH = 7.0		$e_{exp} = 0.01$ g/L	
Emulsificación: UltraTurrax					
Tiempo de conservación					
	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.19	0.22	0.24	0.15	0.22
10	0.33	0.34	0.33	0.29	0.27
15	0.45	0.43	0.41	0.43	0.38
20	0.62	0.55	0.50	0.53	0.48
25	0.65	0.64	0.60	0.58	0.55
30	0.76	0.74	0.69	0.72	0.65
40	0.94	0.94	0.86	0.88	0.81
50	1.20	1.17	1.08	1.08	1.00
60	1.39	1.34	1.25	1.25	1.13
70	1.58	1.51	1.42	1.41	1.32
80	1.82	1.77	1.66	1.61	1.53
90	2.01	1.92	1.80	1.77	1.70
100	2.21	2.09	1.99	1.92	1.82
120	2.64	2.54	2.37	2.28	2.18
150	3.26	3.09	2.92	2.80	2.71
180	3.91	3.69	3.50	3.28	3.24
210	4.53	4.29	4.03	3.79	3.72
240	5.15	4.89	4.60	4.33	4.24
270	5.82	5.46	5.17	4.84	4.79
300	6.42	6.08	5.75	5.39	5.29
360	7.64	7.24	6.87	6.40	6.32
420	8.89	8.39	7.96	7.45	7.36
480	10.09	9.58	9.05	8.50	8.39
540	11.29	10.69	10.14	9.51	9.39
600					
Actividad, UL/g					
	121483	115695	117760	107498	109884
	130255	111586	109110	99618	108745
	123179	125638	107430	96168	88832

La Tabla 4.51 presenta las curvas de hidrólisis obtenidas tras someter durante 1.5 horas a la enzima Lipolase 100 disuelta en tampón glicina (0.01 g/L) a agitación a distintas velocidades.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.51. Desactivación de la enzima Lipolase 100 (solución 0.01 g/L) a distintas velocidades de agitación y temperatura ambiente en presencia de glicina. La actividad se ha determinado utilizando tributirina como sustrato.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}=0.01$ g/L	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Velocidad de agitación					
	0 rpm	400 rpm	750 rpm	900 rpm	1000 rpm	1200 rpm
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.10	0.10	0.10	0.14	0.10	0.10
10	0.20	0.28	0.23	0.22	0.26	0.14
15	0.29	0.36	0.29		0.15	0.24
20	0.41	0.41	0.41	0.26	0.23	0.24
25	0.46	0.56	0.48	0.34	0.41	0.29
30	0.56	0.60	0.58	0.41	0.41	0.36
40	0.77	0.82	0.74	0.53	0.54	0.43
50	0.92	1.00	0.95	0.64	0.66	
60	1.09	1.19	1.14	0.74	0.87	0.63
70	1.24	1.35	1.28	0.87	0.95	0.72
80	1.43	1.57	1.51	0.98	1.09	0.82
90	1.62	1.77	1.74	1.11	1.25	0.91
100	1.76	1.96	1.84	1.23	1.38	1.06
120	2.15	2.33	2.22	1.46	1.62	1.25
150	2.73	2.90	2.76	1.85	2.06	1.51
180	3.22	3.46	3.32	2.16	2.47	1.78
210	3.76	4.05	3.91	2.55	2.86	2.12
240	4.29	4.62	4.46	2.98	3.34	2.45
270	4.85	5.16	5.01	3.32	3.75	2.74
300	5.42	5.72	5.57	3.70	4.21	3.08
360	6.47	6.86	6.64	4.47	5.08	3.70
420	7.51	7.95	7.77	5.24	5.98	4.33
480	8.56	9.04	8.86	6.06	6.83	4.98
540	9.59	10.15	9.95	6.81	7.72	5.68
600					8.74	
Actividad, UL/g						
	107322	110425	111045	76893	86168	63984
	105630	109741	110583	75510	86400	63418
	107408	116706	110132	77477	90085	62317

4.5. ENSAYOS DE LAVADO

Para conocer la eficacia de la enzima Lipolase 100 en el lavado de superficies duras se efectuaron con ella ensayos de lavado en el dispositivo Baño-Sustrato-Flujo (Jurado-Alameda et al., 2003), empleando tributirina coloreada como suciedad y distintas soluciones de limpieza. En todos los ensayos se determinó la cantidad de tributirina eliminada del sustrato y arrastrada al baño de lavado mediante el método espectrofotométrico descrito en el apartado 3.9.4, a partir de lo cual se calcula la detergencia (ecuación III.4) en función del tiempo. Al final del ensayo (20 min) se extrajo la suciedad aún presente en el relleno, lo que permite calcular un valor final de detergencia basado en el sustrato (ecuación III.5).

En primer lugar se llevó a cabo un experimento control con tampón fosfato como solución de limpieza, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4.52. Los resultados que se presentan son la media de las 2 réplicas realizadas, indicándose también la desviación estándar (desv. est.).

Tabla 4.52. Ensayo de lavado con tampón fosfato como solución de limpieza (ensayo control).

Detergencia basada en el baño de lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
0.0	0.0327	-0.026	-0.37	0.90
0.5	0.1375	1.997	29.33	13.14
1.0	0.1728	2.662	39.09	17.23
1.5	0.1387	2.002	29.39	13.25
2.0	0.2128	3.209	47.40	4.83
3.0	0.2185	3.204	47.48	18.51
5.0	0.1601	2.254	33.29	2.42
7.0	0.1836	2.581	38.25	14.16
10.0	0.1318	1.709	25.27	5.21
15.0	0.1267	1.695	24.93	7.43
20.0	0.1368	1.921	28.17	15.74
Detergencia basada en el sustrato (relleno) al final del lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
20.0	0.8418	0.740	89.05	2.20

masa inicial de suciedad depositada en el relleno: 6.7766 g

También se realizó un ensayo de lavado con una solución del tensioactivo aniónico ácido dodecibencenosulfónico lineal (sal sódica), conocido comúnmente como LAS, de 0.1 g/L de concentración, cuyos resultados se recogen en la Tabla 4.53.

Tabla 4.53. Ensayo de lavado con el tensioactivo LAS (0.1 g/L) como solución de limpieza.

Detergencia basada en el baño de lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
0.0	0.0390	-0.116	-1.70	1.30
0.5	0.2185	5.290	77.39	6.01
1.0	0.2483	6.229	91.13	18.08
1.5	0.2404	5.939	86.89	8.12
2.0	0.2421	5.956	87.14	3.41
3.0	0.2307	5.623	82.27	5.24
5.0	0.2506	6.231	91.17	10.43
7.0	0.2610	6.455	94.44	3.99
10.0	0.2667	6.625	96.94	3.06
15.0	0.2547	6.329	92.60	7.75
20.0	0.2533	6.286	91.97	8.08
Detergencia basada en el sustrato (relleno) al final del lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
20.0	0.1316	0.074	98.92	0.04

masa inicial de suciedad depositada en el relleno: 6.8347 g

Finalmente se usaron disoluciones de la enzima Lipolase 100 (0.1 g/L) y de Lipolase 100 (0.1 g/L) y LAS (0.1 g/L) como agentes limpiadores. Los resultados de dichos ensayos se muestran en las Tablas 4.54 y 4.55.

Tabla 4.54. Ensayo de lavado con la enzima Lipolase 100 (0.1 g/L) como solución de limpieza.

Detergencia basada en el baño de lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
0.0	0.0332	-0.034	-0.49	0.19
0.5	0.2522	4.621	67.29	6.39
1.0	0.3247	6.144	89.48	21.13
1.5	0.2444	4.439	64.65	14.83
2.0	0.2293	4.110	59.86	12.55
3.0	0.2548	4.636	67.51	4.69
5.0	0.2523	4.571	66.56	11.44
7.0	0.2671	4.871	70.93	11.96
10.0	0.2638	4.791	69.77	9.63
15.0	0.2671	4.849	70.62	25.09
20.0	0.2968	5.456	79.43	7.33
Detergencia basada en el sustrato (relleno) al final del lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
20.0	0.4971	0.423	93.84	0.85

masa inicial de suciedad depositada en el relleno: 6.8679 g

Tabla 4.55. Ensayo de lavado con la enzima Lipolase 100 (0.1 g/L) y el tensioactivo LAS (0.1 g/L) como solución de limpieza.

Detergencia basada en el baño de lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
0.0	0.0389	0.099	-1.66	1.47
0.5	0.2458	5.521	77.60	1.63
1.0	0.2759	6.267	88.78	2.60
1.5	0.2781	6.235	88.66	8.33
2.0	0.2724	6.128	87.39	2.01
3.0	0.2722	6.076	86.96	3.79
5.0	0.2844	6.324	91.00	7.12
7.0	0.2791	6.255	90.24	1.25
10.0	0.2761	6.085	88.44	2.55
15.0	0.2832	6.286	91.71	1.68
20.0	0.2809	6.214	90.93	2.78
Detergencia basada en el sustrato (relleno) al final del lavado				
tiempo, min.	Absorbancia	m _{tribut.} (g)	De, %	desv. est.
20.0	0.1126	0.062	99.10	0.02

masa inicial de suciedad depositada en el relleno: 6.8349 g

4.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA CON LIPOLASE 100.

Para estudiar la cinética de la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsión O/W, se han realizado experimentos con la enzima Lipolase 100 modificando la concentración de enzima y de sustrato así como la temperatura. Se ha estudiado también la influencia de ciertos tensioactivos en el mecanismo de acción enzimática fijando para ello varias concentraciones de los mismos en el medio de reacción. En todos los casos la hidrólisis se ha seguido mediante la técnica del pHstato durante 20 minutos.

La reacción se inicia añadiendo 1 mL de solución enzimática, de concentración e_{exp} , sobre 15 mL de emulsión de fracción volumétrica α_{exp} .

A continuación se recogen los resultados de los distintos experimentos, en concreto las curvas de valoración promedio. Las velocidades iniciales de reacción, calculadas tal y como se detalla en el apartado 3.10.3.5, se incluyen al final de cada tabla. En el apartado 4.7.1 se analiza la influencia de la goma arábiga, utilizada en la preparación de la emulsión, en la velocidad de reacción. Los resultados de los experimentos cinéticos realizados a 30°C y en los que se analiza la influencia de la concentración de enzima, sustrato y la presencia de tensioactivos se muestran en el apartado 4.7.2. En los apartados 4.7.3, 4.7.4 y 4.7.5 se recogen los resultados de los experimentos de hidrólisis a 40, 50 y 60°C

4.6.1. Influencia de la goma arábica en la hidrólisis de tributirina con Lipolase 100.

La goma arábica ha sido utilizada para estabilizar las emulsiones de tributirina utilizadas en los experimentos cinéticos de hidrólisis. Por ello se ha estudiado su influencia en la hidrólisis, utilizando para ello emulsiones preparadas en ausencia de goma arábica. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.56.

Tabla 4.56 Influencia de la goma arábica en la hidrólisis de tributirina con Lipolase 100.

T=30°C pH=7.0 e _{exp} =1.0 g/L		
α _{exp} =0.01 Emulsificación: UltraTurrax		
Cantidad de Goma Arábica		
	0.1 g/mL de tributirina	Sin goma arábica
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados
5	9.81	2.97
10	35.63	7.91
15	68.31	15.82
20	97.07	22.42
25	123.87	30.33
30	149.04	37.25
40	191.21	53.41
50	228.14	67.42
60	272.26	85.05
70	307.89	103.60
80	350.05	124.61
90	357.90	139.70
100	366.23	156.26
120	402.02	155.27
150	422.61	183.21
180	413.30	195.57
210	424.57	218.07
240	440.26	219.06
270	449.09	243.29
300	418.69	235.38
360	476.54	244.53
420		275.44
480	504.00	
540		292.74
600		251.21
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)		
	1.059·10 ⁻⁴	2.839·10 ⁻⁵
	1.042·10 ⁻⁴	2.115·10 ⁻⁵
	1.085·10 ⁻⁴	2.459·10 ⁻⁵

4.6.2. Experimentos de hidrólisis a 30°C.

4.6.2.1. Influencia de la concentración de enzima en la velocidad de hidrólisis

Se realizaron experimentos a tres fracciones volumétricas (α_{exp}) de tributirina, 0.01, 0.02 y 0.05, modificando la concentración de enzima (e_{exp}). Los resultados se incluyen en las Tablas 4.57 a 4.59.

Tabla 4.57. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 a 30°C

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C				pH=7.0		
	Emulsificación: UltraTurrax						
	Concentración de enzima (e_{exp})						
	0.01 g/L	0.05 g/L	0.10 g/L	0.30 g/L	0.50 g/L	1.0 g/L	1.3 g/L
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.05	0.52	1.05	2.94	3.92	9.81	12.09
20	0.00	1.71	3.85	11.77	17.98	35.63	43.14
40	0.70	3.81	7.74	21.90	35.63	68.31	84.65
60	1.00	5.62	11.65	33.99	52.62	97.07	120.93
80	1.18	7.40	15.71	44.45	67.98	123.87	148.06
100	1.34	9.29	19.42	54.26	82.69	149.04	176.99
140	1.89	12.87	26.70	72.89	110.15	191.21	220.29
180	2.34	16.35	33.73	90.86	135.97	228.14	254.29
240	3.18	21.33	44.03	116.36	170.94	272.26	292.20
300	4.05	26.62	54.06	139.24	203.63	307.89	323.09
360	4.83	31.57	63.75	161.14	234.35	350.05	
420	5.92	36.30	73.15	181.73	262.78	357.90	352.01
480	6.07	41.24	82.21	199.54	289.59	366.23	370.97
540	7.03	46.04	91.08	217.68	317.69	402.02	
600	7.79	50.65	99.78	236.96	339.27	422.61	381.43
660	8.56	55.17	108.38	253.47	355.94	413.30	388.29
720	9.29	59.63	116.68	268.67	367.21	424.57	400.06
780	10.07	64.24	124.71	286.32	387.31	440.26	409.87
840	10.45	68.47	132.58	302.50	410.85	449.09	414.28
900	11.17	72.87	140.38	309.20	406.27	418.69	414.77
960	12.26	77.28	148.42	320.31	413.79	476.54	418.69
1020	12.98	81.61	156.19		412.81		413.79
1080	13.88	85.79	163.63	347.11	417.22	504.00	
1140	14.00	90.15	170.08		447.13		430.95
1180	14.73	93.55	181.19				439.28
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)							
	$9.328 \cdot 10^{-7}$	$5.902 \cdot 10^{-6}$	$1.332 \cdot 10^{-5}$	$3.560 \cdot 10^{-5}$	$6.041 \cdot 10^{-5}$	$1.059 \cdot 10^{-4}$	$1.385 \cdot 10^{-4}$
	$8.706 \cdot 10^{-7}$	$5.501 \cdot 10^{-6}$	$1.248 \cdot 10^{-5}$	$3.765 \cdot 10^{-5}$	$6.128 \cdot 10^{-5}$	$1.042 \cdot 10^{-4}$	$1.357 \cdot 10^{-4}$
	$8.181 \cdot 10^{-7}$	$5.908 \cdot 10^{-6}$	$1.207 \cdot 10^{-5}$	$3.529 \cdot 10^{-5}$	$5.559 \cdot 10^{-5}$	$1.085 \cdot 10^{-4}$	$1.385 \cdot 10^{-4}$

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.57. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 a 30°C – Continuación.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0			pH=7.0		
	Emulsificación: UltraTurrax							
	Concentración de enzima (e_{exp})							
tiempo, s	2.0 g/L	3.0 g/L	5.0 g/L	10.0 g/L	15.0 g/L	20.0 g/L	25.0 g/L	
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	
5	16.02	8.17	10.20	24.23	35.60	40.71	47.31	
20	63.41	72.23	108.72	116.21	133.84	144.72	132.77	
40	121.91	143.81	201.15	168.95	200.77	219.31	214.45	
60	164.40	197.74	263.99	216.84	247.41	258.62	260.60	
80	203.95	240.23	303.79	251.04	277.58	291.01	291.43	
100	235.66	265.73	338.00	283.35	300.00	304.12	313.02	
140	285.01	311.81	378.63	312.03	333.95	347.30	348.79	
180	319.98	335.34	406.26	336.75	356.70	359.01	370.55	
240	356.92	366.23	437.43	371.62	380.02	397.83	391.81	
300	382.41	0.00	448.86	378.05	390.16	405.98	395.60	
360	399.73	409.87	459.71	389.42	403.68	416.20	412.41	
420	411.50	401.04	472.46	397.41	411.75	429.72		
480	420.65	422.12	474.84		421.07	425.02		
540	427.52		494.91	419.58	426.75	447.52	446.53	
600	433.40	424.57	478.63	415.13	426.26	441.09	450.98	
660	438.96	430.46	492.94	419.34	436.15	451.48	438.62	
720	443.20		497.38		435.16		443.07	
780	447.13			407.96	438.37	448.02	450.00	
840	450.72		492.94		449.50	468.79	455.43	
900	454.32	451.05	495.90		445.05	449.01		
960	457.59	455.95		447.77	453.95	475.21	462.85	
1020	460.53		526.00	459.89	453.46	472.99		
1080	463.47		513.00	462.85	454.94		479.67	
1140	466.08	468.70	507.74		457.91	467.06	476.70	
1180		502.04	517.44				475.21	
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)								
	$2.017 \cdot 10^{-4}$	$2.586 \cdot 10^{-4}$	$4.052 \cdot 10^{-4}$	$4.564 \cdot 10^{-4}$	$4.821 \cdot 10^{-4}$	$5.481 \cdot 10^{-4}$	$5.325 \cdot 10^{-4}$	
	$1.961 \cdot 10^{-4}$	$2.721 \cdot 10^{-4}$	$3.769 \cdot 10^{-4}$	$4.172 \cdot 10^{-4}$	$4.080 \cdot 10^{-4}$	$4.914 \cdot 10^{-4}$	$5.089 \cdot 10^{-4}$	
	$2.022 \cdot 10^{-4}$	$2.746 \cdot 10^{-4}$	$4.324 \cdot 10^{-4}$	$4.378 \cdot 10^{-4}$	$4.049 \cdot 10^{-4}$	$4.945 \cdot 10^{-4}$	$4.512 \cdot 10^{-4}$	

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.58. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.02$) con la enzima Lipolase 100 a 30°C.

		T=30°C				pH=7.0			
		$\alpha_{exp}=0.02$							
		Emulsificación: UltraTurrax							
		Concentración de enzima (e_{exp})							
		0.05 g/L	0.50 g/L	2.0 g/L	3.0 g/L	5.0 g/L	7.0 g/L	8.0 g/L	10.0 g/L
t, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.66	2.47	10.36	12.17	16.28	26.65	37.50	29.11	
20	1.97	18.01	57.98	93.59	127.30	166.29	198.19	219.74	
40	4.03	34.54	117.93	183.56	247.87	313.16	361.19	381.26	
60	5.52	51.81	173.69	255.27	343.43	413.99	464.15	487.34	
80	7.52	68.34	217.60	318.43	417.94	499.68	547.71	564.98	
100	9.21	83.64	263.00	376.16	485.54	563.33	602.64	619.75	
140	12.83	112.75	342.93	478.46	583.23	656.92	689.98	698.70	
180	16.23	139.89	419.17	562.51	652.15	724.36	749.19	753.30	
240	21.10	178.62	519.34	658.89	724.60	815.89	810.54	807.74	
300	26.03	212.92	606.18	731.92	773.20	833.57	850.67	845.57	
360	30.93	246.22	684.14	783.07	808.73	865.48	881.51	854.37	
420	35.76	278.54	743.60	822.71	849.93	890.48	908.08	897.22	
480	40.29	309.87	793.68	852.65	845.25	910.38	928.14	915.48	
540	44.88	339.73	832.91	878.14	862.52	896.32	942.94	909.88	
600	49.65	368.10	864.00	909.88	893.27	909.88	957.75	944.59	
660	53.88	396.47	893.60	914.82	921.73	965.15	972.06	934.80	
720	58.57	424.10	908.16	929.46	919.01	1002.90	983.57	452.72	
780	63.04	451.00	931.10	945.91	927.65	1012.77	992.53	954.79	
840	67.38	475.67	939.98	952.07	921.23	906.92	1002.65	984.56	
900	71.65	501.57	959.23	964.33	947.88	991.63	1011.20	982.91	
960	76.08	525.01	970.58	972.06	954.95	966.63	1018.93	1030.53	
1020	79.62	548.45	967.12	980.94	962.35	1071.24	1025.84	1048.54	
1080	84.38	571.15	982.91	988.59	970.08	1051.25	1032.91	1013.01	
1140	88.41	593.10		980.94	975.51	1057.17	1039.33	1009.06	
1180	91.22	606.67	1003.64	1000.43	979.46	1034.72	1043.11	1012.77	
		Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)							
	$5.585 \cdot 10^{-6}$	$5.705 \cdot 10^{-5}$	$2.190 \cdot 10^{-4}$	$2.886 \cdot 10^{-4}$	$4.118 \cdot 10^{-4}$	$5.952 \cdot 10^{-4}$	$6.575 \cdot 10^{-4}$	$8.481 \cdot 10^{-4}$	
	$5.679 \cdot 10^{-6}$	$5.596 \cdot 10^{-5}$	$2.081 \cdot 10^{-4}$	$2.943 \cdot 10^{-4}$	$4.067 \cdot 10^{-4}$	$6.051 \cdot 10^{-4}$	$7.340 \cdot 10^{-4}$	$8.327 \cdot 10^{-4}$	
	$5.732 \cdot 10^{-6}$			$3.073 \cdot 10^{-4}$	$4.509 \cdot 10^{-4}$	$6.871 \cdot 10^{-4}$	$7.957 \cdot 10^{-4}$	$8.666 \cdot 10^{-4}$	

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.59. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.05$) con la enzima Lipolase 100 a 30°C.

$\alpha_{exp}=0.05$	T=30°C			pH=7.0		
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Concentración de enzima (e_{exp})					
	0.05 g/L	0.50 g/L	5.0 g/L	10.0 g/L	12.5 g/L	15.0 g/L
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.31	3.62	30.90	66.55	86.92	94.39
20	2.31	18.09	156.87	295.40	351.09	388.78
40	4.03	41.69	290.99	525.27	621.36	688.25
60	6.18	57.24	414.24	731.38	852.25	946.31
80	7.96	78.95	520.52	910.32	1052.24	1162.94
100	9.67	92.76	625.44	1061.75	1219.30	1345.61
140	13.61	127.63	803.02	1345.95	1503.84	1638.30
180	17.46	159.38	966.34	1585.67	1717.07	1869.19
240	22.72	203.29	1185.01	1864.43	1956.79	2108.56
300	28.18	243.75	1389.07	2065.44	2129.28	2276.98
360	33.24	283.72	1566.65	2215.86	2256.27	2409.06
420	38.42	319.08	1727.26	2330.63	2358.81	2511.60
480	43.53	356.59	1870.20	2424.34	2441.66	2595.81
540	48.50	393.26	1990.06	2499.38	2511.26	2664.06
600	53.22	423.86	2090.23	2563.55	2569.66	2724.16
660	59.26	464.56	2176.47	2619.24	2618.56	2774.41
720	63.63	493.10	2251.51	2667.11	2662.70	2818.21
780	68.44	518.59	2314.67	2707.52	2701.07	2857.26
840	73.73	553.96	2370.01	2745.89	2735.36	2892.23
900	78.11	583.97	2418.23	2747.25	2765.58	2923.13
960	82.71	611.36	2460.67	2872.54	2794.10	2951.31
1020	87.53	639.32	2499.72	2803.78	2727.38	3060.98
1080	92.00	665.47	2534.35	2860.31	2823.64	3000.20
1140	96.80	692.94	2663.21	2947.92	2865.07	3021.94
1180	99.71	702.15	2719.74	2897.32	3067.09	3035.18
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)						
	$5.942 \cdot 10^{-6}$	$5.950 \cdot 10^{-5}$	$4.461 \cdot 10^{-4}$	$9.257 \cdot 10^{-4}$	$1.152 \cdot 10^{-3}$	$1.388 \cdot 10^{-3}$
	$6.017 \cdot 10^{-6}$	$6.160 \cdot 10^{-5}$	$4.743 \cdot 10^{-4}$	$9.435 \cdot 10^{-4}$	$1.229 \cdot 10^{-3}$	$1.356 \cdot 10^{-3}$
	$5.784 \cdot 10^{-6}$	$6.011 \cdot 10^{-5}$	$4.620 \cdot 10^{-4}$	$1.001 \cdot 10^{-3}$	$1.133 \cdot 10^{-3}$	$1.331 \cdot 10^{-3}$

4.6.2.2. Influencia de la concentración de sustrato en la velocidad de hidrólisis

En la Tabla 4.60 se incluyen los resultados obtenidos a una concentración de enzima (e_{exp}) constante de 5.0 g/L y varias fracciones volumétricas de tributirina.

Tabla 4.60. Influencia de la fracción volumétrica de tributirina en la hidrólisis enzimática de la misma mediante la enzima Lipolase 100 a 30°C.

		T=30°C				pH=7.0		
		Emulsificación: UltraTurrax						
		Fracción volumétrica de tributirina (α_{exp})						
		0.0025	0.0050	0.0075	0.01	0.02	0.03	0.05
tiempo, s		μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5		5.49	8.77	21.30	10.20	16.28	36.33	30.90
20		37.08	62.20	92.81	108.72	127.30	174.19	156.87
40		64.54	106.85	157.81	201.15	247.87	297.10	290.99
60		80.92	130.80	197.33	263.99	343.43	406.43	414.24
80		91.22	147.37	218.47	303.79	417.94	510.33	520.52
100		98.79	158.94	237.70	338.00	485.54	599.29	625.44
140		108.02	174.28	261.21	378.63	583.23	751.07	803.02
180		114.13	184.09	277.54	406.26	652.15	883.15	966.34
240		120.04	194.40	297.14	437.43	724.60	1029.83	1185.01
300		123.86	201.25	308.65	448.86	773.20	1141.88	1389.07
360		127.48	206.29	316.87	459.71	808.73	1218.28	1566.65
420		130.08	209.02	325.18	472.46	849.93	1280.08	1727.26
480		132.23	209.99	328.60	474.84	845.25	1327.95	1870.20
540		135.02	216.53	332.74	494.91	862.52	1367.34	1990.06
600		137.17	215.16	336.59	478.63	893.27	1401.30	2090.23
660		138.73	221.59	341.65	492.94	921.73	1429.48	2176.47
720		138.78	223.45	344.47	497.38	919.01	1556.98	2251.51
780		138.53	230.37	345.76		927.65	1474.98	2314.67
840		143.02	232.27	348.36	492.94	921.23	1494.33	2370.01
900		144.19	229.95	350.76	495.90	947.88	1511.65	2418.23
960		143.89	231.64	353.03		954.95	1526.59	2460.67
1020		145.55	233.29	355.20	526.00	962.35	1471.92	2499.72
1080		147.21	234.85	357.20	513.00	970.08	1554.09	2534.35
1140		146.66	228.42	359.28	507.74	975.51	1494.84	2663.21
1180		146.48	237.94	360.49	517.44	979.46	1501.97	2719.74
		Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)						
		$1.511 \cdot 10^{-4}$	$2.175 \cdot 10^{-4}$	$3.021 \cdot 10^{-4}$	$4.052 \cdot 10^{-4}$	$4.118 \cdot 10^{-4}$	$5.060 \cdot 10^{-4}$	$4.461 \cdot 10^{-4}$
		$1.432 \cdot 10^{-4}$	$2.358 \cdot 10^{-4}$	$3.078 \cdot 10^{-4}$	$3.769 \cdot 10^{-4}$	$4.067 \cdot 10^{-4}$	$4.889 \cdot 10^{-4}$	$4.743 \cdot 10^{-4}$
		$1.266 \cdot 10^{-4}$	$2.091 \cdot 10^{-4}$	$3.070 \cdot 10^{-4}$	$4.324 \cdot 10^{-4}$	$4.509 \cdot 10^{-4}$	$5.106 \cdot 10^{-4}$	$4.620 \cdot 10^{-4}$

4.6.2.3. Influencia de la concentración de tensioactivo en la velocidad de hidrólisis

Se han empleado tres tensioactivos no iónicos (Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 y Glucopton 650) y uno aniónico (LAS). Para realizar los experimentos se ha fijado la concentración de enzima y la fracción volumétrica de tributirina, modificándose la concentración de tensioactivo en la emulsión. Los resultados correspondientes al Findet 1214N/23 no se incluyen al no registrarse actividad lipásica en su presencia. El resto de resultados se presentan en las Tablas 4.61 a 4.63.

Tabla 4.61. Influencia del tensioactivo Findet 1214N/16 en la hidrólisis enzimática de tributirina con la enzima Lipolase 100.

T=30°C pH=7.0 e _{exp} =1.0 g/L					
α _{exp} =0.01 Emulsificación: UltraTurrax					
Concentración de tensioactivo en la emulsión					
	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	9.81	10.63		0.79	0.10
20	35.63	35.44	11.87		
40	68.31	61.32	21.76	2.36	
60	97.07	87.69		2.80	
80	123.87	110.77	45.66	4.13	
100	149.04	128.32	56.70	3.21	
140	191.21	163.68	79.94	7.86	
180	228.14	188.90	101.21	9.63	1.28
240	272.26	219.06	140.93	13.81	
300	307.89	244.04	150.58	15.92	
360	350.05	253.68	179.34	18.08	2.46
420	357.90	272.72	193.35	23.75	
480	366.23	284.58	217.58	25.70	
540	402.02	296.70	234.06	32.92	
600	422.61	309.31	242.80	37.84	
660	413.30	312.03	263.24	43.41	4.62
720	424.57	324.39	276.26	49.53	
780	440.26		287.96	56.05	5.21
840	449.09	332.55		63.10	
900	418.69	340.38	309.89	70.73	6.09
960	476.54	350.11	319.94	79.28	6.58
1020		349.61	327.11	88.32	5.80
1080	504.00	360.49	320.44	97.56	
1140		365.44	347.63	107.45	7.76
1180			353.73	114.53	
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)					
	1.059·10 ⁻⁴	9.684·10 ⁻⁵	3.190·10 ⁻⁵	2.980·10 ⁻⁶	4.142·10 ⁻⁷
	1.042·10 ⁻⁴	9.978·10 ⁻⁵	3.070·10 ⁻⁵	3.477·10 ⁻⁶	3.798·10 ⁻⁷
	1.085·10 ⁻⁴	9.714·10 ⁻⁵	2.998·10 ⁻⁵	2.207·10 ⁻⁶	2.942·10 ⁻⁷

Tabla 4.62. Influencia del tensioactivo GlucoPON 650 en la hidrólisis enzimática de tributirina con la enzima Lipolase 100.

$T=30^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}=7.0$ $e_{\text{exp}}=1.0 \text{ g/L}$ $\alpha_{\text{exp}}=0.01$ Emulsificación: UltraTurrax					
Concentración de tensioactivo en la emulsión					
tiempo, s	0 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	9.81	3.96	4.78	1.98	0.99
20	35.63	28.19	18.46		
40	68.31	57.69	37.25		
60	97.07	83.82	56.37	4.45	
80	123.87	105.82	73.35		
100	149.04	125.44	87.86	6.68	
140	191.21	106.98	115.38		8.90
180	228.14	191.12	137.80		11.87
240	272.26	222.20	163.84	15.82	
300	307.89	243.79	201.76	21.26	
360	350.05	266.37	201.10		21.76
420	357.90	280.22	214.61	29.42	
480	366.23	290.77	244.28	33.13	
540	402.02	305.60	235.38	38.08	
600	422.61	309.06	234.15	45.99	
660	413.30	320.93	250.88	51.43	37.58
720	424.57	327.11	276.43	56.87	26.70
780	440.26	321.67	265.79		
840	449.09	332.47	275.19		
900	418.69	349.12	268.02		
960	476.54		284.34	78.63	
1020			284.58	86.54	
1080	504.00	348.29	272.96		
1140			292.25	95.93	
1180			291.76	104.83	51.92
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)					
	$1.059 \cdot 10^{-4}$	$9.809 \cdot 10^{-5}$	$6.975 \cdot 10^{-5}$	$3.675 \cdot 10^{-6}$	$3.437 \cdot 10^{-6}$
	$1.042 \cdot 10^{-4}$	$1.003 \cdot 10^{-4}$	$5.953 \cdot 10^{-5}$	$3.670 \cdot 10^{-6}$	$1.973 \cdot 10^{-6}$
	$1.085 \cdot 10^{-4}$	$9.776 \cdot 10^{-5}$	$5.635 \cdot 10^{-5}$		

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.63. Influencia del tensioactivo LAS en la hidrólisis enzimática de tributirina con la enzima Lipolase 100.

$\alpha_{exp}=0.01$	T=30°C		pH=7.0		$e_{exp}= 1.0 \text{ g/L}$	
	Emulsificación: UltraTurrax					
	Concentración de tensioactivo en la emulsión					
	0 mg/L	20 mg/L	50 mg/L	100 mg/L	200 mg/L	500 mg/L
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	9.81	5.93	7.58	8.24	8.24	7.75
20	35.63	24.07	22.09	29.83	29.51	26.21
40	68.31	50.93	39.97	53.41	50.11	45.66
60	97.07	78.96	59.71	77.64	72.69	67.42
80	123.87	104.83	77.72	98.41	93.46	87.03
100	149.04	123.79	90.25	116.70	111.26	101.21
140	191.21	159.23	118.31	102.20	145.88	135.33
180	228.14	183.71	144.81	186.26	177.53	167.39
240	272.26	211.65	181.32	230.27	219.72	203.24
300	307.89	230.68	215.77	270.66	257.14	245.52
360	350.05	248.49	246.51	307.83	293.73	276.76
420	357.90	259.12	233.45	342.36	329.83	309.06
480	366.23	268.76	314.75	373.59	357.52	340.88
540	402.02	276.43	281.62	393.13	391.48	374.34
600	422.61	280.05	368.90	427.00	414.89	397.74
660	413.30	288.29	395.02	464.83	450.49	423.62
720	424.57	291.10	429.56	476.95	479.67	448.51
780	440.26	0.00	443.98	505.05	491.86	476.70
840	449.09	303.13	466.48	533.32	508.10	494.01
900	418.69	307.08	490.87	546.26	533.57	514.28
960	476.54	311.04	507.77	564.22	551.04	522.19
1020		315.49	517.33	581.37	579.06	545.93
1080	504.00	0.00	538.14	597.03	583.02	567.36
1140		316.97	564.93	609.97	591.42	594.88
1180		319.20	574.36	620.10	600.82	598.10
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)						
	$1.059 \cdot 10^{-4}$	$8.691 \cdot 10^{-5}$	$6.785 \cdot 10^{-5}$	$1.051 \cdot 10^{-4}$	$9.787 \cdot 10^{-5}$	$8.757 \cdot 10^{-5}$
	$1.042 \cdot 10^{-4}$	$9.193 \cdot 10^{-5}$	$6.490 \cdot 10^{-5}$	$1.020 \cdot 10^{-4}$	$8.757 \cdot 10^{-5}$	$8.242 \cdot 10^{-5}$
	$1.085 \cdot 10^{-4}$	$9.004 \cdot 10^{-5}$	$6.658 \cdot 10^{-5}$	$1.020 \cdot 10^{-4}$	$1.020 \cdot 10^{-4}$	$7.418 \cdot 10^{-5}$
			$6.272 \cdot 10^{-5}$			
			$6.508 \cdot 10^{-5}$			
			$6.287 \cdot 10^{-5}$			

4.6.3. Experimentos de hidrólisis a 40°C.

Se emplearon tres fracciones volumétricas (α_{exp}) de tributirina, 0.01, 0.02 y 0.05, y se modificó la concentración de enzima (e_{exp}). Los resultados se incluyen en las Tablas 4.64 a 4.66.

Tabla 4.64. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) mediante la enzima Lipolase 100 a 40°C.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T=40°C				pH=7.0			
	Emulsificación: UltraTurrax							
	Concentración de enzima (e_{exp})							
	0.05 g/L	0.10 g/L	1.0 g/L	3.0 g/L	7.0 g/L	10.0 g/L	15.0 g/L	
tiempo, s	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	
5	0.56	1.41	7.75	29.34	52.12	37.42	58.05	
20	2.06	4.31	37.91	95.50	151.67	158.80	162.59	
40	3.90	7.54	73.19	155.10	217.52	230.71	228.75	
60	5.71	11.51	103.35	199.73	263.40	276.59	269.95	
80	7.43	15.30	129.56	233.44	293.98	305.06	295.54	
100	9.33	18.56	154.12	254.97	312.39	321.66	312.70	
140	12.67	26.01	189.06	290.86	342.04	350.46	339.23	
180	16.23	32.67	217.58	313.33	240.30	370.63	357.33	
240	21.22	42.62	251.70	348.28	378.24	381.69	376.37	
300	26.18	52.67	273.95	351.40	403.52	398.78	389.01	
360	30.99	61.45	293.07	362.32			399.46	
420	35.76	71.19	307.58	382.92	408.20	429.53	410.07	
480	40.44	79.16	317.47	381.05	428.80	428.55	418.50	
540	45.16	88.03	325.63	392.75	421.31	443.19	425.99	
600	49.71	97.16	327.61	377.30		438.80	427.86	
660	54.30	105.76	337.25	398.84		450.03		
720	58.79	114.01	0.00				440.03	
780	63.19	121.96	342.69				445.03	
840	67.81	129.78	342.19	422.24		464.67	449.71	
900	71.96	137.62	350.11	409.14	453.14			
960	76.39	145.28	354.31		456.57			
1020	80.70	153.14	361.73		460.63	463.70		
1080	85.04	158.95	362.14			479.31	465.94	
1140	89.25	168.28	365.27	440.03			469.99	
1180	92.12	173.50	365.44		469.37			
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)								
	6.227·10 ⁻⁶	1.218·10 ⁻⁵	1.199·10 ⁻⁴	3.160·10 ⁻⁴	5.305·10 ⁻⁴	6.032·10 ⁻⁴	5.364·10 ⁻⁴	
	6.227·10 ⁻⁶	1.140·10 ⁻⁵	1.133·10 ⁻⁴	3.101·10 ⁻⁴	5.071·10 ⁻⁴	5.402·10 ⁻⁴	5.617·10 ⁻⁴	
	6.319·10 ⁻⁶	1.124·10 ⁻⁵	1.176·10 ⁻⁴	2.945·10 ⁻⁴	4.681·10 ⁻⁴	5.164·10 ⁻⁴	5.422·10 ⁻⁴	
		1.254·10 ⁻⁵						
		1.213·10 ⁻⁵						
		1.177·10 ⁻⁵						

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.65 Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.02$) mediante la enzima Lipolase 100 a 40°C.

T=40°C		pH=7.0	
$\alpha_{exp}=0.02$		Emulsificación: UltraTurrax	
tiempo, s	e_{exp}		10.0 g/L
	0.10 g/L	10.0 g/L	
	μeq valorados	μeq valorados	
5	1.28	76.74	
20	4.71	247.09	
40	7.95	363.67	
60	12.37	457.77	
80	15.96	534.43	
100	19.59	559.20	
140	26.55	645.56	
180	33.48	723.93	
240	43.66	711.95	
300	54.30	746.17	
360	63.43	799.04	
420	73.21	775.25	
480	82.88	882.79	
540	92.35	756.19	
600	100.88	0.00	
660	110.01	862.26	
720	119.26	873.99	
780	127.16	0.00	
840	135.54	810.45	
900	143.82	820.22	
960	152.20	997.17	
1020	160.11	897.13	
1080	166.25	851.02	
1140	176.62	860.31	
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)			
	$1.241 \cdot 10^{-5}$	$8.589 \cdot 10^{-4}$	
	$1.248 \cdot 10^{-5}$	$8.534 \cdot 10^{-4}$	
	$1.183 \cdot 10^{-5}$	$8.052 \cdot 10^{-4}$	

Tabla 4.66 Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.05$) mediante la enzima Lipolase 100 a 40°C.

T=40°C		pH=7.0	
$\alpha_{exp}=0.05$		Emulsificación: UltraTurrax	
tiempo, s	e_{exp}		10.0 g/L
	0.10 g/L	10.0 g/L	
	μeq valorados	μeq valorados	
5	1.15	98.39	
20	4.12	335.99	
40	7.76	557.87	
60	11.91	777.73	
80	15.74	978.86	
100	19.12	1127.11	
140	27.04	1418.26	
180	33.91	1621.73	
240	44.29	1854.31	
300	54.99	2017.96	
360	64.86	2136.43	
420	75.32	2232.81	
480	85.14	2309.44	
540	94.79	2374.03	
600	104.19	2428.24	
660	113.45	2438.62	
720	122.45	2479.28	
780	131.45		
840	140.45	2632.38	
900	149.23	2580.18	
960	157.51	2606.78	
1020	168.75	2744.83	
1080	175.64	2656.48	
1140	186.33	2779.46	
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)			
	$1.219 \cdot 10^{-5}$	$1.051 \cdot 10^{-3}$	
	$1.228 \cdot 10^{-5}$	$1.027 \cdot 10^{-3}$	
	$1.230 \cdot 10^{-5}$	$9.998 \cdot 10^{-4}$	

4.6.4. Experimentos de hidrólisis a 50°C.

Los experimentos fueron también realizados a tres fracciones volumétricas (α_{exp}) de tributirina, 0.01, 0.02 y 0.05, y varias concentraciones de enzima (e_{exp}). Los resultados de los mismos se muestran en las Tablas 4.67 a 4.69.

Tabla 4.67. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) mediante la enzima Lipolase 100 a 50°C.

tiempo, s	T=50°C					
	pH=7.0					
	Emulsificación: UltraTurrax					
Concentración de enzima (e_{exp})						
	0.05 g/L	0.10 g/L	1.0 g/L	7.0 g/L	10.0 g/L	15.0 g/L
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.58	0.85	7.25	48.06	57.68	68.97
20	2.40	4.57	39.07	137.00	166.20	175.70
40	4.44	7.86	80.44	194.11	227.30	235.00
60	6.45	12.01	111.76	231.56	256.14	272.45
80	8.33	15.91	142.58	245.29	285.79	293.98
100	10.24	18.79	169.78	281.34	299.64	308.34
140	13.93	25.58	213.46	271.51	329.95	333.30
180	17.53	31.62	246.59	322.53	331.41	342.20
240	23.77	42.23	280.38	327.68	331.41	364.20
300	28.23	51.92	301.48	352.96	360.09	373.87
360	33.22	61.92	317.96	347.81	362.70	378.24
420	38.69	70.70	327.19	347.35	370.52	
480	43.26	80.43	335.93	363.73	371.98	
540	48.16	89.03	343.35		406.69	403.52
600	53.05	95.25	349.94			
660	57.78	106.65	355.88		415.49	
720	62.64	117.50	356.04			418.03
780	67.31	126.24	369.39	389.94	392.03	
840	72.17	132.32	372.11			
900	79.57	142.98	371.37			429.27
960	81.44	141.51	373.35		401.80	
1020	85.94	156.29	383.48	406.33	405.71	
1080	90.54	163.11			408.65	438.16
1140	98.58	167.53	383.73		414.51	
1180	98.06	176.56	385.71	414.75		441.44
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)						
	$6.319 \cdot 10^{-6}$	$1.170 \cdot 10^{-5}$	$1.347 \cdot 10^{-4}$	$5.461 \cdot 10^{-4}$	$6.171 \cdot 10^{-4}$	$6.378 \cdot 10^{-4}$
	$6.106 \cdot 10^{-6}$	$1.210 \cdot 10^{-5}$	$1.280 \cdot 10^{-4}$	$5.169 \cdot 10^{-4}$	$6.076 \cdot 10^{-4}$	$5.754 \cdot 10^{-4}$
	$6.582 \cdot 10^{-6}$	$1.271 \cdot 10^{-5}$	$1.311 \cdot 10^{-4}$			$6.125 \cdot 10^{-4}$

4.6.5. Experimentos de hidrólisis a 60°C.

En este caso también se ejecutaron experimentos a tres fracciones volumétricas (α_{exp}) de tributirina, 0.01, 0.02 y 0.05, y a varias concentraciones de enzima (e_{exp}), cuyos resultados se muestran en las Tablas 4.70 a 4.72.

Tabla 4.70. Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) mediante la enzima Lipolase 100 a 60°C.

tiempo, s	T=60°C					
	pH=7.0					
	Emulsificación: UltraTurrax					
Concentración de enzima (e_{exp})						
	0.05 g/L	0.10 g/L	1.0 g/L	7.0 g/L	10.0 g/L	15.0 g/L
	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados	μeq valorados
5	0.44	1.18	6.92	46.50	51.16	62.10
20	2.14	3.83	34.78	141.68	141.10	156.98
40	3.77	6.91	70.55	194.11	183.79	205.35
60	5.57	10.41	102.20	221.42	218.01	233.44
80	7.42	13.62	126.76	240.61	218.99	235.93
100	8.91	16.69	149.50	258.71	227.30	259.34
140	12.31	22.05	183.79	270.57	246.85	282.74
180	14.83	27.63	205.71	282.28		279.00
240	19.25	35.88	229.94	299.60	260.05	299.60
300	23.53	43.73	246.76	315.51		316.45
360	27.66	51.36	256.98			313.64
420	35.39	59.08	266.21	331.90	293.29	
480	35.85	66.43	273.46	352.03		323.94
540	41.64	74.24	280.38	357.64		335.17
600	43.36	82.49	286.81		278.62	312.70
660	47.49	89.17	292.00	341.73	286.93	
720	57.75	95.65	297.69	351.40	303.06	337.05
780	55.08	102.72	302.14		288.40	338.92
840	58.84	110.64	305.85	352.03		349.22
900	62.46	116.71	310.79			
960	69.29	124.55	0.00	353.90		
1020	69.76	131.23	317.47			345.47
1080	73.13	138.07	320.77			
1140	72.04	146.61	325.38	360.45		
1180	75.49	151.33	325.38		314.14	350.47
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)						
	$6.089 \cdot 10^{-6}$	$1.129 \cdot 10^{-5}$	$1.213 \cdot 10^{-4}$	$4.935 \cdot 10^{-4}$	$6.024 \cdot 10^{-4}$	$6.027 \cdot 10^{-4}$
	$4.991 \cdot 10^{-6}$	$1.141 \cdot 10^{-5}$	$1.261 \cdot 10^{-4}$	$5.169 \cdot 10^{-4}$	$5.802 \cdot 10^{-4}$	$6.242 \cdot 10^{-4}$
	$5.335 \cdot 10^{-6}$	$1.084 \cdot 10^{-5}$	$1.126 \cdot 10^{-4}$	$5.169 \cdot 10^{-4}$	$5.413 \cdot 10^{-4}$	$5.656 \cdot 10^{-4}$
	$4.983 \cdot 10^{-6}$	$1.083 \cdot 10^{-5}$				
		$1.086 \cdot 10^{-5}$				

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.71 Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.02$) mediante la enzima Lipolase 100 a 60°C.

tiempo, s	Emulsificación: UltraTurrax	
	Θ_{exp}	
	0.10 g/L	10.0 g/L
	μeq valorados	μeq valorados
5	1.44	87.33
20	3.73	281.88
40	6.43	416.14
60	9.33	510.32
80	12.21	573.21
100	14.68	609.71
140	19.54	673.58
180	23.13	720.99
240	30.08	755.05
300	0.00	379.81
360	41.80	821.69
420	48.81	827.72
480	50.18	830.00
540	54.99	837.82
600	65.40	882.30
660	70.90	886.21
720	76.11	927.76
780	78.99	910.16
840	0.00	886.70
900	92.50	
960	96.97	956.11
1020	102.67	937.54
1080	107.73	919.94
1140	112.88	
1180	103.94	
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)		
	$1.054 \cdot 10^{-5}$	$9.875 \cdot 10^{-4}$
	$1.051 \cdot 10^{-5}$	$1.139 \cdot 10^{-3}$
	$9.886 \cdot 10^{-6}$	$1.023 \cdot 10^{-3}$
	$1.027 \cdot 10^{-5}$	
	$1.029 \cdot 10^{-5}$	

Tabla 4.72 Influencia de la concentración de enzima en la hidrólisis enzimática de tributirina ($\alpha_{exp}=0.05$) mediante la enzima Lipolase 100 a 60°C.

tiempo, s	Emulsificación: UltraTurrax	
	Θ_{exp}	
	0.10 g/L	10.0 g/L
	μeq valorados	μeq valorados
5	1.60	113.78
20	4.32	355.74
40	7.66	581.96
60	11.39	804.51
80	14.96	983.88
100	18.07	1101.34
140	24.99	1299.12
180	30.97	1423.95
240	40.33	1558.82
300	49.20	1654.19
360	58.20	1725.81
420	66.84	1782.36
480	75.52	1886.94
540	84.12	1926.60
600	92.41	1960.23
660	100.69	1928.61
720	108.87	1897.99
780	116.76	1970.27
840	128.30	
900	132.70	2009.43
960	144.45	
1020	148.25	2112.33
1080	156.01	
1140	163.73	2139.44
1180	169.10	2147.97
Velocidad inicial de reacción, mol/(L·s)		
	$1.145 \cdot 10^{-5}$	$1.099 \cdot 10^{-3}$
	$1.189 \cdot 10^{-5}$	$1.225 \cdot 10^{-3}$
	$1.187 \cdot 10^{-5}$	$1.086 \cdot 10^{-3}$

4.7. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS EMULSIONES DURANTE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La distribución de tamaños de gota de las emulsiones preparadas para llevar a cabo los experimentos de hidrólisis fue determinada antes y después de la reacción para poder

evaluar el área interfacial específica de la emulsión y su variación por efecto de la hidrólisis.

Dado que las emulsiones utilizadas en los experimentos cinéticos se han preparado por dilución de una emulsión de fracción volumétrica igual a 0.05 hasta el valor deseado, se ha estudiado en primer lugar si dicha dilución afecta a la distribución de tamaños de la emulsión. Los resultados se incluyen en la Tabla 4.73.

Tabla 4.73. Influencia de la dilución en la distribución de tamaños de gota de una emulsión de tributirina

$\alpha_{exp} = 0.05$ (original) Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	α_{exp}	
	0.05 - original	0.01 - dilución 1/5
	% Área superficial	% Área superficial
0.43	$6.30 \cdot 10^{-1}$	$7.00 \cdot 10^{-1}$
0.57	2.05	2.20
0.76	4.59	4.67
1.00	7.72	7.64
1.32	10.5	10.2
1.75	11.9	11.5
2.31	11.6	11.3
3.06	10.2	9.97
4.05	8.39	8.36
5.35	6.96	7.08
7.08	6.12	6.37
9.37	5.73	6.02
12.40	5.35	5.59
16.40	4.29	4.42
21.69	2.41	2.38
28.70	$8.50 \cdot 10^{-1}$	$8.00 \cdot 10^{-1}$
37.97	$3.12 \cdot 10^{-1}$	$3.36 \cdot 10^{-1}$
50.22	$1.72 \cdot 10^{-1}$	$2.09 \cdot 10^{-1}$
66.44	$9.70 \cdot 10^{-2}$	$1.00 \cdot 10^{-1}$
87.90	$5.10 \cdot 10^{-2}$	$4.90 \cdot 10^{-2}$
116.3	$2.49 \cdot 10^{-2}$	$2.05 \cdot 10^{-2}$
153.8	$1.43 \cdot 10^{-2}$	$1.13 \cdot 10^{-2}$
203.5	$4.21 \cdot 10^{-3}$	$4.07 \cdot 10^{-3}$
269.2	$1.47 \cdot 10^{-4}$	$9.10 \cdot 10^{-5}$
	Diámetro de Sauter, μm	
	5.235	5.303

La distribución de tamaño de gota de las emulsiones preparadas para llevar a cabo los experimentos de hidrólisis fue determinada antes y después de la reacción. Dada la gran cantidad de datos generada no es posible incluir las distribuciones de tamaño correspondientes a todos los experimentos realizados, por lo que solamente se presentan

RESULTADOS EXPERIMENTALES

a título de ejemplo algunas de ellas (Tablas 4.74 a 4.77). Todas ellas corresponden a experimentos con una fracción volumétrica de tributirina fue 0.01 y se han escogido cuatro concentraciones de enzima que cubren el intervalo ensayado. Los resultados de un ensayo control en ausencia de enzima se presentan también (Tabla 4.74).

Tabla 4.74 Distribuciones de tamaño de una emulsión de tributirina antes y después de la hidrólisis enzimática con Lipolase 100. Ensayo control sin enzima.

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=0 g/L
α_{exp}= 0.01 Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	Antes	Después
	% Área superficial	% Área superficial
0.43	9.70·10 ⁻¹	8.80·10 ⁻¹
0.57	2.66	2.51
0.76	5.05	4.90
1.00	7.79	7.69
1.32	10.2	10.1
1.75	11.4	11.3
2.31	11.1	11.0
3.06	9.73	9.63
4.05	8.02	7.90
5.35	6.57	6.44
7.08	5.66	5.52
9.37	5.26	5.11
12.40	5.04	4.94
16.40	4.47	4.49
21.69	3.11	3.26
28.70	1.56	1.76
37.97	7.00·10 ⁻¹	8.90·10 ⁻¹
50.22	3.70·10 ⁻¹	5.10·10 ⁻¹
66.44	2.21·10 ⁻¹	3.40·10 ⁻¹
87.90	1.17·10 ⁻¹	3.30·10 ⁻¹
116.3	4.70·10 ⁻²	2.99·10 ⁻¹
153.8	2.28·10 ⁻²	1.71·10 ⁻¹
203.5	4.82·10 ⁻³	3.74·10 ⁻²
269.2	3.80·10 ⁻⁵	6.09·10 ⁻⁴
	Diámetro de Sauter, μm	
	5.856	6.885

Tabla 4.75 Distribuciones de tamaño de una emulsión de tributirina antes y después de la hidrólisis enzimática con Lipolase 100 (0.05 g/L)

T=30°C pH=7.0 e_{exp}=0.05 g/L
α_{exp}= 0.01 Emulsificación: UltraTurrax

Diámetro, μm	Antes	Después
	% Área superficial	% Área superficial
0.43	8.83·10 ⁻¹	1.68
0.57	2.53	4.10
0.76	4.98	6.63
1.00	7.82	8.95
1.32	10.2	10.4
1.75	11.4	10.4
2.31	11.0	9.23
3.06	9.68	7.48
4.05	8.12	6.08
5.35	6.93	5.50
7.08	6.30	5.67
9.37	6.03	6.20
12.40	5.64	6.49
16.40	4.47	5.59
21.69	2.41	3.26
28.70	8.20·10 ⁻¹	1.16
37.97	3.52·10 ⁻¹	4.73·10 ⁻¹
50.22	2.18·10 ⁻¹	2.97·10 ⁻¹
66.44	1.11·10 ⁻¹	1.68·10 ⁻¹
87.90	5.37·10 ⁻²	1.08·10 ⁻¹
116.3	1.94·10 ⁻²	6.79·10 ⁻²
153.8	6.85·10 ⁻³	3.92·10 ⁻²
203.5	1.53·10 ⁻³	1.11·10 ⁻²
	Diámetro de Sauter, μm	
	5.306	5.897

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.76 Distribuciones de tamaño de una emulsión de tributirina antes y después de la hidrólisis enzimática con Lipolase 100 (0.50 g/L)

T=30°C pH=7.0 e _{exp} =0.50 g/L α _{exp} = 0.01 Emulsificación: UltraTurrax		
	Antes	Después
Diámetro, μm	% Área superficial	% Área superficial
0.43	8.03·10 ⁻¹	1.37
0.57	2.33	3.34
0.76	4.73	5.54
1.00	7.61	7.88
1.32	10.2	9.79
1.75	11.6	10.6
2.31	11.5	9.99
3.06	10.3	8.57
4.05	8.77	7.17
5.35	7.50	6.39
7.08	6.66	6.18
9.37	6.06	6.09
12.40	5.27	5.51
16.40	3.77	4.09
21.69	1.80	2.47
28.70	5.47·10 ⁻¹	1.54
37.97	2.43·10 ⁻¹	1.13
50.22	1.51·10 ⁻¹	8.10·10 ⁻¹
66.44	8.63·10 ⁻²	6.07·10 ⁻¹
87.90	5.09·10 ⁻²	4.50·10 ⁻¹
116.3	1.95·10 ⁻²	3.14·10 ⁻¹
153.8	8.70·10 ⁻³	1.63·10 ⁻¹
203.5	2.14·10 ⁻³	3.46·10 ⁻²
269.2	3.97·10 ⁻⁵	8.93·10 ⁻⁴
	Diámetro de Sauter, μm	
	4.961	7.233

Tabla 4.77 Distribuciones de tamaño de una emulsión de tributirina antes y después de la hidrólisis enzimática con Lipolase 100 (10.0 g/L)

T=30°C pH=7.0 e _{exp} =10.0 g/L α _{exp} = 0.01 Emulsificación: UltraTurrax		
	Antes	Después
Diámetro, μm	% Área superficial	% Área superficial
0.43	1.55	2.15
0.57	3.75	5.19
0.76	6.01	8.09
1.00	8.33	10.3
1.32	10.2	11.0
1.75	10.9	9.76
2.31	10.0	7.34
3.06	8.11	5.10
4.05	6.09	4.17
5.35	4.75	4.76
7.08	4.52	6.07
9.37	5.46	7.08
12.40	6.94	6.84
16.40	7.04	5.00
21.69	4.32	2.77
28.70	1.29	1.58
37.97	3.61·10 ⁻¹	1.10
50.22	2.07·10 ⁻¹	7.43·10 ⁻¹
66.44	1.16·10 ⁻¹	5.05·10 ⁻¹
87.90	4.23·10 ⁻²	2.68·10 ⁻¹
116.3	1.85·10 ⁻²	1.13·10 ⁻¹
153.8	4.57·10 ⁻³	2.87·10 ⁻²
203.5	1.78·10 ⁻⁴	1.07·10 ⁻³
	Diámetro de Sauter, μm	
	6.137	6.606

Por último, en las Tablas 4.78 a 4.81, se presentan los diámetros de Sauter, antes y después de la hidrólisis, para los experimentos de hidrólisis realizados a diferentes temperaturas. Cada uno de los valores es la media de tres réplicas, indicándose también la desviación estándar.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.78. Variación del diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina antes y después de la hidrólisis con Lipolase 100. Experimentos a 30°C y en ausencia de tensioactivo.

T=30°C		pH=7.0		Emulsificación: UltraTurrax	
α_{exp} , v/v	e_{exp} , g/L	d_{gs} (antes), μm	desv. est.	d_{gs} (después), μm	desv. est.
0.0025	5.00	5.52	0.207	-	-
0.0050	5.00	5.77	0.334	-	-
0.0075	5.00	5.71	0.135	-	-
0.01	0.01	5.83	0.043	6.55	0.474
0.01	0.05	5.31	0.010	5.90	0.141
0.01	0.10	5.27	0.084	6.45	0.319
0.01	0.30	5.86	0.530	10.18	2.116
0.01	0.50	4.96	0.101	7.23	0.635
0.01	1.00	5.47	0.325	19.98	1.590
0.01	1.30	5.96	0.102	10.84	0.675
0.01	2.00	5.60	0.098	8.97	1.052
0.01	3.00	5.52	0.099	11.65	2.472
0.01	5.00	5.00	0.108	7.40	0.314
0.01	10.00	6.14	0.170	6.61	0.653
0.01	15.00	6.12	0.189	6.52	0.380
0.01	20.00	5.89	0.079	6.24	0.267
0.01	25.00	5.94	0.240	6.39	0.425
0.02	0.05	5.59	0.091	5.97	0.092
0.02	0.50	5.70	0.143	8.49	0.049
0.02	2.00	5.25	0.071	7.37	0.135
0.02	3.00	5.51	0.063	7.24	0.461
0.02	5.00	5.98	0.166	8.32	0.172
0.02	7.00	5.57	0.319	8.86	1.214
0.02	8.00	5.51	0.106	8.18	0.349
0.02	10.00	5.42	0.172	8.25	0.535
0.03	5.00	5.39	0.026	7.03	0.632
0.05	0.05	5.87	0.334	5.91	0.086
0.05	0.50	5.44	0.187	5.97	0.123
0.05	5.00	5.60	0.319	7.94	0.480
0.05	10.00	5.52	0.123	8.03	0.083
0.05	12.50	5.64	0.237	7.51	1.335
0.05	15.00	5.51	0.103	7.16	0.659

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.79. Variación del diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina antes y después de la hidrólisis con Lipolase 100. Experimentos a 40°C.

T=40°C		pH=7.0		Emulsificación: UltraTurrax	
α_{exp} , v/v	e_{exp} , g/L	d_{gs} (antes), μm	desv. est.	d_{gs} (después), μm	desv. est.
0.05	0.01	5.83	-	6.57	0.087
0.10	0.01	6.48	0.54	8.39	0.973
1.00	0.01	6.15	0.04	7.14	0.181
3.00	0.01	6.28	0.34	8.35	0.836
7.00	0.01	6.08	0.41	7.74	0.064
10.0	0.01	6.06	0.30	8.21	0.120
15.0	0.01	6.06	0.24	8.65	1.011
0.10	0.02	6.88	1.16	8.64	1.759
10.0	0.02	6.05	0.29	9.72	1.369
0.10	0.05	6.58	1.12	7.36	0.491
10.0	0.05	6.02	0.73	7.67	0.561

Tabla 4.80. Variación del diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina antes y después de la hidrólisis con Lipolase 100. Experimentos a 50°C.

T=50°C		pH=7.0		Emulsificación: UltraTurrax	
α_{exp} , v/v	e_{exp} , g/L	d_{gs} (antes), μm	desv. est.	d_{gs} (después), μm	desv. est.
0.05	0.01	5.89	0.87	6.85	0.223
0.10	0.01	6.56	0.93	8.99	1.771
1.00	0.01	5.43	0.12	7.17	0.180
7.00	0.01	6.40	0.44	8.44	0.197
10.00	0.01	6.00	0.10	9.85	0.745
15.0	0.01	6.17	0.11	7.20	0.479
0.1	0.02	6.88	1.16	8.64	1.759
10.00	0.02	6.19	0.45	8.38	0.807
0.10	0.05	6.58	1.12	7.36	0.480
10.0	0.05	6.31	1.13	7.57	1.096

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 4.81. Variación del diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina antes y después de la hidrólisis con Lipolase 100. Experimentos a 60°C.

T=60°C		pH=7.0		Emulsificación: UltraTurrax	
α_{exp} , v/v	e_{exp} , g/L	d_{gs} (antes), μm	desv. est.	d_{gs} (después), μm	desv. est.
0.05	0.01	5.19	0.21	6.00	0.554
0.10	0.01	6.60	0.51	9.25	1.391
1.00	0.01	6.02	0.19	7.09	0.059
7.00	0.01	5.89	0.33	7.75	0.379
10.00	0.01	6.59	0.60	8.52	0.495
15.0	0.01	6.39	0.23	7.61	0.524
0.1	0.02	6.17	0.54	7.22	0.226
10.00	0.02	5.20	0.37	6.56	0.536
0.10	0.05	6.64	1.70	7.71	1.103
10.0	0.05	6.59	1.16	8.44	0.438

Finalmente en la Tabla 4.82 se recoge la variación del diámetro de Sauter durante la hidrólisis para experimentos realizados en presencia de diferentes tensioactivos.

Tabla 4.82. Variación del diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina antes y después de la hidrólisis con Lipolase 100. Experimentos a 30°C y en presencia de tensioactivo.

$\alpha_{exp} = 0.01$	T=30°C	pH=7.0		$e_{exp} = 1.0$ g/L	Emulsificación: UltraTurrax
	[tensioactivo], mg/L	d_{gs} (antes), μm	desv. est.	d_{gs} (después), μm	
Findet 1214N/23					
0.05		5.56	0.122	5.45	0.085
Findet 1214N/16					
0.05		6.06	0.107	6.85	0.090
0.10		5.62	0.115	6.49	0.343
0.15		5.33	0.112	5.64	0.133
0.20		5.50	0.169	5.47	0.180
Glucopon 650					
0.05		5.65	0.092	6.56	0.098
0.10		5.51	0.131	5.77	0.092
0.15		5.30	0.089	5.54	0.226
0.20		5.91	0.154	5.94	0.304
LAS					
0.02		5.28	0.137	6.55	0.442
0.05		5.53	0.182	11.32	2.073
0.10		5.48	0.307	14.38	0.283
0.20		5.33	0.088	15.74	3.924
0.50		5.69	0.140	15.10	-

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se discuten los resultados obtenidos y que han sido presentados en los apartados 4.1 a 4.8.

En primer lugar se analiza la actividad lipásica utilizando tributirina (apartado 5.1) y trioleína (apartado 5.2) como sustrato. Se compara la actividad de las enzimas Lipolase 100, LipoPrime 50T y Novozym 388 sobre ambos sustratos y se analiza la influencia de ciertas características de la emulsión (fracción de fase grasa, método de preparación y estabilidad) en la medida de la actividad, usando la enzima Lipolase 100.

En el apartado 5.3 se estudia la estabilidad en condiciones de lavado de las tres enzimas utilizadas, analizándose a continuación la desactivación de la enzima Lipolase 100 por efecto de la temperatura y la agitación.

Las características de la enzima Lipolase 100, tales como temperatura y pH óptimo de actuación y su estabilidad y actividad en presencia de tensioactivos dispersantes y proteasas son analizadas en el apartado 5.4.

En el apartado 5.5 se discuten los ensayos de lavado realizados en el sistema BSF con la enzima Lipolase 100 y tensioactivo aniónico (LAS), utilizando tributirina coloreada como suciedad.

El estudio cinético de la hidrólisis de tributirina en emulsión O/W mediante la enzima Lipolase 100 y el desarrollo de los modelos cinéticos adecuados a esta reacción, se aborda en los apartados 5.6 y 5.7. Finalmente, en el apartado 5.8, se analiza el efecto de diferentes tensioactivos (uno aniónico y tres no iónicos) sobre la hidrólisis enzimática de tributirina.

5.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIBUTIRINA COMO SUSTRATO

El empleo de la tributirina como sustrato para la medida de la actividad lipásica mediante el método del pHstato resulta bastante frecuente (Rapp, 1995; Patil et al., 2000; Noor et al., 2003), dado que el ácido butírico es muy soluble en agua y es posible valorarlo continuamente durante la reacción de hidrólisis.

En primer lugar se determinó la actividad sobre tributirina de las tres lipasas estudiadas, eligiendo para ello la concentración de enzima más adecuada. A continuación, se analizó la influencia de la concentración de sustrato, de la técnica de emulsificación y de la estabilidad de la emulsión en medida de la actividad con la enzima Lipolase 100. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.2 a 4.6 del capítulo de "Resultados Experimentales". Todos los experimentos fueron realizados a pH 7.0 y

30°C y diluyendo el preparado enzimático comercial en tampón fosfato. La metodología seguida se describe en el apartado 3.4.

Previamente se llevó a cabo un ensayo control en ausencia de enzima a pH 7.00, determinándose la cantidad de base (NaOH 0.05 N) añadida durante los 10 minutos que se sigue la reacción. La pendiente entre 180 y 480 s de la curva de hidrólisis así obtenida fue prácticamente igual a 0. Por esta razón puede considerarse despreciable la adición de base en ausencia de enzima de cara al cálculo de la actividad enzimática a pH 7.00.

A continuación se discuten los resultados obtenidos.

5.1.1. Influencia de la concentración de enzima

Las condiciones para la medida de la actividad enzimática deben ser elegidas de forma que el método produzca resultados reproducibles y que sirvan de comparación para estudiar el efecto de diferentes variables sobre la actividad. En concreto la concentración de la solución de preparado enzimático que se añade a la emulsión del sustrato para dar comienzo a la hidrólisis, e_{exp} (g/L), ha de ser escogida de forma que la cantidad de enzima añadida no esté por debajo del límite de detección del método del pHstato ni sea tan alta que la velocidad de reacción experimente un descenso brusco una vez comenzada la hidrólisis, lo que dificultaría el cálculo de la velocidad inicial, al no ser lineal la curva de hidrólisis en dichas condiciones. En este sentido, los propios fabricantes de las enzimas, en su método de referencia para la medida de la actividad enzimática (Novo-Nordisk, 1991), recomiendan una concentración de enzima de aproximadamente 1.0 LU/mL cuando se emplea NaOH 0.05N.

Para elegir la concentración de enzima más adecuada se realizaron ensayos de actividad a distintos valores de la misma. En la Tabla 5.1 se muestran los valores de actividad enzimática para tres concentraciones diferentes de enzima Lipolase 100. El cálculo de la actividad se ha realizado a partir de la pendiente de la curva de hidrólisis entre 180 y 480 segundos de la reacción, intervalo recomendado en el método analítico suministrado por los fabricantes (Novo-Nordisk, 1991). Las emulsiones utilizadas contienen una fracción volumétrica de tributirina (α_{exp}) de 0.01, y han sido preparadas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.). Como una medida de la dispersión de los resultados se ha incluido la desviación estándar de las medidas y su coeficiente de variación (C.V.), calculado a partir de la ecuación V.1. También se indica en el título de la tabla el número de réplicas (n) realizadas.

Tabla 5.1. Actividad de la enzima Lipolase 100 obtenida utilizando disoluciones de la misma de diferente concentración (n≥3).

e_{exp} , g/L	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %	e_{exp} , LU/mL
0.01	97034	4242	4.4	0.97
0.10	97056	1420	1.5	9.71
1.00	29287	42645	14.6	29.3

$$C.V. = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} \times 100$$

V.1

Aunque no existen diferencias significativas (a un nivel de confianza del 95%) entre los valores de actividad obtenidos con 0.01 y 0.1 g/L de enzima y la cinética es lineal durante los primeros 10 minutos en ambos casos, tal como se aprecia en la Figura 5.1, la concentración de enzima más adecuada resulta ser de 0.01 g/L, ya que representa prácticamente 1 LU/mL. La dispersión de los resultados es aceptable (C.V.<5%) en estas condiciones. Cuando se emplea 1.0 g/L de enzima la actividad calculada disminuye, pero lo que en realidad sucede es que la velocidad de reacción decrece acusadamente con el tiempo durante los primeros instantes de la hidrólisis, como se observa en la Figura 5.1. Por esta razón la pendiente entre 180 y 480 segundos no representa ya la velocidad inicial de la reacción, a diferencia de lo que sucede a las otras dos concentraciones. Estas condiciones no son deseables para el cálculo de la actividad enzimática, que vendrá afectada por un mayor error, como pone de manifiesto el elevado coeficiente de variación de los resultados para 1.0 g/L de enzima.

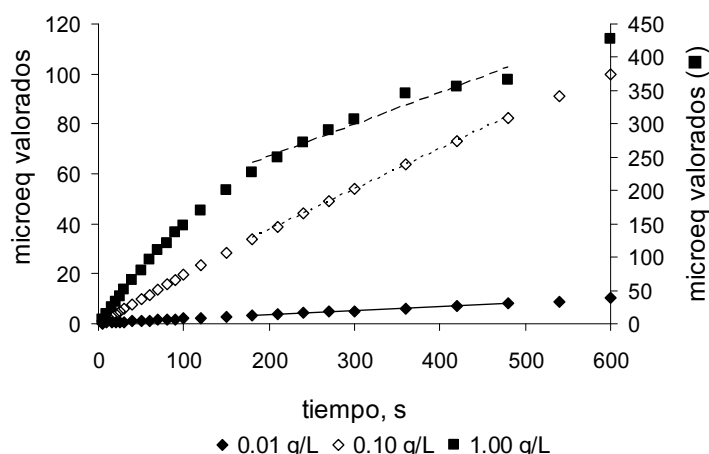


Figura 5.1. Curvas de hidrólisis obtenidas para distintas concentraciones de Lipolase 100 (e_{exp} =0.01, 0.10 y 1.00 g/L) y una fracción en volumen de tributirina de 0.01. Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión entre los 180 y 480 segundos.

El mismo criterio se ha aplicado para determinar las concentraciones más adecuadas de las enzimas LipoPrime 50T y Novozym 388, utilizando emulsiones de tributirina con una fracción en volumen de 0.01 preparadas mediante dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.). Para LipoPrime 50T se considera apropiada una concentración de enzima de 0.03 g/L, mientras que para la Novozym 388 se elige a un valor de 0.05 g/L. Estas concentraciones son en todos los casos próximas a 1.0 LU/mL, tal y como se aprecia en la Tabla 5.2. La cinética de la hidrólisis es en los dos casos lineal dentro del intervalo estudiado, tal y como se observa en la Figura 5.2.

Tabla 5.2. Concentración de las enzimas LipoPrime 50T y Novozym 388 para la medida de la actividad lipásica con tributirina y valores de actividad obtenidos ($n \geq 2$).

Enzima	e_{exp} , g/L	Actividad media, LU/g	C.V., %	e_{exp} , LU/mL
LipoPrime 50T	0.03	28082	3.8	0.84
Novozym 388	0.05	14963	1.3	0.75

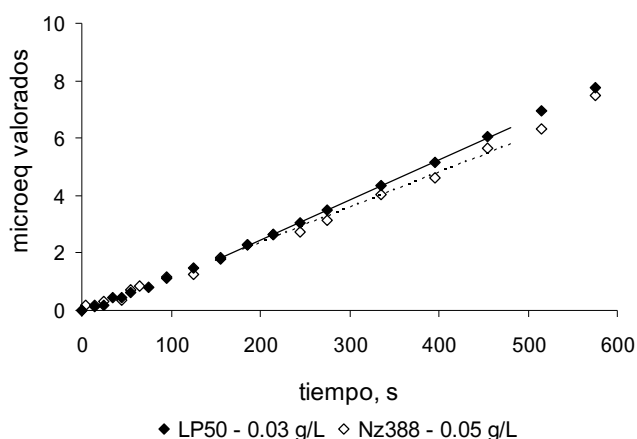


Figura 5.2. Curvas de hidrólisis obtenidas con las enzimas LipoPrime 50T (LP50, 0.03 g/L) y Novozym 388 (Nz388, 0.05 g/L) y una fracción en volumen de tributirina de 0.01. Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos.

A partir de los resultados presentados en las Tablas Tabla 5.1 y Tabla 5.2 puede concluirse que la actividad de las tres enzimas analizadas, medida sobre tributirina, guarda la siguiente relación:

$$\text{Actividad (Lipolase 100)} > \text{Actividad (LipoPrime 50T)} > \text{Actividad (Novozym 388)}$$

Este resultado coincide básicamente con la información aportada por los fabricantes de las enzimas (Tabla 3.1).

5.1.2. Influencia de la concentración de sustrato

En la Tabla 5.3 se presentan los valores de actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp} = 0.05$ g/L) medidos sobre dos emulsiones con diferente fracción volumétrica de tributirina. Las emulsiones fueron obtenidas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min). La comparación de las medias mediante un test de contraste de hipótesis confirma que no existen diferencias significativas entre los valores de actividad determinados con una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 y 0.02. Por tanto, no cabe pensar que el área interfacial disponible sea limitante para la hidrólisis enzimática cuando se emplea una fracción en volumen de tributirina de 0.01 y concentraciones de enzima iguales o inferiores a 0.05 g/L.

Tabla 5.3. Actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.05$ g/L) medida sobre emulsiones con distinta fracción volumétrica de tributirina ($n \geq 3$).

α_{exp} v/v	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
0.01	99762	3683	3.7
0.02	97257	2142	2.2
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Igualdad de Varianzas	0.2529	No existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	0.3660	No existen diferencias significativas	

Por otro lado, si se comparan las curvas de hidrólisis obtenidas para $\alpha_{exp} = 0.01$ y 0.02, Figura 5.3, se aprecia que éstas son prácticamente coincidentes.

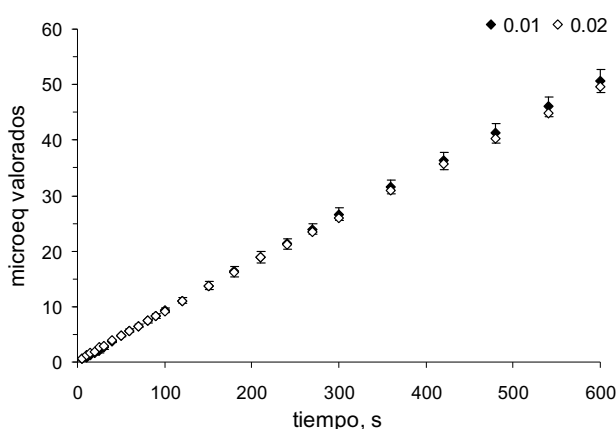


Figura 5.3. Curvas de hidrólisis obtenidas con distintas fracciones volumétricas de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$ y 0.02) y con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.05$ g/L).

Aunque no afecte a la actividad enzimática, la fracción volumétrica de tributirina en la emulsión sí influye en la distribución de tamaños de gota de la misma cuando se emplea una cantidad de goma arábica constante. Esto se pone de manifiesto en la Figura 5.4, donde se comparan las distribuciones de tamaño de gota de dos emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}= 0.01$ y 0.05) obtenidas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.). La emulsión más concentrada presenta una distribución claramente bimodal y un importante incremento en la cantidad de gotas de tamaño superior a $10 \mu\text{m}$. Sin embargo, en ninguno de los dos casos el área interfacial específica disponible ($1.108 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{L}$ para $\alpha_{exp}=0.01$ y $4.580 \cdot 10^5 \text{ cm}^2/\text{L}$ para $\alpha_{exp}=0.05$) limita la velocidad de hidrólisis.

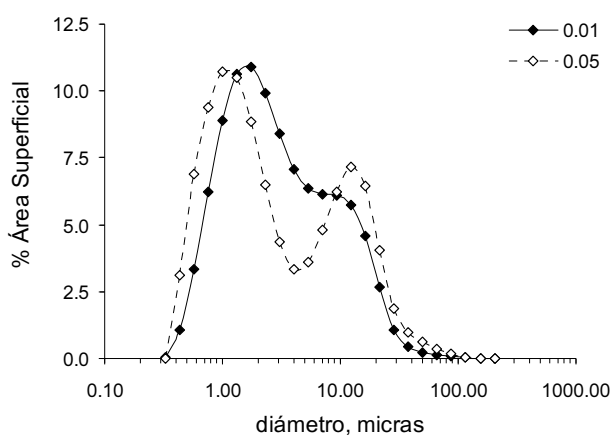


Figura 5.4. Distribuciones de tamaño de emulsiones de tributirina con distintas fracciones volumétricas ($\alpha_{exp}=0.01$ y 0.05) obtenidas mediante dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min) y con 1.0 g/L de goma arábica.

Por tanto una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 se considera apropiada para la medida de la actividad, al menos para concentraciones de enzima iguales a 0.05 g/L o inferiores.

5.1.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad.

A diferencia de lo que sucede en la catálisis enzimática homogénea, donde la actividad enzimática se mide sobre soluciones acuosas del sustrato, en el caso de las lipasas, dada la naturaleza interfacial de su mecanismo de actuación y la propia insolubilidad del sustrato, es necesario utilizar emulsiones del mismo. Dichas emulsiones son sistemas inestables desde el punto de vista termodinámico, y sus características dependen en gran medida de la forma en que han sido producidas y del agente de superficie y/o estabilizante utilizado en su obtención.

Es por tanto necesario optimizar la forma de preparación de la emulsión y conocer la influencia de la estabilidad de la misma en la medida de la actividad lipásica.

5.1.3.1. Influencia del método de preparación de la emulsión.

Dos técnicas diferentes han sido empleadas para la obtención de las emulsiones: ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax). Todas las emulsiones utilizadas para la medida de la actividad lipásica se han estabilizado con una cantidad fija de goma arábica igual a 1.0 g por litro de emulsión. Cuando se emplean ultrasonidos la emulsificación se produce por efecto de la microcavitación provocada por las ondas ultrasónicas (Behrend y Schubert, 2001), mientras el UltraTurrax produce emulsiones gracias a los esfuerzos de cizalla que se producen en el cabezal agitador.

Los datos de actividad de la enzima Lipolase 100 medida sobre emulsiones de tributirina obtenidas tanto por aplicación de ultrasonidos como por dispersión mecánica se presentan en la Tabla 5.4.

Para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos utilizando una y otra técnica se ha aplicado un test de contraste de hipótesis para comparar ambas medias, cuyos resultados, también recogidos en la Tabla 5.4, ponen de manifiesto que la actividad obtenida cuando se usan ultrasonidos es significativamente menor que cuando se emplea dispersión mecánica.

Tabla 5.4. Influencia del método de preparación de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) ($n \geq 5$).

Método de preparación	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
Ultrasonidos 1 min.	84894	2305	2.7
Dispersión 13000 rpm, 1 min.	97034	4242	4.4
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Igualdad de Varianzas	0.0925	No existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	0.0002	Existen diferencias significativas	

Esta diferencia se ve también reflejada en las curvas de hidrólisis obtenidas con emulsiones preparadas con una y otra técnica, las cuales se presentan en la Figura 5.5. La cinética de la reacción en ambos casos es lineal durante los diez minutos de duración del ensayo de actividad.

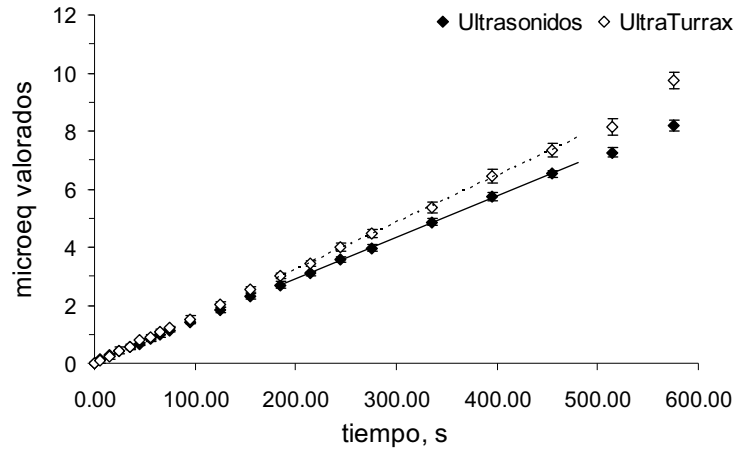


Figura 5.5. Curvas de hidrólisis obtenidas con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) y emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) preparadas mediante ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.). Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos.

Para encontrar una explicación a esta diferencia se han determinado las distribuciones de tamaño de ambas emulsiones, que se representan en la Figura 5.6. La emulsión obtenida por dispersión mecánica es más polidispersa que la obtenida por ultrasonidos y presenta un área interfacial específica ligeramente inferior, aunque del mismo orden ($1.108 \cdot 10^5$ cm²/L frente a $3.240 \cdot 10^5$ cm²/L). Abismaïl et al. (1999) obtienen resultados análogos al comparar las distribuciones de tamaño de gota de emulsiones de queroseno en agua obtenidas por ultrasonidos y dispersión mecánica en presencia de bajas concentraciones de tensioactivo.

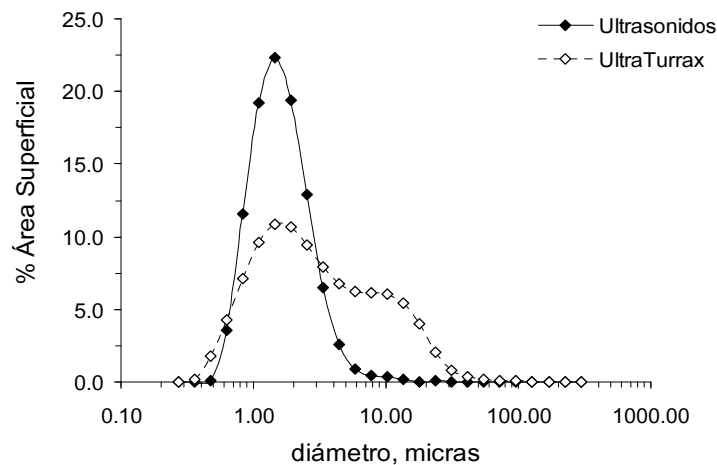


Figura 5.6. Distribuciones de tamaño de emulsiones de tributirina preparadas mediante ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax).

Dado que se ha empleado una concentración de enzima muy baja y que el área interfacial específica de ambas emulsiones es del mismo orden y bastante elevada, la diferencia no puede atribuirse a una limitación en el área interfacial disponible, que en cualquier caso provocaría el efecto contrario, al ser mayor el área de la emulsión obtenida por ultrasonidos.

La generación de algún compuesto inhibidor para la enzima durante la sonicación podría provocar la disminución de la actividad, con lo que, si esto fuera así, se debería producirse un descenso creciente de la actividad al incrementar el tiempo de aplicación de los ultrasonidos. Para comprobar este hecho se planificaron experimentos a diferentes tiempos de sonicación. En la Figura 5.7 se muestran las curvas de hidrólisis para cada tiempo de sonicación y en la Tabla 5.5 los valores de actividad correspondientes.

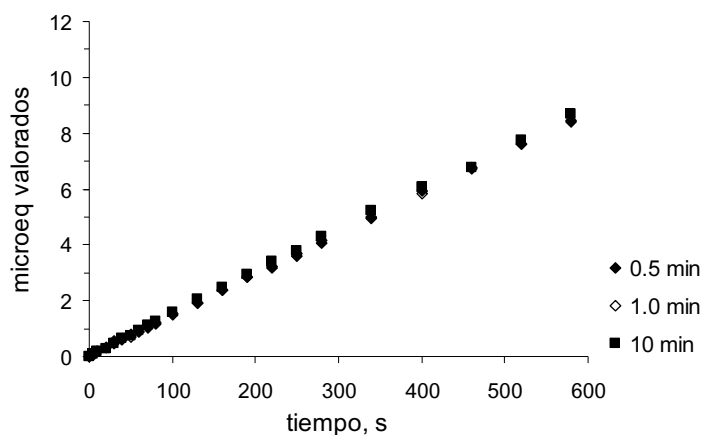


Figura 5.7. Curvas de hidrólisis de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) en función del tiempo de sonicación de la emulsión.

Tabla 5.5. Influencia del tiempo de tratamiento (sonicación) en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) ($n \geq 3$).

Tiempo de sonicación, min.	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
0.5	86536	3751	4.3
1.0	86675	1547	1.8
10.0	89261	2445	2.7
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
ANOVA de un factor	0.3702	No existen diferencias significativas entre grupos	

Se observa que el tiempo de tratamiento tampoco parece influir de forma significativa en la actividad medida posteriormente sobre la emulsión preparada. La existencia de diferencias significativas entre los valores de actividad queda descartada al realizar un análisis de la varianza (ANOVA). Por otro lado con 0.5 minutos de tratamiento parece ya existir el área interfacial suficiente para no imponer limitación a la actividad enzimática. Estos resultados se corresponden también con los obtenidos por Abismaïl et al. (1999) los cuales, al estudiar el tamaño de gota de emulsiones de queroseno en agua, encuentran que los primeros 15 segundos de tratamiento, tanto por ultrasonidos como por dispersión mecánica, producen la mayor disminución en el tamaño de gota de la emulsión.

En cualquier caso la menor actividad registrada con los ultrasonidos no parece tampoco estar relacionada con la generación durante el proceso de sonicación de sustancia alguna que inhiba la enzima, pues en ese caso su concentración debería aumentar con el tiempo de tratamiento, disminuyendo por tanto la actividad enzimática, cosa que no sucede. La causa de esta disminución podría estar relacionada con la alteración de las propiedades interfaciales de las gotas de tributirina durante el proceso de sonicación. En este sentido Reddy y Fogler (1980) demuestran que la estabilidad de emulsiones de parafina obtenidas por ultrasonidos en ausencia de tensioactivo es debida a interacciones electrostáticas, al presentar la superficie de las gotas una carga negativa que atribuyen a la adsorción de iones hidroxilo (OH^-). La acumulación de cargas negativas sobre las gotas disminuye e incluso evita la adsorción de la lipasa, según Skagerlind et al. (1995), lo que explicaría la disminución de la actividad. Este mecanismo, sin embargo, podría también darse en emulsiones producidas por dispersión mecánica en las mismas condiciones, ya que según Reddy y Fogler (1980) los iones OH^- que contribuyen a estabilizar la emulsión obtenida por ultrasonidos son los existentes en el agua y no se producen durante la sonicación.

Las diferentes distribuciones de tamaño de las emulsiones producidas mediante ultrasonidos y dispersión mecánica (Figura 5.6) podrían provocar también la diferencia en las actividades determinadas sobre ellas, independientemente de que el área interfacial de ambas sea suficiente. En este sentido Fritz et al. (2004) encuentran una clara dependencia entre la actividad de la lipoproteína lipasa y el tamaño de gota de emulsiones de trioleína monodispersas utilizadas como sustrato. Sin embargo, dada la polidispersidad que presentan las emulsiones utilizadas en el presente trabajo, especialmente las obtenidas por dispersión mecánica, no es posible llegar a ninguna conclusión a este respecto.

En cualquier caso, aunque no queda clara la causa de la disminución de la actividad observada en emulsiones preparadas por ultrasonidos, puede estar relacionada con las propiedades interfaciales de la emulsión obtenida mediante esta técnica o con su distribución de tamaños de gota.

5.1.3.2. Influencia de la estabilidad de la emulsión.

Para estudiar la influencia de la estabilidad de la emulsión en la actividad enzimática se han realizado ensayos de actividad en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión, las cuales se obtuvieron utilizando ultrasonidos. Las curvas de hidrólisis para cada tiempo se muestran en la Figura 5.8 y los valores de actividad correspondientes se incluyen en la Tabla 5.6.

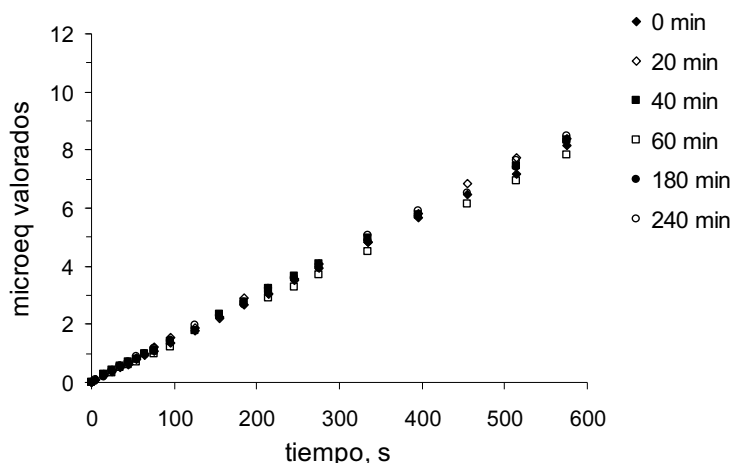


Figura 5.8. Curvas de hidrólisis de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión (ultrasonidos).

Tabla 5.6. Influencia de la estabilidad de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) ($n \geq 2$).

Tiempo transcurrido desde preparación emulsión, min.	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
0	85222	2368	2.8
20	87121	2959	3.4
40	86575	1597	1.8
60	81077	-	-
180	86384	-	-
240	88524	2923	3.3
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
ANOVA de un factor	0.3446	No existen diferencias significativas entre grupos	

A la vista de los resultados del análisis de la varianza, la estabilidad de la emulsión no parece ser un factor que influya, al menos en las cuatro primeras horas, en la determinación de la actividad enzimática. La baja concentración de enzima unida a la gran cantidad de área interfacial disponible explican este hecho.

Además la estabilidad de la emulsión es considerable durante estas primeras 4 horas, como se pone de manifiesto en la Figura 5.9, donde se comparan las distribuciones de tamaño de una serie de emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) obtenidas, en este caso por dispersión mecánica (13000 rpm, 1min.) a distintos tiempos desde su preparación. La variación no es importante durante las cuatro primeras horas tras la preparación de la emulsión, por lo que puede utilizarse la misma emulsión para diferentes experimentos en un intervalo de al menos cuatro horas.

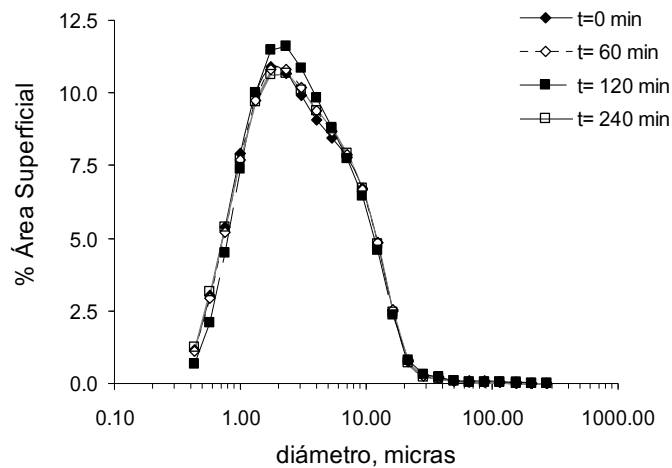


Figura 5.9. Distribuciones de tamaño de emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$, UltraTurrax 13000 rpm, 1 min.) en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

Así en cuanto a la influencia de las características de la emulsión en la actividad lipásica medida sobre tributirina cabe concluir que:

- 1) La aplicación de ultrasonidos, si bien consigue emulsiones menos polidispersas y con mayor área interfacial específica, conduce a valores de actividad lipásica significativamente inferiores. Aunque no es clara la razón de esta disminución, se prefiere la dispersión mecánica como medio de preparación de las emulsiones, optando por un minuto de tratamiento.
- 2) La estabilidad de las emulsiones no afecta, ni negativa ni positivamente, a la actividad enzimática, al menos hasta cuatro horas después de su preparación.

5.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA CON TRIOLEINA COMO SUSTRATO

La trioleína, triglicérido de cadena larga y completamente insoluble en agua, es un sustrato natural de las lipasas y resulta idóneo para el estudio de la actividad de estas enzimas (Jensen, 1983). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el ácido butírico, el ácido oleico es insoluble en agua y su equilibrio de reparto y de disociación es bastante más complejo y depende enormemente del pH del medio (Kaibara et al., 1997). Por ello cuando se emplea el método del pHstato se presentan fundamentalmente dos inconvenientes:

- El rango de pH al que se puede trabajar, de forma que se asegure la completa disociación del ácido oleico, es restringido. Si la disociación no es completa algunos autores consideran la valoración en continuo como muy imprecisa, incluso tras incluir un factor de corrección (Jensen, 1983; Beisson et al., 2000). Benzonana y Desnuelle (1968) cifran el pK del ácido oleico en las condiciones de medida de la actividad lipásica en aproximadamente 7.5 y Jensen (1983) considera que hasta un pH de al menos 9.0 el ácido oleico no se halla completamente disociado. Este valor depende de la fuerza iónica en el medio y de la presencia de iones calcio, lo que hace su estimación compleja y muy dependiente de las condiciones del ensayo.
- El propio ácido oleico tiene actividad interfacial, con lo que, especialmente si se encuentra disociado, tenderá a acumularse en la interfase de las gotas, provocando un rápido descenso de la actividad enzimática. Esto lo observan ya Benzonana y Desnuelle (1968).

Debido a esto, para la determinación de la actividad lipásica con trioleína como sustrato, se ha utilizado además del método del pHstato un método espectrofotométrico. Así se han podido comparar los resultados obtenidos mediante cada uno de ellos. Al igual que en el caso de la tributirina se ha estudiado el efecto de diversas variables sobre la actividad enzimática.

Todos los experimentos se realizaron a pH 7.0 y 30°C, usando tampón fosfato para la dilución de la enzima. La velocidad de adición de agente valorante (NaOH 0.05 N) en ausencia de enzima a pH 7.0 resultó aproximadamente igual a 0 en el intervalo 180 – 480 segundos.

5.2.1. Influencia de la concentración de enzima

Las curvas de hidrólisis de trioleína con diferentes concentraciones de Lipolase 100 se muestran en la Figura 5.10, donde se han representado también las rectas obtenidas

por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos. En la Tabla 5.7 se recogen los valores de actividad correspondientes calculados a partir de la pendiente de dichas rectas. Las emulsiones fueron obtenidas por dispersión mecánica (UltraTurrax 13000 rpm, 1 min.). Dado que el pH al que se realizaron las medidas fue 7.0, no todo el ácido oleico formado se disociará, por lo que el valor calculado no representará en este caso la actividad enzimática real. Para elegir la concentración de enzima adecuada se usó el mismo criterio que en el caso de la tributirina, es decir, que represente aproximadamente 1 LU/mL.

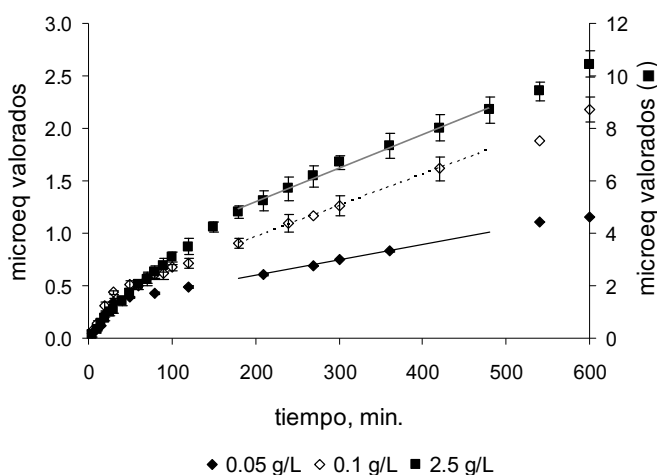


Figura 5.10. Curvas de hidrólisis de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) con tres concentraciones diferentes de la enzima Lipolase 100. Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos.

Tabla 5.7. Actividad de la enzima Lipolase 100 utilizando disoluciones de la misma de diferente concentración y trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato ($n \geq 3$).

e_{exp} , g/L	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %	e_{exp} , LU/mL
0.05	1658	53	3.2	0.02
0.10	1821	92	5.1	0.09
2.5	320	8.0	2.3	0.80

La concentración de enzima más adecuada resulta ser 2.5 g/L, pues equivale a 0.80 LU/mL, si bien la curva de hidrólisis no es lineal en esas condiciones, tal y como puede observarse en la Figura 5.10. En este caso no es posible encontrar una concentración de enzima que satisfaga ambos requerimientos: linealidad de la curva de hidrólisis y hallarse

en torno a 1.0 LU/mL. En principio, y dado que la dispersión de los resultados obtenidos para 2.5 g/L de enzima es pequeña y el ajuste a una recta en el intervalo 180 – 480 segundos es aceptable, se elige esta concentración. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la no linealidad de la curva de hidrólisis podría conducir a conclusiones erróneas si existe una discrepancia entre el efecto de una variable sobre la pendiente de la curva de hidrólisis calculada en el instante inicial y la calculada entre 180 y 480 segundos. Para evitar este problema se compararán en cualquier caso las curvas de hidrólisis completas, y no sólo los valores de actividad calculados de la forma expuesta.

En la Figura 5.11 se presentan y comparan las curvas de hidrólisis obtenidas con las enzimas LipoPrime 50T y Novozym 388. La actividad de cada una de ellas sobre trioleína se recoge en la Tabla 5.8. Las concentraciones empleadas para la medida de la actividad son en los dos casos 2 órdenes de magnitud más elevadas que las utilizadas cuando el sustrato es tributirina.

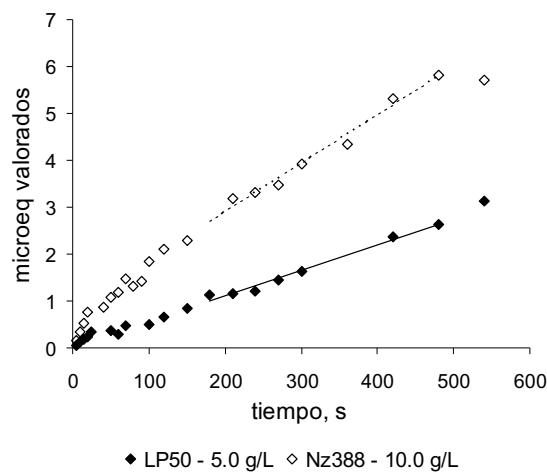


Figura 5.11. Curvas de hidrólisis obtenidas con las enzimas LipoPrime 50T (LP50, 5.0 g/L) y Novozym 388 (Nz388, 10.0 g/L) y una fracción en volumen de trioleína de 0.01. Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos.

Tabla 5.8. Concentración de las enzimas LipoPrime 50T y Novozym 388 para la medida de la actividad lipásica con trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) y valores de actividad obtenidos ($n \geq 2$).

Enzima	e_{exp} , g/L	Actividad media, LU/g	C.V., %	e_{exp} , LU/mL
LipoPrime 50T	5.0	70.7	6.5	0.35
Novozym 388	10.0	59.4	6.5	0.59

La actividad de las tres enzimas guarda entre sí la misma relación que en el caso de la tributirina:

$$\text{Actividad (Lipolase 100)} > \text{Actividad (LipoPrime 50T)} > \text{Actividad (Novozym 388)}$$

Se observa además que la velocidad de reacción en todos los casos disminuye con el tiempo, lo que puede indicar una inhibición de la enzima por los productos de la reacción.

5.2.2. Influencia de la concentración de sustrato

Al emplearse una mayor concentración de enzima en la determinación de la actividad lipásica con trioleína como sustrato, la fracción volumétrica de trioleína en la emulsión puede ser un factor crítico en la medida de la actividad. Para estudiar su influencia se midió la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.5$ g/L) utilizando dos fracciones volumétricas diferentes de trioleína (0.01 y 0.02), obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 5.9. Las emulsiones se prepararon por dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.).

Tabla 5.9. Actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.5$ g/L) medida sobre emulsiones con distinta fracción volumétrica de trioleína ($n \geq 3$).

α_{exp} v/v	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
0.01	458	30	6.5
0.02	492	48	9.6
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Igualdad de Varianzas	0.2819	No existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	0.1754	No existen diferencias significativas	

La ausencia de diferencias significativas en la actividad enzimática a dos concentraciones distintas de trioleína pone de manifiesto que, al igual que sucedía en el caso de la tributirina, la cantidad de sustrato o, más concretamente, su área interfacial tampoco parecen limitar la velocidad de hidrólisis. Esta observación se confirma por la total coincidencia de ambas curvas de hidrólisis, mostradas en la Figura 5.12.

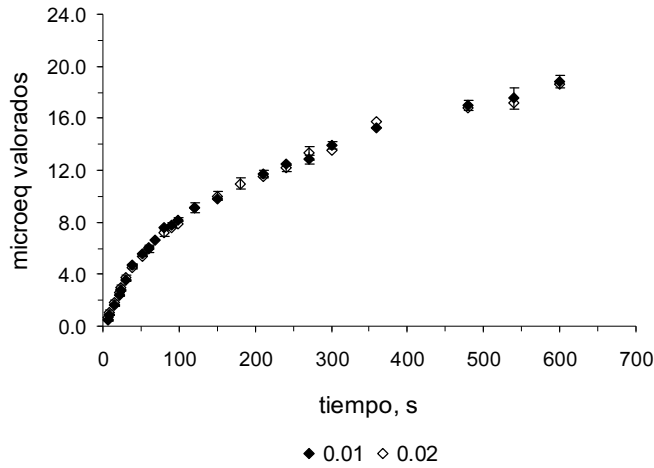


Figura 5.12. Curvas de hidrólisis obtenidas con distintas fracciones volumétricas de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$ y 0.02) y con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.5$ g/L).

Por tanto una fracción volumétrica de trioleína de 0.01 resulta suficiente para la determinación de la actividad enzimática. Sin embargo, el empleo de una mayor concentración de trioleína, manteniendo constante la cantidad de goma arábica, disminuye la eficacia de la emulsificación, como se aprecia en las distribuciones de tamaño presentadas en la Figura 5.13. El porcentaje de gotas de tamaño superior a 7.0 micras se incrementa considerablemente al aumentar la fracción volumétrica de trioleína de 0.01 a 0.05. De cualquier forma, la emulsión con mayor fracción volumétrica presenta la mayor área interfacial específica ($5.210 \cdot 10^5$ frente a $2.240 \cdot 10^5$ cm^2/L), lo cual muestra claramente que este parámetro no es un factor limitante de la actividad enzimática cuando se usa una fracción volumétrica de trioleína igual a 0.01 y una solución de la enzima Lipolase 100 de 2.5 g/L.

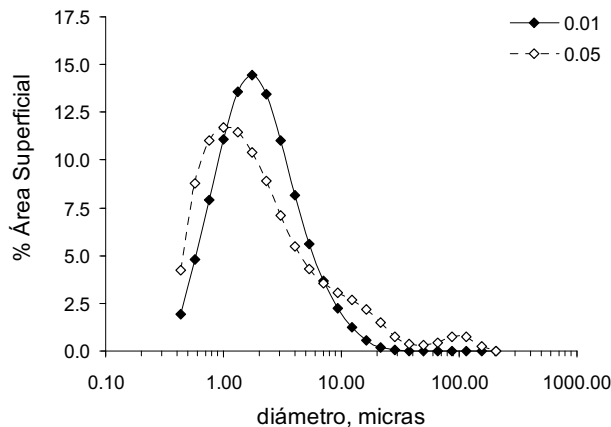


Figura 5.13. Distribuciones de tamaño de emulsiones de trioleína con distintas fracciones volumétricas ($\alpha_{exp}=0.01$ y 0.05) obtenidas mediante dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min) y con 1.0 g/L de goma arábica.

5.2.3. Influencia de las características de la emulsión en la actividad.

Las características de la emulsión de trioleína que se emplean para la medida de la actividad lipásica y su efecto sobre ésta, han sido también estudiados. Además, como ya se ha indicado, la disponibilidad de área interfacial puede resultar un factor más crítico que en el caso de la tributirina, al emplearse una mayor concentración de enzima. Para verificar este aspecto se ha medido la actividad lipásica sobre trioleína utilizando distintas técnicas para preparar la emulsión así como en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

5.2.3.1. Influencia del método de preparación de la emulsión.

En la Tabla 5.10 se presentan los valores de actividad de la enzima Lipolase 100 obtenidos con emulsiones de trioleína preparadas tanto por ultrasonidos como por dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.).

Tabla 5.10. Influencia del método de preparación de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.5$ g/L) medida sobre trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) ($n \geq 7$).

Método de preparación	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
Ultrasonidos 1 min.	367	35	9.6
Dispersión 13000 rpm, 1 min.	320	8	2.3
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Igualdad de Varianzas	$6.858 \cdot 10^{-5}$	Existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	2.447	No existen diferencias significativas	

La comparación de los valores medios de la actividad mediante un test de contraste de hipótesis para varianzas desiguales pone de manifiesto que en este caso no existen diferencias significativas entre ellos, a diferencia de lo que sucedía con la tributirina. Sin embargo, la elevada dispersión que presentan los resultados obtenidos mediante ultrasonidos parece ser la responsable de esta conclusión, tal y como se pone de manifiesto en las curvas de hidrólisis correspondientes, las cuales se comparan en la Figura 5.14. La concentración de enzima es en este caso bastante elevada, pudiendo ser cercana a la necesaria para saturar la interfase, lo que hace que la actividad sea más sensible a los cambios en el área interfacial disponible.

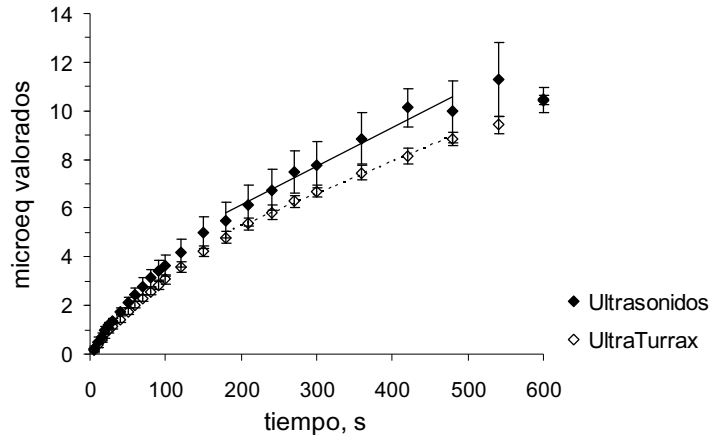


Figura 5.14. Curvas de hidrólisis obtenidas con emulsiones de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) preparadas mediante ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.) y con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L). Las líneas rectas representan la recta obtenida por regresión de los datos entre 180 y 480 segundos.

Sin embargo, si se comparan las distribuciones de tamaño de las emulsiones obtenidas mediante una y otra técnica, Figura 5.15, se observa que, aunque las emulsiones obtenidas mediante ultrasonidos presenten menor polidispersidad y mayor área interfacial específica ($4.785 \cdot 10^5$ frente a $2.240 \cdot 10^5$ cm^2/L), el incremento de ésta última no debería suponer un aumento de la actividad, de acuerdo con los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la concentración de sustrato. Lo que sí puede influir es la distribución de tamaños de gota, si se admite una dependencia entre la velocidad de hidrólisis y el diámetro de las gotas de trioleína, tal como observan Fritz et al. (2004) con la lipoproteína lipasa. En cualquier caso esta posibilidad sólo puede ser apuntada a partir de nuestros resultados pero no investigada en mayor profundidad, dada la polidispersidad de las emulsiones obtenidas, especialmente por dispersión mecánica (UltraTurrax).

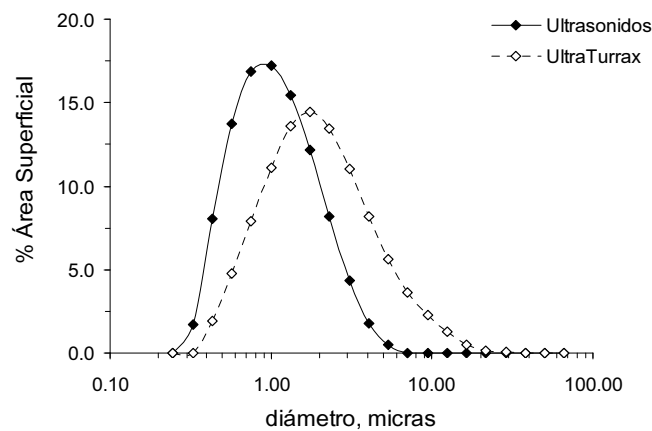


Figura 5.15. Distribuciones de tamaño de emulsiones de trioleína ($e_{exp}=0.01$) obtenidas mediante ultrasonidos y dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.)

5.2.3.2. Influencia de la estabilidad de la emulsión.

En la Figura 5.16 se presentan las curvas de hidrólisis de trioleína con la enzima Lipolase 100 obtenidas con la misma emulsión, preparada con ultrasonidos, en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

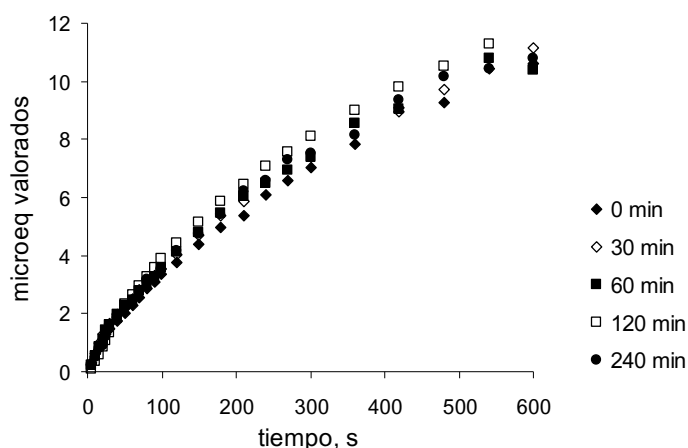


Figura 5.16. Curvas de hidrólisis de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.50$ g/L) en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la emulsión (ultrasonidos).

Los valores de actividad calculados a partir de las curvas de hidrólisis representadas en la Figura 5.16 se recogen en la Tabla 5.11. La aplicación del análisis de la varianza, cuyos resultados se muestran en la misma tabla, indica la ausencia de diferencias significativas en los valores de actividad obtenidos en función del tiempo. Por ello se puede descartar que la desestabilización de la emulsión, dentro de las primeras cuatro horas desde su preparación, influya de manera significativa en la actividad enzimática determinada sobre ella.

Tabla 5.11. Influencia de la estabilidad de la emulsión en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.50$ g/L) medida sobre trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$). La emulsión fue preparada mediante ultrasonidos ($n \geq 2$).

Tiempo transcurrido desde preparación emulsión, min.	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
0	346	30	8.8
30	351	-	-
60	347	35	10.1
120	379	-	-
240	330	35	10.8
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
ANOVA de un factor	0.8237	No existen diferencias significativas entre grupos	

La razón de este comportamiento puede atribuirse a que la desestabilización de la emulsión en este intervalo de tiempo es casi inapreciable, como se aprecia en la Figura 5.17, donde se comparan las distribuciones de tamaño de emulsiones de trioleína obtenidas por dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.) hasta 3 horas después de su preparación.

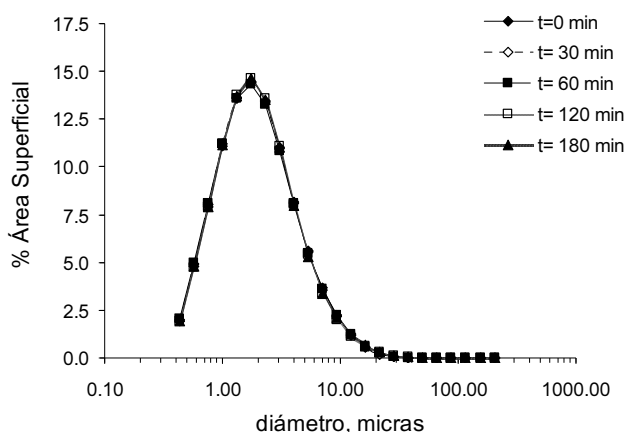


Figura 5.17. Distribuciones de tamaño de emulsiones de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) a distintos tiempos desde su preparación.

5.2.4. Determinación de la actividad lipásica mediante un método colorimétrico.

El equilibrio de reparto del ácido oleico en el sistema en que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática de trioleína es sin duda complejo. Al tratarse de un sistema binario, con una fase acuosa y otra grasa, el ácido oleico liberado en el transcurso de la hidrólisis podrá pasar a la fase orgánica, a la acuosa o quedar adsorbido en la interfase. En la fase acuosa o en la interfase puede a su vez disociarse, lo cual dependerá del pH del medio, y agruparse formando diversos agregados. Kaibara et al. (1997) han estudiado el comportamiento fásico del sistema oleato sódico-agua en función del pH mediante turbidimetría y espectrofotometría de correlación fotónica. Según sus resultados el ácido oleico no se encuentra completamente disociado hasta un pH igual o superior a 10.5, condiciones en las que se encuentra en forma de micelas que presentan gran tendencia a unirse entre sí dando lugar a agregados de tamaño superior. Al acidificarse el medio el tamaño de dichos agregados va creciendo, apareciendo una nueva fase constituida por jabones ácidos de estructura $OI(Na^+)3OIH$, donde $OI($ representa el anión oleato. Finalmente a pH inferior a 8.5 se aprecia a simple vista la aparición una fase oleosa

constituida por gotas de ácido oleico puro. Sin embargo en nuestro caso el sistema resulta aún más complejo por la presencia una fase orgánica adicional: la trioleína.

En cualquier caso, sólo el ácido oleico presente en la fase acuosa y disociado será detectado por el método del pHstato, por lo que los valores de actividad obtenidos mediante dicha técnica a pH 7.0 son sólo válidos a efectos comparativos, pero no representan la actividad real de las enzimas estudiadas. Para contrastar dichos resultados se ha seguido la reacción analizando el contenido de ácido oleico en el medio mediante un método colorimétrico (Kwon y Rhee, 1986). Dicho método permite detectar la totalidad del ácido oleico presente, pero tiene los inconvenientes de no permitir la medida en continuo y ser mucho más laborioso que el método del pHstato. Por esta razón se ha empleado con fines comparativos y para estimar la actividad real de la enzima sobre la trioleína.

En la Figura 5.18 se muestran las curvas de hidrólisis obtenidas por ambos métodos a pH 7.0, para la hidrólisis enzimática de trioleína con Lipolase 100. El método colorimétrico permite detectar una cierta cantidad de ácido oleico, o de algún otro ácido graso que reaccione con las sales de cobre, inicialmente presente en la trioleína como impureza. Lógicamente esto no puede ser detectado mediante el método del pHstato. Por lo demás la forma de ambas curvas de hidrólisis es similar, reflejando un descenso de la velocidad de reacción con el tiempo.

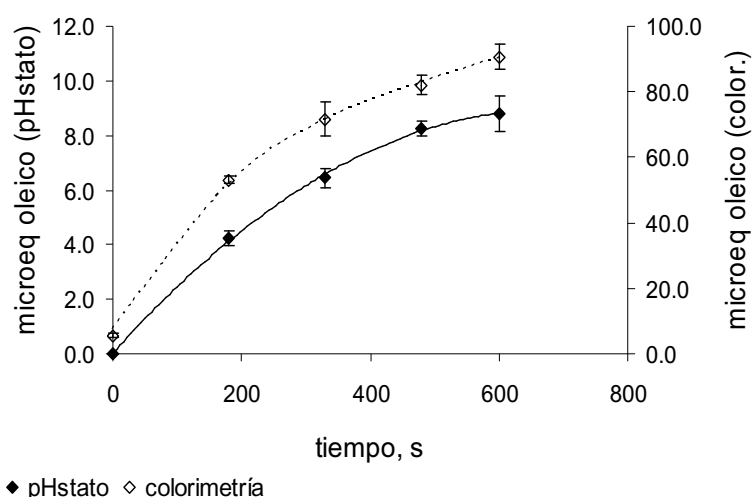


Figura 5.18. Evolución de la cantidad de ácido oleico generada en la hidrólisis enzimática de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) con Lipolase 100 ($e_{exp}=2.5$ g/L) a pH 7.0. Comparación del pHstato con el método colorimétrico. Las líneas son ajustes de los datos a polinomios de 3^{er} grado.

Si se calcula la actividad enzimática a partir de la pendiente de la curva de hidrólisis entre 180 y 480 segundos se llega a unos valores de 320.5 y 2304 LU/g con el método del pHstato y el colorimétrico respectivamente. Sin embargo dada la forma de las curvas de hidrólisis de trioleína en el intervalo estudiado, la actividad enzimática debe estimarse a partir de la pendiente a tiempo 0 de la curva de hidrólisis, que es la que representa la velocidad inicial de reacción. El valor estimado, usando un polinomio de tercer grado para el ajuste de los datos obtenidos mediante el método colorimétrico, es de 8859 LU/g, mucho más bajo que el obtenido cuando se usa tributirina como sustrato.

Este resultado está en consonancia con los de Martinelle et al. (1996) y Tiss et al. (2001). Estos últimos autores encuentran que la actividad de la lipasa de *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa*, microorganismo del que procede la Lipolase 100, es de 2 a 8 veces superior sobre triglicéridos de cadena corta (tributirina) o media (trioctanoína) que sobre los de cadena larga (aceite de soja natural y refinado y aceite de oliva natural). Dado que según la revisión realizada por Xu (2000) la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* no presenta una marcada acilespecificidad, es decir, preferencia por una determinada longitud de cadena del ácido graso, la menor actividad registrada sobre triglicéridos de cadena larga puede ser achacable al efecto inhibitorio de sus ácidos grasos constitutivos, de mayor actividad interfacial, que a la especificidad de la enzima.

Un dato interesante que puede ser estimado a partir de los resultados presentados en la Figura 5.18 es el porcentaje de ácido oleico detectado por el pHstato, respecto del total presente en el medio, determinado mediante el método colorimétrico. Las cantidades obtenidas en función del tiempo de reacción se muestran en la Tabla 5.12. Aunque parece existir una ligera tendencia al alza en función del tiempo, se admitirá que el resultado es independiente del momento de la reacción en que se determine, siendo su media $9.96 \pm 0.78\%$.

Tabla 5.12. Porcentaje de ácido oleico presente en el medio que es detectado por el método del pHstato a diferentes tiempos durante la hidrólisis de trioleína a pH 7.0 (n=3)

Tiempo, s	Porcentaje de ácido detectado.
0	0 (no puede detectar)
180	$8.9 \pm 0.3\%$
330	$9.8 \pm 0.3\%$
480	$10.8 \pm 0.1\%$
600	$10.4 \pm 0.4\%$

Este mismo procedimiento se ha llevado a cabo a diferentes valores de pH, lo que ha permitido obtener el porcentaje detectado en función del pH, tal y como se recoge en la Figura 5.19. Los resultados se comparan en la misma figura con los obtenidos por Hoppe y Theimer (1996), los cuales llevaron a cabo la valoración del ácido oleico en presencia de un 3% de goma arábica, pero sin trioleína. Puede observarse que ambas curvas concuerdan en un alto grado, lo que pone de manifiesto que la disociación del ácido es el principal factor limitante en el seguimiento de la hidrólisis enzimática de trioleína mediante el método del pHstato a pH inferior a 9.5.

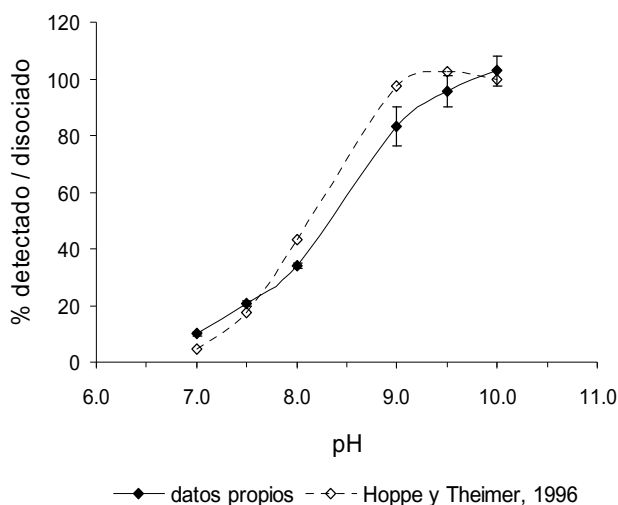


Figura 5.19. Porcentaje de ácido oleico detectado mediante la técnica del pHstato respecto del determinado colorimétricamente, en función del pH del medio. Se muestran también los resultados obtenidos por Hoppe y Theimer (1996).

A partir de los resultados presentados en la Figura 5.19 se puede obtener una expresión para estimar la cantidad de ácido oleico detectado por el método del pHstato en función del pH. Dicha expresión se recoge en la ecuación V.2. y es válida en las condiciones utilizadas en los ensayos de actividad con trioleína y a pH entre 7.0 y 10.0.

$$\%(\text{Oleico Detectado}) = -6.9317pH^3 + 175.58pH^2 - 1436.2pH + 3837.9 \quad \text{V.2}$$

Por otra parte si se analizan los coeficientes de distribución (D) del ácido oleico (OIH) en el sistema octanol-agua, dados por la ecuación V.3, en función del pH, Tabla 5.13, se aprecia claramente que en todo el intervalo de pH utilizado en los experimentos de hidrólisis el ácido se distribuye mayoritariamente en la fase orgánica. Extrapolando estos datos al sistema trioleína-ácido oleico se puede concluir que, en las condiciones experimentales que se dan durante la hidrólisis enzimática, es el equilibrio de disociación

y no el de reparto el que influye decisivamente en la detección potenciométrica del ácido oleico.

$$D = \frac{[OIH]_{octanol} + [OI^-]_{octanol}}{[OIH]_{agua} + [OI^-]_{agua}} \quad V.3$$

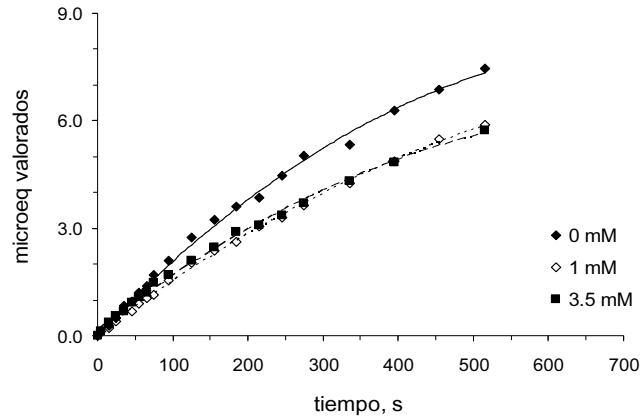
Tabla 5.13. Coeficientes de distribución (D) del ácido oleico en el sistema octanol-agua en función del pH.

pH	logD
1	7.70
4	7.63
7	5.48
8	4.53
10	3.63

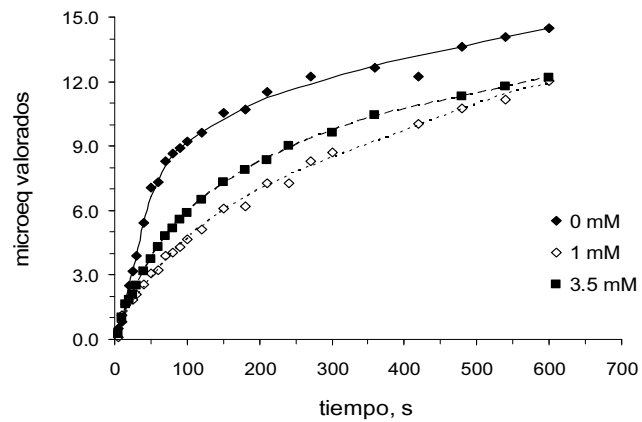
5.2.5. Influencia de la concentración de ácido oleico en la emulsión.

El ácido oleico actúa como un inhibidor de la lipólisis enzimática (Benzonana y Desnuelle, 1968) y su generación puede ocasionar el descenso de la velocidad de reacción que se observa en la hidrólisis enzimática de trioleína (Figura 5.10) aun en sus momentos iniciales.

Para verificar este último aspecto se ha medido la actividad de la enzima Lipolase 100 sobre trioleína en presencia de distintas cantidades de ácido oleico añadido a la emulsión. Hay que tener en cuenta que la trioleína utilizada contiene inicialmente una pequeña cantidad de ácido oleico u otro ácido graso reactivo a las sales de cobre (1.12%). Los experimentos se han llevado a cabo a distinto pH para estudiar también el posible efecto de la disociación del ácido. En la Figura 5.20 se muestran las curvas de hidrólisis en presencia de ácido oleico añadido (1 mM y 3.5 mM) y en su ausencia, a pH 7.0 y 8.0.



(a)



(b)

Figura 5.20. Curvas de hidrólisis de trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) con la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=2.50$ g/L) en presencia (1mM y 3.5 mM) y en ausencia de ácido oleico y a distinto pH: (a) pH=7.0; (b) pH=8.0. Las emulsiones han sido obtenidas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.).

La velocidad inicial de hidrólisis disminuye con la adición del ácido oleico independientemente del pH al que se lleve a cabo la reacción. Sin embargo el aumento de la cantidad de oleico añadida al medio no se traduce en una disminución equivalente de la velocidad inicial de hidrólisis, al contrario, ésta crece al pasar de 1 mM a 3.5 mM, tal y como se aprecia en la Tabla 5.14, donde se muestran los valores de la pendiente en el origen de la curva de hidrólisis (valor medio \pm desviación estándar) en presencia y ausencia de ácido oleico (1.0 y 3.5 mM) en el medio y a pH 7.0 y 8.0. Por otro lado, la disminución en la velocidad inicial de reacción es más acusada a pH 8.0 que a pH 7.0 (un 78.3% frente a un 37.8% respectivamente, para una concentración de ácido oleico de 1.0 mM).

Tabla 5.14. Variación de la velocidad inicial de hidrólisis de trioleína en función de la concentración inicial de ácido oleico (C_{ol}) añadido a la emulsión ($n=3$)

	$C_{ol} = 0.0 \text{ mM}$	$C_{ol} = 1.0 \text{ mM}$	$C_{ol} = 3.5 \text{ mM}$
pH	V_{ini} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	V_{ini} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	V_{ini} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
7.0	1.5 ± 0.1	0.90 ± 0.04	1.3 ± 0.1
8.0	12.9 ± 0.8	2.8 ± 0.3	5.8 ± 0.2

Estos resultados permiten extraer dos conclusiones:

1. La acción inhibitoria del ácido oleico está condicionada por su equilibrio de distribución en el medio de reacción, y particularmente por la cantidad del mismo presente en la interfase. Una vez saturada la interfase, posteriores adiciones de ácido no influyen negativamente en la velocidad de reacción.
2. El grado de disociación del ácido, que es superior a pH 8.0 que a 7.0, parece jugar también un papel importante en su capacidad para inhibir la lipólisis. Este hecho puede explicarse por la adsorción del ácido ionizado en la interfase, posición que, debido a sus propiedades tensioactivas, tendrá una mayor tendencia a ocupar. Esto traerá consigo una acumulación de carga negativa en la interfase y un debilitamiento de la interacción enzima-interfase, ya que según Skagerlind et al. (1995), las lipasas interaccionan más débilmente con interfases cargadas negativamente.

5.3. ESTUDIO DE LA DESACTIVACIÓN DE LAS LIPASAS.

De cara a su aplicación práctica no basta con que una enzima sea más activa que otra sobre un sustrato determinado, además es necesario que dicha actividad se mantenga inalterada durante el mayor tiempo posible en las condiciones de uso de la enzima.

Un estudio teórico que pone de manifiesto la importancia de este aspecto lo realiza Misset (1997) para la aplicación de las lipasas en formulaciones detergentes, mostrando claramente como la eficacia de una enzima en un proceso detergente está directamente relacionada con su actividad y estabilidad en las condiciones de lavado. En este sentido este mismo autor resalta la conveniencia de realizar experimentos diagnósticos para conocer la estabilidad de las enzimas en las condiciones que se dan en el sistema de lavado.

En este apartado se analiza en primer lugar la desactivación de las tres lipasas estudiadas en condiciones similares a las de lavado (agitación constante y diferentes

temperaturas). A continuación se analiza la desactivación con la temperatura y la velocidad de agitación de la enzima Lipolase 100.

5.3.1. Desactivación enzimática en condiciones de lavado

Para estudiar la posible desactivación de las lipasas Lipolase 100, LipoPrime 50T y Novozym 388 en condiciones de lavado se ha sometido una solución de las mismas en tampón fosfato de la misma concentración que la empleada en el ensayo de actividad a agitación a velocidad constante (1000 rpm) y a diferentes temperaturas (30, 40 y 50°C), para simular las condiciones existentes en un dispositivo de lavado automático. Periódicamente se tomaron muestras de la solución enzimática para llevar a cabo ensayos de actividad con las mismas.

5.3.1.1. Ensayos con la enzima Lipolase 100

Los resultados obtenidos para la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) a distintas temperaturas y empleando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato se muestran en la Figura 5.21. Se presentan en cada caso los valores de la actividad relativa, definida como la relación porcentual entre la actividad en un momento determinado y la inicial (a tiempo 0).

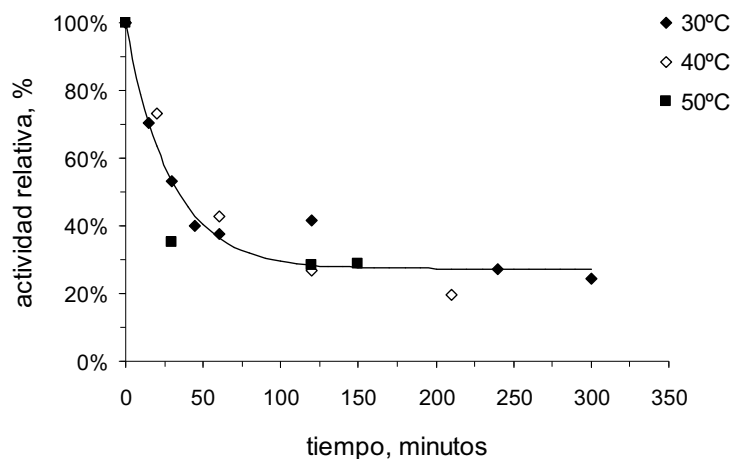


Figura 5.21. Desactivación de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las emulsiones se prepararon por ultrasonidos (1 min.). La línea representa el ajuste de todos los puntos experimentales a un modelo de desactivación parcial de primer orden.

En las condiciones experimentales utilizadas la desactivación de la enzima Lipolase 100 parece no depender de la temperatura y responder a un modelo de desactivación parcial de primer orden, puesto que se alcanza una actividad final constante y distinta de 0.

Suponiendo dicho modelo, la velocidad de desactivación vendría dada por la ecuación V.4, donde A representa la actividad (LU/g), k_d la constante de desactivación (min^{-1}) y A_{res} (LU/g) la actividad residual.

$$-\frac{dA}{dt} = k_d (A - A_{res}) \quad \text{V.4}$$

Integrando la ecuación V.4 entre el instante inicial ($t=0$), en el que la actividad será igual a A_0 , y un instante cualquiera, se obtiene la ecuación V.5:

$$\frac{A}{A_0} = \left(1 - \frac{A_{res}}{A_0}\right) \exp(-k_d \cdot t) + \frac{A_{res}}{A_0} \quad \text{V.5}$$

Dado que el cociente A/A_0 representa a la actividad relativa, se puede aplicar directamente la ecuación V.5 a los datos mostrados en la Figura 5.21., considerando como parámetros k_d y A_{res} . Para determinar los valores de dichos parámetros se ha utilizado la herramienta de optimización Solver de Microsoft Excel® de modo que se minimice la suma del valor absoluto de los residuos.

En la Tabla 5.15 se muestran los valores de las constantes encontradas para cada temperatura por separado y con todos los puntos en conjunto. Para medir la bondad del ajuste se ha calculado la desviación relativa a partir de la ecuación V.6, donde los subíndices “exp” y “cal” designan los valores experimentales y los calculados por el modelo respectivamente.

$$\text{desv. rel.} = \frac{\sum \left| \left(\frac{A}{A_0} \right)_{\text{exp}} - \left(\frac{A}{A_0} \right)_{\text{cal}} \right|}{\sum \left(\frac{A}{A_0} \right)_{\text{exp}}} \times 100 \quad \text{V.6}$$

Tabla 5.15. Constante de desactivación y actividad residual relativa en función de la temperatura para la enzima LipoPrime 50T ($e_{\text{exp}}=0.03$ g/L) empleando tributirina ($\alpha_{\text{exp}}=0.01$) como sustrato.

Temperatura	k_d, min^{-1}	A_{res}/A_0	desviación relativa
30°C	0.035	27.3%	5.2%
40°C	0.020	18.2%	0.5%
50°C	0.080	28.6%	0.0%
Todos los puntos	0.035	27.3%	9.9%

Ni la constante de desactivación ni la actividad residual relativa (A_d/A_{res}) parecen seguir una tendencia definida con la temperatura, siendo por otro lado el ajuste conjunto de todos los puntos bastante satisfactorio teniendo en cuenta la dispersión de los datos experimentales (Figura 5.21). Por esta razón puede afirmarse que la temperatura no es el factor determinante en la desactivación de la enzima Lipolase 100 entre 30 y 50°C en las condiciones experimentales utilizadas.

5.3.1.2. Ensayos con la enzima LipoPrime 50T

En la Figura 5.22 se presentan los valores de actividad en función del tiempo de conservación de la enzima LipoPrime 50T (0.03 g/L) en las condiciones ya descritas, medidos utilizando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato.

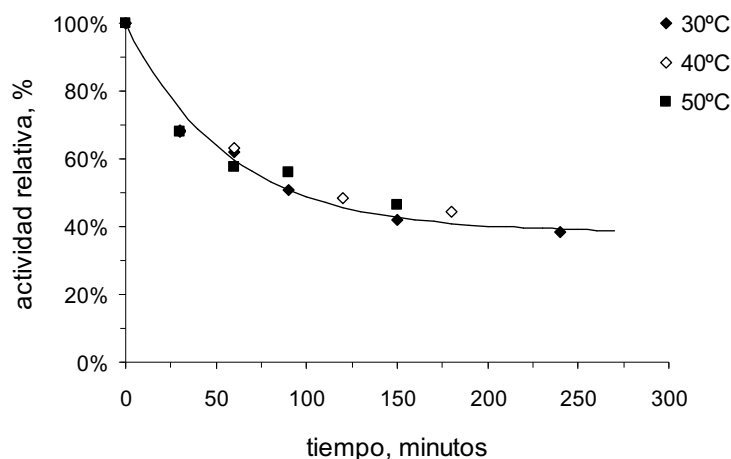


Figura 5.22. Desactivación de la enzima LipoPrime 50T ($e_{exp}=0.03$ g/L) medida sobre emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las emulsiones se prepararon por ultrasonidos (1 min.). La línea representa el ajuste de todos los puntos experimentales a un modelo de desactivación parcial de primer orden.

Al igual que en el caso de la enzima Lipolase 100 la desactivación también parece responder a una cinética parcial de primer orden y ser independiente de la temperatura. Las constantes cinéticas para dicho modelo en función de la temperatura y considerando todos los puntos en el ajuste se presentan en la Tabla 5.16.

Tabla 5.16. Constante de desactivación y actividad residual relativa en función de la temperatura para la enzima LipoPrime 50T ($e_{exp}=0.03$ g/L) empleando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato.

Temperatura	k_d, min^{-1}	A_{res}/A_0	desviación relativa
30°C	0.017	37.5%	2.5%
40°C	0.015	38.3%	3.3%
50°C	0.025	44.8%	4.3%
Todos los puntos	0.018	38.4%	5.0%

La falta de tendencia en los parámetros cinéticos calculados y el satisfactorio ajuste de los puntos obtenidos a diferentes temperaturas de forma conjunta, parece indicar que la temperatura no es nuevamente el factor determinante en la desactivación de la enzima LipoPrime 50T en las condiciones experimentales utilizadas.

5.3.1.3. Ensayos con la enzima Novozym 388

Los resultados correspondientes a la desactivación de la enzima Novozym 388, en las mismas condiciones empleadas para las otras enzimas, se muestran en la Figura 5.23.

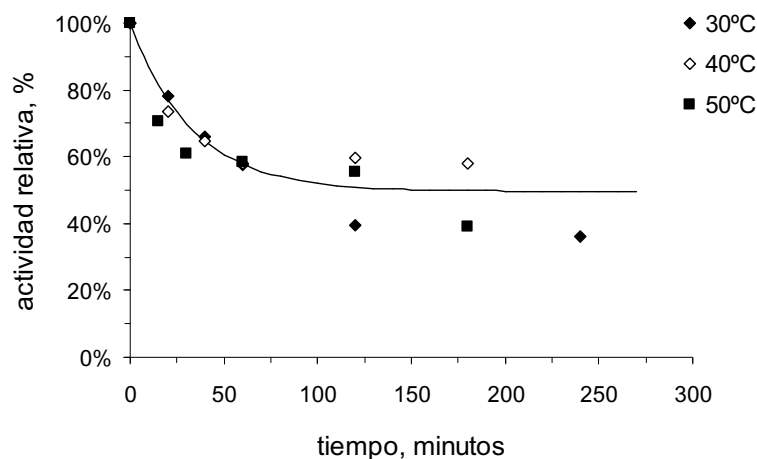


Figura 5.23. Desactivación de la enzima Novozym 388 ($e_{exp}=0.05$ g/L) medida sobre emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las emulsiones se prepararon por ultrasonidos (1 min.). La línea representa el ajuste de todos los puntos experimentales a un modelo de desactivación parcial de primer orden.

Aunque la dispersión de los datos experimentales, sobre todo para tiempos por encima de 60 minutos, es bastante elevada, tampoco parece existir un comportamiento diferente en función de la temperatura. Por tanto, tiene sentido realizar un ajuste conjunto de los resultados. Las constantes cinéticas para cada una de las temperaturas ensayadas, así como para las tres en conjunto, se muestran en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Constante de desactivación y actividad residual relativa en función de la temperatura para la enzima Novozym 388 ($e_{exp}=0.05$ g/L) empleando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato.

Temperatura	k_d , min ⁻¹	A_{res}/A_0	desviación relativa
30°C	0.018	35.4%	1.6%
40°C	0.050	57.9%	1.1%
50°C	0.072	55.4%	4.7%
Todos los puntos	0.030	49.7%	8.3%

Sí parece observarse en este caso un aumento de la constante k_d con la temperatura, que podría indicar que la enzima Novozym 388 es más sensible al efecto de dicha variable en el intervalo ensayado que las otras dos enzimas.

En la Figura 5.24 se comparan los resultados experimentales de actividad relativa con los calculados mediante la ecuación V.5 para el conjunto de los datos (30°C, 40°C y 50°C) y las tres enzimas. La desviación media entre valores predichos y experimentales es inferior al 10%.

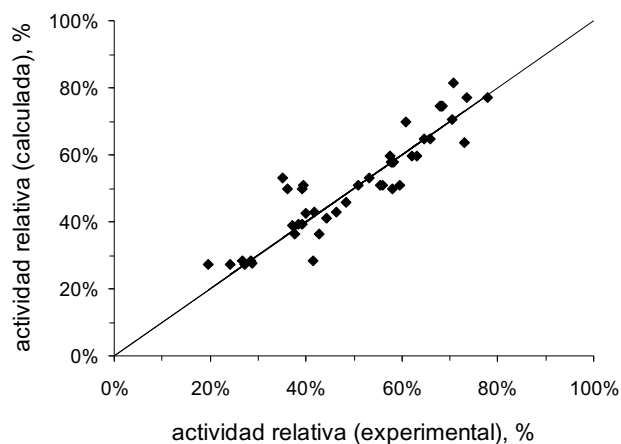


Figura 5.24. Valores de actividad relativa predichos por la ecuación V.5 frente a los experimentales para todas las temperaturas y enzimas ensayadas

5.3.1.4. Comparación del comportamiento de las tres enzimas estudiadas

En general parece cumplirse para las tres enzimas estudiadas que la temperatura, en el intervalo 30-50°C, no influye considerablemente en la desactivación observada. En todos los casos se observa una disminución inicial de la actividad enzimática, la cual

permanece constante a partir de los 100 minutos aproximadamente. Esta pérdida de actividad podría deberse a la agitación, o a algún factor relacionado con la misma.

En cualquier caso para identificar la enzima que sufre la menor alteración de sus propiedades catalíticas en las condiciones experimentales empleadas habría que tener en cuenta dos elementos:

- 1) La velocidad de desactivación y la actividad residual relativa, que podemos cuantificar a partir de los parámetros del modelo aplicado y que resultan en cualquier caso más desfavorables para la enzima Lipolase 100, ya que presenta una mayor constante de desactivación y una menor actividad residual relativa (usando el ajuste conjunto de los datos).
- 2) La actividad inicial de la enzima, que resulta considerablemente superior para la enzima Lipolase 100.

Para poder elegir la enzima más adecuada desde este punto de vista hay que cuantificar la influencia de ambos elementos de forma conjunta. Si consideramos que un ciclo de lavado de superficies duras difícilmente supondrá más de 60 minutos (es incluso de 2 ó 3 minutos en el caso de lavavajillas industriales), una forma de cuantificar la eficacia de la enzima es hallar el área bajo la curva de desactivación entre 0 y 60 minutos y multiplicarla por su actividad inicial. En otras palabras, se trata de integrar la actividad enzimática en el tiempo.

Para hacer esto se ha integrado la ecuación V.5 para cada enzima entre 0 y 60 minutos, utilizando los parámetros determinados a partir del ajuste conjunto de los datos. Los resultados, junto con la actividad inicial a 30°C de cada una de las enzimas y el producto de ambas cantidades se muestran en la Tabla 5.18.

Tabla 5.18. Integración de la actividad enzimática a 30°C entre 0 y 60 minutos para las tres enzimas estudiadas.

Enzima	A_0 (30°C), LU/g	Área bajo curva entre 0 y 60 min., min.	Actividad en el tiempo, (LU/g)·min
Lipolase 100	84213	34.8	$2.927 \cdot 10^6$
LipoPrime 50T	27334	45.9	$1.254 \cdot 10^6$
Novozym 388	20198	43.7	$8.826 \cdot 10^5$

Bajo este punto de vista la enzima Lipolase 100 es, de las tres enzimas estudiadas, la que presenta una mayor eficacia en las condiciones experimentales utilizadas. Por esta razón, en lo que sigue, se utilizará esta enzima para estudiar su estabilidad, propiedades

y eficacia detergente, así como la cinética de la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsiones O/W.

Para conocer los mecanismos implicados en la desactivación de la enzima Lipolase 100 es preciso estudiar de forma separada la influencia de la temperatura y de la agitación en dicho fenómeno.

5.3.2. Estabilidad de la enzima Lipolase 100 a distintas temperaturas.

La actividad de la enzima Lipolase 100 se ha medido en función del tiempo de conservación de la misma a cuatro temperaturas diferentes: 30, 40, 50 y 60°C. Para ello se ha mantenido una solución de la enzima en tampón fosfato, en completo reposo, a la temperatura deseada durante 2 horas, tomándose muestras periódicamente y midiendo la actividad de las mismas sobre tributirina.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 5.25. En este caso la desactivación parece responder a un modelo de orden cero (velocidad de desactivación constante), y, tal como se esperaba, tiene poca importancia para temperaturas inferiores a 60°C. Las líneas rectas que se muestran en la figura corresponden al ajuste al modelo de orden 0, que viene dado por la ecuación V.7, cuya forma integrada es la ecuación V.8.

$$-\frac{dA}{dt} = k_{dt} \tag{V.7}$$

$$A = A_0 - k_{dt} \cdot t \tag{V.8}$$

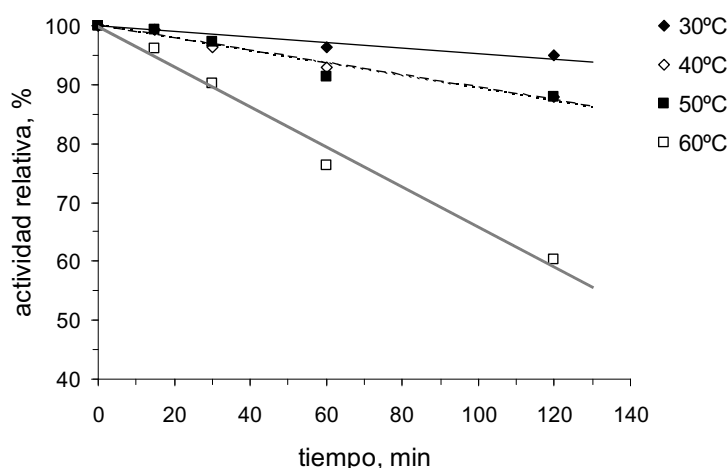


Figura 5.25. Desactivación térmica de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las emulsiones se prepararon por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.). Las líneas representan el ajuste a un modelo de desactivación de orden cero, para cada temperatura.

Los valores encontrados, mediante regresión lineal, para las constantes cinéticas se muestran en la Tabla 5.19. La desviación relativa, calculada de forma análoga a la expuesta en la ecuación V.6, es en todos los casos muy baja, lo que confirma la bondad del ajuste.

De cualquier forma, dado que la desactivación parece ser poco significativa por debajo de 60°C se ha utilizado el análisis de la varianza con el fin de verificar si existen diferencias significativas entre los datos de actividad en función del tiempo para cada temperatura. Los resultados muestran que a 30°C no existen diferencias significativas, por los que únicamente a partir de 40°C cobra importancia la desactivación térmica.

Tabla 5.19. Constante de desactivación térmica de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) empleando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato.

Temperatura	k_{dt} , min ⁻¹	desviación relativa
30°C	0.047	1.2%
40°C	0.105	0.5%
50°C	0.108	1.0%
60°C	0.342	1.5%

El ajuste de la constante de desactivación obtenida en función de la temperatura a la ecuación de Arrhenius (ecuación V.9), que se muestra en la Figura 5.26, conduce a la obtención de la energía de activación aparente para la desactivación enzimática la cual resulta ser igual a 13.2 Kcal/mol.

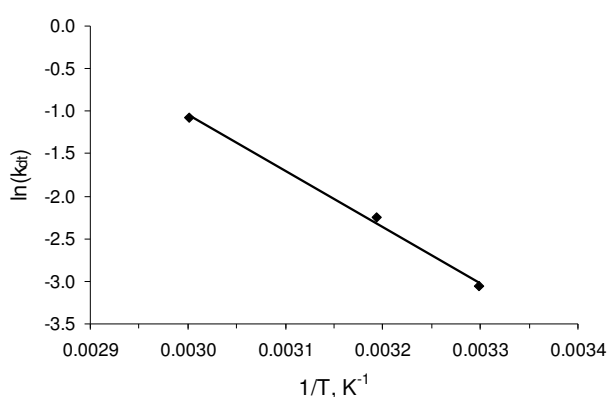


Figura 5.26. Variación de la constante k_{dt} con la temperatura. Ajuste a la ecuación de Arrhenius. (Se ha eliminado el valor correspondiente a 50°C, que se desvía de la tendencia que presentan los restantes).

$$k_{dt} = Be^{\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)}$$

5.3.3. Estabilidad de la enzima Lipolase 100 en función de la velocidad de agitación

Una vez descartado que la desactivación térmica de la enzima Lipolase 100 sea apreciable a temperaturas inferiores a 40°C, queda estudiar el papel de la agitación mecánica en la desactivación de dicha enzima.

Para ello se mantuvo una solución de la enzima Lipolase 100 (0.01 g/L) sometida a agitación a diferentes velocidades (300 – 900 rpm) y a temperatura ambiente (25°C). En distintos momentos se tomaron muestras y se determinó la actividad lipásica de las mismas. De esta forma se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 5.27.

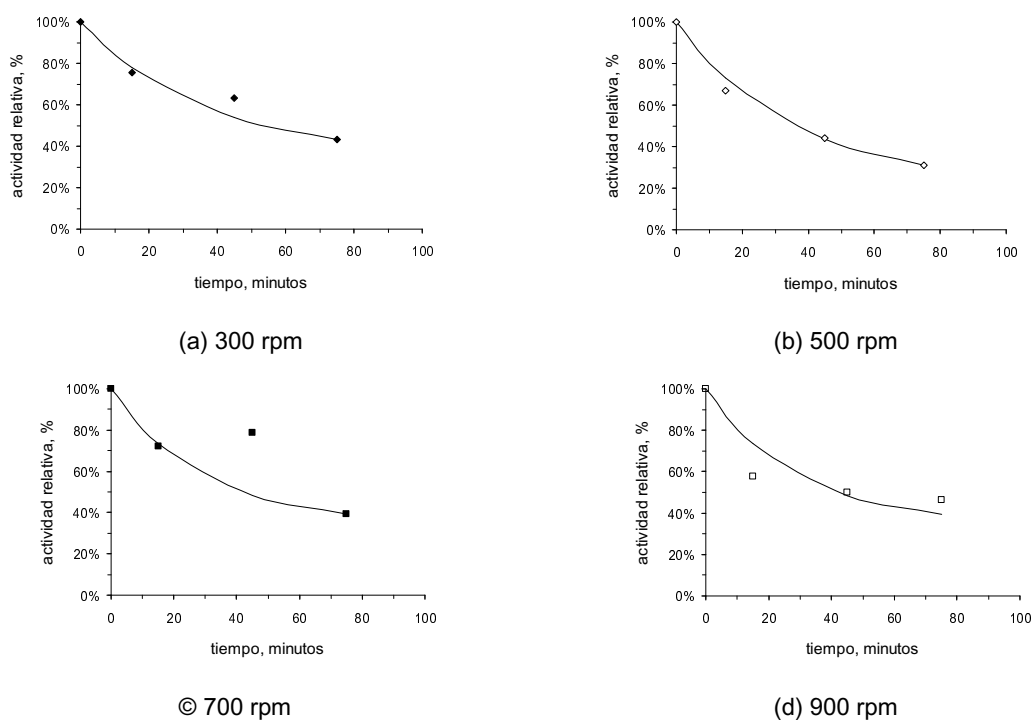


Figura 5.27. Desactivación de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) a diferentes velocidades de agitación y a temperatura ambiente. Se usó tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$, 13000 rpm, 1 min.) como sustrato. Las líneas representan el ajuste a un modelo de desactivación de primer orden con actividad residual.

El mecanismo de desactivación parece responder también a un modelo de primer orden con actividad residual, ecuación V.5, como el observado en los experimentos en condiciones de lavado. Los parámetros de dicho modelo, para cada velocidad de agitación se recogen en la Tabla 5.20.

Tabla 5.20. Constante de desactivación, k_{da} , y actividad residual relativa en función de la velocidad de agitación para la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) empleando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato.

Velocidad de agitación	k_{da} , min ⁻¹	A_{res}/A_0	desviación relativa
300 rpm	0.028	35.4%	4.2%
500 rpm	0.028	21.6%	2.7%
700 rpm	0.034	34.2%	11.0%
900 rpm	0.078	28.6%	12.5%

Aunque la actividad residual relativa no parece seguir tendencia alguna con la velocidad de agitación, la constante de desactivación sí que aumenta con ésta, por encima de las 500 rpm. La desactivación de la enzima parece por tanto estar relacionada con la velocidad de agitación o con algún factor directamente dependiente de aquella.

Es sabido que las lipasas pueden sufrir desnaturalización por efecto de la tensión superficial cuando se adsorben en la interfase aire-agua, (Lee y Choo, 1989; Patil et al., 2000), por lo que es muy probable que la agitación del sistema, al aumentar la velocidad de transferencia de la lipasa desde el seno de la fase acuosa a la superficie, favorezca su desactivación. El aumento de la velocidad de agitación conduciría, tal y como se observa, a una pérdida más rápida de actividad de la enzima. Dos evidencias más apuntan en la dirección de que este fenómeno es el responsable de la desactivación observada:

- 1) Durante el curso de la reacción de hidrólisis el reactor se agita a 700 rpm, pero no se aprecia ninguna pérdida de actividad. La presencia de una interfase orgánica de elevada área interfacial, junto con la propia geometría del reactor, son con toda probabilidad las responsables de la estabilización de la enzima.
- 2) Si la adsorción de la enzima en la interfase aire-agua es la responsable de su desactivación, debería ocurrir que, a igualdad de la velocidad de agitación, si la enzima se mantiene en un recipiente de gran superficie, se producirá una mayor desactivación que si se conserva en un recipiente de superficie reducida. Al realizar esta experiencia en dos recipientes de diámetros 10 y 2.5 cm, y medir la actividad lipásica tras mantener la enzima Lipolase 100 durante 30 min en las anteriores condiciones, se observa que, en efecto, la enzima conservada en el recipiente de mayor superficie se ha desactivado completamente, mientras que la colocada en el recipiente de superficie pequeña sólo ha perdido un 25% de su actividad inicial. La actividad residual observada estaría por tanto relacionada con la cantidad de interfase disponible, de ahí que no presente tendencia alguna en los experimentos realizados

(Tabla 5.20) ya que en ellos la geometría del recipiente que contenía la enzima, y por tanto la superficie, fueron siempre los mismos.

Lee y Choo (1989) al estudiar la desactivación de la lipasa de *Candida cylindracea* en función de la velocidad de agitación, llegan también a la conclusión de que la pérdida de actividad lipolítica observada se debe a la desnaturalización de la lipasa en la interfase por efecto de la tensión superficial, fenómeno favorecido por la agitación. Estos autores diferencian entre la velocidad de cizalla, que es proporcional a la velocidad de agitación y el estrés mecánico, que depende además de la viscosidad de la fase líquida. Este último, a diferencia de la velocidad de cizalla, parece no tener efecto en la desactivación de la enzima. Además la supresión de la interfase aire-agua o la incorporación de compuestos tensioactivos produjeron una disminución drástica en la velocidad de desactivación.

Patil et al. (2000) han estudiado también la desactivación de la enzima Lipolase 100 (Novo-Nordisk) en condiciones similares, pero fijando una velocidad agitación de 1000 rpm, y proponen también un modelo cinético basado en la desnaturalización de la enzima en la interfase aire-agua y su posterior reactivación, que explica satisfactoriamente los resultados obtenidos por estos autores. En este caso no se observa la existencia de una actividad residual, a pesar de lo cual estos datos no son contradictorios con los obtenidos en el presente trabajo, ya que Patil et al. utilizan una elevada velocidad de agitación, incorporando mucho aire en el sistema por lo que el área interfacial específica aire-agua resulta muy elevada.

5.3.4. Efecto protector de la glicina en la estabilidad de las enzimas

El aminoácido glicina, junto con una serie de moléculas orgánicas conocidas como “osmolitos”, término que engloba ciertos aminoácidos, polioles y metilaminas, ejerce una acción estabilizadora de las proteínas, previniendo la desnaturalización térmica de las mismas (Arakawa y Timasheff, 1985; Santoro et al., 1992). Esta función la desempeña en sistemas vivos, tales como microorganismos que viven en condiciones extremas, pero es también aprovechada en técnicas analíticas y formulaciones comerciales donde se busca preservar la estabilidad de enzimas y componentes proteínicos (Suzuki et al., 1986; Kurahashi y Matsunaga, 1994).

5.3.4.1. Efecto de la glicina sobre la actividad enzimática

Para estudiar el efecto estabilizador de la glicina conviene previamente conocer su acción sobre la actividad de la enzima Lipolase 100. Por ello la actividad de la misma se ha medido en presencia y en ausencia de glicina (0.1 M), utilizando emulsiones de

tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) preparadas por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.). Los resultados se recogen en la Tabla 5.21.

Tabla 5.21. Influencia de glicina (0.1 M) en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L), medida sobre tributirina ($e_{exp}=0.01$) (n=3).

	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
Tampón Fosfato	99065	3991	4.0
Tampón Glicina	110357	3869	3.5
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Igualdad de varianzas	0.459	No existen diferencias significativas	
Igualdad de medias	$8.656 \cdot 10^{-6}$	Existen diferencias significativas	

Los test de contraste de hipótesis confirman que existen diferencias significativas entre la actividad enzimática en ausencia y en presencia de glicina, siendo superior en el segundo caso, en un 11.4%.

5.3.4.2. Efecto estabilizador de la glicina

Dado que a partir de 40°C eran ya significativos los efectos de la desactivación térmica, se han realizado experimentos de desactivación con la enzima Lipolase 100 a temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C, en las mismas condiciones que los anteriores, pero manteniendo la enzima en tampón glicina (pH 10.8) en vez de en tampón fosfato.

En la Figura 5.28 muestran los resultados obtenidos, tanto con tampón fosfato como con tampón glicina. Se aprecia como esta última contribuye a incrementar la estabilidad térmica de la enzima, siendo su efecto más evidente a 40 y 50°C, donde no se aprecia en este caso desactivación alguna, como confirma el análisis de la varianza de los datos de actividad a dichas temperatura con el tiempo como factor.

A 60°C sigue apreciándose desactivación térmica, si bien en este caso ésta se atenúa, sobre todo tras dos horas a dicha temperatura.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

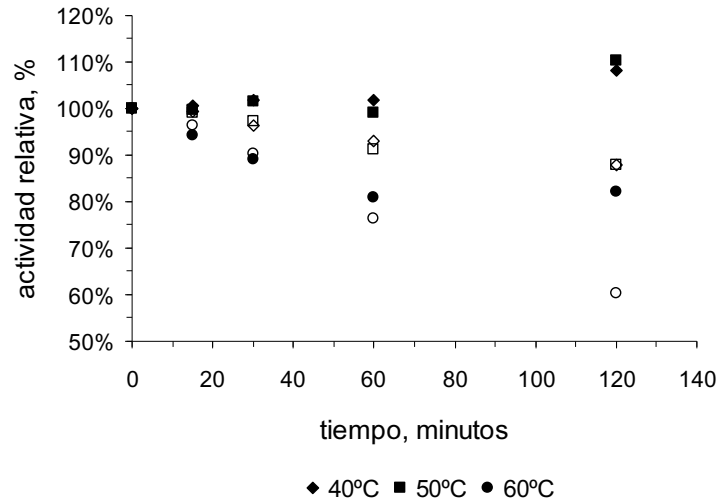


Figura 5.28. Efecto de la glicina (símbolos rellenos) en la estabilidad térmica de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las emulsiones se prepararon por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.) Se representan también los datos obtenidos con tampón fosfato (símbolos huecos).

También se ha estudiado el efecto de la velocidad de agitación en la actividad de la enzima Lipolase 100 a temperatura ambiente, medida sobre tributirina en las condiciones ya descritas, pero utilizando tampón glicina, en vez de fosfato, para diluir y conservar el preparado enzimático comercial. La actividad se determinó una única vez al cabo de 1.5 horas de agitación. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.29.

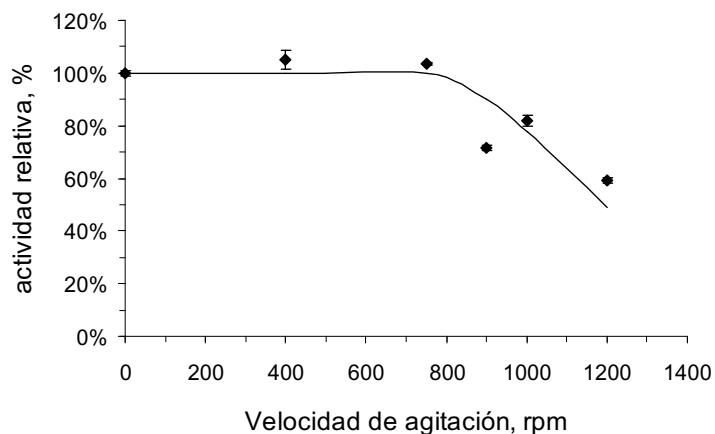


Figura 5.29. Efecto de la glicina en la estabilidad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) sometida a agitación a temperatura ambiente. Sustrato: tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$, UltraTurrax 13000 rpm, 1 min.).

Solamente a partir de 900 rpm se produce desactivación de la enzima, por lo que la glicina ejerce un efecto protector también en este sentido. Estos resultados sugieren que la glicina podría ser incorporada como un aditivo estabilizante de la lipasa en formulaciones detergentes.

5.4. ESTUDIO DE LA ENZIMA LIPOLASE 100 CON TRIBUTIRINA Y TRIOLEÍNA COMO SUSTRATO.

Dado que la enzima Lipolase 100 es la que presenta una mejor relación actividad/estabilidad, resulta en principio la más indicada para ser incorporada en formulaciones detergentes. A continuación se va a proceder a analizar la influencia sobre su actividad y estabilidad de variables tales como la temperatura, el pH y la presencia de tensioactivos, dispersantes y proteasas. Todos estos aspectos son relevantes de cara al uso de esta enzima como aditivo para detergentes.

5.4.1. Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100

La influencia de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100 se ha investigado utilizando tanto trioleína como tributirina como sustrato, en el intervalo 30 – 50°C. En la Figura 5.30 se muestran las curvas de hidrólisis obtenidas en función de la temperatura.

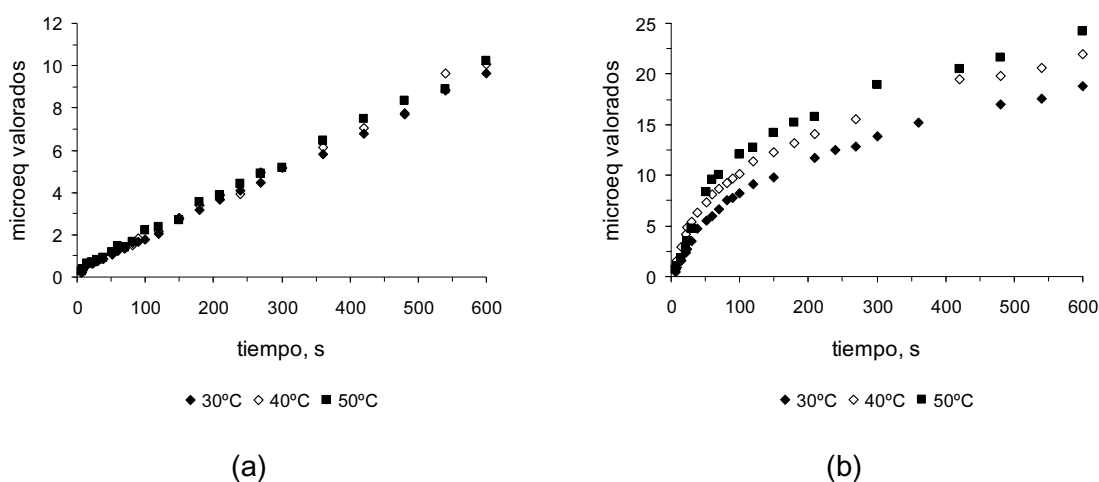


Figura 5.30. Curvas de hidrólisis de tributirina (a) y trioleína (b) a pH 7.0 y diferentes temperaturas con la enzima Lipolase 100. La fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión (α_{exp}) fue de 0.01 en ambos casos. Las emulsiones se prepararon mediante UltraTurrax (13000 rpm, 1 min.). Las concentraciones de enzima (e_{exp}) fueron 0.01 g/L para tributirina y 2.5 g/L para trioleína.

La actividad enzimática, calculada a partir de la pendiente de las anteriores curvas de hidrólisis en el intervalo 180 – 480 s, se muestra en la Figura 5.31.

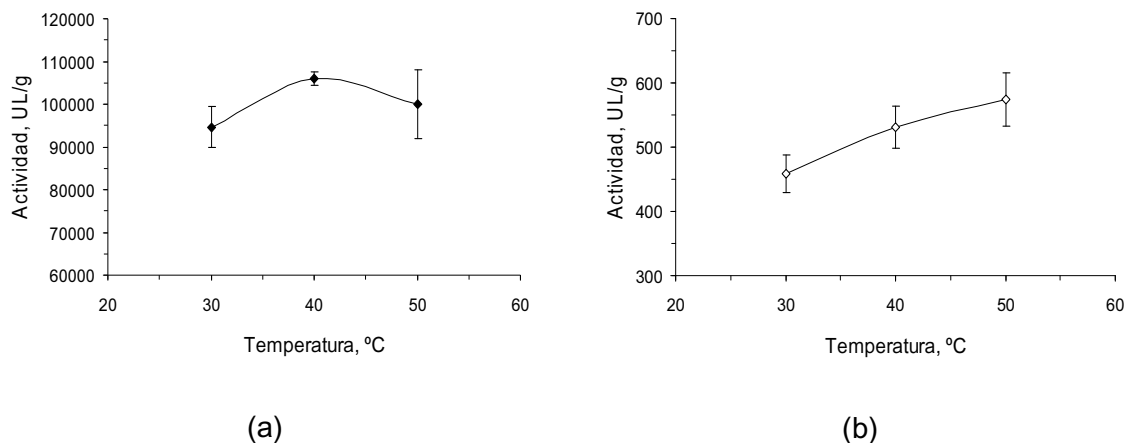


Figura 5.31. Efecto de la temperatura en la actividad de la enzima Lipolase 100 medida sobre emulsiones de tributirina, (a), y trioleína (b). (n≥3).

En el caso de la tributirina, aunque la dispersión de los resultados a 50°C es mayor, la actividad óptima se alcanza en el intervalo 40 – 50°C, lo que coincide con las informaciones técnicas facilitadas por el fabricante de la enzima, que sitúa el óptimo en 40°C. Cuando se utiliza trioleína la actividad parece aumentar con la temperatura hasta 50°C. Si bien si se comparan las correspondientes curvas de hidrólisis (Figura 5.30.b), se aprecia como la pendiente de las mismas en el origen, es decir, la velocidad inicial de hidrólisis, no aumenta al pasar de 40 a 50°C, lo que también sitúa la actividad óptima en torno a los 40°C.

Un aspecto destacable es que aunque la actividad crece al pasar de 30 a 40°C, no lo hace de forma importante (un 12% en el caso de la tributirina y un 16% en el de la trioleína). De esta forma la enzima es considerablemente activa a bajas temperaturas, lo cual es favorable, dada las actuales tendencias sobre las condiciones de lavado.

5.4.2. Influencia del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100

El efecto del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100 se ha estudiado utilizando tributirina y trioleína como sustratos. El consumo de base en ausencia de enzima fue calculado a los diferentes valores de pH utilizados, obteniéndose las velocidades medias (pendiente entre 180 y 480 segundos) que se recogen en la Tabla 5.22. La velocidad es prácticamente despreciable hasta pH 10.0 e igual para ambos sustratos. De cualquier

forma para el cálculo de la actividad a la velocidad de adición de valorante en presencia de enzima se le ha restado la obtenida en su ausencia.

Tabla 5.22. Consumo de valorante (NaOH 0.05N) en función del pH y en ausencia de enzima.

pH	consumo, mL/min
7.0	0.000
7.5	0.000
8.0	0.001
8.5	0.001
9.0	0.001
9.5	0.002
10.0	0.003
10.5	0.009

En la Figura 5.32 se muestran las curvas de hidrólisis de tributirina y trioleína en función del pH.

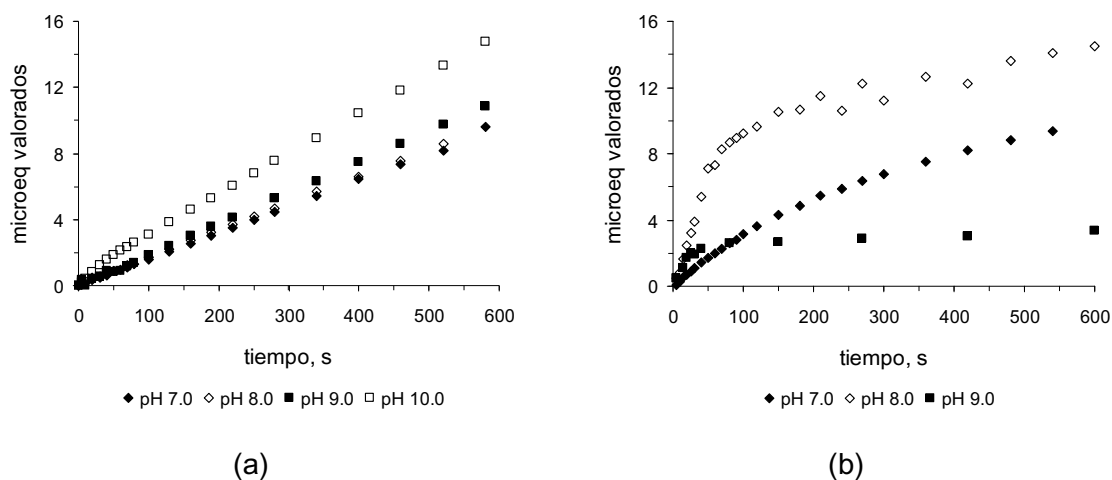


Figura 5.32. Curvas de hidrólisis de tributirina (a) y trioleína (b) a 30°C y diferente pH, con la enzima Lipolase 100. La fracción volumétrica de fase grasa en la emulsión (α_{exp}) fue de 0.01 en ambos casos. Las emulsiones se prepararon mediante UltraTurrax (13000 rpm, 1 min.). Las concentraciones de enzima (e_{exp}) fueron 0.01 g/L para tributirina y 2.5 g/L para trioleína.

La variación de la actividad con el pH calculada a partir de las curvas de hidrólisis mostradas se presenta en la Figura 5.33.

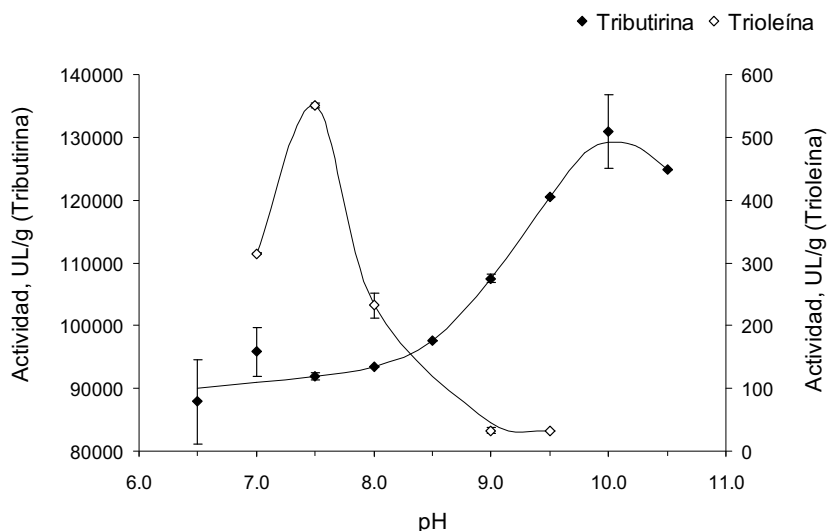


Figura 5.33. Efecto del pH en la actividad de la enzima Lipolase 100 a 30°C utilizando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) y trioleína ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato. Las emulsiones se prepararon por dispersión mecánica (13000 rpm, 1 min.) Las concentraciones de enzima (e_{exp}) utilizadas fueron de 0.01 y 2.5 g/L para tributirina y trioleína respectivamente. Las líneas son solo guías visuales.

Los resultados obtenidos con tributirina como sustrato concuerdan con la información aportada por el fabricante de la enzima, según la cual la actividad máxima se alcanza a pH 10. Cuando se emplea trioleína como sustrato los resultados difieren de los obtenidos con tributirina, incluso aunque se aplicara como coeficiente de corrección la cantidad de ácido detectado en función del pH, ecuación V.2, o se empleara la pendiente a tiempo 0 de la curva de hidrólisis (Figura 5.32.b) para calcular la actividad. La razón de este comportamiento se encuentra en el rápido descenso de la velocidad de hidrólisis que se hace más acusado cuanto mayor es el pH. La acumulación de las moléculas de ácido oleico en la interfase, cuyo grado de disociación aumenta con el pH, puede explicar este comportamiento.

5.4.3. Influencia de los tensioactivos en la estabilidad de la enzima Lipolase 100

La actividad de la enzima Lipolase 100 se midió tras incubar durante una hora una solución de la enzima misma (0.01 g/L, tampón fosfato) con diferentes concentraciones de los tensioactivos no iónicos Berol LFG 61 (mezcla de alcoholes grasos etoxilado y alquilpoliglucósido), Findet 1214N/23 (alcohol graso etoxilado) y GlucoPON 650 (alquilpoliglucósido). Estos tensioactivos se han escogido debido su elevada biodegradabilidad y eficacia detergente (Altmajer-Vaz, 2004) que los hace idóneos para su empleo en formulaciones detergentes eficaces y respetuosas con el medio ambiente,

cuyo desarrollo es uno de los objetivos de la investigación en la que se encuadra la presente tesis doctoral.

Las medidas de actividad se realizaron a 30°C y pH 7.0 y utilizando tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) como sustrato. Las emulsiones se prepararon por dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.).

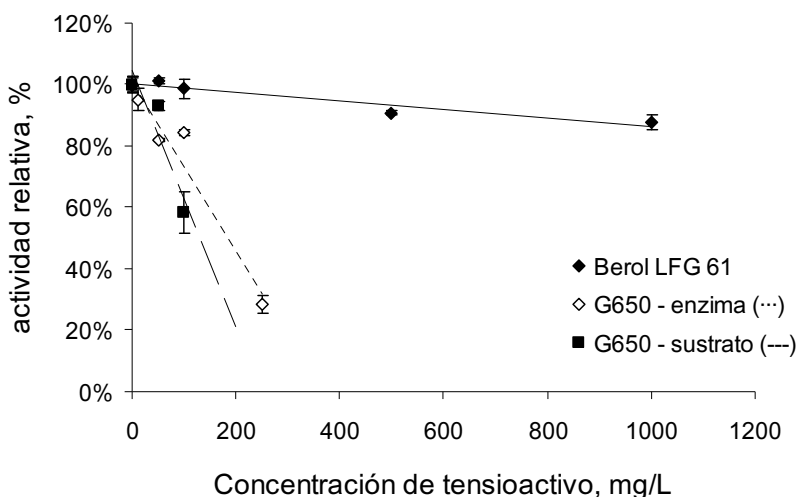


Figura 5.34. Influencia de los tensioactivos no iónicos Berol LFG 61 y Glucocon 650 (G650) en la actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) medida sobre tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las líneas son una guía visual.

En la Figura 5.34 se presenta la actividad en función de la concentración de tensioactivo en cada caso. Para el Glucocon 650 y el Findet 1214N/23 se comparan los resultados con los obtenidos incubando el sustrato en presencia del tensioactivo (apartado 5.8).

Con el Findet 1214N/23 la actividad fue siempre nula, aun a la concentración de tensioactivo más baja ensayada e independientemente de si se incubaba la enzima o el sustrato en su presencia. Los otros dos tensioactivos provocan una disminución de la actividad con su concentración, moderada en el caso del Berol LFG 61 pero muy pronunciada para el Glucocon 650. Cuando el Glucocon 650 fue incorporado al medio de reacción antes que la enzima la disminución de la actividad fue incluso más pronunciada, lo que indica que este fenómeno no es achacable a la desnaturalización de la enzima en presencia del tensioactivo, sino, muy probablemente, a la interacción de ambos a nivel de la interfase. Este aspecto se considerará más en profundidad en el apartado 5.8.

El Berol LFG 61 resulta el tensioactivo comercial de mayor compatibilidad con la enzima Lipolase 100 de todos los ensayos

5.4.4. Efecto del agente dispersante Cellesh 100 en la actividad y estabilidad de la enzima.

El Cellesh 100 es un homopolímero del ácido acrílico que se añade a las formulaciones detergentes por su capacidad secuestrante de los iones calcio así como porque mejora la dispersión de la suciedad en el baño de lavado, reduciendo la redeposición de la misma.

Cuando se incubaba la enzima durante 1 hora en presencia de 0.1 g/L de Cellesh 100 se produce una ligera disminución de la actividad lipásica, tal y como se aprecia en la Tabla 5.23, descenso que resulta ser estadísticamente significativo. Sin embargo dicha disminución es mucho más pronunciada cuando el Cellesh 100, en la misma concentración, se halla presente en el medio de reacción antes de la incorporación de la enzima.

Tabla 5.23. Actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) en presencia de Cellesh 100 (0.1 g/L). Se usaron emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$).

Método de preparación	Actividad media, LU/g	Desviación estándar	C.V., %
Ensayo control	119431	2890	2.4
Enzima incubada con Cellesh 100 (0.1 g/L)	106865	583	0.6
Sustrato incubado con Cellesh 100 (0.1 g/L)	90164	2856	3.2
Contraste de hipótesis (a nivel 0.05)			
	p-valor	Conclusión	
Control vs Cellesh + Enz.			
Igualdad de Varianzas	0.0391	Existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	0.0179	Existen diferencias significativas	
Control vs Cellesh + Sust.			
Igualdad de Varianzas	0.4941	No existen diferencias significativas	
Igualdad de Medias	0.0002	Existen diferencias significativas	

Estos resultados indican que, como sucedía con el Glucocon 650, probablemente la interacción de la enzima y el agente dispersante en la interfase de las gotas de grasa es la responsable de la disminución de la actividad observada.

5.4.5. Efecto de las proteasas en la actividad y estabilidad de la enzima.

Las proteasas son las enzimas más comúnmente incorporadas en las formulaciones detergentes, siendo su misión la de catalizar la descomposición de proteínas de alto peso molecular en fracciones de menor peso más fácilmente eliminables de las superficies a lavar. Actúan sobre suciedades de naturaleza proteica de difícil eliminación, tales como sangre y huevo (Ochoa-Gómez, 1996). Sin embargo, su capacidad proteolítica las hace

susceptibles de hidrolizar otras enzimas presentes e incluso a ellas mismas (autodigestión). En los experimentos se ha empleado la proteasa comercial Alcalase 2.5L (Novozymes).

Cuando la actividad de la enzima Lipolase 100 se midió en presencia de la proteasa (1.0 g/L en el medio de reacción), sin incubación previa y con tributirina como sustrato, se observó un aumento considerable y estadísticamente significativo en la actividad lipásica, tal y como se recoge en la Tabla 5.24. Ensayos de actividad en ausencia de tributirina permitieron descartar una hidrólisis significativa de la lipasa por parte de la proteasa en tan corto periodo de tiempo. Sin embargo la pendiente de la curva de valoración (entre 180 y 480 segundos) cuando en el medio de reacción se encuentra sólo la proteasa es elevada, como se refleja en la misma Tabla 5.24. Por esta razón el incremento observado en la actividad lipásica ha de achacarse a la hidrólisis de la tributirina por parte de la proteasa, que resulta apreciable a la concentración de Alcalase 2.5L existente en el medio (1.0 g/L). Esta hidrólisis podría tener lugar debido a que el centro activo de las lipasas y de las serín proteasas es similar, y además la tributirina es ligeramente soluble en agua.

Tabla 5.24. Actividad de la enzima Lipolase 100 ($e_{exp}=0.01$ g/L) en presencia de la proteasa Alcalase 2.5L (1.0 g/L en el medio de reacción). Se usaron emulsiones de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Se reflejan los valores medios \pm desviación estándar.

	Actividad, LU/g	Pendiente curva de valoración, microl/min
Ensayo control	102000 \pm 5000	1.02 \pm 0.05
Lipolase 100 + Alcalase 2.5L	172000 \pm 4000	1.73 \pm 0.04
Alcalase 2.5L	-	0.89 \pm 0.02

La resistencia de la enzima Lipolase 100 al ataque por parte de la proteasa ha sido estudiada incubando la lipasa (0.1 g/L) durante 5 días a 25°C en presencia de distintas concentraciones (0.01 – 1.00 g/L) de Alcalase 2.5L. Para la medida de la actividad la solución se diluía hasta 0.01 g/L de lipasa, con lo que la concentración máxima de proteasa en el medio de reacción fue de 0.1 g/L. En la Figura 5.35 se ha representado la actividad relativa en función de la concentración de proteasa tras 1 y 5 días de almacenamiento.

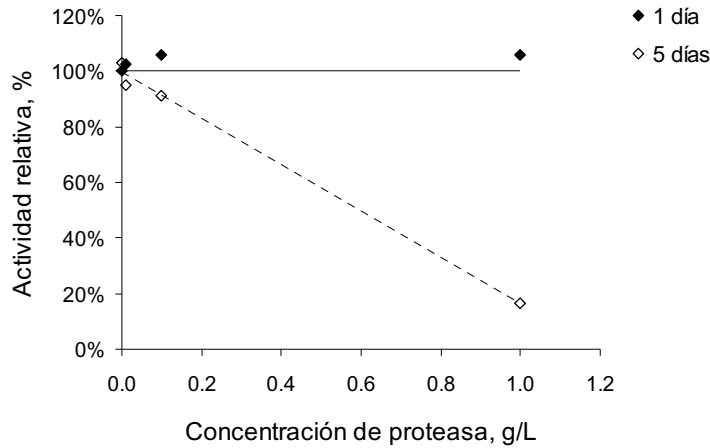


Figura 5.35. Estabilidad de la enzima Lipolase 100 (0.1 g/L) en presencia de distintas concentraciones de la proteasa Alcalase 2.5L. La actividad se ha medido sobre tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$). Las líneas son una guía visual.

La digestión de la lipasa resulta casi completa tras 5 días de almacenamiento con 1.0 g/L de proteasa. Los resultados pueden recoger el incremento de actividad que se observa en presencia de proteasa, si bien la pérdida de actividad de la lipasa no parece importante el primer día de almacenamiento, ni para concentraciones inferiores a 1 g/L.

Por tanto las formulaciones detergentes que contengan la enzima Lipolase 100 y proteasas deberán contener agentes estabilizantes o bien impedir el contacto directo de ambas enzimas durante el periodo de almacenamiento.

5.5. ENSAYOS DE LAVADO

Para estudiar la eficacia detergente de la enzima Lipolase 100 se han llevado a cabo estudios de lavado en el dispositivo Baño-Sustrato-Flujo (BSF) diseñado por Jurado-Alameda et al. (2003) y descrito en la sección 3.7. El mencionado dispositivo es adecuado para la evaluación de la eficacia detergente de formulaciones detergentes sobre superficies duras (vidrio, loza, metal, etc.), aplicación para la que los métodos disponibles en la actualidad son escasos y poco reproducibles en comparación con los existentes para la determinación de la detergencia sobre sustratos textiles (Altmajer-Vaz, 2004). Permite además simular un sistema de limpieza tipo CIP, usados en instalaciones industriales. Así, son varios los estudios sobre el aporte de las lipasas en la limpieza de tejidos (Fujii et al., 1986; Xia et al., 1996; Hemachander y Puvanakrishnan, 2000; Obendorf et al., 2001), pero casi inexistentes los que se refieren a superficies duras.

En el sistema BSF, la suciedad (tributirina coloreada), previamente depositada sobre la superficie del sustrato a limpiar, es eliminada mediante el flujo continuo de la

disolución de lavado que contiene el componente o la mezcla de componentes, cuya eficacia detergente se pretende ensayar. La acción limpiadora de la solución de lavado se basa por tanto en dos efectos combinados: (a) la acción mecánica, debida al flujo, y (b) la acción de los componentes presentes en la solución de limpieza.

Las condiciones de los experimentos realizados se resumen en la Tabla 5.25. Para tener en cuenta la acción hidrodinámica se han llevado a cabo ensayos control con tampón fosfato como baño de lavado. La enzima utilizada fue en todos casos la Lipolase 100 y a efectos comparativos se utilizó un tensioactivo aniónico de uso muy extendido, la sal sódica del ácido dodecibencenosulfónico lineal (LAS). La cantidad de tributirina coloreada eliminada del sustrato y arrastrada hasta el baño de lavado, se determinó utilizando un método espectrofotométrico (apartado 3.9.4). La hidrólisis de la tributirina se ha seguido neutralizando el ácido butírico liberado en la hidrólisis mediante el método del pHstato.

Tabla 5.25. Condiciones experimentales utilizadas en los ensayos de lavado con la enzima Lipolase 100

Temperatura	30°C
pH	7.00
Caudal de solución limpiadora	34 L/h
Solución limpiadora	1) Tampón fosfato (ensayo control) 2) Tampón fosfato + enzima (0.1 g/L) 3) Tampón fosfato + tensioactivo (0.1 g/L) 4) Tampón fosfato + enzima (0.1 g/L) + tensioactivo (0.1 g/L)
nº de réplicas por ensayo	2
Sustrato	Esferas de vidrio (borosilicato) de 3 mm de diámetro.
Suciedad	Tributirina coloreada
Concentración máxima de suciedad en el baño de lavado.	12.7 g/L (0.012 v/v)

La cantidad de tributirina coloreada presente en la solución limpiadora se ha ido determinando a lo largo del ensayo de lavado, de veinte minutos de duración. Al final de cada ensayo se extrajo y se determinó la tributirina todavía presente en las esferas del relleno. De esta forma es posible conocer la distribución de la suciedad en el sistema tras el lavado.

Se ha definido la detergencia (D_e , %) o eficacia detergente como la razón porcentual entre la cantidad de suciedad presente en cada momento en el baño de lavado y la inicialmente depositada sobre el sustrato de acuerdo con la ecuación III.5.

En la Figura 5.36 se presenta la variación de la detergencia en función del tiempo durante el lavado, para las diferentes soluciones limpiadoras utilizadas. La disminución de

la cantidad de tributirina debida a la hidrólisis enzimática no se ha considerado ya que se ha supuesto que afecta por igual la suciedad independientemente de donde se encuentre.

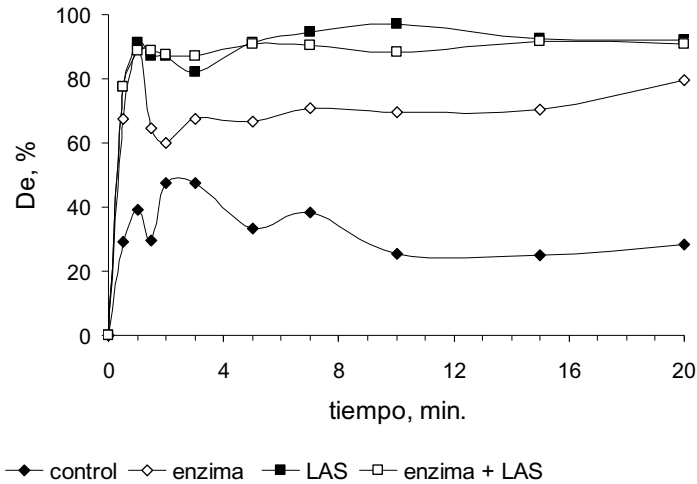


Figura 5.36. Evolución de la detergencia a lo largo del lavado según la solución limpiadora utilizada. Condiciones de ensayo: ver Tabla 5.25

En el ensayo control el arrastre de la suciedad hacia el baño de lavado resulta más lento, alcanzándose la detergencia máxima a los 2 – 3 minutos de lavado, frente al minuto que tarda en alcanzarse con el resto de soluciones limpiadoras. En cualquier caso este corto espacio de tiempo está relacionado con el hecho de que la tributirina es una sustancia relativamente fácil de dispersar en agua debido a sus propiedades fisicoquímicas: es líquida a temperatura ambiente y tiene una baja tensión superficial (29.6 mN/m a 25°C, según Goodrum y Eiteman, 1996) comparada con otros triglicéridos. En cualquier caso la presencia de la enzima parece facilitar el arrastre con respecto al ensayo control, suponiendo además un incremento en la detergencia máxima alcanzada de un 42%.

Otro aspecto a destacar que se produce en el ensayo control es que una vez alcanzada la detergencia máxima la cantidad de suciedad presente en el baño de lavado tiende a disminuir, lo que puede atribuirse al efecto de la redeposición de la misma sobre las diferentes superficies del sistema. La presencia de la enzima evita en gran medida este efecto, si bien se sigue produciendo un descenso de la cantidad de suciedad en el baño tras el primer minuto de lavado. Cuando se emplea tensioactivo la cantidad de tributirina en el baño de lavado permanece prácticamente constante e igual a la máxima

durante todo el lavado. En este sentido la alta detergencia alcanzada con el LAS impide ver diferencias significativas cuando se emplea el tensioactivo junto con la enzima.

El papel de la redeposición se observa más claramente en la Figura 5.37, donde se presenta, para cada uno de los experimentos, la distribución de suciedad a los 20 minutos de ensayo entre el relleno, el baño homogeneizado y las diferentes superficies del sistema (redeposición), evaluado por diferencia hasta el total de suciedad colocada inicialmente sobre el relleno.

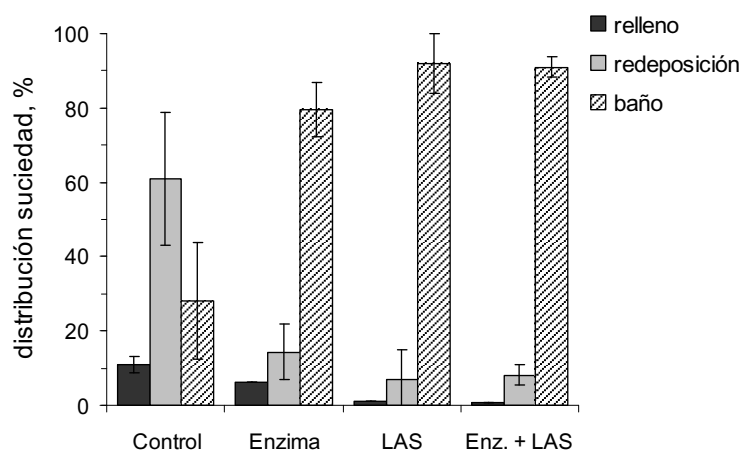


Figura 5.37. Distribución de la suciedad tras 20 minutos de lavado con las diferentes soluciones ensayadas. Condiciones de ensayo: ver Tabla 5.25

La incorporación de la enzima y, en mayor medida, del tensioactivo consiguen disminuir el fenómeno de la redeposición incrementando significativamente la cantidad de suciedad en el baño al final del lavado. La suciedad que permanece en el sustrato tras el lavado es en cualquier caso pequeña ($11.0 \pm 2.2\%$ en el ensayo control), pero disminuye al incorporar la enzima y el tensioactivo. En este sentido conviene destacar que la eliminación de la suciedad en condiciones prácticas debe ser total, pues la existencia de una película de materia grasa sobre la superficie del sustrato, no muy relevante en cuanto a su peso, impedirá apreciar el sustrato como limpio.

Nuevamente no pueden establecerse diferencias significativas cuando se usa la enzima junto con el tensioactivo. En este sentido conviene resaltar que para aprovechar el efecto detergente de la enzima deberá optimizarse la composición de la formulación detergente, eligiendo adecuadamente el tipo y la cantidad de tensioactivo empleado, tal y como también ponen de manifiesto Wolff y Showell (1997). Para esto se precisaría un diseño experimental utilizando el dispositivo BSF con una suciedad más resistente que la

tributirina, que permitiera apreciar las diferencias debidas a la incorporación de la enzima, si es que existen.

La reacción de hidrólisis cuando se utiliza Lipolase 100 se ha seguido valorando de forma continua el ácido butírico generado durante el proceso de lavado.

Considerando que la reacción que tiene lugar en el sistema viene dada por:



donde L100 representa la enzima, se ha calculado la conversión a partir de la ecuación V.10.

$$x = \frac{\text{N}^\circ \text{ de enlaces hidrolizados en el instante } t}{\text{N}^\circ \text{ inicial de enlaces éster hidrolizables}} \quad \text{V.10}$$

En la Figura 5.38 se representa la conversión en función del tiempo, para los ensayos de lavado con enzima, sin y con tensioactivo.

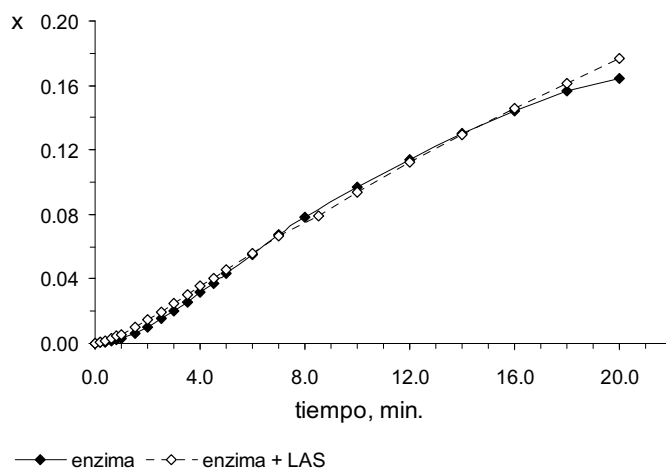


Figura 5.38. Conversión de la reacción de hidrólisis enzimática de tributirina en función del tiempo durante lavado.

Se aprecia la existencia de una “fase lag” durante el primer minuto de lavado, transcurrida la cual la velocidad de reacción aumenta, tanto en presencia como en ausencia de tensioactivo. Este tiempo se corresponde con el periodo inicial, de 1 minuto aproximadamente, durante el que tiene lugar el arrastre de la suciedad desde el sustrato hasta el baño de lavado (ver Figura 5.36). Así, la baja velocidad registrada puede explicarse por el hecho de que la suciedad no se encuentra adecuadamente dispersada

en el baño de lavado, siendo el área interfacial, y por tanto el sustrato accesible a la enzima, pequeños. A partir de este momento la grasa se va emulsionando en el baño de lavado y la evolución de la curva de hidrólisis es similar a la obtenida en los ensayos cinéticos realizados en esta investigación con sustratos preemulsificados. La conversión máxima alcanzada a los 20 minutos de lavado, 0.165 y 0.175, sin y con tensioactivo respectivamente, es inferior a la que se consigue en los experimentos de hidrólisis previos en condiciones similares¹, que llega a un valor de 0.32. La menor área interfacial de la emulsión formada en el dispositivo BSF es con bastante probabilidad la responsable de este hecho.

Un aspecto a destacar que se aprecia en la Figura 5.38 es que la curva de hidrólisis en presencia de LAS es más lineal y llega a una conversión ligeramente superior al final del ensayo de lavado.

En cualquier caso los valores de conversión alcanzados hacen imposible pensar que la hidrólisis de la suciedad grasa tenga lugar con una extensión muy grande durante un ciclo normal de lavado. Sin embargo esto no es necesario para que la enzima ejerza su efecto detergente, ya que éste se produce por la liberación al medio de productos de hidrólisis, tales como diglicéridos y ácidos grasos libres, que al presentar actividad interfacial disminuyen la tensión interfacial y mejoran el arrastre y la dispersión de la suciedad inicialmente adherida a la superficie del sustrato. En este sentido Labourdenne et al. (1997) han medido la tensión interfacial durante el curso de la lipólisis enzimática de aceite de soja con lipasa pancreática porcina, usando para ello un tensiómetro de gota. De esta forma encuentran que esta magnitud disminuye de forma continua durante la hidrólisis.

Altmajer-Vaz (2004) en ensayos de lavado realizados en el dispositivo BSF observa que los ácidos grasos libres, como el oleico, son más fácilmente arrastrados y eliminados que el triglicérido original, incluso por la propia acción hidrodinámica.

El efecto positivo de la enzima sobre la eliminación y posterior estabilización de la suciedad en el baño de lavado queda por tanto claramente establecido. Si se combina con los tensioactivos adecuados, la enzima Lipolase 100 permitiría reducir la cantidad de tensioactivo necesaria e incrementar la eficacia detergente a temperaturas bajas como la utilizada en los ensayos (30°C) (Altmajer-Vaz, 2004).

¹ 1 fracción volumétrica de tributirina 0.01 (α_{exp}) y concentración de enzima de 2 g/L (e_{exp}).

5.6. ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA EN EMULSIÓN O/W

Para estudiar la cinética de la hidrólisis de tributirina con la enzima Lipolase 100 se han realizado experimentos de hidrólisis, de 20 minutos de duración, a varias temperaturas y modificando las concentraciones de enzima y sustrato, en los intervalos que se indican en la Tabla 5.26. El dispositivo y la técnica experimental utilizados son los descritos en la sección 3.10.

Tabla 5.26. Intervalos de concentración de enzima y sustrato empleados en los experimentos de hidrólisis de tributirina.

Temperatura, °C	Concentración de enzima, g/L	Concentración de sustrato, fracción v/v
30	0.01 – 25.0	0.0025 – 0.050
40	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050
50	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050
60	0.05 – 15.0	0.010 – 0.050

Dado que para dar comienzo a la reacción se adiciona 1 mL de solución de enzima de concentración e_{exp} (g/L) sobre 15 mL de emulsión de tributirina de concentración α_{exp} (fracción v/v), las concentraciones de enzima (e'_0) y de tributirina (α) en la emulsión, al comienzo de la reacción, vienen dadas por las ecuaciones V.11 y V.12 respectivamente.

$$e'_0 = \frac{e_{exp}}{16}, \text{ g/L} \quad \text{V.11}$$

$$\alpha = \frac{15}{16} \alpha_{exp}, \text{ fracción v/v} \quad \text{V.12}$$

5.6.1. Análisis preliminar de los resultados obtenidos

5.6.1.1. Efecto de la dilución en la distribución de tamaños de gota de las emulsiones.

Las emulsiones de tributirina utilizadas en los experimentos de hidrólisis se han preparado siempre en idénticas condiciones ($\alpha_{exp}=0.05$, dispersión mecánica, 13000 rpm, 1 min., 0.1 g de goma arábica por mL de tributirina) de forma que sus características sean lo más uniformes posible. Así, para obtener emulsiones con una fracción

volumétrica de tributirina diferente, se ha diluido la emulsión inicialmente preparada con tampón fosfato hasta la concentración final de tributirina deseada.

Dado que dicha dilución podría afectar a la distribución de tamaños de gota de la emulsión se ha medido ésta antes y después de diluirla, al objeto de verificar su influencia. Las distribuciones de tamaño correspondientes se presentan en la Figura 5.39.

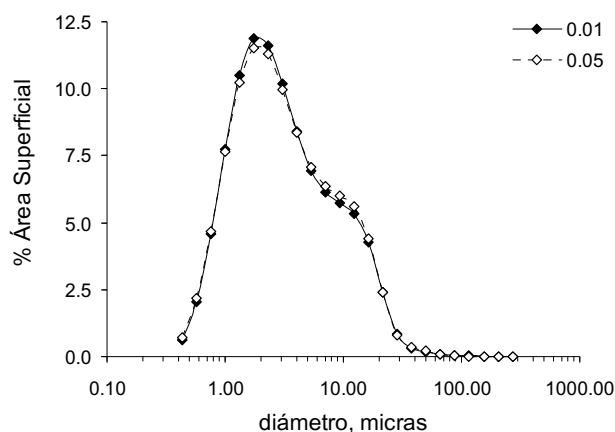


Figura 5.39. Influencia de la dilución en la distribución de tamaños de gota de las emulsiones de tributirina utilizadas en los experimentos de hidrólisis. Se comparan las distribuciones de la emulsión inicial ($\alpha_{exp}=0.05$) y la de su correspondiente dilución ($\alpha_{exp}=0.01$).

Tal como puede apreciarse una dilución 1/5 no produce cambios apreciables en la distribución de tamaños de gota, como confirman los diámetros medios de Sauter de ambas emulsiones que resultan ser de 5.30 y 5.24 μm para una fracción volumétrica de 0.01 y 0.05 respectivamente. Este resultado parece responder al hecho de que, según Dickinson (2003), la película superficial de goma arábica que se forma sobre las gotas de fase orgánica confiriéndoles estabilidad, no se ve apenas afectada por la subsiguiente dilución de la fase continua acuosa.

5.6.1.2. Influencia de la goma arábica en la hidrólisis enzimática de tributirina

Tal y como se ha indicado, a fin de estabilizar las emulsiones de tributirina utilizadas en los experimentos cinéticos se ha empleado goma arábica en su preparación. La goma arábica es un hidrocoloide natural que contribuye a la estabilidad de las emulsiones al impedir la coalescencia de las gotas mediante mecanismos predominantemente estéricos. A diferencia de otros hidrocoloides, que confieren estabilidad a las emulsiones al incrementar la viscosidad de la fase continua, la goma arábica posee una cierta

actividad interfacial debido a la presencia en su estructura de una pequeña fracción (2%) de proteína fuertemente hidrofóbica (Dickinson, 2003). Por esta razón es conveniente estudiar la influencia de la goma arábica en la velocidad de la hidrólisis enzimática de tributirina.

Para ello se han realizado experimentos de hidrólisis preparando las emulsiones con y sin goma arábica (0.1 g/mL de tributirina). En ambos casos las emulsiones han sido preparadas mediante dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.). En la Tabla 5.27 se recoge la velocidad inicial de reacción medida en cada caso, junto con el diámetro medio de Sauter (d_{gs}) de las emulsiones antes de la hidrólisis. Se han incluido también los coeficientes de variación (C.V.) correspondientes.

Tabla 5.27. Influencia de la goma arábica (GA) en la velocidad de hidrólisis de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con Lipolase 100 ($e_{exp}=1.0$ g/L) a 30°C. Se incluye también el diámetro de Sauter (d_{gs}) de las emulsiones formadas en cada caso (n=3).

	r_0 , mol/(L·s)	C.V., %	d_{gs} , μm	C.V., %
con GA (0.1 g/mL de tributirina)	$1.062 \cdot 10^{-4}$	2.0	5.5	5.9
sin GA	$2.471 \cdot 10^{-5}$	14.7	33.2	26.8

Como puede observarse en la Tabla 5.27 la adición de la goma arábica tiene dos efectos:

- La velocidad inicial de hidrólisis resulta 4.3 veces mayor, mientras que el diámetro medio de Sauter aumenta 6.1 veces. Dado que el incremento del diámetro medio se traduce en una mayor área interfacial específica, ésta es con seguridad la causa del aumento observado en la velocidad.
- La reproducibilidad de los resultados se ve incrementada, disminuyendo considerablemente el coeficiente de variación. La incorporación de goma arábica permite obtener las emulsiones con una reproducibilidad aceptable.

Tanto el mayor valor de la velocidad de reacción como, especialmente, la reproducibilidad de los resultados obtenidos en presencia de goma arábica, hacen aconsejable utilizarla en la preparación de las emulsiones. Tiss et al. (2001) han estudiado también la influencia de la goma arábica en la actividad de la lipasa de *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* (HLL) sobre un amplio abanico de triglicéridos (desde tributirina a aceite de oliva) utilizando una concentración de goma arábica 9 veces superior a la empleada en nuestros experimentos. A pesar de ello encuentran que la HLL es más activa (de 1.3 a 3 veces) sobre todos los triglicéridos ensayados cuando estos

fueron emulsificados en su presencia. Además cuando emplearon tributirina y trioctanoína como sustratos la cinética fue reproducible y lineal durante al menos 10 minutos.

5.6.1.3. Velocidades iniciales de reacción

Las velocidades iniciales de reacción para la hidrólisis de tributirina a 30°C, calculadas según se describe en la sección 3.10.3.5 (ecuación III.7) y que se hallan recogidas en las Tablas 4.57 a 4.59, se representan en la Figura 5.40. Se aprecia como para una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 se produce un fenómeno de saturación al incrementar la concentración de enzima, alcanzándose una velocidad máxima, lo que no sucede para fracciones volumétricas de tributirina superiores en el mismo rango de concentración de enzima. El aumento de la fracción volumétrica de tributirina también produce el mismo fenómeno, para una concentración de enzima constante, como se pone de manifiesto en la Figura 5.40.b.

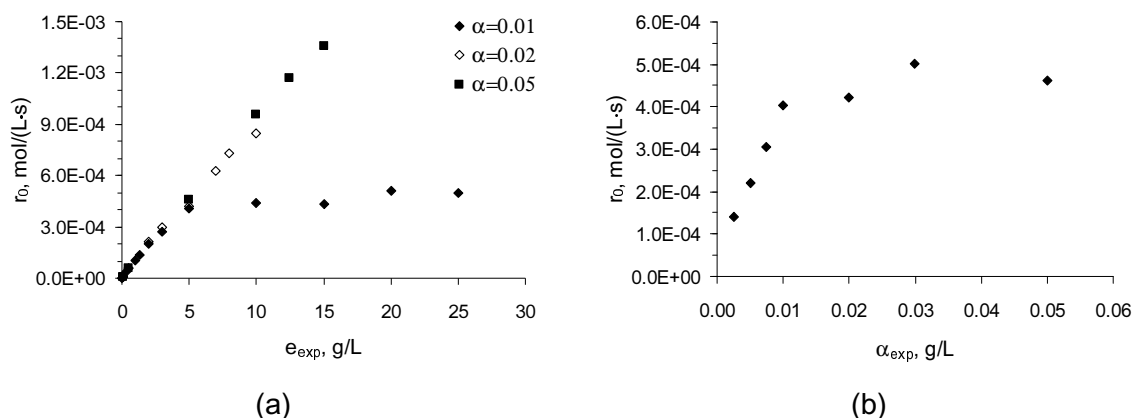


Figura 5.40. Influencia de la concentración de enzima (a) y de la fracción en volumen de sustrato (b) en la velocidad inicial de hidrólisis de tributirina con Lipolase 100 a 30°C. La influencia de la concentración de enzima se ha ensayado a tres fracciones en volumen de tributirina (α_{exp}) diferentes. La influencia de la fracción en volumen de tributirina se ensayó a una concentración de enzima (e_{exp}) de 5.0 g/L

En la Figura 5.41 se compara la variación de la velocidad inicial de reacción con la concentración de enzima, a una fracción en volumen de tributirina de 0.01, para las diferentes temperaturas ensayadas. En todos los casos aparece el mismo fenómeno de saturación a altas concentraciones de enzima. La velocidad de reacción crece moderadamente de 30 a 50°C, tendencia que se rompe a 60°C, donde se aprecia un ligero descenso.

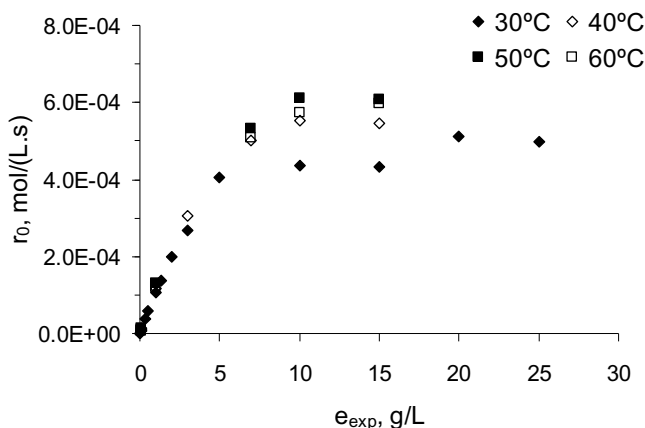
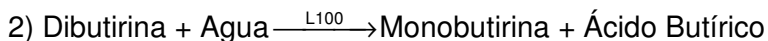
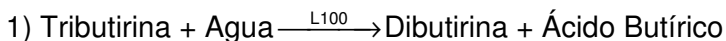


Figura 5.41. Variación de la velocidad inicial de hidrólisis con la concentración de enzima a diferentes temperaturas. La fracción volumétrica de tributirina (α_{exp}) es en todos los casos igual a 0.01.

5.6.1.4. Cálculo de la conversión y progreso de la reacción con el tiempo.

El cálculo de la conversión se ha realizado en base al número total de enlaces hidrolizables que existen en el sistema, de acuerdo con la ecuación V.10, y teniendo en cuenta que la reacción transcurre según el esquema siguiente:



En el anterior esquema se ha tenido en cuenta que la enzima es 1,3 específica y por tanto no aparecerá glicerol, siempre que no tengan lugar procesos de acilmigración.

El número de enlaces éster hidrolizados en cada instante es igual al número de moléculas de ácido butírico valoradas en dicho instante. El número inicial de enlaces éster hidrolizables es igual al número inicial de moléculas de tributirina multiplicado por tres, considerando que los tres enlaces éster de la tributirina puedan ser hidrolizados, lo cual conlleva que no se producirán en ningún caso conversiones superiores a 0.66. De esta forma la ecuación V.10 puede escribirse:

$$X = \frac{V_{NaOH} \cdot N_{NaOH} \cdot M_T}{3\alpha \cdot V_{e0} \cdot \rho_T \cdot 10^3} \tag{V.13}$$

donde:

V_{NaOH} es el volumen de NaOH añadido en el instante t, mL

N_{NaOH} es la normalidad del NaOH

M_T es el peso molecular de la tributirina (302.37 g/mol)

α es la fracción volumétrica de tributirina en la emulsión

V_{e0} es el volumen inicial de emulsión (15 mL)

ρ_T es la densidad de la tributirina (1.035 g/mL a 20°C)

La ecuación V.13 necesita sin embargo ser corregida, puesto que si la hidrólisis se realiza a pH=7.0 el ácido formado se reparte entre la fase acuosa, $[AH]_w$, y la fase orgánica, $[AH]_o$. Además, en la fase acuosa debe cumplirse el equilibrio de disociación.

Si utilizamos el coeficiente de partición octanol-agua para el ácido butírico ($\log P_{ow}=0.78$) como coeficiente de reparto entre la fase orgánica y la acuosa:

$$\frac{[AH]_o}{[AH]_w} = 10^{0.78} \quad [AH]_o = 6.026 [AH]_w \quad V.14$$

Y teniendo en cuenta que el pK_a del ácido butírico es de 4.83 a 25°C, tenemos que:

$$\frac{[A^-][H^+]}{[AH]_w} = 10^{-pK_a} \quad [A^-] = 10^{pH-pK_a} [AH]_w = 147.9 [AH]_w \quad V.15$$

Con lo que realizando un balance al ácido:

$$[AH]_o + [AH]_w + [A^-] = C_{AH} \quad V.16$$

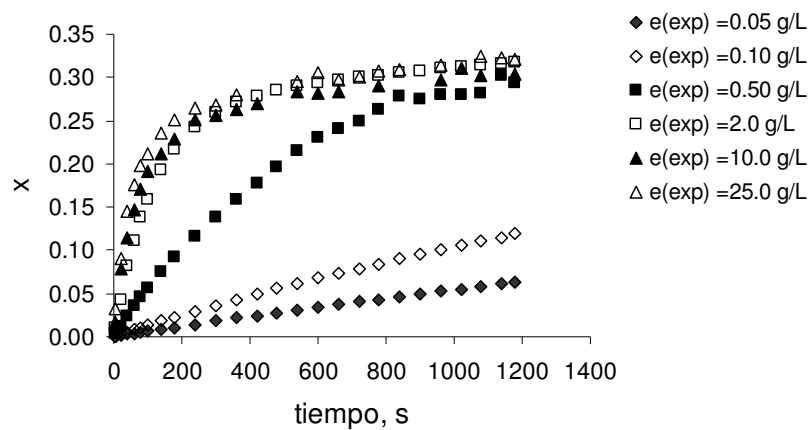
$$6.026 [AH]_w + [AH]_w + 147.9 [AH]_w = 154.93 [AH]_w = C_{AH}$$

donde C_{AH} representa la concentración total de ácido butírico.

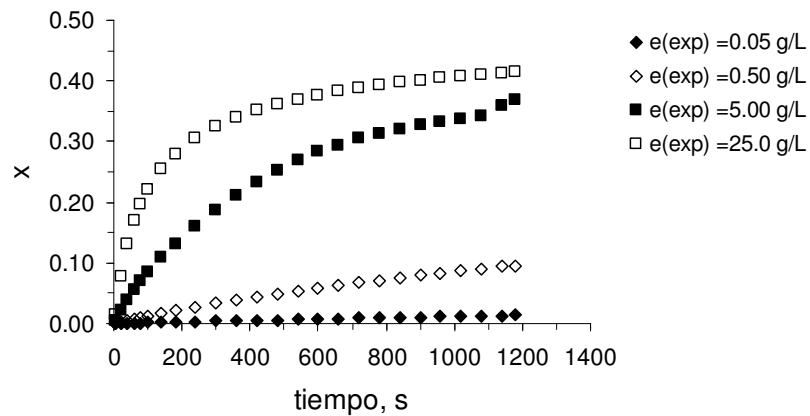
Resolviendo la ecuación V.16 se obtiene que un 3.9% del ácido butírico quedará en la fase orgánica, mientras que un 0.6% permanecerá en la fase acuosa sin disociarse. Debido a esto la conversión calculada por el consumo de base necesario para mantener constante el pH representa el 95.5% del ácido realmente liberado. Por tanto los valores de la conversión calculados por el consumo de base, ecuación V.13, deberán multiplicarse por 1.05.

A título de ejemplo se presentan en la Figura 5.42 los valores de la conversión en función del tiempo, obtenidos como se ha descrito, para algunos de los experimentos de hidrólisis realizados a 30°C y con fracciones volumétricas de tributirina (α_{exp}) de 0.01 y 0.05.

De forma análoga, en las Figuras 5.43 a 5.45 se muestran los valores de conversión alcanzados en función del tiempo para las mismas fracciones volumétricas de tributirina y a diversas concentraciones de enzima, pero en experimentos realizados a 40, 50 y 60°C.



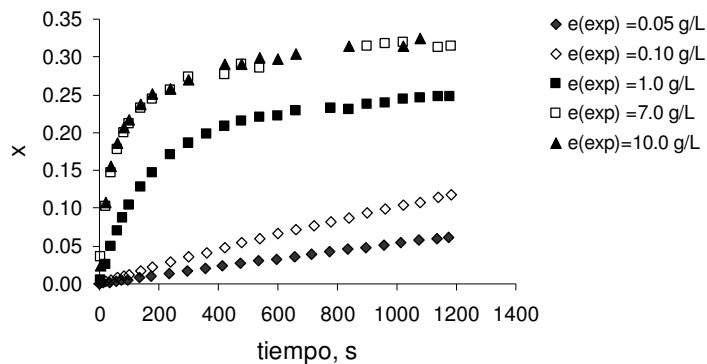
(a)



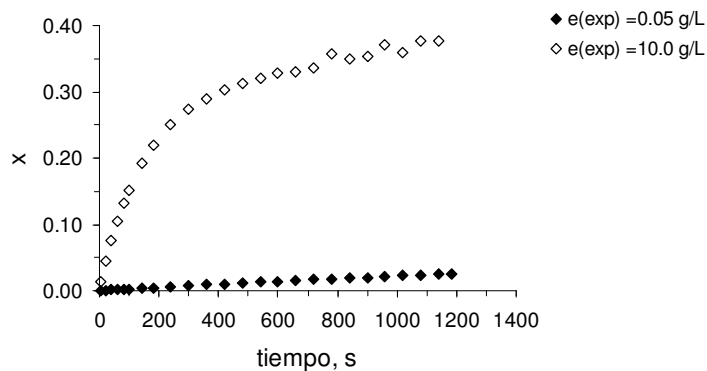
(b)

Figura 5.42. Variación de la conversión en función del tiempo para la hidrólisis de tributirina a 30°C con distintas concentraciones de enzima. (a) $\alpha_{exp}=0.01$; (b) $\alpha_{exp}=0.05$

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

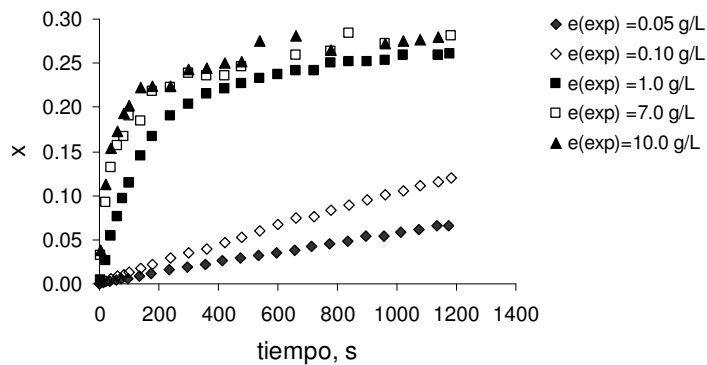


(a)

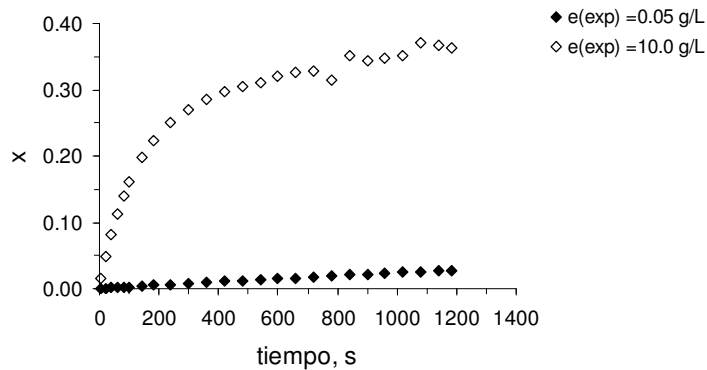


(b)

Figura 5.43. Variación de la conversión en función del tiempo para la hidrólisis de tributirina a 40°C con distintas concentraciones de enzima. (a) $\alpha_{exp}=0.01$; (b) $\alpha_{exp}=0.05$



(a)



(b)

Figura 5.44. Variación de la conversión en función del tiempo para la hidrólisis de tributirina a 50°C con distintas concentraciones de enzima. (a) $\alpha_{exp}=0.01$; (b) $\alpha_{exp}=0.05$

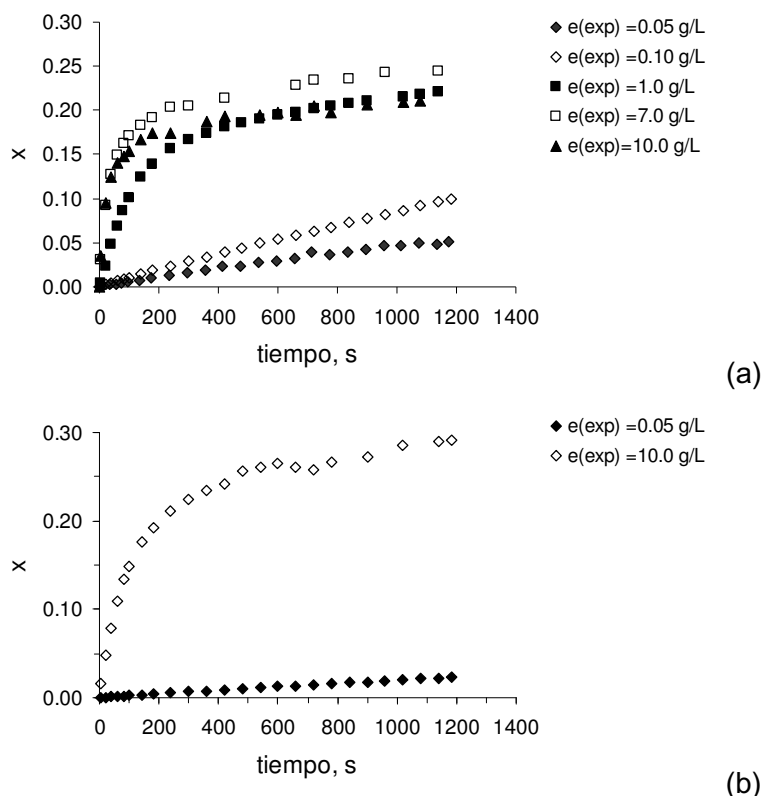


Figura 5.45. Variación de la conversión en función del tiempo para la hidrólisis de tributirina a 60°C con distintas concentraciones de enzima. (a) $\alpha_{exp}=0.01$; (b) $\alpha_{exp}=0.05$

Los resultados presentados en las Figuras 5.42 a 5.45, para todas las temperaturas ensayadas, muestran que la conversión aumenta de forma rápida hasta alcanzar un valor entre 0.25 y 0.30, momento a partir del cual el progreso es mucho más lento.

Cuando la fracción en volumen de tributirina es de 0.01 se aprecia que, independientemente de la temperatura a la que se realicen los experimentos, existe una concentración de enzima por encima de la cual la curva que describe el progreso de reacción permanece prácticamente invariable, lo que también se ve reflejado en la igualdad de las velocidades iniciales de reacción correspondientes (ver Figura 5.40.a y Figura 5.41). Este fenómeno no aparece en el mismo rango de concentraciones de enzima cuando la fracción volumétrica de tributirina es de 0.05, como se observa claramente en la Figura 5.42.b.

La influencia de la temperatura en el progreso de la reacción se refleja en la Figura 5.46, donde se han representado las curvas de conversión en función del tiempo para una fracción volumétrica de tributirina (α_{exp}) de 0.01 y una concentración de enzima (e_{exp}) de 0.1 g/L a las cuatro temperaturas ensayadas. En el intervalo 30 – 50°C no aparecen diferencias apreciables en el progreso de la reacción en función de la temperatura, pero a

60°C si se observa una caída de la velocidad de hidrólisis, achacable con toda probabilidad a la desactivación térmica de la enzima.

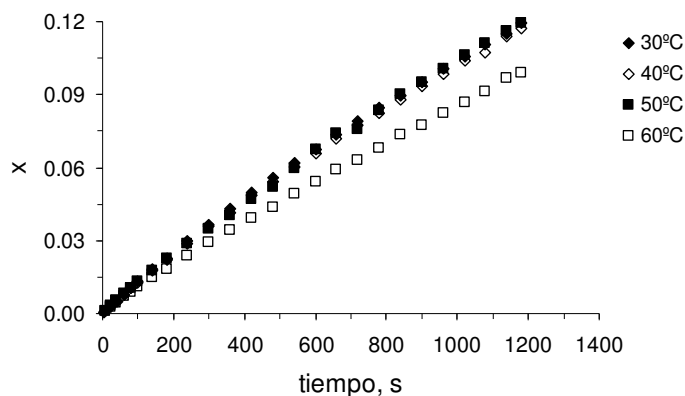


Figura 5.46. Influencia de la temperatura en el progreso de la hidrólisis de tributirina ($\alpha_{exp}=0.01$) con Lipolase 100 ($e_{exp}=0.10$ g/L).

El hecho de que la hidrólisis progrese hasta un valor de conversión en torno a 0.30 parece indicar que sólo un tercio de los enlaces totales presentes son hidrolizados en esta fase inicial de la reacción. Dado que la enzima es 1-3 específica la hidrólisis no progresaría en ningún caso hasta más del 66%, a no ser que sucediera un fenómeno de acil-migración. Por tanto los resultados obtenidos indican que de los dos enlaces externos de la tributirina susceptibles de ser hidrolizados por la enzima, el primero es hidrolizado más rápidamente que el segundo. Este comportamiento puede explicarse si se considera que, dada la naturaleza interfacial de la acción de la enzima y el estado de agregación del sustrato, la enzima sólo puede acceder a aquellas moléculas de tributirina que se encuentran en la superficie de la gota. Una vez hidrolizado el primer enlace éster de cada molécula de tributirina, el diglicérido formado, fundamentalmente hidrófobo, tenderá a quedarse formando parte de la gota. Sin embargo, el grupo alcoholico libre que posee, dado su carácter hidrófilo se orientará preferentemente hacia la fase acuosa, quedando los enlaces restantes, de los cuales sólo el sn-3 puede ser hidrolizado, inaccesibles a la enzima, al disponerse hacia la fase orgánica. Esto motivaría que la hidrólisis progresase únicamente hasta el 33% de los enlaces totales, como se observa experimentalmente.

Por otro lado, la variación del tamaño de las gotas de tributirina durante la hidrólisis no debería ser muy acusado, al permanecer en ellas el diglicérido formado. Para comprobar este hecho se analiza a continuación el efecto de la hidrólisis sobre la distribución de tamaños de gota de las emulsiones.

5.6.1.5. Evolución del tamaño de gota de las emulsiones durante la reacción de hidrólisis.

Con el fin de estudiar el efecto que la hidrólisis enzimática tiene sobre el tamaño de las gotas de la emulsión, se han determinado mediante difracción láser las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones antes y después de la reacción de hidrólisis. En la Figura 5.47 se resumen los resultados obtenidos, representando para ello la diferencia entre el diámetro medio de Sauter medido después, $(d_{gs})_f$, y antes, $(d_{gs})_i$, de la reacción, para distintas concentraciones de tributirina, en función de la concentración de enzima utilizada (e_{exp}), a 30°C.

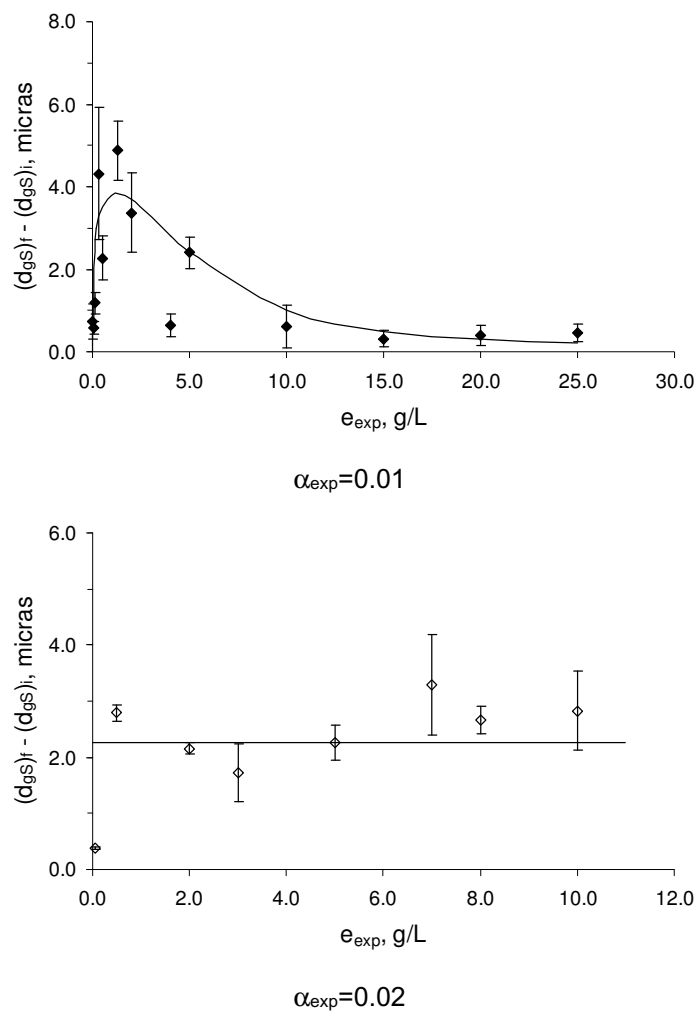


Figura 5.47. Diferencia entre el diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina después y antes de la hidrólisis.

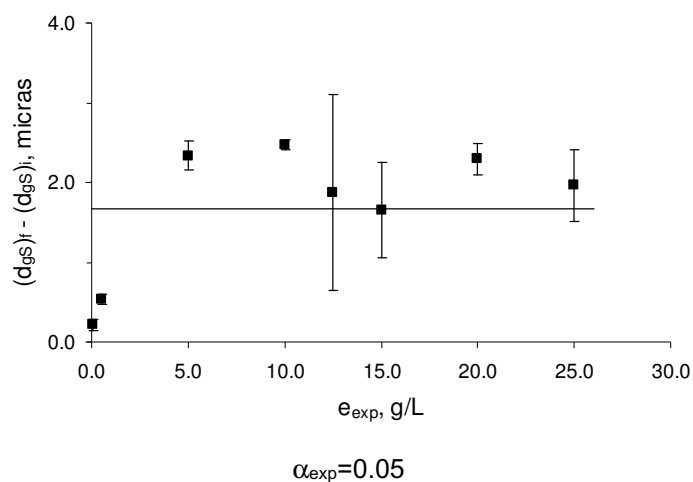


Figura 5.47 Diferencia entre el diámetro medio de Sauter de las emulsiones de tributirina después y antes de la hidrólisis (continuación).

Se observa en todos los casos que el diámetro medio de Sauter aumenta tras la hidrólisis. Además se aprecia que dicho incremento es más acusado a ciertas concentraciones de enzima. Por ejemplo, para una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 el aumento del diámetro medio de Sauter es más importante a concentraciones de enzima comprendidas entre 0.3 y 3.0 g/L, tendiendo a disminuir a mayores concentraciones de enzima. Es de destacar el hecho de que, precisamente a concentraciones de enzima superiores a 3.0 g/L, aparece el fenómeno de saturación para una fracción de tributirina igual a 0.01. Para fracciones volumétricas mayores el incremento del diámetro de Sauter tras la hidrólisis es prácticamente constante si se tiene en cuenta la dispersión de los resultados experimentales.

Parece extraño que el diámetro medio de Sauter de las emulsiones aumente por efecto de la reacción, ya que la hidrólisis de las moléculas de tributirina provocará en todos los casos una disminución de la cantidad de triglicérido presente en las gotas de fase orgánica y, siendo el ácido butírico soluble en agua, éste no permanecerá en la fase orgánica, más que en una fracción muy pequeña. Aún admitiendo que el diglicérido quede formando parte de la gota, el tamaño medio de las gotas debería disminuir más o menos acusadamente por efecto de la reacción. Esto es precisamente lo que observan Fritz et al. (2004) al estudiar en continuo la distribución de tamaños de gota de emulsiones de trioleína de muy baja polidispersidad durante su hidrólisis con lipoproteína lipasa. Kierkels et al. (1990) observan también un aumento del área interfacial específica

de emulsiones de butirato de glicidilo en el transcurso de su hidrólisis con lipasa pancreática porcina.

Para interpretar el incremento observado se han representado en la Figura 5.48 las distribuciones de tamaño completas, antes y después de la reacción, para una fracción en volumen de tributirina igual a 0.01 y tres concentraciones de enzima diferentes. También se presentan los resultados de un ensayo control sin enzima, para analizar la posible desestabilización de la emulsión por causas diferentes de la hidrólisis durante su permanencia en el reactor. Los resultados obtenidos (Figura 5.48.a) permiten descartar que la emulsión se desestabilice apreciablemente en el reactor en ausencia de enzima.

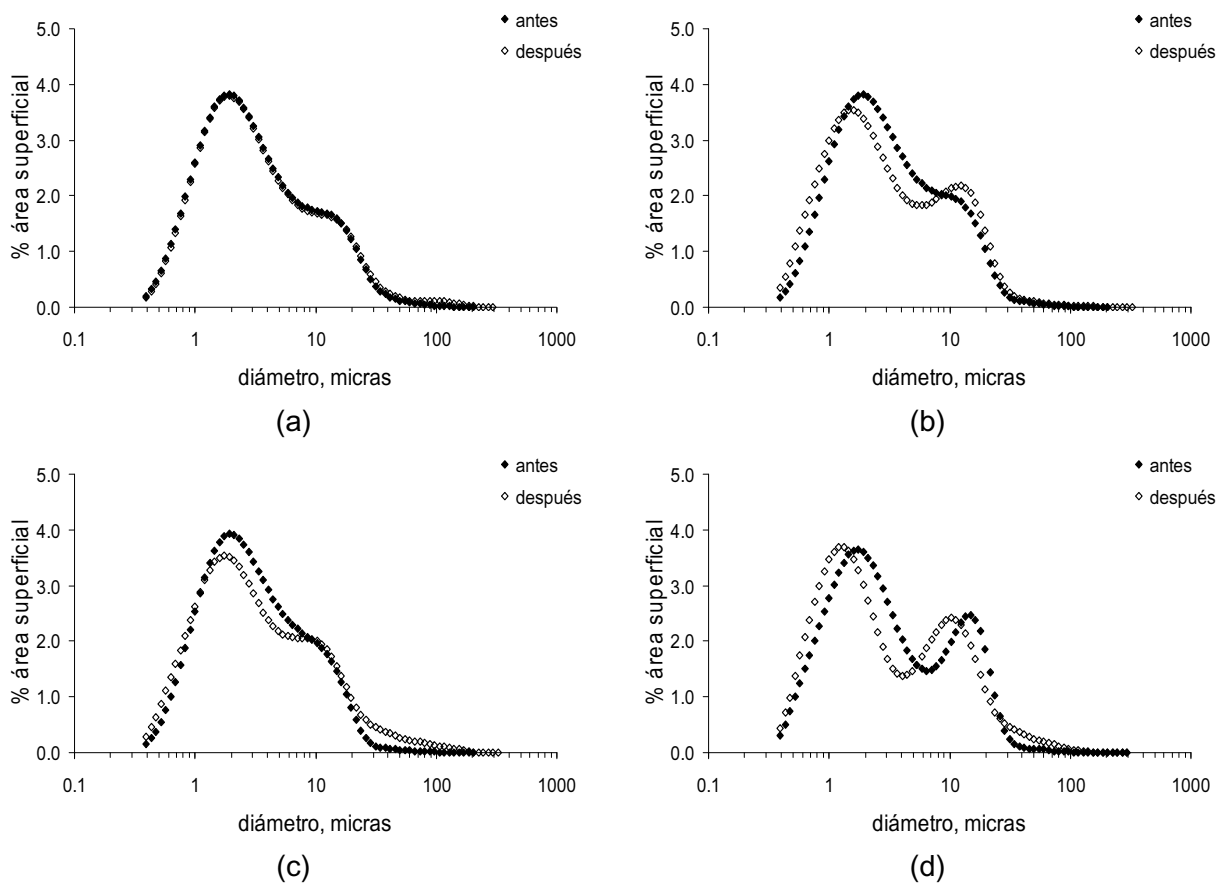


Figura 5.48. Distribuciones de tamaño de gota de emulsiones de tributirina ($\alpha=0.01$) antes y después de la hidrólisis con diferentes concentraciones de la enzima Lipolase 100: (a) 0.00 g/L; (b) 0.05 g/L; (c) 0.50 g/L; (d) 10.0 g/L.

La adición de enzima sí afecta a la distribución de tamaños de gota, aunque al comparar las distribuciones de tamaño obtenidas antes y después de la reacción, se aprecia que el efecto de la hidrólisis no es el mismo para todos los tamaños:

- La fracción de gotas de menor tamaño ($<1.5 \mu\text{m}$) aumenta tras la reacción, independientemente de la concentración de enzima. Esto puede deberse a la

hidrólisis de las gotas de diámetro inicial superior (1.5 – 10 μm), que provoca la disminución de su tamaño.

- La fracción de gotas de tamaño intermedio (1.5 – 10 μm , aprox.) decrece al producirse la hidrólisis. Cabe pensar que la disminución de tamaño de las gotas mayores de 10 μm contribuiría a aumentar la fracción de gotas de tamaño inferior, tal y como sucede con las gotas de menos de 1.5 μm . Sin embargo la fracción de gotas de tamaño superior a 10 μm es relativamente pequeña, con lo que dicho efecto no resulta apreciable.
- La fracción de gotas de mayor tamaño (>10 μm aprox., o algo más para una concentración de enzima de 10 g/L) aumenta después de la reacción. Este efecto no puede deberse a la hidrólisis ni tampoco a la desestabilización de la emulsión, pues no se da en ausencia de enzima. Realmente lo que indica es que dichas gotas son relativamente más abundantes tras la reacción, lo cual se debe a que son las menos afectadas por la hidrólisis, al ser su tamaño inicial mayor. Además es posible que una fracción considerable de las gotas menores de 1.5 μm no sean ya detectables por el equipo tras la reacción, puesto que su límite de detección es de 0.4 μm , con lo que la importancia relativa de las gotas mayores crecería. Esto además explicaría por qué el diámetro medio de Sauter crece tras la reacción.

La evolución de las distribuciones de tamaños de gota durante la reacción de hidrólisis, en emulsiones polidispersas como las utilizadas, resulta compleja. Algunos autores (Fritz et al. 2004) demuestran también una dependencia entre la velocidad de hidrólisis y el tamaño de gota, lo cual es difícil de apreciar en los resultados obtenidos debido a la polidispersidad de las emulsiones, pero obviamente puede influir en los cambios observados. En cualquier caso parece producirse para todas las concentraciones de enzima ensayadas un desplazamiento de la distribución de tamaños a la izquierda, que no se ve reflejado en el diámetro de Sauter debido al incremento porcentual de la cantidad de gotas mayores y la posible salida de las gotas más pequeñas fuera del límite de detección del equipo. Por tanto puede considerarse que en la primera fase de la hidrólisis, hasta conversiones en torno a 0.3, el diámetro medio de Sauter permanece aproximadamente constante.

5.6.2. Mecanismo general del proceso

La hidrólisis de un triglicérido insoluble por una enzima soluble es un proceso enzimático heterogéneo puesto que la reacción de hidrólisis tiene lugar en la interfase de

las gotas de triglicérido (fase orgánica) dispersas en el seno de la fase acuosa, donde se encuentra la enzima inicialmente.

De acuerdo con la bibliografía (Verger et al., 1973b; Tsai y Chang, 1993) y como corresponde a un sistema de este tipo, el proceso de hidrólisis ha de transcurrir a través de las siguientes etapas:

- 1) Transporte de la enzima desde el seno de la fase acuosa hasta la interfase.
- 2) Adsorción o penetración de la enzima en la interfase, que implica un cambio conformacional de la enzima, en virtud del cual el centro activo queda expuesto y accesible para el sustrato. La enzima adsorbida es normalmente denominada enzima activada.
- 3) Formación del complejo enzima-sustrato, propiamente dicho, de acuerdo con el mecanismo clásico de Michaelis-Menten, por unión de una molécula de sustrato presente en la superficie de la gota con el centro activo de la enzima. Esta etapa es también reversible.
- 4) Etapa catalítica, que conlleva la descomposición del complejo enzima-sustrato y la liberación de los productos, es decir, un ácido graso libre y un diglicérido, monoglicérido o glicerol. En función de la solubilidad del ácido graso y del pH del medio estos productos se repartirán entre la fase acuosa y la orgánica, pudiendo incluso permanecer en la interfase. En esta etapa se regenera la enzima en su forma activada. Puede considerarse como una única etapa o como la suma de dos, consistentes en la formación de la acil-enzima y la posterior hidrólisis de ésta.

En nuestro caso el triglicérido empleado es la tributirina, por lo que como resultado de su hidrólisis se produce ácido butírico. Al pH al que se han realizado los experimentos, 7.0, casi la totalidad del ácido butírico (95.5%) pasa a la fase acuosa y se disocia, por lo que la etapa 4 ó la hidrólisis de la acil-enzima puede considerarse irreversible.

5.6.3. Concentración de enlaces éster superficiales

La solubilidad de la tributirina en agua es muy reducida, del orden de 0.410 mM, según Ferrato et al. (1997). Esto quiere decir que incluso para el valor más pequeño de concentración de tributirina utilizado (0.0025 frac. v/v, que equivale a 8.60 mM), el límite de solubilidad ha sido ampliamente sobrepasado, por lo que la práctica totalidad de la tributirina se halla en forma de emulsión.

Se trata por tanto de un sistema heterogéneo, en el que las moléculas de sustrato se encuentran formando parte de agregados de tamaño superior, concretamente

pequeñas gotas. Por ello el término concentración de sustrato, tal y como se entiende en la cinética enzimática homogénea, no tiene sentido en la hidrólisis de tributirina (Benzonana y Desnuelle, 1965; Verger et al., 1973b).

Para que una molécula de tributirina sea accesible a la enzima, que se encuentra en la fase acuosa, es necesario que esté situada en la superficie de las gotas de fase orgánica. La concentración de moléculas superficiales en gotas de tributirina de diámetro d_g puede calcularse admitiendo que dichas moléculas superficiales son las que se encuentran en la corona esférica exterior de espesor igual al diámetro de la molécula (d_m). Dado que d_m es muy pequeño con respecto de d_g , esta corona esférica puede considerarse como una lámina de superficie πd_g^2 y espesor d_m . Por tanto el número de moléculas que contiene será:

$$N_{ms} = \frac{\pi d_g^2 d_m}{\frac{\pi}{6} d_m^3} = 6 \frac{d_g^2}{d_m^2} \quad \text{V.17}$$

El diámetro de una molécula de tributirina en fase líquida puede estimarse de forma inmediata a partir del volumen molecular (V_m), que a su vez puede calcularse a partir de la ecuación V.18, donde N_{Av} es el número de Avogadro.

$$V_m = \frac{M_T}{\rho_T N_{Av}} = \frac{302.37}{(1.0350)(6.022 \cdot 10^{23})} = 4.85 \cdot 10^{-22} \text{ cm}^3 \therefore 4.85 \cdot 10^{-10} \mu\text{m}^3 \quad \text{V.18}$$

$$V_m = \frac{\pi}{6} d_m^3 \Rightarrow d_m = \sqrt[3]{\frac{6V_m}{\pi}} = 9.75 \cdot 10^{-4} \mu\text{m} \quad \text{V.19}$$

El número total de moléculas en la gota (N_m) será:

$$N_m = \frac{\pi d_g^3}{6V_m} = \frac{d_g^3}{d_m^3} \quad \text{V.20}$$

Y por tanto la fracción de moléculas superficiales (Y_s) vendrá dada por la ecuación V.21, donde ambos diámetros han de expresarse en micras.

$$Y_s = \frac{N_{ms}}{N_m} = 6 \frac{d_m}{d_g} = \frac{5.85 \cdot 10^{-3}}{d_g} \quad \text{V.21}$$

Debido a que las emulsiones utilizadas, tal y como se ha descrito, no son monodispersas es preciso emplear un tamaño medio de gota. El diámetro medio más adecuado es el que promedia la relación superficie/volumen, diámetro medio de Sauter (d_{gs}), que es la que influye en el proceso considerado:

$$\frac{1}{d_{gs}} = \frac{\int_0^{\infty} f d_g^2 d d_g}{\int_0^{\infty} f d_g^3 d d_g} \quad \text{V.22}$$

Cuando se prepara una emulsión con una fracción de volumen α de la fase orgánica, la concentración total de tributirina por unidad de volumen de emulsión será:

$$c_0 = \frac{\alpha V \rho_T}{M_T V} = \frac{1035 \alpha}{302.37} = 3.42 \alpha \quad \frac{\text{mol}}{\text{L}} \quad \text{V.23}$$

Por tanto la concentración de moléculas de tributirina en la interfase fase orgánica-fase acuosa, será:

$$c_{s0} = Y_s c_0 = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gs}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{L}} \quad \text{V.24}$$

con d_{gs} expresado en micras.

Esta concentración superficial sí representa la cantidad de sustrato realmente accesible a la enzima.

También es posible evaluar la concentración de moléculas superficiales por unidad de área superficial de la emulsión (mol/m^2), lo que generalmente se denomina densidad superficial del triglicérido. Este valor es constante para un tipo dado de sistema micelar o emulsión, y depende solamente de la naturaleza química de la molécula y de los parámetros físicos del ambiente que la rodea, tales como pH, fuerza iónica y temperatura (Verger et al., 1973b).

Dicha concentración superficial de moléculas de tributirina, que llamaremos c_{s0}^* , puede ser calculada a partir de su concentración molar ya determinada, ecuación V.24, y el área interfacial específica de la emulsión (a_T , cm^2/L), la cual puede estimarse a partir de la expresión V.25, donde el diámetro medio de Sauter ha de expresarse en micras.

$$a_T = 10^7 \frac{6\alpha}{d_{gs}}, \text{ cm}^2 / \text{L} \quad \text{V.25}$$

$$c_{s0}^* = \frac{c_{s0}}{a_T} = \frac{0.0200}{6 \cdot 10^7} = 3.337 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2 \quad \text{V.26}$$

En la Tabla 5.28 se recogen a título de ejemplo las áreas interfaciales específicas de las emulsiones utilizadas en los experimentos de hidrólisis, en función de la fracción volumétrica de tributirina en la emulsión.

Tabla 5.28. Áreas interfaciales específicas de las emulsiones utilizadas en los experimentos de hidrólisis. Se muestran diámetros de Sauter promedio.

α_{exp}	$d_{gs}, \mu\text{m}$	$a_T, \text{cm}^2/\text{L}$
0.01	5.64	$1.06 \cdot 10^5$
0.02	5.57	$2.16 \cdot 10^5$
0.05	5.61	$5.34 \cdot 10^5$

5.7. DESARROLLO DE MODELOS CINÉTICOS PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA EN EMULSIÓN.

Para estudiar el mecanismo de actuación de la enzima Lipolase 100 sobre tributirina emulsificada se proponen a continuación dos modelos cinéticos. Ambos modelos consideran que la reacción de hidrólisis tiene lugar por medio de la unión de la enzima con un enlace éster superficial. El primero (modelo simplificado) considera que la cantidad de enzima en la interfase es proporcional a la existente en fase acuosa. Además tiene en cuenta la concentración de moléculas de tributirina en la interfase de las gotas por unidad de volumen de emulsión (c_{s0}), que representa la cantidad de sustrato realmente accesible a la enzima. El segundo modelo propuesto contempla la saturación de la interfase aceite-agua por parte de la enzima, y tiene en cuenta el área interfacial disponible.

5.7.1. Modelo cinético simplificado.

Para que la hidrólisis enzimática tenga lugar, es preciso que la enzima entre en contacto con un enlace éster superficial. Debido a la disposición tetraédrica del carbono central de la glicerina en la molécula de tributirina y a la presencia de tres grupos n-butilo

hidrófobos en tres de las cuatro posiciones, lo más probable es que la molécula de tributirina se disponga con la arista formada por el hidrógeno y un grupo éster en contacto con la fase acuosa. Por esta razón resulta lógico suponer que la concentración inicial de moléculas de tributirina superficiales (c_{s0}) es igual a la de enlaces éster superficiales accesibles.

En principio no se considerará la etapa inicial de transporte de la enzima, ya que a partir de los experimentos de hidrólisis realizados no se aprecia ningún tipo de retraso (“fase lag”) en la reacción, comenzando ésta justo en el momento de incorporar la enzima. Por esta razón podemos suponer el transporte como prácticamente instantáneo, lo cual tiene sentido en un reactor perfectamente agitado (700 rpm) como es el caso. Al-Zuhair et al. (2004a) obtienen para la hidrólisis de aceite de palma mediante lipasa en un reactor tanque agitado a 800 rpm un tiempo de inducción para la adsorción de la enzima no superior a 0.22 min., lo que está en consonancia con la suposición de que el transporte de la enzima de la fase acuosa a la interfase es instantáneo en estas condiciones.

En una primera aproximación, el mecanismo más sencillo que se puede suponer contemplaría tres etapas:

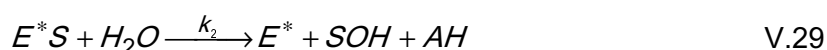
- 1) Adsorción o penetración de la enzima en la interfase fase acuosa – fase orgánica, lo que conlleva la formación de la “enzima activada”.



- 2) Unión de la enzima a un enlace éster hidrolizable superficial y formación del complejo enzima-sustrato:



- 3) Hidrólisis y separación del intermedio formado en los productos y liberación de la enzima activada:



donde E representa la enzima libre, E^* la enzima activada (adsorbida), S un enlace éster superficial e hidrolizable libre, E^*S el complejo enzima-sustrato, SOH el diglicérido y AH el

ácido graso liberado en la hidrólisis. Las constantes cinéticas elementales correspondientes son k_a , k_d , k_1 , k_{-1} y k_2 .

En principio se considerará que la cantidad de enzima adsorbida es proporcional a la cantidad existente en la fase acuosa, equilibrio de la etapa V.27. Así la concentración de enzima adsorbida podrá expresarse en función de la de enzima libre en la fase acuosa:

$$[E^*] = \frac{k_a}{k_d} [E] = K_A [E] \quad \text{V.30}$$

donde K_A es la constante de equilibrio asociada a la adsorción de la enzima.

Aplicando la aproximación de estado estacionario al intermedio formado:

$$\frac{d[E^*S]}{dt} = k_1 [E^*][S] - (k_{-1} + k_2) [E^*S] \approx 0 \quad \text{V.31}$$

Los corchetes representan las concentraciones molares de las correspondientes especies (moles por unidad de volumen de emulsión).

Despejando la concentración del complejo enzima-sustrato de la ecuación V.31 resulta:

$$[E^*S] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} [E^*][S] \quad \text{V.32}$$

Y la velocidad de reacción puede obtenerse a partir de la segunda etapa irreversible:

$$r = k_2 [E^*S] = \frac{k_2 k_1}{(k_{-1} + k_2)} [E^*][S] \quad \text{V.33}$$

Si aplicamos la ecuación V.33 al caso de las velocidades iniciales de reacción, se obtiene:

$$r_0 = \frac{k_2 k_1}{(k_{-1} + k_2)} [E^*]_0 [S]_0 \quad \text{V.34}$$

Los balances de enzima y de enlaces éster hidrolizables y superficiales vienen dados por:

$$[E^*S] + [E^*] + [E] = [E^*S] + [E^*] \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) = e_0 \quad \text{V.35}$$

$$[E^*S] + [S] = c_{S0} \quad \text{V.36}$$

Dependiendo de los valores relativos de e_0 y c_{S0} los balances de enzima y enlaces éster podrán simplificarse o no:

- Si $e_0 \ll c_{S0}$ la ecuación V.36 se simplifica a:

$$[S] \approx c_{S0} \quad \text{V.37}$$

Con lo que:

$$r_0 = \frac{k_2 e_0 c_{S0}}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) + c_{S0}} \quad \text{V.38}$$

A altas concentraciones de centros activos superficiales la enzima estará saturada, siendo la velocidad máxima:

$$r_{\max} = k_2 e_0 \quad \text{V.39}$$

Esto es lo que parece ocurrir en la Figura 5.40.b para una concentración de enzima, $e_{\text{exp}} = 5 \text{ g/L}$. Estas condiciones son las ideales para medir la actividad de la enzima.

- Si $e_0 \gg c_{S0}$ la ecuación V.35 queda:

$$[E] + [E^*] = [E^*] \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) \approx e_0 \quad \text{V.40}$$

Y por tanto:

$$r_0 = \frac{k_2 c_{s0} e_0}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) + e_0} \quad \text{V.41}$$

Y a altas concentraciones de enzima en la fase acuosa los centros activos superficiales estarán saturados, siendo la velocidad máxima:

$$r_{\max} = k_2 c_{s0} \quad \text{V.42}$$

Esto es lo que parece ocurrir en la Figura 5.40.a para $\alpha_{\text{exp}} = 0.01$ y concentraciones de enzima altas, $e_{\text{exp}} \geq 2$ g/L .

- Cuando no son aplicables ninguna de las dos simplificaciones anteriores, deben utilizarse los balances de enzima y centros activos superficiales en su forma inicial:

$$[E^*S] + [E^*] + [E] = e_0 \Rightarrow [E^*] = \frac{e_0 - [E^*S]}{\left(1 + \frac{1}{K_A}\right)} \quad \text{V.43}$$

$$[E^*S] + [S] = c_{s0} \Rightarrow [S] = c_{s0} - [E^*S] \quad \text{V.44}$$

Sustituyendo las ecuaciones V.43 y V.44 en la ecuación V.32, se obtiene una ecuación de segundo grado en $[E^*S]$:

$$[E^*S] = \frac{k_1}{(k_{-1} + k_2)} \left(\frac{e_0 - [E^*S]}{1 + \frac{1}{K_A}} \right) (c_{s0} - [E^*S]) \quad \text{V.45}$$

Que simplificando:

$$[E^*S]^2 - (e_0 + c_{s0} + K'_M)[E^*S] + e_0 c_{s0} = 0 \quad \text{V.46}$$

donde se ha introducido la constante de Michaelis-Menten modificada, K'_M , que incluye la constante de equilibrio correspondiente a la adsorción de la enzima:

$$K'_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \left(1 + \frac{1}{K_A}\right) \quad \text{V.47}$$

Las soluciones de la ecuación V.46 son:

$$[E^*S] = \frac{1}{2} \left((e_0 + c_{s0} + K'_M) \pm \sqrt{(e_0 + c_{s0} + K'_M)^2 - 4e_0c_{s0}} \right) \quad \text{V.48}$$

y la velocidad de reacción sustituyendo en la ecuación V.33:

$$r_0 = \frac{k_2}{2} \left((e_0 + c_{s0} + K'_M) - \sqrt{(e_0 + c_{s0} + K'_M)^2 - 4e_0c_{s0}} \right) \quad \text{V.49}$$

donde se ha dejado sólo el signo negativo, ya que la velocidad de reacción debe ser cero en ausencia de enzima o de sustrato.

Para poder aplicar el modelo a los datos experimentales conviene conocer por tanto el rango de concentraciones de enzima y sustrato en el que nos encontramos, ambos en base molar, para así decidir cuál de las ecuaciones que se han deducido, V.38, V.41 ó V.49, resulta la más adecuada.

El cálculo de la concentración de enlaces éster hidrolizables por unidad de volumen de emulsión puede realizarse mediante la ecuación V.24, mientras que el cálculo de la concentración molar de enzima requiere conocer la cantidad de proteína activa presente en el preparado enzimático comercial y el peso molecular de la misma.

La cantidad de enzima en el preparado enzimático comercial ha sido estimada gravimétricamente, previa precipitación, separación por centrifugación y desecación del precipitado. El valor resultante fue de 3.01% en peso. El peso molecular de la enzima utilizada, que procede del hongo *Thermomyces lanuginosus*, es de 31700 Da (Novozymes, 2003; Wannenberg et al., 1997). En base a estos dos datos es posible estimar la concentración molar de la enzima en la emulsión, e_0 , a partir de la siguiente expresión:

$$e_0 = \frac{0.0301}{31700} e'_0 = 9.495 \cdot 10^{-7} e'_0 \quad \text{V.50}$$

donde e'_0 es la concentración del preparado enzimático comercial en g/L en la emulsión. Lógicamente este método no permite asegurar que la masa total de proteína medida gravimétricamente corresponda a enzima activa y por tanto el valor estimado de la concentración molar de enzima será un valor máximo.

Tabla 5.29. Comparación de los valores de concentración de enzima y sustrato utilizados en los experimentos de hidrólisis.

	e_{exp} , g/L	e'_0 , g/L	e_0 , mol/L	α_{exp}	α	c_{s0} , mol/L ⁽¹⁾
Valor mínimo	0.01	$6.250 \cdot 10^{-4}$	$5.935 \cdot 10^{-10}$	0.0025	0.002	$8.20 \cdot 10^{-6}$
Valor máximo	25.0	1.56	$1.834 \cdot 10^{-6}$	0.05	0.047	$1.67 \cdot 10^{-4}$

⁽¹⁾Para el cálculo de c_{s0} según la ecuación V.24 se ha usado el diámetro de Sauter promedio de todos los experimentos, que es de 5.61 μm

En la Tabla 5.29 se comparan los valores mínimos y máximos de concentraciones molares de enzima y enlaces superficiales empleadas en los experimentos, pudiendo apreciarse que en todo el rango de valores experimentales siempre se cumple que la concentración de enzima es inferior a la de sustrato al menos en casi un orden de magnitud. Además hay que tener en cuenta que los dos valores extremos $\alpha_{exp}=0.0025$ y $e_{exp}=25.0$ g/L, no fueron utilizados nunca en el mismo experimento. Por esta razón se puede considerar en principio que la ecuación V.38 sería la más adecuada para ajustar los resultados experimentales. Sin embargo, esta ecuación predice que la velocidad inicial de reacción es proporcional a la concentración de enzima por lo que no podrá explicar nunca la saturación de enzima que se observa en la Figura 5.40.a para $\alpha_{exp} = 0.01$.

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación V.38 se ha llevado a cabo mediante un programa en MatLab®, incluido en el Anexo III, que permite optimizar los valores de las constantes k_2 y K'_M , minimizando para ello la suma del valor absoluto de los residuos. Los valores experimentales que se suministran al programa, es decir la velocidad inicial de reacción y las concentraciones de enzima y de enlaces éster superficiales, se recogen en la Tabla 5.30 para todos los experimentos de hidrólisis realizados a 30°C.

Para medir la bondad del ajuste se ha calculado en cada caso la desviación relativa entre las velocidades iniciales experimentales y las predichas por el modelo, de forma análoga a la expuesta en la ecuación V.6.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 5.30. Resultados de los experimentos de hidrólisis llevados a cabo a 30°C con la enzima Lipolase 100

α_{exp} , % v/v	α , % v/v	d_{gs} , μm	C_{s0} , mol/L	e_{exp} , g/L	e'_0 , g/L	e_0 , mol/L	r_0 , mol/(L·s)
0.0025	0.0023	5.52	$8.492 \cdot 10^{-6}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$1.403 \cdot 10^{-4}$
0.0050	0.0047	5.77	$1.624 \cdot 10^{-5}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$2.208 \cdot 10^{-4}$
0.0075	0.0070	5.71	$2.465 \cdot 10^{-5}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$3.056 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.83	$3.216 \cdot 10^{-5}$	0.01	0.0006	5.982E-10	$8.739 \cdot 10^{-7}$
0.01	0.0094	5.31	$3.534 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.0031	$2.972 \cdot 10^{-9}$	$5.770 \cdot 10^{-6}$
0.01	0.0094	5.27	$3.556 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.262 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	5.86	$3.198 \cdot 10^{-5}$	0.30	0.0188	$1.780 \cdot 10^{-8}$	$3.618 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	4.96	$3.780 \cdot 10^{-5}$	0.50	0.0313	$2.967 \cdot 10^{-8}$	$5.910 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	5.47	$3.427 \cdot 10^{-5}$	1.00	0.0625	$5.935 \cdot 10^{-8}$	$1.062 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.96	$3.144 \cdot 10^{-5}$	1.30	0.0813	$7.715 \cdot 10^{-8}$	$1.376 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.60	$3.348 \cdot 10^{-5}$	2.00	0.1250	$1.187 \cdot 10^{-7}$	$2.000 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.52	$3.397 \cdot 10^{-5}$	3.00	0.1875	$1.780 \cdot 10^{-7}$	$2.684 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.00	$3.752 \cdot 10^{-5}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$4.048 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.14	$3.055 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$4.372 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.12	$3.062 \cdot 10^{-5}$	15.0	0.9375	$8.902 \cdot 10^{-7}$	$4.317 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.89	$3.185 \cdot 10^{-5}$	20.0	1.250	$1.187 \cdot 10^{-6}$	$5.113 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.94	$3.159 \cdot 10^{-5}$	25.0	1.563	$1.484 \cdot 10^{-6}$	$4.975 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.59	$6.712 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.0031	$2.972 \cdot 10^{-9}$	$5.665 \cdot 10^{-6}$
0.02	0.0188	5.70	$6.575 \cdot 10^{-5}$	0.50	0.0313	$2.967 \cdot 10^{-8}$	$5.651 \cdot 10^{-5}$
0.02	0.0188	5.25	$7.137 \cdot 10^{-5}$	2.00	0.1250	$1.187 \cdot 10^{-7}$	$2.135 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.51	$6.806 \cdot 10^{-5}$	3.00	0.1875	$1.780 \cdot 10^{-7}$	$2.967 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.98	$6.273 \cdot 10^{-5}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$4.231 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.57	$6.736 \cdot 10^{-5}$	7.00	0.4375	$4.154 \cdot 10^{-7}$	$6.291 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.51	$6.805 \cdot 10^{-5}$	8.00	0.5000	$4.748 \cdot 10^{-7}$	$7.290 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	5.42	$6.917 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$8.491 \cdot 10^{-4}$
0.03	0.0281	5.39	$1.043 \cdot 10^{-4}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$5.019 \cdot 10^{-4}$
0.05	0.0469	5.87	$1.597 \cdot 10^{-4}$	0.05	0.0031	$2.972 \cdot 10^{-9}$	$5.914 \cdot 10^{-6}$
0.05	0.0469	5.44	$1.723 \cdot 10^{-4}$	0.50	0.0313	$2.967 \cdot 10^{-8}$	$6.040 \cdot 10^{-5}$
0.05	0.0469	5.60	$1.674 \cdot 10^{-4}$	5.00	0.3125	$2.967 \cdot 10^{-7}$	$4.608 \cdot 10^{-4}$
0.05	0.0469	5.52	$1.698 \cdot 10^{-4}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$9.567 \cdot 10^{-4}$
0.05	0.0469	5.64	$1.663 \cdot 10^{-4}$	12.5	0.7813	$7.418 \cdot 10^{-7}$	$1.171 \cdot 10^{-3}$
0.05	0.0469	5.51	$1.703 \cdot 10^{-4}$	15.0	0.9375	$8.902 \cdot 10^{-7}$	$1.358 \cdot 10^{-3}$

Como era de esperar, el ajuste no resulta satisfactorio cuando se lleva a cabo usando todos los datos experimentales y la ecuación V.38, tal y como se muestra en la Tabla 5.31, si bien los valores de las constantes pueden ser calculados. La mayor desviación se produce para los datos obtenidos a una fracción volumétrica de tributirina de 0.01 y concentraciones de enzima (e_{exp}) superiores a 2.0 g/L así como los

correspondientes a fracciones en volumen de tributirina inferiores a 0.01. Excluyendo estos puntos sí que se consigue un ajuste satisfactorio, pasando la desviación relativa entre los valores experimentales y predichos del 26.68 al 4.60%, como se aprecia en la misma Tabla 5.31.

Tabla 5.31. Resultado del ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones V.38, V.41 y V.49.

Ecuación	Datos Ajustados	Desviación relativa	k_2, s^{-1}	$K_M, mol/L$
V.38	Todos	26.6%	2125	$5.76 \cdot 10^{-5}$
V.38	Todos menos: $\alpha_{exp} = 0.01$ y $e_{exp} \geq 2.0$ g/L $\alpha_{exp} < 0.01$	4.6%	1610	$3.31 \cdot 10^{-6}$
V.49	$\alpha_{exp} = 0.01$ y $e_{exp} \geq 2.0$ g/L $\alpha_{exp} < 0.01$	No es posible el ajuste	-	-
V.49	Todos menos: $\alpha_{exp} = 0.01$ y $e_{exp} \geq 2.0$ g/L $\alpha_{exp} < 0.01$	4.6%	1610	$3.28 \cdot 10^{-6}$
V.41	$\alpha_{exp} = 0.01$ y $e_{exp} \geq 2.0$ g/L $\alpha_{exp} < 0.01$	7.1%	19.2	$2.31 \cdot 10^{-7}$
V.41	Todos	32.9%	10.7	$3.07 \cdot 10^{-7}$

Para ilustrar este resultado se muestra en la Figura 5.49 el gráfico resumen de valores predichos por la ecuación V.38 frente a los experimentales. La representación de los datos experimentales junto con los predichos para las distintas fracciones en volumen de tributirina ensayadas ($\alpha_{exp}=0.01, 0.02$ y 0.05) y para una concentración de enzima (e_{exp}) constante de 5 g/L se presenta en la Figura 5.50.

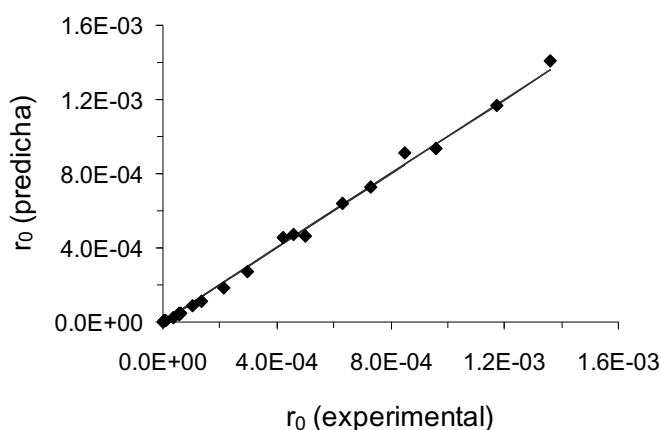


Figura 5.49. Velocidades iniciales predichas por la ecuación V.38 frente a las experimentales. Experimentos realizados a 30°C y pH 7.0 con tres fracciones volumétricas de tributirina (α_{exp}) diferentes (0.01, 0.02 y 0.05).

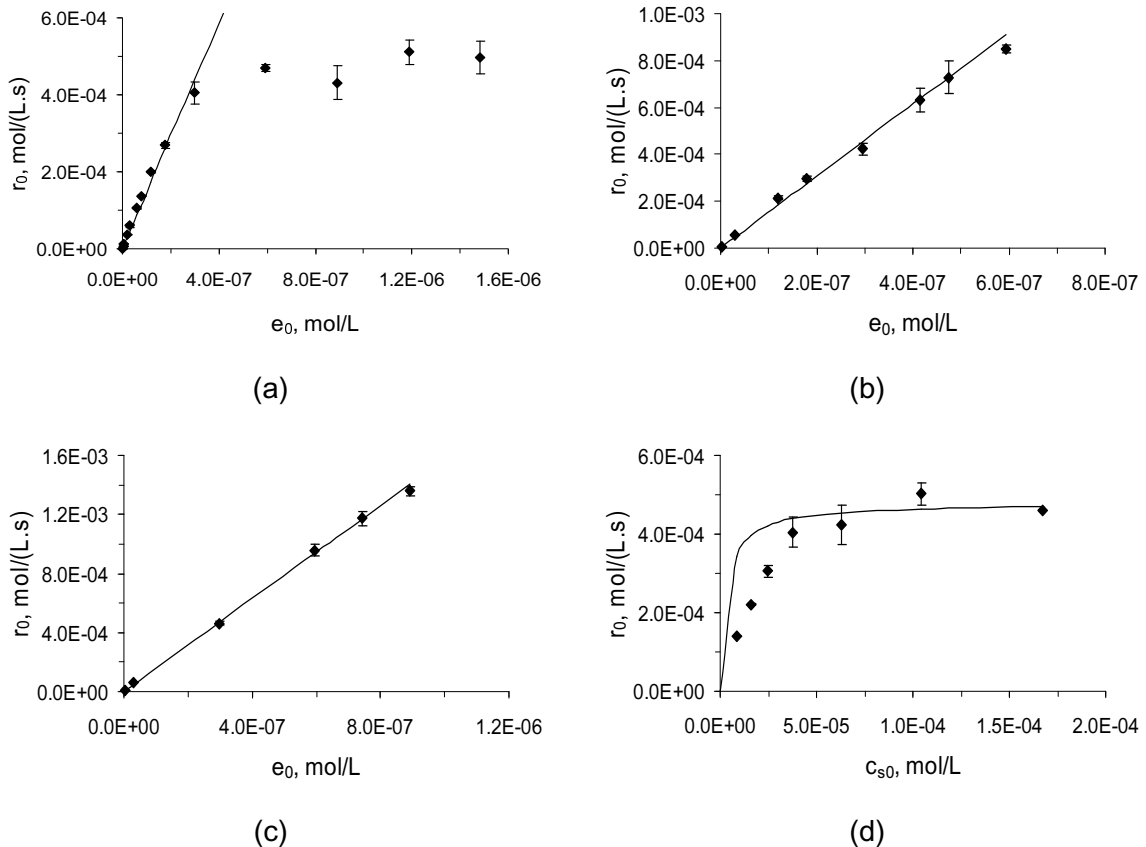


Figura 5.50. Comparación de los datos experimentales (puntos) y los predichos por la ecuación V.38 (líneas continuas) para los experimentos de hidrólisis a 30°C. (a) $\alpha_{exp}=0.01$; (b) $\alpha_{exp}=0.02$; (c) $\alpha_{exp}=0.05$; (d) $\theta_{exp}=5$ g/L

Los valores que se desvían corresponden a la saturación observada a concentraciones de enzima elevadas y fracción en volumen de tributirina de 0.01 (Figura 5.50.a) así como a una concentración de enzima de 5.0 g/L y fracciones volumétricas de tributirina inferiores a 0.01 (Figura 5.50.d)

Dado que la ecuación utilizada no ajusta satisfactoriamente un determinado rango de datos, se ha recurrido a los otras dos ecuaciones propuestas, V.41 y V.49, para verificar si se consigue un ajuste satisfactorio de dichos resultados, aunque el uso de la ecuación V.41 no sería coherente teniendo en cuenta la relación entre las concentraciones molares de enzima y de enlaces éster superficiales utilizadas en los experimentos. La ecuación V.49, es más general que la ecuación V.38 y se reduce a ella en las condiciones indicadas, por tanto debe poder aplicarse en las mismas situaciones.

Los resultados de estos ajustes se muestran también en la Tabla 5.31. Como era de esperar, la ecuación V.49 reproduce los valores que eran ajustados por la ecuación V.38 pero no el resto, resultando unos valores casi idénticos para las constantes k_2 y K_M .

La ecuación V.41 sí permite un ajuste de la totalidad de los datos, pero con una alta desviación relativa (Tabla 5.31), ya que no explica la saturación de sustrato que se observa en la Figura 5.40.b. Cuando se aplica solamente al rango de datos que no eran ajustados por las ecuaciones V.38 y V.49 la desviación relativa es menor, sin llegar tampoco a ser satisfactoria. Además los valores de las constantes cinéticas difieren de las obtenidas mediante las otras ecuaciones hasta en dos órdenes de magnitud, lo que explica el fracaso de la ecuación general V.49 para ajustar todos los resultados obtenidos.

Se puede concluir por tanto que el modelo propuesto no permite un ajuste satisfactorio de todos los resultados experimentales, porque las dos simplificaciones de la ecuación V.49, ecuaciones V.38 y V.41, que permiten explicar independientemente las observaciones experimentales de saturación de sustrato, Figura 5.40.b, y de saturación de enzima, Figura 5.40.a, respectivamente, conducen a valores de los parámetros muy diferentes. Además de acuerdo con las concentraciones efectivas de sustrato y de enzima, no debería haberse observado la saturación de enzima.

Dado que en todo momento la concentración molar de enzima es inferior a la de sustrato, hay que admitir que la saturación no puede explicarse por la escasez de enlaces éster superficiales hidrolizables, sino que la adsorción de la enzima en la interfase ha de ser la responsable de la saturación de la misma. Así, a partir de una determinada concentración de enzima, que dependerá del área interfacial disponible, la adición de nueva enzima no supone un incremento de la velocidad de hidrólisis, al convertirse el área interfacial en un factor limitante, es decir, aunque la concentración de enlaces éster superficiales hidrolizables sea superior a la concentración de enzima activa, esta debe unirse a la superficie de las gotas para que la reacción se produzca y al hacerlo, dado su tamaño molecular, ocupa un espacio muy superior al correspondiente a un enlace éster superficial.

La aplicación del modelo al resto de las temperaturas ensayadas, cuyos datos experimentales se resumen en la Tabla 5.32, dentro del rango de concentraciones de enzima en el que resulta válido, permite obtener la variación de la constante cinética k_2 con la temperatura, que se recoge en la Tabla 5.33. El ajuste resulta satisfactorio, con desviaciones relativas siempre inferiores al 5%, como también puede observarse en la Figura 5.51 donde se han representado los valores calculados aplicando la ecuación V.38 frente a los experimentales para el resto de las temperaturas (40-60°C). La variación de la constante K'_M con la temperatura no presenta una tendencia definida siendo su valor medio en el intervalo 30 – 60°C de $3.28 \cdot 10^{-6}$ mol/L.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Tabla 5.32. Resultados de los experimentos de hidrólisis con la enzima Lipolase 100 a 40, 50 y 60°C.

Experimentos de hidrólisis a 40°C							
α_{exp} , % v/v	α , % v/v	d_{gs} , μm	c_{s0} , mol/L	e_{exp} , g/L	e'_0 , g/L	e_0 , mol/L	r_0 , mol/(L·s)
0.01	0.0094	5.83	$3.216 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.0031	$2.967 \cdot 10^{-9}$	$6.258 \cdot 10^{-6}$
0.01	0.0094	6.48	$2.893 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.188 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	6.15	$3.049 \cdot 10^{-5}$	1.0	0.0625	$5.935 \cdot 10^{-8}$	$1.169 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.28	$2.987 \cdot 10^{-5}$	3.0	0.1875	$1.780 \cdot 10^{-7}$	$3.069 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.08	$3.086 \cdot 10^{-5}$	7.0	0.4375	$4.154 \cdot 10^{-7}$	$5.019 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.06	$3.092 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$5.533 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.06	$3.096 \cdot 10^{-5}$	15.0	0.9375	$8.902 \cdot 10^{-7}$	$5.468 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	6.88	$5.449 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.224 \cdot 10^{-5}$
0.02	0.0188	6.05	$6.202 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$8.392 \cdot 10^{-4}$
0.05	0.0469	6.58	$1.424 \cdot 10^{-4}$	0.10	0.0062	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.226 \cdot 10^{-5}$
0.05	0.0469	6.02	$1.557 \cdot 10^{-4}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$1.026 \cdot 10^{-3}$
Experimentos de hidrólisis a 50°C							
α_{exp} , % v/v	α , % v/v	d_{gs} , μm	c_{s0} , mol/L	e_{exp} , g/L	e'_0 , g/L	e_0 , mol/L	r_0 , mol/(L·s)
0.01	0.0094	5.89	$3.184 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.0031	$2.967 \cdot 10^{-9}$	$6.336 \cdot 10^{-6}$
0.01	0.0094	6.56	$2.856 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.217 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	5.43	$3.455 \cdot 10^{-5}$	1.0	0.0625	$5.935 \cdot 10^{-8}$	$1.312 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.40	$2.928 \cdot 10^{-5}$	7.0	0.4375	$4.154 \cdot 10^{-7}$	$5.315 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.00	$3.124 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$6.123 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.17	$3.040 \cdot 10^{-5}$	15.0	0.9375	$8.902 \cdot 10^{-7}$	$6.086 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	6.88	$5.449 \cdot 10^{-5}$	0.1	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.265 \cdot 10^{-5}$
0.02	0.0188	6.19	$6.058 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$8.824 \cdot 10^{-4}$
0.05	0.0469	6.58	$1.424 \cdot 10^{-4}$	0.1	0.0063	$5.935 \cdot 10^{-9}$	$1.311 \cdot 10^{-5}$
0.05	0.0469	6.31	$1.486 \cdot 10^{-4}$	10.0	0.6250	$5.935 \cdot 10^{-7}$	$1.105 \cdot 10^{-3}$
Experimentos de hidrólisis a 60°C							
α_{exp} , % v/v	α , % v/v	d_{gs} , μm	c_{s0} , mol/L	e_{exp} , g/L	e'_0 , g/L	e_0 , mol/L	r_0 , mol/(L·s)
0.01	0.0094	5.19	$3.613 \cdot 10^{-5}$	0.05	0.0031	$2.967 \cdot 10^{-9}$	$5.350 \cdot 10^{-6}$
0.01	0.0094	6.60	$2.842 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.915 \cdot 10^{-9}$	$1.105 \cdot 10^{-5}$
0.01	0.0094	6.02	$3.114 \cdot 10^{-5}$	1.0	0.0625	$5.915 \cdot 10^{-8}$	$1.200 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	5.89	$3.182 \cdot 10^{-5}$	7.0	0.4375	$4.140 \cdot 10^{-7}$	$5.091 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.59	$2.846 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.915 \cdot 10^{-7}$	$5.746 \cdot 10^{-4}$
0.01	0.0094	6.39	$2.933 \cdot 10^{-5}$	15.0	0.9375	$8.872 \cdot 10^{-7}$	$5.975 \cdot 10^{-4}$
0.02	0.0188	6.17	$6.074 \cdot 10^{-5}$	0.10	0.0063	$5.915 \cdot 10^{-9}$	$1.030 \cdot 10^{-5}$
0.02	0.0188	5.20	$7.205 \cdot 10^{-5}$	10.0	0.6250	$5.915 \cdot 10^{-7}$	$1.050 \cdot 10^{-3}$
0.05	0.0469	6.64	$1.412 \cdot 10^{-4}$	0.10	0.0063	$5.915 \cdot 10^{-9}$	$1.173 \cdot 10^{-5}$
0.05	0.0469	6.59	$1.423 \cdot 10^{-4}$	10.0	0.6250	$5.915 \cdot 10^{-7}$	$1.136 \cdot 10^{-3}$

Tabla 5.33. Variación de la constante k_2 con la temperatura. Se incluye también la desviación relativa de los ajustes.

Temperatura	Desviación relativa	k_2 , s ⁻¹
30°C	4.6%	1610
40°C	3.7%	1773
50°C	2.8%	1911
60°C	1.3%	1967

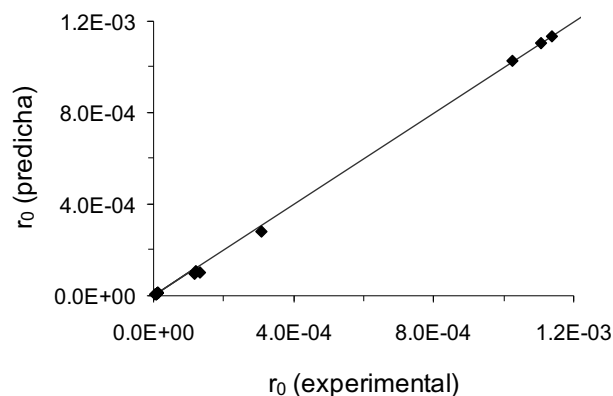


Figura 5.51. Velocidades iniciales predichas por la ecuación V.38 frente a las experimentales. Experimentos realizados a 40 - 60°C y pH 7.0 con tres fracciones volumétricas de tributirina (α_{exp}) diferentes (0.01, 0.02 y 0.05).

El ajuste de la constante k_2 a la ecuación de Arrhenius, V.9, conduce a la obtención de la energía de activación aparente de la etapa de descomposición del complejo enzima-sustrato (ΔE) y del factor de frecuencia (B), los cuales se reflejan en la Tabla 5.34. El punto correspondiente a 60°C no ha sido incluido en el ajuste, ya que se desvía de la tendencia de los otros tres, como se aprecia en la Figura 5.52. La mayor importancia de la desactivación enzimática a 60°C es muy probablemente la causa de este comportamiento.

Tabla 5.34. Parámetros de la ecuación de Arrhenius y coeficiente de determinación del ajuste. Modelo sin saturación interfacial (ecuación V.38)

$\Delta E/R$, K	ΔE , Kcal/mol	B , s ⁻¹	R^2
839.9	1.7	$2.58 \cdot 10^{-4}$	0.997

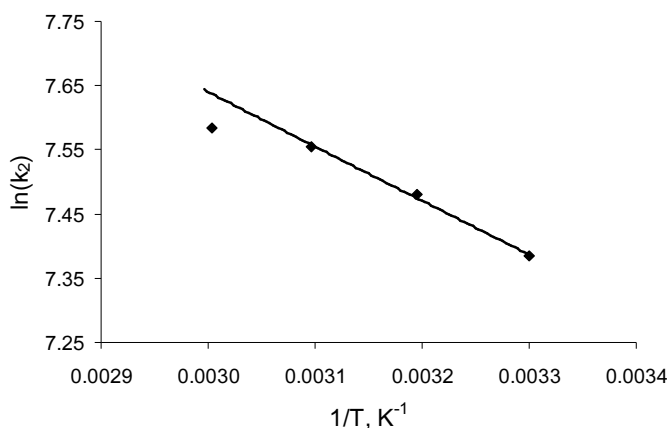


Figura 5.52. Variación de la constante k_2 (ecuación V.38) con la temperatura. Ajuste a la ecuación de Arrhenius

El valor obtenido para la energía de activación de la reacción concuerda con el encontrado por Al-Zuhair et al. (2003) para la hidrólisis de aceite de palma mediante lipasa que es de 1.2 Kcal/mol. Si bien resulta algo menor que los valores hallados por otros autores para la hidrólisis enzimática de triglicéridos, tanto en emulsión, 5.3 Kcal/mol (Desnuelle, 1961), como en micelas inversas, 7.0 Kcal/mol (Kim y Chung, 1995).

En cuanto a la utilidad práctica del modelo propuesto, cabe destacar que, desde el punto de vista de su aplicación a la hidrólisis de triglicéridos en emulsión O/W, es necesario que la concentración de enzima utilizada no sobrepase en ningún caso el valor crítico a partir del cual se produce la saturación, valor que dependerá lógicamente de la fracción volumétrica de triglicérido y del diámetro medio de las gotas de la emulsión.

5.7.2. Modelo cinético con saturación interfacial.

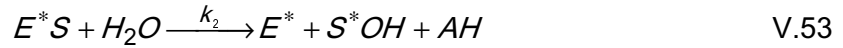
Dado que la adsorción de la enzima en la interfase parece alcanzar la saturación en algunas de las condiciones experimentales utilizadas, para que un modelo sea aplicable a todo el rango de concentraciones de enzima y sustrato empleadas deberá incluir esta posibilidad.

Para ello se van a introducir las siguientes modificaciones en el modelo anteriormente propuesto:

- 1) La adsorción/penetración de la enzima en la interfase se considerará que responde a una adsorción monomolecular tipo Langmuir (Benzonana y Desnuelle, 1965). Por ello la velocidad de adsorción de la enzima en la interfase será proporcional a la cantidad de enzima libre en la fase acuosa así como a la cantidad de área interfacial libre disponible.

- 2) Dado que el área interfacial disponible limita la velocidad de reacción, se realizará un balance al área interfacial en vez de a los enlaces éster superficiales.
- 3) Las concentraciones de las distintas especies, a excepción de la de enzima libre en la fase acuosa, se expresarán en términos interfaciales (mol/cm²), lo que se indica con un superíndice en forma de asterisco en el símbolo correspondiente.

Tras introducir estas modificaciones las etapas del modelo propuesto quedan de la forma siguiente:



donde a representa el área interfacial específica libre (cm²/L).

Aplicando la aproximación de estado estacionario a ambos intermedios en los que interviene la enzima, E^* y E^*S , tenemos.

$$\frac{d[E^*]}{dt} = k_a[E]a + (k_{-1} + k_2)[E^*S] - (k_d + k_1[S^*])[E^*] \approx 0 \quad V.54$$

$$\frac{d[E^*S]}{dt} = k_1[E^*][S^*] - (k_{-1} + k_2)[E^*S] \approx 0 \quad V.55$$

Y planteando los balances a la enzima y al área interfacial:

$$e_0 = [E] + a_T([E^*] + [E^*S]) \quad V.56$$

$$a_T = a + A_m a_T([E^*] + [E^*S]) \quad V.57$$

Donde:

a_T , área interfacial específica total, cm²/L

A_m , área ocupada por un mol de enzima, cm²/mol (se considera en principio que la enzima activada y la unida al sustrato ocupan la misma área).

A partir de la ecuación V.55 se obtiene:

$$[E^*S] = \frac{k_1[S^*]}{k_{-1} + k_2} [E^*] \quad \text{V.58}$$

Sustituyendo V.58 en V.54 se llega a:

$$[E^*] = a \frac{k_a}{k_d} [E] \quad \text{V.59}$$

Lo que sustituido en V.58:

$$[E^*S] = a \frac{k_a k_1 [S^*]}{k_d (k_{-1} + k_2)} [E] \quad \text{V.60}$$

Sustituyendo V.59 y V.60 en el balance de enzima y despejando la concentración de enzima libre:

$$[E] = \frac{k_d (k_{-1} + k_2) e_0}{k_d (k_{-1} + k_2) + a_T k_a a (k_{-1} + k_2 + k_1 [S^*])} \quad \text{V.61}$$

Sustituyendo la ecuación V.61 en las ecuaciones V.59 y V.60 queda:

$$[E^*] = \frac{k_a a (k_{-1} + k_2) e_0}{k_d (k_{-1} + k_2) + a_T k_p a (k_{-1} + k_2 + k_1 [S^*])} \quad \text{V.62}$$

$$[E^*S] = \frac{k_p a k_1 [S^*] e_0}{k_d (k_{-1} + k_2) + a_T k_a a (k_{-1} + k_2 + k_1 [S^*])} \quad \text{V.63}$$

La velocidad del proceso, utilizando la etapa catalítica, y referida al volumen total de emulsión, vendrá dada por:

$$r = k_2 a_T [E^*S] \quad \text{V.64}$$

Sustituyendo V.63 en V.64 se obtiene la expresión para la velocidad de reacción:

$$r = \frac{k_2 e_0 a_T k_a a k_1 [S^*]}{k_d (k_{-1} + k_2) + a_T k_p a (k_{-1} + k_2 + k_1 [S^*])} \quad \text{V.65}$$

Ecuación que se puede escribir de la forma siguiente:

$$r = \frac{k_2 e_0 [S^*]}{\frac{K_M^*}{K_e \cdot a \cdot a_T} + K_M^* + [S^*]} \quad \text{V.66}$$

Donde se han definido las siguientes constantes:

- K_M^* , constante de Michaelis-Menten referida al complejo interfacial enzima-sustrato, que se define como:

$$K_M^* = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{V.67}$$

- K_e , constante de equilibrio relativa a la adsorción/desorción de la enzima:

$$K_e = \frac{k_a}{k_d} \quad \text{V.68}$$

Si aplicamos esta ecuación a las velocidades iniciales, dado que la concentración de enzima empleada es inferior a la de enlaces superficiales ($e_0 \ll c_{s0}$) podemos suponer que $[S^*] \gg [E^*S]$ y por ello $[S^*] \approx c_{s0}^*$ (concentración interfacial inicial de enlaces hidrolizables). Así la ecuación V.66 podría escribirse:

$$r_0 = \frac{k_2 e_0 c_{s0}^*}{K_M^* \left(1 + \frac{1}{K_e \cdot a \cdot a_T} \right) + c_{s0}^*} \quad \text{V.69}$$

La ecuación V.69 conduce a la obtenida por Verger et al. (1973b) cuando $a = a_T$, lo que sucede a bajas concentraciones de enzima, condiciones en las que se realizaron los experimentos de estos autores.

El valor de c_{s0}^* , que tal como se ha indicado es una constante para este sistema, fue estimado a partir de la ecuación V.26 resultando ser igual a $3.337 \cdot 10^{-10}$ mol/cm².

A partir del balance de área superficial podremos expresar el área interfacial libre en función de las otras variables medibles. Así sustituyendo en la ecuación V.57 las

ecuaciones V.62 y V.63 y despejando a , se llega a la ecuación de segundo grado siguiente:

$$a^2 + \left[\frac{K_M^*}{a_T (K_M^* + [S^*]) K_e} + A_m e_0 - a_T \right] \cdot a - \frac{K_M^*}{(K_M^* + [S^*]) K_e} = 0 \quad \text{V.70}$$

El valor de a viene dado sólo por la solución positiva, pues ha de cumplirse que $a = a_T$ cuando $e_0 = 0$.

$$a = \frac{1}{2} \left(\left[a_T - \frac{K_M^*}{a_T (K_M^* + [S^*]) K_e} - A_m e_0 \right] + \sqrt{\left[a_T - \frac{K_M^*}{a_T (K_M^* + [S^*]) K_e} - A_m e_0 \right]^2 + \frac{4 \cdot K_M^*}{(K_M^* + [S^*]) K_e}} \right) \quad \text{V.71}$$

Sustituyendo $[S^*]$ por c_{s0}^* , queda:

$$a = \frac{1}{2} \left(\left[a_T - \frac{K_M^*}{a_T (K_M^* + c_{s0}^*) K_e} - A_m e_0 \right] + \sqrt{\left[a_T - \frac{K_M^*}{a_T (K_M^* + c_{s0}^*) K_e} - A_m e_0 \right]^2 + \frac{4 \cdot K_M^*}{(K_M^* + c_{s0}^*) K_e}} \right) \quad \text{V.72}$$

Las ecuaciones V.69 y V.72 permiten aplicar el modelo para las velocidades iniciales de reacción, teniendo como parámetros K_M^* , K_e , k_2 y A_m . Sin embargo dado que de estos cuatro parámetros sólo tres son realmente independientes, las ecuaciones anteriores pueden reformularse de la forma siguiente:

$$r_0 = \frac{k_2 e_0 c_{s0}^*}{(K_M^* + c_{s0}^*) + \frac{K_M^*}{K_e \cdot a \cdot a_T}} = \frac{k_2 c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^*} \frac{e_0}{1 + \frac{K_M^*}{K_e (K_M^* + c_{s0}^*)} \frac{a_T}{a}} = k_{ap} \frac{e_0}{1 + \frac{1}{K_{ap} a_T^2 y_a}} \quad \text{V.73}$$

donde se han definido las dos nuevas constantes:

$$k_{ap} = \frac{k_2 c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^*} \quad \text{V.74}$$

$$K_{ap} = \frac{K_e (K_M^* + c_{s0}^*)}{K_M^*} \quad \text{V.75}$$

y la fracción de área interfacial específica libre, y_a , dada por:

$$y_a = \frac{a}{a_T} \quad \text{V.76}$$

Si se considera que K_M^* y c_{s0}^* serán posiblemente del mismo orden, como sucede en la cinética enzimática homogénea, las constantes k_{ap} y K_{ap} prácticamente representan la constante cinética y la constante de equilibrio de adsorción de la enzima, ya que las dos relaciones que intervienen serán del orden de la unidad:

$$\beta = \frac{c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^*} \quad 1 - \beta = \frac{K_M^*}{K_M^* + c_{s0}^*} \quad \text{V.77}$$

Si se sustituye la ecuación V.72 en la V.76 se obtiene para la fracción de área interfacial específica libre la siguiente expresión:

$$y_a = \frac{1}{2} \left(\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \sqrt{\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + 4 \frac{1}{K_{ap} a_T^2}} \right) \quad \text{V.78}$$

Sustituyendo esta expresión en la ecuación V.73 queda:

$$r_0 = \frac{k_{ap} e_0}{2} \frac{1}{1 + \frac{K_{ap} a_T^2}{\left(\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \sqrt{\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + \frac{4}{K_{ap} a_T^2}} \right)}} \quad \text{V.79}$$

La ecuación V.79 es aplicable a los datos de velocidades iniciales de reacción, lo que permitiría determinar los tres parámetros k_{ap} , K_{ap} y A_m , a cada temperatura.

Para encontrar el valor óptimo de las tres constantes cinéticas anteriores se ha utilizado un programa elaborado en MatLab®, incluido en el Anexo IV, de forma que la suma del valor absoluto de los residuos sea minimizada y se ha aplicado a los datos experimentales obtenidos a 30°C (Tabla 5.30). Los valores experimentales con los que se realiza el ajuste son los mismos que en el modelo anterior, pero en vez de la

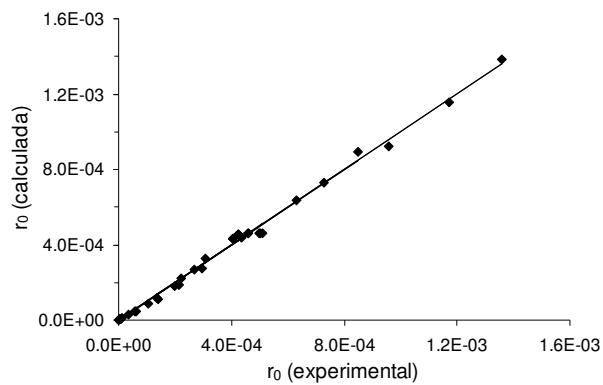
concentración de centros superficiales (c_{s0}) se emplea el área interfacial específica (a_7), obtenida de la ecuación V.25.

Para que el programa de cálculo converja hacia una solución satisfactoria es necesario escoger adecuadamente los valores iniciales de las constantes. El valor de k_2 puede suponerse del mismo orden que el obtenido en el ajuste con el modelo anterior (1610 s^{-1}). Dado que en la cinética enzimática homogénea la constante de Michaelis-Menten representan la concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la máxima, en este caso, al ser la concentración interfacial de sustrato constante, se tomará este valor ($3.337 \cdot 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$) como una primera aproximación de K_M^* . El parámetro A_m puede ser estimado en principio como 3400 \AA^2 por molécula, es decir $2.048 \cdot 10^{11} \text{ cm}^2/\text{mol}$, valor calculado por Martinelle et al. (1995) a partir del estudio de la adsorción de la lipasa de *Humicola lanuginosa* sobre una superficie de poliestireno. Por último como valor inicial para K_e puede tomarse el encontrado por Al-Zuhair et al. (2004a) en el estudio cinético de la hidrólisis enzimática de aceite de palma en un reactor tanque agitado, que es de $1.3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$. A partir de estos valores es posible calcular los valores iniciales para las constantes cinéticas del modelo: $k_{ap} \approx 8.05 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$ y $K_{ap} \approx 2.60 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$.

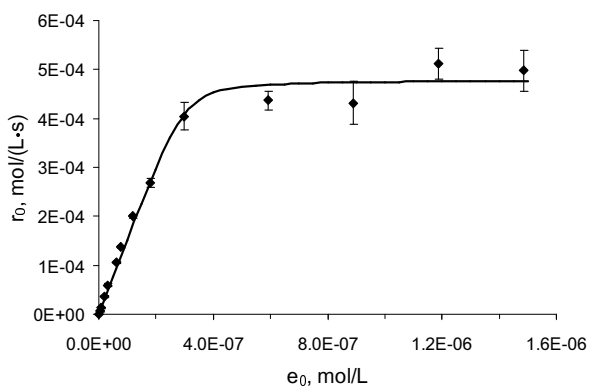
Los parámetros obtenidos del ajuste, para las diferentes temperaturas ensayadas, se muestran en la Tabla 5.35, junto con la desviación relativa entre los valores predichos por el modelo y los experimentales, que en todos los casos es inferior al 5.0%. La buena correlación entre los resultados experimentales y los calculados se aprecia también en la Figura 5.53, para 30°C y en la Figura 5.54, para el resto de temperaturas ensayadas.

Tabla 5.35. Resultado del ajuste de los datos experimentales al modelo cinético con saturación interfacial (ecuación V.79) para las distintas temperaturas ensayadas.

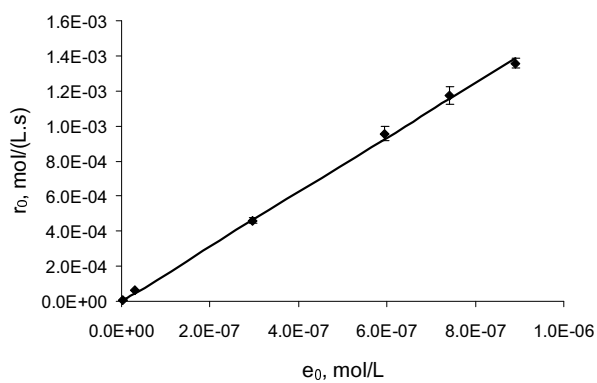
Temperatura	Desv. rel.	k_{ap}, s^{-1}	K_{ap}, cm^2	$A_m, \text{cm}^2/\text{mol}$
30°C	4.8%	1559	$5.059 \cdot 10^{-3}$	$3.198 \cdot 10^{11}$
40°C	3.6%	1821	$3.542 \cdot 10^{-3}$	$2.996 \cdot 10^{11}$
50°C	3.4%	1988	$2.038 \cdot 10^{-3}$	$2.908 \cdot 10^{11}$
60°C	5.0%	2005	$1.293 \cdot 10^{-3}$	$2.816 \cdot 10^{11}$



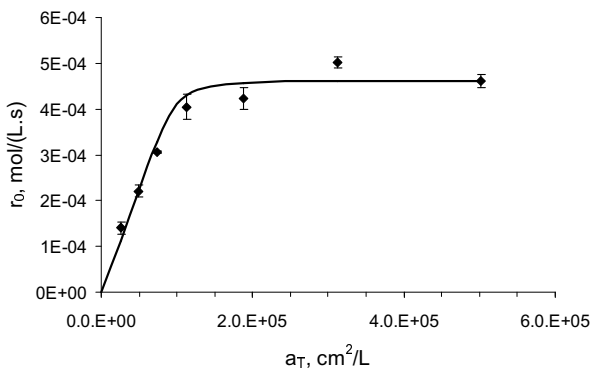
(a)



(b)

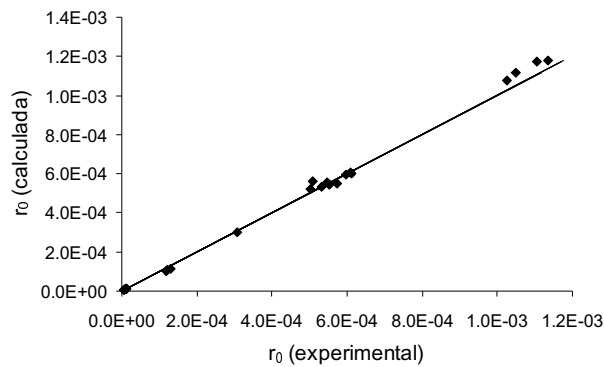


(c)

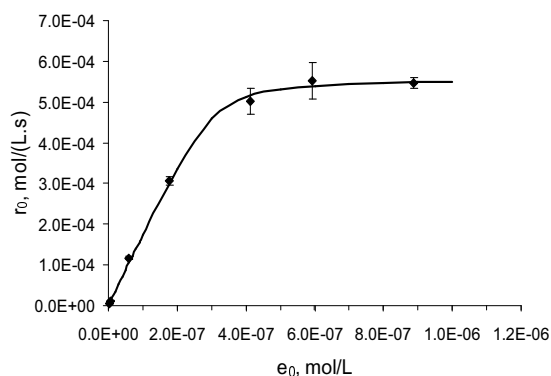


(d)

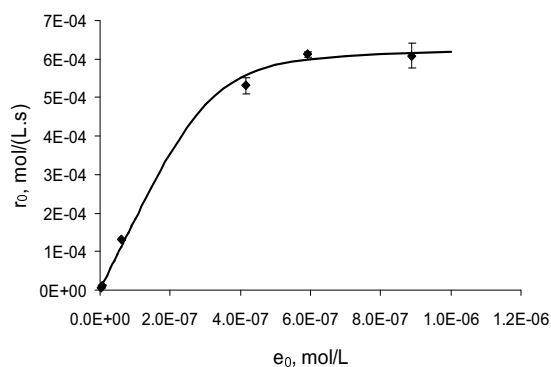
Figura 5.53. Ajuste de los datos experimentales al modelo cinético con saturación interfacial (ecuación V.79) para 30°C. (a) Valores calculados frente a experimentales; (b) $\alpha_{exp}=0.01$; (c) $\alpha_{exp}=0.05$; (d) $e_{exp}=5.0$ g/L.



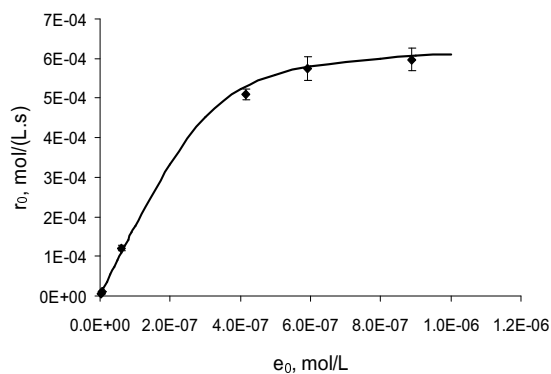
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 5.54. Ajuste de los datos experimentales al modelo cinético con saturación interfacial (ecuación V.79) para 40 – 60°C. (a) gráfico de valores calculados frente a experimentales para el conjunto de los experimentos y a continuación los respectivos ajustes para una fracción en volumen de tributirina (α_{exp}) igual a 0.01 y a 40°C (b), 50°C (c) y 60°C (d).

Los valores calculados para el parámetro A_m parecen tener una tendencia descendente con la temperatura. En principio no parece lógico suponer una disminución del área ocupada por la enzima al aumentar la temperatura. Además, dado que el número de puntos experimentales es superior para 30°C que para el resto de temperaturas, estos valores pueden venir afectados por un mayor error. Por esta razón estimaremos A_m como la media aritmética de los valores obtenidos a diferentes las temperaturas, lo que da un resultado de $2.98 \cdot 10^{11}$ cm²/mol, o lo que es lo mismo, 4950 Å² por molécula, valor que resulta superior a los 3400 Å² por molécula calculados por Martinelle et al. (1995). Este aumento puede tener sentido, ya que dicho valor ha sido estimado en un estudio de la adsorción de la enzima sobre superficies sólidas de poliestireno, donde ninguna molécula se une su centro activo. En nuestro caso la enzima incorpora en su centro activo una molécula de sustrato, lo que puede provocar un aumento del área ocupada por la misma.

La variación de las constantes k_{ap} (ascendente) y K_{ap} (descendente) con la temperatura representa el cambio con dicha variable de la constante catalítica (k_2) y de la constante de equilibrio de adsorción de la enzima (K_e), que no pueden ser directamente estimadas a partir del ajuste de las velocidades iniciales.

5.7.2.1. Estudio del progreso de la reacción con el tiempo.

Dado que el modelo que contempla la saturación de la interfase por la enzima resulta ser adecuado para predecir las velocidades iniciales de reacción en todo el rango de concentraciones de enzima y de sustrato ensayadas y a diferentes temperaturas, el siguiente paso será verificar si dicho modelo es capaz de predecir adecuadamente el progreso de la reacción con el tiempo. Para ello hay que analizar previamente, en base a los resultados disponibles, el posible comportamiento del sistema durante la hidrólisis enzimática.

Cada molécula superficial de tributirina tiene 3 grupos éster, pero probablemente no todos ellos sean accesibles desde la fase acuosa. Para que se una a la enzima el grupo éster debe estar en el hemisferio de la molécula en contacto con la fase acuosa y no en el hemisferio sumergido en la fase orgánica. Tal y como ya se ha indicado, la disposición tetraédrica del carbono central de la glicerina en la molécula de tributirina y los tres grupos n-butilo hidrófobos unidos a tres de estas posiciones sugieren que sólo uno de los grupos ésteres será accesible desde la fase acuosa, es decir, que la molécula de tributirina se dispondrá más frecuentemente con la arista formada por el hidrógeno y un grupo éster en contacto con la fase acuosa. Además, el mismo razonamiento indica que

cuando se produce la hidrólisis el diglicérido producto que queda retenido en la fase orgánica, si se encuentra en la superficie se dispondrá preferentemente con el hidrógeno y el grupo alcohólico libre hacia la fase acuosa, ocultando sus grupos ésteres restantes hacia el seno de la fase orgánica.

Esto significa que en condiciones normales el proceso alcanzará la hidrólisis de alrededor de 1/3 de los grupos ésteres presentes, si bien el movimiento molecular permitirá que en ocasiones la molécula de diglicérido exponga su grupo éster extremo hacia la fase acuosa y la hidrólisis continuará, aunque probablemente a menor velocidad. Este hecho se constata además experimentalmente, observando la forma de las curvas de conversión en función del tiempo (Figura 5.42), ya que el avance de la reacción es rápido hasta que se alcanza una conversión del 30%, y muy lento a partir de ese momento.

Por tanto, podría considerarse que el proceso transcurre en dos etapas que se superponen parcialmente. En la primera, se produce fundamentalmente la hidrólisis de un grupo éster extremo de moléculas de tributirina que determina la aparición de dibutirina que permanece formando parte de la gota, y sólo cuando la concentración de moléculas de tributirina superficiales es muy escasa, conversiones del orden del 30 %, empezará a hidrolizarse el segundo grupo éster extremo de las moléculas de dibutirina, cuando estas se sitúan en la interfase en la posición adecuada.

Si se introduce la conversión referida a la concentración inicial total de grupos ésteres en la emulsión:

$$x = \frac{3c_0 - c_e}{3c_0} \quad c_e = 3c_0(1 - x) \quad \text{V.80}$$

siendo c_0 la concentración inicial de tributirina (mol/L) y c_e la concentración total de grupos ésteres en cada instante del proceso en la emulsión (mol/L).

El valor de c_0 puede ser calculado mediante la ecuación V.23, con lo que la ecuación V.80 queda de la siguiente forma:

$$c_e = 10.26 \alpha (1 - x) \quad \text{V.81}$$

La velocidad del proceso vendrá dada por:

$$r = -\frac{dc_e}{dt} = 10.26 \alpha \frac{dx}{dt}, \quad \text{mol/ (L \cdot s)} \quad \text{V.82}$$

Puesto que el diglicérido y una pequeña fracción del ácido butírico liberados quedan en la fase orgánica una aproximación aceptable, en principio, sería que el tamaño de las gotas permanece prácticamente constante durante el proceso, fundamentalmente durante la primera etapa indicada anteriormente, y por tanto la fracción volumétrica de fase orgánica y el área interfacial específica total. Aunque el diglicérido por su grupo alcohólico libre puede tener más tendencia a situarse en la superficie de la gota que el triglicérido, se admitirá también en principio que la composición de la fase orgánica es uniforme entre el seno y la superficie de la gota. Admitiendo que el grupo éster de la posición 2 no se hidroliza, ya que la enzima es 1,3-específica, en cada instante, se cumplirá:

$$C_0 = C_{TB} + C_{DB} + C_{MB} \quad \text{V.83}$$

$$C_e = 3C_{TB} + 2C_{DB} + C_{MB} \quad \text{V.84}$$

siendo C_{TB} , C_{DB} y C_{MB} las concentraciones molares del triglicérido, diglicérido y monoglicérido en la emulsión respectivamente.

En la primera etapa de la hidrólisis, no se formará prácticamente monoglicérido y las ecuaciones anteriores se simplifican a:

$$C_0 = C_{TB} + C_{DB} \quad \text{V.85}$$

$$C_e = 3C_{TB} + 2C_{DB} \quad \text{V.86}$$

Restando ambas ecuaciones, para eliminar la concentración de dibutirina:

$$C_{TB} = C_e - 2 C_0 = C_0 (1 - 3 x) \quad \text{V.87}$$

$$C_{DB} = 3 C_0 x \quad \text{V.88}$$

Con estas hipótesis la concentración de grupos ésteres superficiales accesibles (mol/L) en cualquier instante de esta primera etapa, sería:

$$C_s = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gs}} (1 - 3x) \quad \text{V.89}$$

Y la concentración molar de grupos alcohólicos libres superficiales (diglicéridos):

$$c_{SOH} = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gS}} 3x = 0.0600 \frac{\alpha}{d_{gS}} x \quad V.90$$

La relación entre ambas concentraciones será:

$$\frac{c_{SOH}}{c_S} = \frac{3x}{1-3x} \quad V.91$$

Admitiendo que el área interfacial específica total permanece aproximadamente constante durante esta primera etapa de la hidrólisis y que la concentración superficial de grupos ésteres accesibles y de grupos alcohólicos libres serán iguales a las respectivas concentraciones volumétricas divididas por el área interfacial específica total, la relación definida en la ecuación V.91 también se verificará para las respectivas concentraciones superficiales (mol/cm²), pudiendo escribirse:

$$\frac{[S^*OH]}{[S^*]} = \frac{3x}{1-3x} \quad V.92$$

Realizando un balance a los grupos ésteres superficiales:

$$c_{s0}^* = [S^*] + [E^*S] + [S^*OH] \quad V.93$$

Sin embargo se puede admitir, dado que la concentración molar de grupos ésteres superficiales es en el más desfavorable de los casos unas 23 veces superior a la de enzima, que $[E^*S] \ll [S^*] + [S^*OH]$, con lo que despejando $[S^*OH]$ de la ecuación V.92 y sustituyendo en la ecuación V.93, queda:

$$[S^*] = c_{s0}^* (1-3x) \quad V.94$$

Sustituyendo la ecuación V.94 en las ecuaciones V.66 y V.71 y teniendo en cuenta las ecuaciones V.74 y V.75, se llega a:

$$r = \frac{k_{ap} e_0 (1-3x)}{\frac{K_M^* + c_{s0}^* (1-3x)}{K_M^* + c_{s0}^*} + \frac{1}{K_{ap} a_T^2 y_a}} \quad V.95$$

$$y_a = \frac{1}{2} \left(\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} \frac{K_M^* + c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^* (1-3x)} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \left(\left(1 - \frac{1}{K_{ap} a_T^2} \frac{K_M^* + c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^* (1-3x)} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + 4 \frac{1}{K_{ap} a_T^2} \frac{K_M^* + c_{s0}^*}{K_M^* + c_{s0}^* (1-3x)} \right)^{1/2} \right) \quad \text{V.96}$$

Utilizando el parámetro “ β ”, definido en la ecuación V.77, es posible expresar las anteriores ecuaciones de la forma siguiente:

$$r = \frac{k_{ap} e_0 (1-3x)}{1-\beta + \beta(1-3x) + \frac{1}{K_{ap} a_T^2 y_a}} \quad \text{V.97}$$

$$y_a = \frac{1}{2} \left(\left(1 - \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \left(\left(1 - \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + 4 \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} \right)^{1/2} \right) \quad \text{V.98}$$

Por tanto, teniendo también en cuenta la ecuación V.82, se obtiene la expresión siguiente para la velocidad de reacción:

$$\frac{dx}{dt} = k_{ap} \frac{\frac{e_0}{10.26\alpha} (1-3x)}{1-\beta + \beta(1-3x) + \frac{\frac{e_0}{10.26\alpha} (1-3x)}{2} \left(\left(1 - \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \left(\left(1 - \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + 4 \frac{1-\beta + \beta(1-3x)}{K_{ap} a_T^2} \right)^{1/2} \right)} \quad \text{V.99}$$

Aplicando la ecuación V.99 a los valores de conversión en función del tiempo para cada experimento de hidrólisis (e_0 , α y a_T constantes) y considerando los valores de las constantes cinéticas k_{ap} y K_{ap} y del parámetro A_m , calculados a partir de las velocidades iniciales, es posible simular el progreso de la reacción con el tiempo, imponiendo para ello el valor de β , que deberá estar comprendido entre 0 y 1. Para llevar a cabo dicha simulación se ha elaborado un programa en MatLab®, incluido en el Anexo V, que permite realizar la integración numérica de la ecuación V.99.

Las simulaciones obtenidas imponiendo un valor de $\beta=0.5$ y a diferentes concentraciones de enzima y sustrato se muestran en la en Figura 5.55 y se comparan con los valores experimentales correspondientes.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

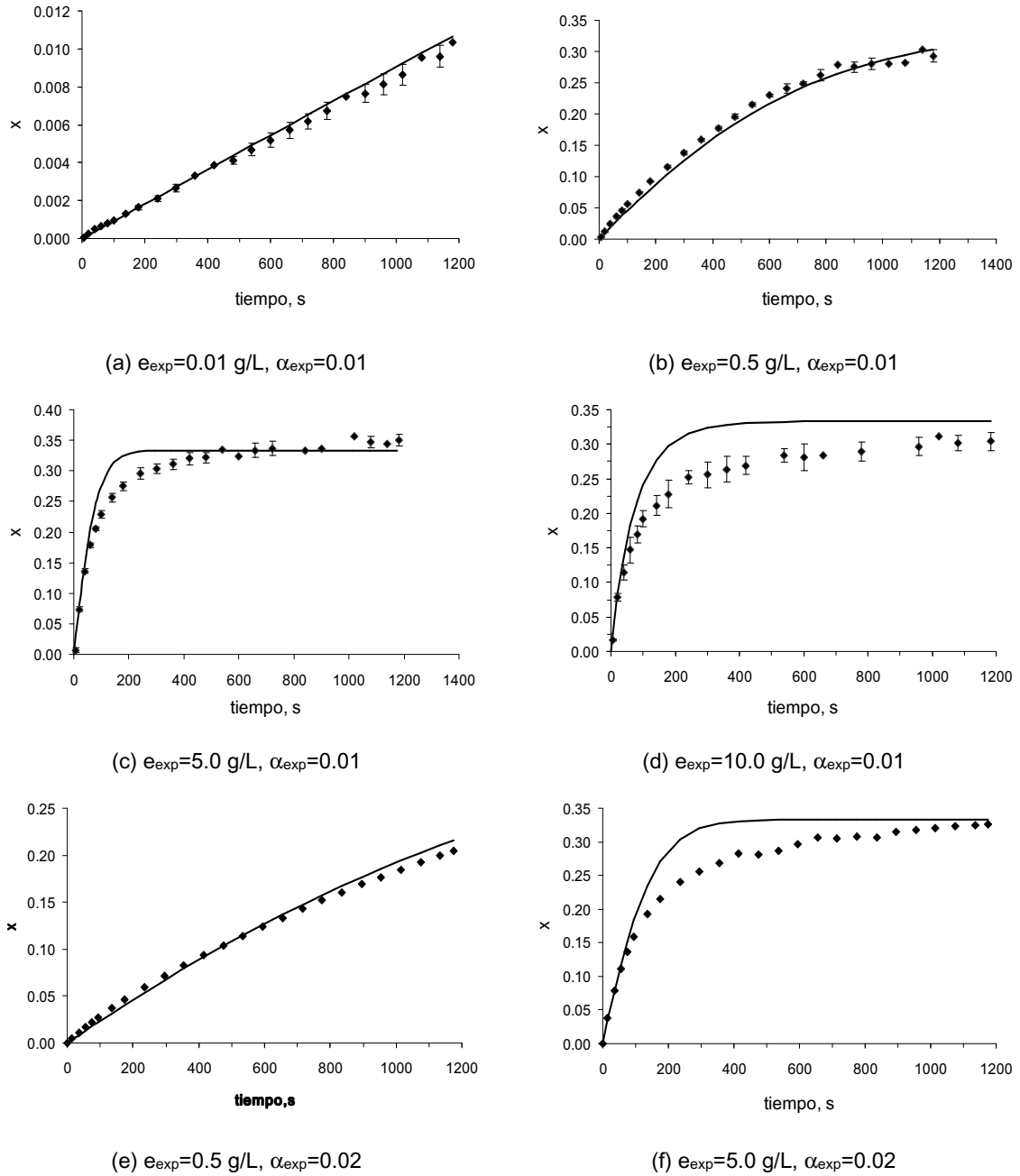


Figura 5.55. Simulaciones teóricas y valores experimentales para la hidrólisis de tributirina a diferentes concentraciones de enzima y sustrato.

Aún sin optimizar el valor de β la concordancia entre los valores experimentales y las simulaciones es satisfactoria a bajas concentraciones de enzima, apreciándose las mayores desviaciones para concentraciones de enzima próximas o superiores a aquellas que producen saturación de la interfase (Figura 5.55.c, d, y f). En estos casos el modelo predice un progreso de la reacción más rápido que el observado en la práctica. Al utilizar otros valores de β comprendidos en el intervalo 0 – 1 no se consigue un ajuste satisfactorio de estos experimentos, prevaleciendo siempre la misma tendencia.

En principio, varios factores podrían explicar este fenómeno:

- 1) La desnaturalización o desactivación de la enzima, lo cual se puede descartar, ya que se ha comprobado experimentalmente que la desactivación térmica no es apreciable a 30°C, sino sólo a partir de 40°C. Además afectaría a la hidrólisis independientemente de la concentración de enzima.
- 2) La acumulación de productos de hidrólisis, especialmente diglicéridos, en la interfase, lo que contravendría una de las hipótesis que se han hecho, que es la homogeneidad de las composiciones del interior de la gota y de su superficie. Esta acumulación puede tener dos causas: (1) La mayor tendencia que los glicéridos parciales formados presentan a permanecer en la interfase por sus grupos alcohólicos hidrófilos libres, y (2) la posible limitación que la difusión de estos glicéridos hacia el interior de la gota podría imponer a elevadas velocidades de reacción, es decir, a altas concentraciones de enzima.
- 3) Las constantes cinéticas del modelo, particularmente la constante catalítica y la constante de equilibrio de adsorción de la enzima, pueden depender de las propiedades de la interfase, las cuales se modifican durante la hidrólisis. De esta forma las constantes utilizadas, que han sido calculadas a partir de las velocidades iniciales, no serían completamente válidas durante el progreso de la reacción. Wannenberg et al. (1997), al estudiar la actividad y la adsorción de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* sobre superficies de distinta hidrofiliidad, encuentran que la cantidad de enzima adsorbida decrece al aumentar la hidrofiliidad de la superficie, mientras que la actividad específica de la misma aumenta. Si bien estos autores trabajan con un sustrato soluble, sus conclusiones claramente indican que las propiedades de la interfase afectan a la capacidad catalítica de la enzima.

En el caso de que el diglicérido, por su grupo alcohólico libre, tenga más tendencia a situarse en la superficie de la gota que el triglicérido, esto determinaría una diferencia de la composición de la fase orgánica entre el seno y la superficie de la gota.

Si consideramos que las ecuaciones V.87 y V.88 representan únicamente las concentraciones de triglicérido y diglicérido en el seno de la gota y que existe un reparto no uniforme entre el seno de la gota y su superficie, se podría definir un coeficiente de reparto del diglicérido, K_r , dado por:

$$K_r = \frac{C_{DBs}}{C_{DB}} > 1 \quad \text{V.100}$$

donde c_{DBs} representa la concentración molar de diglicérido en la superficie de la gota, que teniendo en cuenta la ecuación V.90 será:

$$c_{DBs} = K_r 3c_{s0} x \quad V.101$$

Puesto que la concentración de glicéridos superficiales (c_{s0}) es constante, la concentración superficial de tributirina (C_{TBs}) vendrá dada por:

$$c_{TBs} = c_{s0} - c_{DBs} = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gS}} - K_r 3c_{s0} x \quad V.102$$

Con estas hipótesis la concentración de grupos ésteres superficiales accesibles (mol/L) en cualquier instante de esta primera etapa, sería:

$$c_s = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gS}} (1 - 3K_r x) \quad V.103$$

Y la concentración molar de grupos alcohólicos libres superficiales (diglicéridos):

$$c_{SOH} = 0.0200 \frac{\alpha}{d_{gS}} 3K_r x = 0.0600 \frac{\alpha}{d_{gS}} K_r x \quad V.104$$

La relación entre ambas concentraciones será:

$$\frac{c_{SOH}}{c_s} = \frac{3K_r x}{1 - 3K_r x} \quad V.105$$

Relación que también resulta válida para las respectivas concentraciones superficiales (mol/cm²):

$$\frac{[S^*OH]}{[S^*]} = \frac{3K_r x}{1 - 3K_r x} \quad V.106$$

Aplicando un balance a los enlaces superficiales accesibles, ecuación V.93, y admitiendo que $[E^*S] \ll [S^*] + [S^*OH]$, se llega a una expresión similar a la obtenida anteriormente, ecuación V.94, para la concentración superficial de enlaces éster hidrolizables en el transcurso de la reacción.

$$[S^*] = c_{s0}^* (1 - 3K_r x) \quad \text{V.107}$$

La ecuación V.107 considera la influencia del coeficiente de reparto del diglicérido en la concentración superficial de enlaces éster hidrolizables. A partir de ella, procediendo de la misma forma que con la hipótesis inicial, se llega a la siguiente expresión para la velocidad de la reacción:

$$r = \frac{k_{ap} e_0 (1 - 3K_r x)}{1 - \beta + \beta(1 - 3K_r x) + \frac{K_{ap} a_T^2 \left(\left(1 - \frac{1 - \beta + \beta(1 - 3K_r x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right) + \left(\left(1 - \frac{1 - \beta + \beta(1 - 3K_r x)}{K_{ap} a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T} \right)^2 + 4 \frac{1 - \beta + \beta(1 - 3K_r x)}{K_{ap} a_T^2} \right)^{1/2} \right)}{2} \quad \text{V.108}$$

La ecuación V.108 permite simular el progreso de la reacción con el tiempo, fijando para ello un valor de β y del coeficiente de reparto K_r . Sin embargo, cuando se procede de esta forma, aparecen dos problemas:

- La concordancia entre los valores experimentales y los calculados, que es aceptable para conversiones inferiores a 0.25, decrece a partir de ese momento. Con toda probabilidad, una vez saturada la interfase de diglicérido, el enlace éster extremo aún sin hidrolizar, comienza a ser hidrolizado de forma apreciable, formándose el monoglicérido. Dado que esta segunda etapa de la reacción, considerablemente más lenta que la primera, no ha sido contemplada en las ecuaciones del modelo propuesto, se producirá una desviación entre los resultados predichos y los experimentales, tal y como se aprecia en la Figura 5.56.

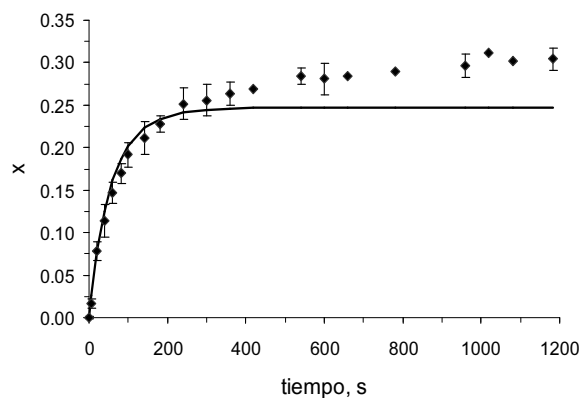


Figura 5.56. Simulación mediante la ecuación V.108 y valores experimentales de la conversión en función del tiempo durante la hidrólisis con $e_{exp}=10.0$ g/L y $\alpha_{exp}=0.01$. Los valores de β y K_r utilizados fueron 0.5 y 1.35 respectivamente.

- No resulta posible encontrar un único valor de K_r válido para todo el intervalo de concentraciones de enzima utilizadas. Tal y como se aprecia en la Tabla 5.36, dicho coeficiente presenta una tendencia creciente con la concentración de enzima hasta alcanzar un máximo a concentraciones por enzima de 5.0 g/L, es decir cuando la interfase se encuentra saturada.

Tabla 5.36. Valores del coeficiente de reparto, K_r , a diferentes concentraciones de enzima y sustrato con $\beta=0.5$ para conversiones no superiores a 0.25

$e_{exp}, g/L$	$\alpha_{exp}, v/v$	K_r
0.01	0.01	1.00
0.5	0.01	1.00
1.0	0.01	1.15
5.0	0.01	1.30
10.0	0.01	1.35
25.0	0.01	1.25
0.5	0.02	1.15
5.0	0.02	1.30

El aumento del coeficiente de reparto es claramente paralelo al de la velocidad de reacción, alcanzando incluso un máximo a concentraciones de enzima saturantes. Por tanto la diferencia de composición entre el seno de la gota y su superficie se acentúa a velocidades de reacción elevadas. En estas condiciones, muy probablemente, la velocidad de difusión del diglicérido desde la superficie de la gota hasta su interior y la del triglicérido en sentido contrario no es suficiente para mantener la homogeneidad de composición en la gota, tendiendo el diglicérido a acumularse en la superficie.

En una situación como ésta, en la que la velocidad de reacción en la interfase determina la existencia de un gradiente dentro de las gotas, el planteamiento del modelo tiene que incorporar las ecuaciones que describen la difusión en una esfera:

$$\frac{D_{TD}}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_T}{\partial r} \right) = \frac{\partial c_T}{\partial t} \quad \text{V.109}$$

$$\frac{D_{DT}}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial c_D}{\partial r} \right) = \frac{\partial c_D}{\partial t} \quad \text{V.110}$$

$$t = 0 \quad 0 \leq r \leq \frac{d_g}{2} \quad c_T = c_{T0} \quad c_D = 0 \quad \text{V.111}$$

$$\begin{aligned}
 t > 0 \quad r = 0 \quad \frac{\partial c_T}{\partial r} = 0 \quad \frac{\partial c_D}{\partial r} = 0 \\
 r = \frac{d_g}{2} \quad -D_{TD} \frac{\partial c_T}{\partial r} = v \quad D_{DT} \frac{\partial c_D}{\partial r} = v_{\text{int}}
 \end{aligned}
 \tag{V.112}$$

Donde “ v_{int} ” es la velocidad de hidrólisis en la interfase, que cambia con el tiempo.

Una aproximación a este efecto es expresar el coeficiente de reparto anteriormente definido, K_r , como una función de la concentración de enzima. Para ello es necesario que dicho coeficiente aumente con la concentración de enzima hasta alcanzar un máximo, momento a partir del cual debe permanecer constante. La ecuación empírica V.113 predice aproximadamente el valor de K_r , de acuerdo con las datos recogidos en la Tabla 5.36.

$$K_r = 1.30 - 0.30 \exp(-9.0 \cdot 10^6 \cdot e_0)
 \tag{V.113}$$

En la Figura 5.57 se muestran las simulaciones realizadas con las ecuaciones V.108 y V.113 para conversiones inferiores a 0.25 y utilizando un valor de β igual a 0.5 y varias concentraciones de enzima.

La concordancia entre los resultados predichos por el modelo y los experimentales en el intervalo de conversiones 0 - 0.25, aun sin optimizar el valor del parámetro β , es bastante satisfactoria.

Cuando el modelo cinético propuesto se aplica a las demás temperaturas ensayadas, con los valores de las constantes k_{ap} , K_{ap} y A_m determinados a partir de las velocidades iniciales y el mismo valor de β , los resultados obtenidos son también satisfactorios, para el mismo intervalo de conversiones, tal y como se aprecia en la Figura 5.58.

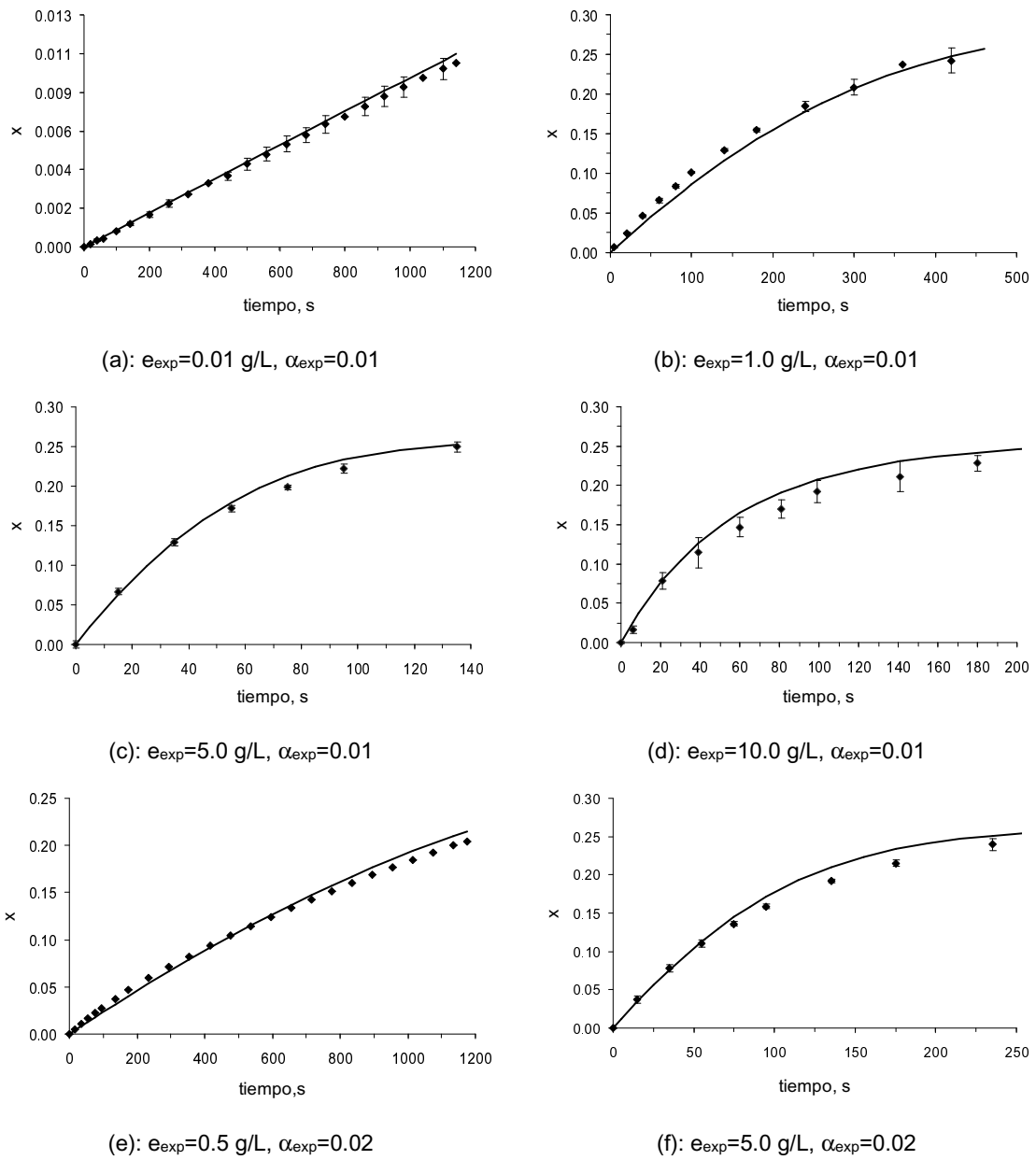


Figura 5.57. Simulaciones teóricas, según la ecuación V.108, y valores experimentales para la hidrólisis de tributirina a diferentes concentraciones de enzima y sustrato. El coeficiente de reparto, K_r , se ha estimado con la ecuación V.113 y se ha utilizado un valor de β igual a 0.5.

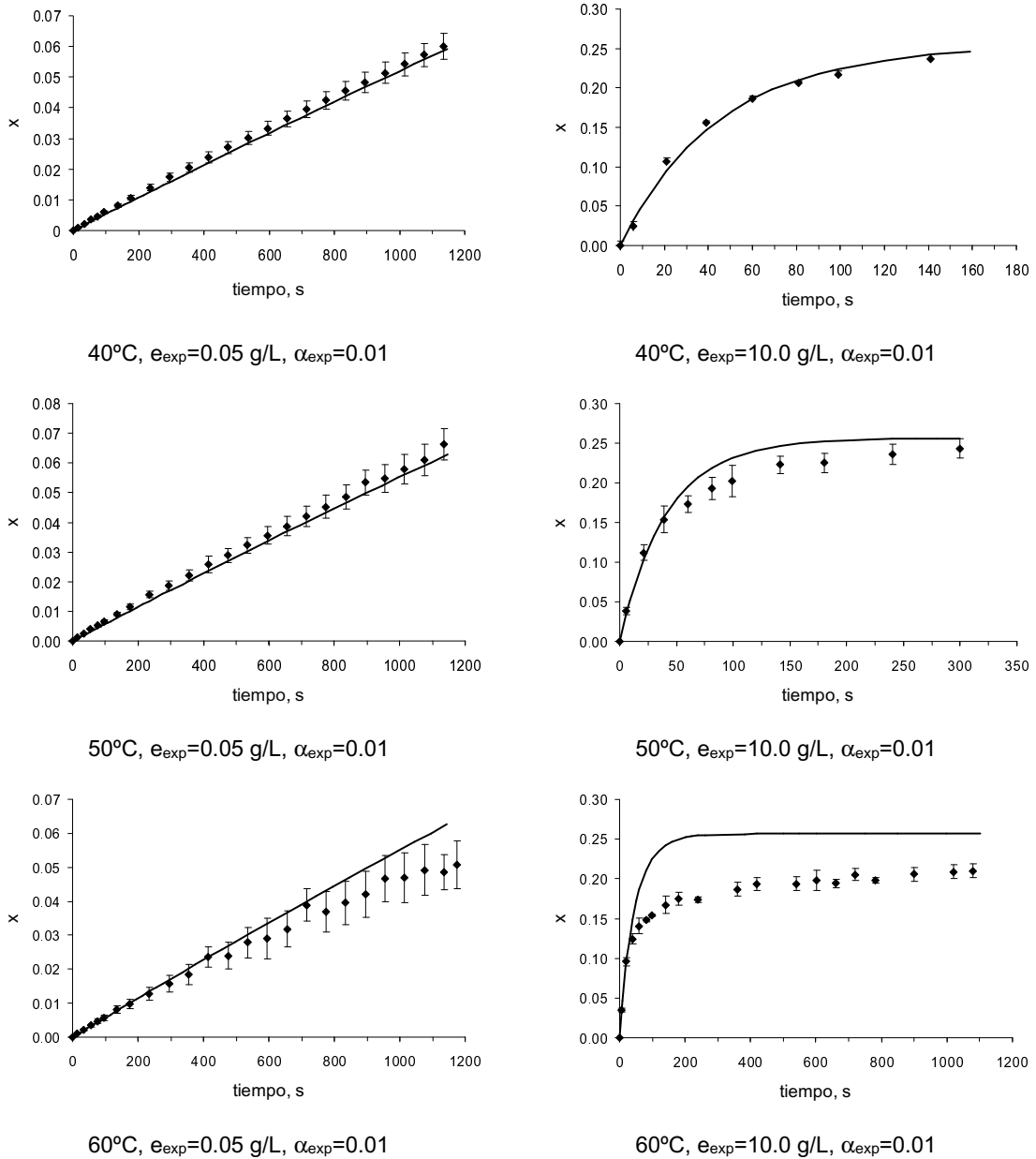


Figura 5.58. Simulaciones teóricas, según la ecuación V.108, y valores experimentales para la hidrólisis de tributirina a diferentes concentraciones de enzima y sustrato y temperaturas. El coeficiente de reparto, K_r , se ha estimado con la ecuación V.113 y se ha utilizado un valor de β igual a 0.5.

Las desviaciones que se observan a 60°C pueden, con bastante seguridad, achacarse a la desactivación enzimática que es ya apreciable a dicha temperatura, y quizá ligeramente a 50°C.

El valor del parámetro β debería variar con la temperatura al hacerlo K_M^* y c_{s0}^* , sin embargo es en principio aceptable admitir que esa variación, probablemente descenso, no sea muy importante, de modo que dado el error asociado a su estimación no merezca la pena intentar estimarlo a las diferentes temperaturas. De cualquier forma, utilizando un valor de β igual a 0.5 resulta posible a su vez estimar la constante cinética elemental, k_2 , y la constante de equilibrio de adsorción de la enzima, K_e , a partir de las constantes k_{ap} y K_{ap} y la ecuación V.77. Los valores resultantes para ambas se recogen en la Tabla 5.37.

Tabla 5.37. Estimación de las constantes k_2 y K_e a las diferentes temperaturas utilizadas en los experimentos.

Temperatura	k_2, s^{-1}	K_e, cm^2
30°C	3118	$2.53 \cdot 10^{-3}$
40°C	3642	$1.77 \cdot 10^{-3}$
50°C	3976	$1.02 \cdot 10^{-3}$
60°C	4010	$6.47 \cdot 10^{-4}$

La variación de la constante k_2 , única constante cinética elemental calculada, con la temperatura se ha ajustado a la ecuación de Arrhenius (ecuación V.9). En la Figura 5.59 se representan los valores del $\ln(k_2)$ frente a la inversa de la temperatura y el correspondiente ajuste a la ecuación de Arrhenius. Tal y como sucedía con el modelo inicialmente propuesto, el ajuste de los valores obtenidos experimentalmente a la ecuación de Arrhenius es satisfactorio excepto para 60°C, valor que se desvía de la tendencia que presentan los restantes. Como ya se ha indicado, esto se debe casi con toda probabilidad a la desactivación enzimática.

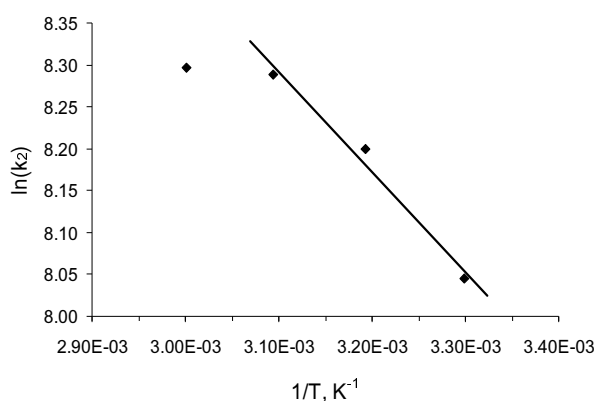


Figura 5.59. Variación de la constante catalítica k_2 con la temperatura. Ajuste a la ecuación de Arrhenius.

La energía de activación aparente para la hidrólisis enzimática resulta ser de 2.4 Kcal/mol. Dicho valor es ligeramente mayor que el obtenido mediante el modelo inicialmente propuesto pero también del orden de los encontrados por otros autores (Desnuelle, 1961; Kim y Chung, 1995; Al-Zuhair et al. 2003).

Por otro lado la variación de la constante de equilibrio para la adsorción de la enzima con la temperatura deberá responder a la ecuación de Van't Hoff, V.114, lo que nos permitiría calcular el calor de adsorción (ΔH) de dicho proceso.

$$K_e = C \exp\left(\frac{-\Delta H}{RT}\right) \quad \text{V.114}$$

En la Figura 5.60 se incluye la representación del $\ln(K_e)$ frente a la inversa de la temperatura, observándose un ajuste satisfactorio de los datos a la ecuación de Van't Hoff. A partir de dicho ajuste es posible calcular la entalpía de adsorción de la enzima, que resulta igual a -9.3 Kcal/mol. Este valor es superior al de un proceso de adsorción física, lo cual resulta lógico puesto que la adsorción implica la activación de la enzima y por tanto debe suponer ligeros cambios estructurales de la misma.

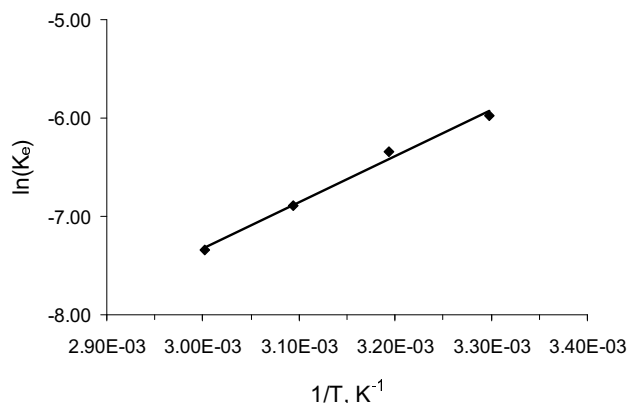


Figura 5.60. Variación de la constante de equilibrio K_e con la temperatura. Ajuste a la ecuación de Van't Hoff.

5.8. INFLUENCIA DE LOS TENSIOACTIVOS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIBUTIRINA

La presencia de tensioactivos en el medio de reacción afecta a la velocidad de hidrólisis enzimática de la tributirina. Dada la naturaleza interfacial de la acción de las

lipasas el efecto del tensioactivo sobre la actuación de la enzima puede darse a dos niveles distintos:

- Formación de complejos enzima–tensioactivo, cuyas propiedades catalíticas difieren de las de la enzima original, tanto en sentido positivo como negativo. Numerosos autores (Kawase et al., 1985; Fujii et al., 1986; Helistö y Korpela, 1998), tras incubar distintas lipasas en presencia de tensioactivos, encuentran que los tensioactivos no iónicos activan a las lipasas, provocando su inhibición sólo a muy altas concentraciones. Sin embargo los tensioactivos aniónicos inhiben por lo general a una gran cantidad de lipasas.
- Modificación de las propiedades interfaciales del sustrato a causa de la adsorción del tensioactivo. Kawase et al. (1985) hallaron que la actividad lipásica decrece de forma lineal con la concentración de tensioactivo cuando el sustrato era incubado en presencia de éste. La densidad de carga de la interfase parece jugar también un papel decisivo en la adsorción de la lipasa, que tiene muy poca afinidad por interfases cargadas negativamente especialmente a alta presión superficial (Skagerlind et al., 1995).

Para estudiar el efecto de los tensioactivos sobre la velocidad de hidrólisis enzimática de tributirina se han llevado a cabo experimentos consistentes en añadir a la emulsión del sustrato cantidades crecientes de cuatro agentes de superficie diferentes, añadiendo la enzima posteriormente para comenzar la hidrólisis. Los tensioactivos utilizados fueron tres no iónicos (Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 y GlucoPON 650) y uno aniónico (sal sódica del ácido dodecibencenosulfónico ó LAS), cuyas características y propiedades se presentan en el apartado 3.3.

En la Figura 5.61 se muestra la variación de la velocidad inicial de hidrólisis de tributirina en función de la concentración de tensioactivo a 30°C. Los resultados para el Findet 1214N/23 no se incluyen por que la velocidad de reacción fue nula a todas las concentraciones ensayadas. Los resultados para el tensioactivo aniónico y para los no iónicos se presentan por separado.

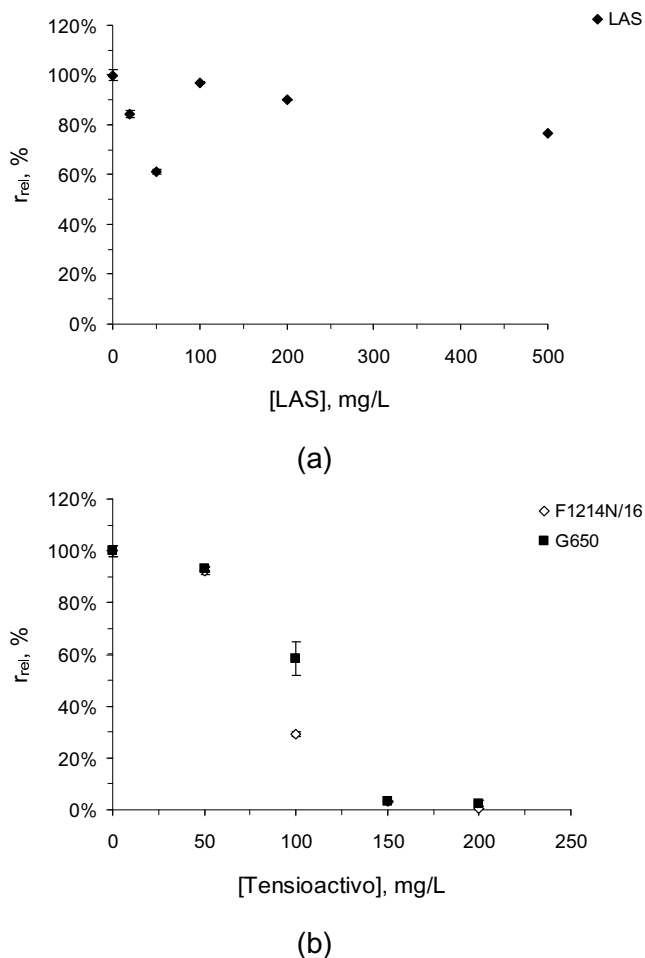
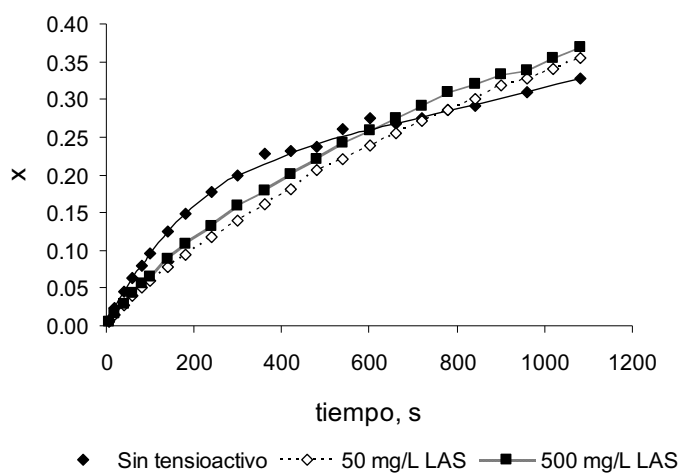


Figura 5.61. Influencia de la concentración de tensioactivo en la velocidad inicial de hidrólisis de tributirina. Condiciones de los experimentos: 30°C; $\alpha_{exp} = 0.01$; $e_{exp} = 1.0$ g/L. Tensioactivos utilizados: (a) aniónico; (b) no iónicos. Las velocidades se han calculado como un porcentaje respecto de la velocidad en ausencia de tensioactivo ($r_0 = 1.062 \cdot 10^{-4}$ mol/(L·s)) en las mismas condiciones.

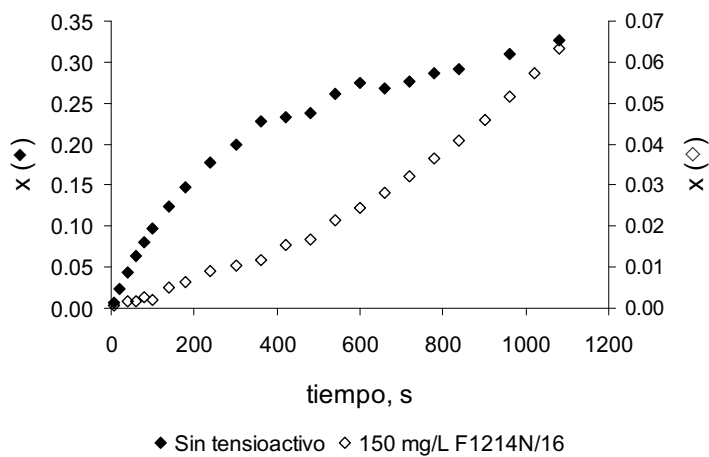
Tal como puede apreciarse en la Figura 5.61 la evolución de la velocidad inicial de reacción es completamente diferente según se trate de un tensioactivo aniónico o no iónico. En el primer caso se produce una disminución brusca, a bajas concentraciones de LAS, recuperándose la velocidad a valores mayores, si bien manteniendo una tendencia decreciente. Para los tensioactivos no iónicos el descenso de la velocidad inicial de reacción es suave para concentraciones bajas de tensioactivo (50 mg/L), experimentando a continuación una caída brusca, de forma que para 150 mg/L de tensioactivo la velocidad inicial es prácticamente nula en ambos casos.

Este comportamiento diferenciado también se refleja en el progreso de la reacción tonel tiempo, como se observa en la Figura 5.62. En el caso del LAS, las curvas son similares a las obtenidas en ausencia de tensioactivo, de forma que la pendiente más elevada es la inicial, momento a partir del cual ésta decrece. Para los tensioactivos no

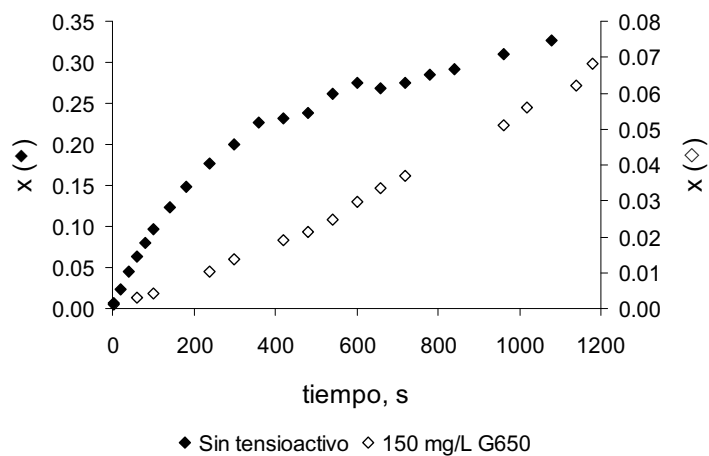
iónicos esto no es así, ya que la velocidad de reacción aumenta en el transcurso de la hidrólisis.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.62. Evolución de la reacción de hidrólisis de tributirina en ausencia y en presencia de diferentes tensioactivos: (a) LAS; (b) Findet 1214N/16; (c) Glucopton 650

Un aspecto a destacar es que la curva de hidrólisis obtenida en presencia de LAS (Figura 5.62.a) no presenta el acusado descenso de la velocidad de hidrólisis para conversiones en torno a 0.3, observado en todos los experimentos de hidrólisis realizados en ausencia de tensioactivo. Además la conversión alcanzada a los 20 minutos es mayor (en torno a 0.4).

Esto se ve reflejado en la distribución de tamaños de gota de la emulsión tras la hidrólisis en presencia de LAS, que experimenta un cambio más importante que el que se produce en su ausencia, como se muestra en la Figura 5.63.

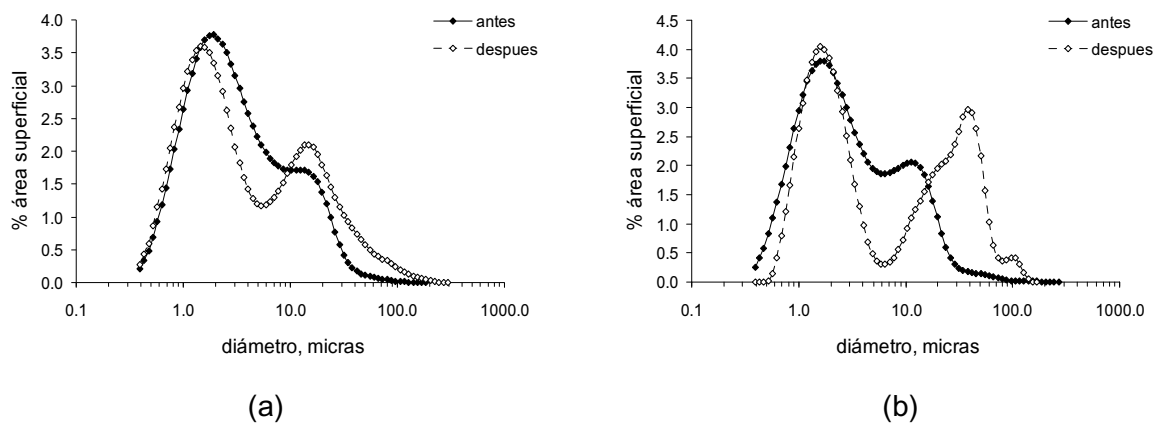


Figura 5.63. Distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones antes y después de la hidrólisis en ausencia (a) y en presencia (b) de LAS (500 mg/L). Condiciones de los experimentos: 30°C; $\alpha_{\text{exp}} = 0.01$; $e_{\text{exp}} = 1.0$ g/L.

La hidrólisis de tributirina en presencia de LAS presenta, a la vista de estos resultados, dos aspectos característicos:

- El descenso de la velocidad inicial, que puede venir motivado por la interacción entre la enzima y el tensioactivo, interacción que dependerá del reparto del tensioactivo entre las distintas fases presentes en el medio de reacción y la propia interfase, y que por tanto depende de la concentración de tensioactivo.
- La diferente progresión de la hidrólisis, comportamiento que puede estar relacionado con el cambio de las propiedades interfaciales en presencia del tensioactivo aniónico, parte del cual se encontrará con seguridad adsorbido en la interfase, lo que conferirá a ésta una cierta carga negativa. Por ello es posible que la ubicación del diglicérido en la superficie de las gotas con el grupo hidroxilo hacia la fase acuosa no sea ya tan favorable como lo es en ausencia de tensioactivo.

En el caso de los tensioactivos no iónicos el comportamiento observado es diferente, pudiendo achacarse el descenso observado en la velocidad inicial a la disminución del área interfacial disponible para la enzima, debido a la adsorción del tensioactivo. La presencia del tensioactivo puede retrasar la penetración de la enzima en la interfase aumentando el tiempo de inducción asociado a dicho proceso, parámetro definido por Veger et al. (1973b). Así en el transcurso de la hidrólisis la velocidad puede aumentar, tal y como se aprecia en la Figura 5.62.b y c, al ir penetrando una mayor cantidad de enzima. En cualquier caso los valores de conversión alcanzados están muy por debajo de los obtenidos en ausencia de tensioactivo a los 20 minutos de reacción.

Para confirmar esta hipótesis se va a tratar de cuantificar el área interfacial libre disponible en el momento de la adición de la enzima, suponiendo que el tensioactivo, previamente añadido, se encuentra repartido entre la fase acuosa y la interfase, en equilibrio:



En la anterior expresión T representa el tensioactivo en la fase acuosa, a el área interfacial específica libre, T^* el tensioactivo adsorbido en la interfase y k_{Ta} y k_{Td} las constantes cinéticas correspondientes a la adsorción y desorción del tensioactivo respectivamente.

Si admitimos que el proceso se encuentra en equilibrio las velocidades del proceso de adsorción y desorción serán iguales:

$$k_{Ta} [T]_{aq} a = k_{Td} [T^*] \quad \text{V.116}$$

siendo $[T]_{aq}$ la concentración de tensioactivo en la fase acuosa, mg/L, a el área interfacial libre, cm²/L, y $[T^*]$ la concentración interfacial de tensioactivo adsorbido, mg/cm².

Realizando un balance al tensioactivo y al área interfacial libre:

$$T_t = [T]_{aq} + a_T [T^*] \quad \text{V.117}$$

$$a_T = a + A_T [T^*] a_T \quad \text{V.118}$$

donde T_t es la concentración total de tensioactivo, mg/L, a_T el área interfacial específica total, cm²/L y A_T representa el área ocupada por mg de tensioactivo.

Despejando la concentración de tensioactivo en la fase acuosa de la ecuación V.116 y sustituyendo en V.117 queda:

$$[T^*] = \frac{T_t}{a_T + \frac{1}{K_T a}} \quad \text{V.119}$$

Donde se ha introducido la constante de equilibrio de adsorción del tensioactivo:

$$K_T = \frac{k_{Ta}}{k_{Td}} \quad \text{V.120}$$

Sustituyendo V.119 en el balance de área interfacial, V.118 y operando, se obtiene una ecuación de segundo grado en a :

$$a^2 + \left(\frac{1}{K_T a_T} - a_T + A_T T_t \right) a - \frac{1}{K_T} = 0 \quad \text{V.121}$$

A partir de la ecuación V.121 se puede calcular el área interfacial libre disponible tras la adsorción del tensioactivo, que vendrá dada por:

$$a = \frac{1}{2} \left(\left(\frac{1}{K_T a_T} - a_T + A_T T_t \right) + \sqrt{\left(\frac{1}{K_T a_T} - a_T + A_T T_t \right)^2 + \frac{4}{K_T}} \right) \quad \text{V.122}$$

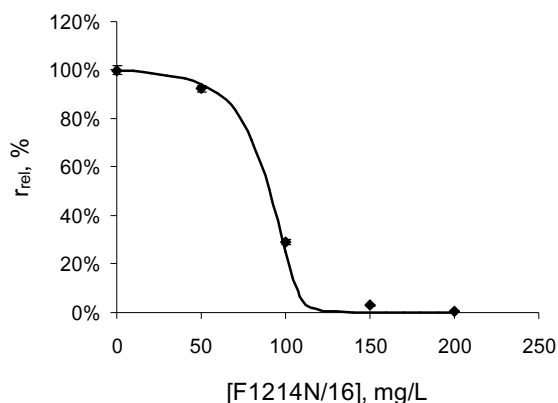
Se ha considerado sólo la solución positiva, ya que cuando T_t sea igual a 0, $a = a_T$.

Admitiendo que el área interfacial libre que queda tras la adsorción del tensioactivo será la disponible para la enzima, la ecuación V.122 puede utilizarse junto con la ecuación cinética del modelo con saturación interfacial, V.79, para predecir la evolución de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de tensioactivo.

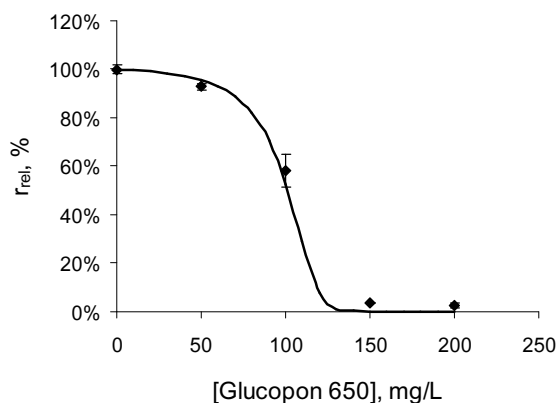
Para ello se han buscado los valores óptimos de los parámetros K_T y A_T , de forma que la diferencia entre las velocidades iniciales experimentales y calculadas por el modelo sea mínima. El resto de los parámetros del modelo cinético se ha considerado constante e igual a los ya obtenidos en el ajuste previo con las velocidades iniciales. Los resultados se presentan en la Tabla 5.38 y en la Figura 5.64.

Tabla 5.38. Resultados del ajuste de las velocidades iniciales de reacción en presencia de tensioactivo no iónico al modelo propuesto.

Tensioactivo	Desv. rel.	K_T , cm ²	A_T , cm ² /mg	P_m , Da	A_T , Å ² /molec.
Findet 1214N/16	2.60%	$5.950 \cdot 10^{-2}$	$9.685 \cdot 10^2$	370.4	5.98
Glucopon 650	3.26%	$7.944 \cdot 10^{-2}$	$8.679 \cdot 10^2$	382.8	5.52



(a)



(b)

Figura 5.64. Comparación de los valores experimentales y los predichos por el modelo para la variación de la velocidad inicial de reacción (relativa a la inicial en cada caso) en función de la concentración de tensioactivo: (a) Findet 1214N/16; (b) Glucopon 650.

Los resultados del ajuste pueden considerarse satisfactorios, si bien el valor calculado para el parámetro A_T es en los dos casos un orden inferior a los encontrados en bibliografía para tensioactivos iguales o similares. Así Sabahi (2004) encuentra para el Glucopon 650, aplicando la isoterma de Gibbs a la variación de la tensión superficial con la concentración de tensioactivo, un área mínima molecular de 61.24 \AA^2 (correspondiente a la CMC). Persson et al. (2003) mediante estudios de adsorción de diferentes tensioactivos, aplicando también la isoterma de Gibbs, determinan un área molecular

correspondiente a la CMC de 42.4 Å² para el tetra-oxietilen dodecil éter (similar al Findet 1214N/16) y de 46.7 Å² para el n-dodecil-β-D-maltopiranosido (similar al Glucocon 650).

La razón de esta diferencia puede estar en que el reparto del tensioactivo muy probablemente tendrá lugar no sólo entre la fase acuosa y la interfase, sino también en la fase orgánica, lo que contraviene el balance de tensioactivo (ecuación V.117). Por tanto las condiciones experimentales no son comparables a las propias de los experimentos de adsorción, realizados en sistemas tensioactivo-agua. En general la CMC del tensioactivo no parece desempeñar un papel importante en el comportamiento de los sistemas de tres componentes: agua-grasa-tensioactivo. Abismaïl et al. (1999) llegan también a esta conclusión al estudiar la influencia de la concentración de tensioactivo en el diámetro medio de gota de emulsiones de queroseno en agua. Estos autores observan que el diámetro de Sauter de dichas emulsiones disminuye con la concentración de tensioactivo, incluso por encima de su CMC, lo que atribuyen también a la solubilidad del tensioactivo en ambas fases, acuosa y orgánica.

De esta forma la concentración de tensioactivo que hace nula la velocidad inicial de reacción es superior a la que se daría si el tensioactivo se repartiese tan sólo entre la fase acuosa y la interfase. Otro dato que viene a apoyar este hecho es que con el tensioactivo Findet 1214N/23 la velocidad es nula en el mismo rango de concentraciones que el ensayado para el Findet 1214N/16. Ambos tensioactivos son idénticos, excepto que el primero presenta una mayor etoxilación que el segundo (11 moles promedio de óxido de etileno frente a 4), por lo que el Findet 1214N/23 es más hidrofílico y por tanto menos tendente a situarse en la fase orgánica que el 1214N/16. Esto explicaría por qué el 1214N/23 satura la interfase a concentraciones menores que el 1214N/16.

El enfoque presentado es quizá demasiado simple para describir el complejo fenómeno de interacción entre la enzima y tensioactivo. Sin embargo las conclusiones obtenidas refuerzan la idea de que los tensioactivos no iónicos no interaccionan de forma directa con la enzima, sino que compiten con ella por ocupar la interfase. A diferencia de ellos en el caso del LAS sí parece existir una interacción enzima-tensioactivo, que depende del estado de agregación de este último, si bien se necesitaría un desarrollo experimental adicional para confirmar los resultados obtenidos con este tensioactivo.

En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que para analizar esta interacción en profundidad debe considerarse también el progreso de la hidrólisis con el tiempo más que las velocidades iniciales, ya que en los tres casos considerados la presencia del tensioactivo atenúa la disminución de la velocidad de hidrólisis con el tiempo (LAS) o incluso produce la tendencia contraria (tensioactivos no iónicos).

6. CONCLUSIONES

A partir de la investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Se ha puesto a punto el método del pHstato, determinándose las concentraciones de enzima y sustrato más adecuadas para la determinación de la actividad lipásica mediante dicha técnica. Las concentraciones de enzima se recogen en la Tabla 6.1, para las tres lipasas utilizadas. En cuanto a la concentración de sustrato se ha comprobado que una fracción volumétrica de 0.01 es suficiente para la medida de la actividad con las concentraciones de enzima indicadas y para los dos sustratos empleados (tributirina y trioleína).

Tabla 6.1. Concentraciones de enzima adecuadas para la medida de la actividad mediante el método del pHstato

Enzima	Sustrato	Concentración de enzima, g/L	Actividad, LU/g
Lipolase 100	Tributirina	0.01	97000±4000
LipoPrime 50T	Tributirina	0.03	28000±1000
Novozym 388	Tributirina	0.05	15000±200
Lipolase 100	Trioleína	2.5	320±8
LipoPrime 50T	Trioleína	5.0	71±5
Novozym 388	Trioleína	10.0	59±4

Por tanto, la actividad de las tres enzimas ensayadas guarda la siguiente relación, independientemente del sustrato que se utilice:

$$\text{Actividad (Lipolase 100)} > \text{Actividad (LipoPrime 50T)} > \text{Actividad (Novozym 388)}$$

2. El análisis de la actividad enzimática medida sobre emulsiones de tributirina preparadas con ultrasonidos (1 min.) y dispersión mecánica (UltraTurrax, 13000 rpm, 1 min.) demuestra que la actividad obtenida cuando se usan ultrasonidos es significativamente menor. Por el contrario en el caso de las emulsiones preparadas con trioleína, la actividad enzimática no presenta variaciones significativas con la forma de preparación de la emulsión. El análisis de la distribución de tamaño de gotas de las emulsiones generadas por los dos procedimientos ponen de manifiesto, para los dos sustratos empleados, que las emulsiones preparadas por dispersión mecánica presentan una mayor polidispersidad y un diámetro medio de gota ligeramente superior.
3. Se ha comprobado mediante ensayos de actividad enzimática y medidas de distribución de tamaño de gotas que las emulsiones de tributirina y trioleína

originadas tanto con ultrasonidos como por dispersión mecánica con 1.0 g/L de goma arábica como estabilizante permanecen estables al menos durante 240 minutos y son válidas para la medida de la actividad.

4. La aplicación de un método colorimétrico para determinar el ácido oleico liberado durante la hidrólisis de trioleína ha permitido corregir la actividad evaluada por el método del pHstato, ya que a pH 7.0 el ácido oleico no está totalmente disociado. Las medidas de actividad realizadas a diferente pH mediante ambos procedimientos han puesto de manifiesto que a $pH \leq 9.5$, en las condiciones del ensayo de actividad, el porcentaje de oleico detectado método del pHstato puede estimarse mediante la siguiente relación:

$$\%(\text{Oleico Detectado}) = -6.9317pH^3 + 175.58pH^2 - 1436.2pH + 3837.9$$

5. Se ha comprobado el ácido oleico actúa como un inhibidor de la lipólisis enzimática. Esta inhibición aumenta con la concentración de ácido oleico añadido a la emulsión hasta que se produce la saturación de la interfase, siendo más acusada cuando el ácido oleico se encuentra más disociado, es decir, a mayores valores de pH. Este hecho se explica por la adsorción del ácido ionizado en la interfase, creando una carga negativa y debilitando la interacción enzima-interfase.
6. La cinética de desactivación de la enzima Lipolase 100 en tampón fosfato con la temperatura, sigue una cinética de orden cero. La desactivación enzimática es importante a 60°C y prácticamente despreciable a 30°C. Se ha calculado la energía de activación aparente para la desactivación térmica de la enzima, que resultó ser de 13.2 Kcal/mol.
7. La enzima Lipolase 100 sufre una desactivación importante con la agitación a temperatura ambiente. La desactivación sigue una cinética de parcial primer orden y se ha comprobado que está originada por la adsorción de la enzima en la interfase aire-agua. La constante de desactivación aumenta con la velocidad de agitación.
8. Se ha comprobado que la glicina tiene un efecto activador y estabilizador sobre la enzima Lipolase 100. La actividad de la enzima Lipolase 100 es un 11.4% superior, en su presencia y no se aprecia desactivación enzimática a las temperaturas de 40

y 50°C. En la misma forma cuando la enzima es sometida a agitación en presencia de glicina no se produce desactivación con velocidades inferiores a 900 rpm.

9. La actividad de la enzima Lipolase 100 alcanza un valor máximo a 40°C y a pH 10.0, cuando se utiliza tributirina como sustrato. En el caso de la trioleína la actividad enzimática incrementa con la temperatura en el intervalo investigado 30-50°C y alcanza un valor máximo a pH = 7.5.

10. El análisis de actividad realizado tras incubar la enzima Lipolase 100 durante una hora en presencia de distintos tensioactivos no iónicos, del agente dispersante Cellesh 100 y de la proteasa Alcalase 2.5L, ha determinado que el tensioactivo Berol LFG61, mezcla comercial formada por alquilpoliglucósidos y alcoholes grasos etoxilados, es el que presenta mayor compatibilidad con la enzima, y que el alcohol graso etoxilado Findet 1214N/23 la inactiva a todas las concentraciones ensayadas. La presencia del agente dispersante Cellesh 100 (100 mg/L) produce una ligera disminución de la actividad enzimática. La disminución de la actividad observada con los tensioactivos y el dispersante se achaca fundamentalmente a la interacción de la enzima con dichas sustancias en la superficie de las gotas de sustrato. La actividad enzimática de la Lipolase 100 se incrementa un 69% en presencia de 1.0 g/L de la proteasa comercial Alcalase 2.50L, sin incubación previa y con tributirina como sustrato. Sin embargo la lipasa se desactiva cuando es incubada durante más de un día en una solución de proteasa de 1.0 g/L.

Los resultados obtenidos determinan que una formulación detergente adecuada para suciedades grasas podría estar compuesta por Berol LFG61, Lipolase 100 y el agente dispersante Cellesh 100.

11. Los experimentos de lavado realizados utilizando el dispositivo BSF han puesto de manifiesto que la presencia en el baño de lavado de la enzima Lipolase 100, a una concentración de 0.1 g/L, incrementa un 42% detergencia de suciedades grasas y disminuye de forma considerable la grasa retenida en el relleno y la redepositada en las superficies del sistema de lavado, respecto a una solución control sin enzima. Este efecto aumenta cuando se utiliza una mezcla de enzima y el tensioactivo LAS a concentraciones de 0.1 g/L en el baño de lavado.

12. Las medidas de distribución de tamaño de gota de las emulsiones de tributirina, antes y después de los experimentos de hidrólisis con la enzima Lipolase 100, han

puesto de manifiesto que se produce un pequeño aumento del diámetro de Sauter tras el proceso de hidrólisis. Este aumento está motivado por el incremento de la fracción de gotas de mayor tamaño y la generación de gotas de diámetro inferior a 0.4 μm , que no son detectadas por el equipo. Estos resultados determinan que el diámetro de las gotas pueda suponerse prácticamente constante durante la primera etapa de la hidrólisis (conversiones inferiores a 0.3). Por ello las emulsiones han sido caracterizadas por su diámetro de Sauter inicial.

13. Se ha desarrollado un procedimiento para estimar la concentración de enlaces éster superficiales en las gotas de tributirina, en función de la fracción volumétrica de tributirina, α , y el diámetro de Sauter de la emulsión, d_{gs} , a partir de la expresión:

$$c_{s0} = 0.020 \frac{\alpha}{d_{gs}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

De la misma forma se ha evaluado la concentración de moléculas superficiales por unidad de área superficial de la emulsión, teniendo en cuenta el área interfacial específica de la misma, a_T (cm^2/L), que resulta ser de $3.337 \cdot 10^{-10}$ mol/cm^2 .

Estos parámetros han sido utilizados para el desarrollo de los modelos cinéticos propuestos en esta investigación.

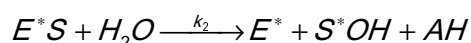
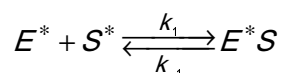
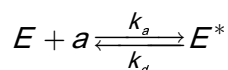
14. Se propone un modelo cinético simplificado para la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsiones O/W con la enzima Lipolase 100. El modelo tiene en cuenta la concentración de moléculas de tributirina en la interfase de las gotas por unidad de volumen de emulsión (c_{s0}), que representa la cantidad de sustrato realmente accesible a la enzima. Al aplicar el modelo propuesto a las velocidades iniciales de reacción se obtiene la siguiente expresión:

$$r_0 = \frac{k_2}{2} \left((e_0 + c_{s0} + K'_M) - \sqrt{(e_0 + c_{s0} + K'_M)^2 - 4e_0c_{s0}} \right)$$

Este modelo reproduce los resultados experimentales de velocidades iniciales de reacción a todas las temperaturas ensayadas, cuando no existe saturación de la interfase por la enzima.

Se han obtenido las constantes cinéticas k_2 y K'_M para todas las temperaturas, lo que, aplicando la ecuación de Arrhenius, ha permitido calcular la energía de activación aparente de la reacción enzimática, que resultó ser de 1.7 Kcal/mol.

15. Se ha desarrollado un modelo cinético general para la hidrólisis enzimática de tributirina en emulsiones O/W, que tiene en cuenta la saturación enzimática de la interfase y puede ser aplicado en todo el intervalo de concentraciones de enzima y sustrato ensayadas. Este modelo tiene en cuenta el área interfacial total disponible en el sistema y responde al siguiente mecanismo



Desarrollando el mecanismo propuesto y planteando balances de enzima y área interfacial disponible, la velocidad inicial de reacción puede ser determinada a partir de la expresión:

$$r_0 = \frac{k_{ap}e_0}{1 + \frac{K_{ap}a_T^2}{\left(1 - \frac{1}{K_{ap}a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T}\right) + \sqrt{\left(1 - \frac{1}{K_{ap}a_T^2} - \frac{A_m e_0}{a_T}\right)^2 + \frac{4}{K_{ap}a_T^2}}}}$$

Esta ecuación reproduce todos los resultados experimentales obtenidos a las cuatro temperaturas ensayadas con desviaciones relativas siempre inferiores al 5% y ha permitido evaluar las constantes cinéticas k_{ap} y K_{ap} y el área ocupada por un mol de enzima, A_m , en función de la temperatura, recogidos en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Parámetros del modelo cinético con saturación interfacial en función de la temperatura.

Temperatura	k_{ap}, s^{-1}	K_{ap}, cm^2	$A_m, cm^2/mol$
30°C	1559	$5.059 \cdot 10^{-3}$	$3.198 \cdot 10^{11}$
40°C	1821	$3.542 \cdot 10^{-3}$	$2.996 \cdot 10^{11}$
50°C	1988	$2.038 \cdot 10^{-3}$	$2.908 \cdot 10^{11}$
60°C	2005	$1.293 \cdot 10^{-3}$	$2.816 \cdot 10^{11}$

16. El modelo cinético general propuesto permite reproducir el progreso de la hidrólisis enzimática de tributirina con la enzima Lipolase 100 para conversiones inferiores a 0.25. Para ello hay que considerar un coeficiente de reparto del diglicérido, K_r , el

cual es función de la concentración de enzima. Las ecuaciones que permiten la simulación del proceso cinético han resultado ser

$$r = \frac{k_{ap}e_0(1-3K_r x)}{1-\beta+\beta(1-3K_r x) + \frac{2}{K_{ap}a_r^2 \left(\left(1 - \frac{1-\beta+\beta(1-3K_r x)}{K_{ap}a_r^2} - \frac{A_m e_0}{a_r} \right) + \left(\left(1 - \frac{1-\beta+\beta(1-3K_r x)}{K_{ap}a_r^2} - \frac{A_m e_0}{a_r} \right)^2 + 4 \frac{1-\beta+\beta(1-3K_r x)}{K_{ap}a_r^2} \right)^{1/2} \right)}$$

$$K_r = 1.30 - 0.30 \exp(-9.0 \cdot 10^6 \cdot e_0)$$

Estas ecuaciones reproducen los resultados experimentales a todas las concentraciones de sustrato y enzimas ensayadas y conversiones inferiores a 0.25, encontrándose las mayores desviaciones a la temperatura de 60°C, temperatura para la cual se produce una mayor desactivación enzimática.

17. A partir de los datos de progreso de la reacción de hidrólisis se han podido evaluar las constantes cinéticas del modelo propuesto, k_2 (constante catalítica) y K_e (constante de equilibrio de adsorción de la enzima) en función de la temperatura. Esto ha permitido a su vez estimar la energía de activación aparente de la reacción enzimática, 2.4 Kcal/mol, y el calor de adsorción de la enzima, -9.3 Kcal/mol.

18. Los experimentos de hidrólisis enzimática de tributirina con la enzima Lipolase 100, realizados en presencia de un tensioactivo aniónico (LAS), y tres no iónicos (Findet 1214N/23, Findet 1214N/16 y Glucocon 650), ha puesto de manifiesto el diferente comportamiento de estos tensioactivos en el proceso de hidrólisis. La velocidad inicial de reacción en presencia del LAS disminuye con la concentración éste y el progreso de la reacción resulta similar al que se da en ausencia de tensioactivo, si bien se alcanzan conversiones ligeramente superiores. En el caso de los tensioactivos no iónicos Findet 1214N/16 y Glucocon 650 la velocidad inicial de reacción disminuye con la concentración del tensioactivo ensayado mientras que la velocidad de hidrólisis aumenta con el tiempo de reacción. La velocidad de reacción en presencia del tensioactivo Findet 1214N/23 ha sido nula para todos los experimentos realizados.

La aplicación del modelo cinético general de hidrólisis a las velocidades iniciales de reacción para los experimentos realizados con los tensioactivos no iónicos, evaluando el área interfacial libre descontando la ocupada por la previa adsorción del tensioactivo, permite predecir satisfactoriamente los resultados experimentales.

De esta forma se ha podido evaluar la constante del equilibrio de adsorción del tensioactivo, K_T y el área ocupada por el tensioactivo, A_T (cm^2/mg), que se recogen en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Constantes de equilibrio de adsorción del tensioactivo y área ocupada por el mismo

Tensioactivo	K_T, cm^2	A_T, cm^2/mg	A_T, $\text{Å}^2/\text{molec.}$
Findet 1214N/16	$5.950 \cdot 10^{-2}$	$9.685 \cdot 10^2$	5.98
Glucopon 650	$7.944 \cdot 10^{-2}$	$8.679 \cdot 10^2$	5.52

NOMENCLATURA

A	Actividad lipásica, LU/g
Ab	Absorbancia
A_m	área interfacial ocupada por un mol de enzima adsorbida, cm ² /mol
A_T	área interfacial ocupada por el tensioactivo, cm ² /mg
a	área interfacial específica libre, no ocupada, cm ² /L
a_T	área interfacial específica total, libre y ocupada, cm ² /L
B	Factor de frecuencia (ecuación de Arrhenius), s ⁻¹
BSF	Dispositivo Baño-Sustrato-Flujo para la evaluación de la eficacia detergente sobre superficies duras.
C.V.	Coeficiente de variación (%)
c₀	Concentración de tributirina por unidad de volumen de emulsión, mol/L
C_{AH}	Concentración total de ácido butírico, mol/L
C_{ben}	Concentración de ácido benzoico para el contraste del hidróxido sódico, g/L
C_{DB}	Concentración molar de dibutirina en la emulsión, mol/L
C_{DBs}	Concentración molar de dibutirina en la superficie de la gota, mol/L
C_e	Concentración total de grupos ésteres en la emulsión durante la hidrólisis, mol/L
CIP	“Cleaning In Place”. Sistema de limpieza usado en instalaciones industriales.
C_{MB}	Concentración molar de monobutirina en la emulsión, mol/L
CMC	Concentración Micelar Crítica
C_{ol}	Concentración de ácido oleico, mmol/L
C_{oM}	Concentración de oleico (conocida) en una muestra, mmol/L
C_{oR}	Concentración de ácido oleico tras la extracción, mmol/L
C_s	Concentración molar de enlaces éster accesibles durante la hidrólisis, mol/L
C_{s0}	concentración de enlaces éster superficiales inicial, mol/L
C_{s0}[*]	concentración interfacial de enlaces éster superficiales inicial, mol/cm ²
C_{SOH}	Concentración molar de grupos alcohólicos libres superficiales durante la

	hidrólisis, mol/L
C_{TB}	Concentración molar de tributirina en la emulsión, mol/L
C_{tb_col}	Concentración de tributirina coloreada, g/L
C_{TBs}	Concentración molar de tributirina en la superficie de la gota, mol/L
D	Coeficiente de distribución (ecuación V.3)
De	Detergencia (eficacia detergiva), % (ecuaciones III.4 y III.5)
d_g	Diámetro de gota de tributirina, μm
d_{gs}	Diámetro medio de Sauter de las emulsiones
d_m	Diámetro de molécula de tributirina, μm
e_{exp}	Concentración de la solución de enzima que se añade a la emulsión para iniciar la hidrólisis, g/L
e_o	Concentración total de enzima, mol/L
e'_o	Concentración total de enzima, g/L
F1214N/16	Tensioactivo Findet 1214N/16
G650	Tensioactivo GlucoPON 650
GA	Goma arábica
HLB	Balance Hidrófilo-Lipófilo
k₂	constante cinética de la descomposición del complejo enzima-sustrato interfacial, que incluye la concentración de agua, s ⁻¹
K_A	Constante de equilibrio de adsorción de la enzima, ecuación V.30
k_{ap}	constante cinética aparente, s ⁻¹ , dada por la ecuación V.74
K_{ap}	constante de equilibrio de adsorción de la enzima aparente, cm ² , dada por la ecuación V.75
K_e	constante de equilibrio de adsorción de la enzima en la interfase, cm ²
K'_M	Constante de Michaelis-Menten modificada, ecuación V.47
K_M[*]	constante de Michaelis-Menten del complejo enzima-sustrato interfacial, mol/cm ²
K_r	coeficiente de reparto del diglicérido entre la interfase y el seno de la gota, adimensional

NOMENCLATURA

k_r	coeficiente de desviación de composición uniforme en la gota provocada por la concentración inicial de enzima, L/mol
K_T	constante de equilibrio de adsorción del tensioactivo en la interfase, cm^2
L100	Enzima Lipolase 100
LAS	Ácido Dodecilbencenosulfónico Lineal (sal sódica)
$m_b(t)$	Cantidad de tributirina existente en el baño de lavado, g
$m_s(0)$	Cantidad de tributirina colocada inicialmente sobre el sustrato, g
$m_s(f)$	Cantidad de tributirina permanece adherida al sustrato al final del lavado, g
M_T	Peso molecular de la tributirina (302.37 g/mol)
N_{Av}	Número de Avogadro ($6.022 \cdot 10^{23}$)
N_m	Número de moléculas
N_{ms}	Número moléculas superficiales de tributirina en una gota
N_{NaOH}	Normalidad del hidróxido sódico (contrastada)
PE_{ben}	Peso equivalente del benzoico, 122.12 g/eq
r	velocidad de reacción, mol/(L s)
r_0	velocidad inicial de reacción, mol/(L s)
R^2	Coefficiente de determinación
Re	Recuperación del ácido oleico, %
tb	Tributirina pura
tb_col	Tributirina coloreada
v	Velocidad media de adición de hidróxido sódico entre los 180 y 480 segundos de hidrólisis
V_{ben}	Volumen de benzoico añadido para el contraste del hidróxido sódico, mL
V_{e0}	Volumen inicial de emulsión (mL)
v_{ini}	Velocidad inicial de reacción expresada como variable extensiva, $\mu\text{mol}/\text{min}$
V_m	Volumen molecular de la tributirina, μm^3
V_{NaOH}	Volumen de hidróxido sódico (mL) añadido durante la hidrólisis enzimática para mantener el pH constante

y_a	fracción adimensional de área interfacial libre
Y_s	Fracción de moléculas superficiales en una gota de tributirina
α	fracción volumétrica de sustrato tras la adición de la enzima
α_{exp}	fracción volumétrica de sustrato antes de la adición de la enzima
β	relación adimensional dada por la ecuación V.77
ΔE	Energía de activación aparente, Kcal/mol
ρ_T	Densidad de la tributirina, 1.035 g/mL a 20°C

ANEXOS

ANEXO I: Programa en MatLab para el cálculo de la velocidad inicial de reacción a partir de la máxima pendiente de la curva de hidrólisis.

CARACTERÍSTICAS: El programa realiza ajustes a líneas rectas con los puntos de la curva de hidrólisis utilizando el método de los mínimos cuadrados. Parte de un número de puntos mínimo especificado y los va incrementando progresivamente hasta incluirlos todos, calculando la pendiente de cada recta. Finalmente escoge la mayor pendiente. Para verificar si el resultado obtenido es adecuado el programa realiza dos representaciones: (1) los puntos experimentales y la recta de pendiente máxima y (2) la variación de la pendiente con el número de puntos considerado.

LISTADO:

```
s=input('Serie numero: ');
n=input('Numero de puntos minimo: ');
t=dat(:,1);
V=dat(:,2);
for i=n:length(dat);
    f=i-n+1;
    pend(f,:)=polyfit(t(1:i,1),V(1:i,1),1);
end
indmax=find(pend==max(pend(:,1)));
der=max(pend(:,1));
o_o=pend(indmax,2);
lin0(s,1)=der;
disp('Velocidad inicial (ml/s):');
disp(der)
npoints=indmax+n-1;
disp('Numero de puntos:');
disp(npoints)
subplot(2,1,1);
xplot=t(1:npoints*5);
yplot=(xplot*der+o_o);
plot(t(1:npoints*10,1),V(1:npoints*10,1),'o',xplot,yplot,'r')
xlabel('tiempo, s')
ylabel('Vol, mL')
grid on;
subplot(2,1,2);
np_plot=linspace(n,npoints*10,(npoints*10-n+1));
plot(np_plot,pend(1:npoints*10-n+1,1),'s')
xlabel('num. de puntos')
ylabel('pendiente')
grid on;
resp=input('Borrar matriz de datos? (s o ENTER para no) ');
```

```
if (resp == s)
  clear('dat');
end
```

ANEXO II: Programa en MatLab para el cálculo de la velocidad inicial de reacción a partir del ajuste de la curva de hidrólisis a polinomios de grado mayor o igual que dos.

CARACTERÍSTICAS: El programa realiza el ajuste de la curva de hidrólisis a un polinomio del grado especificado. Para determinar el polinomio que mejor ajusta el mayor número de puntos experimentales, el número de puntos utilizado en el ajuste se va incrementando gradualmente hasta que la primera derivada del polinomio resultante, evaluada en el instante inicial, no varíe más de un 0.5% para dos estimaciones consecutivas. Para comprobar la bondad del ajuste se generan dos representaciones gráficas: (1) los puntos experimentales utilizados y el polinomio resultante; (2) los puntos experimentales junto con la recta tangente al polinomio en el inicio (cuya pendiente representa la velocidad inicial de hidrólisis determinada mediante el programa).

LISTADO:

```
s=input('Serie numero: ');
n=input('Orden del polinomio: ');
resp=input('Excluir el 0? (s o ENTER para no) ');
warning off MATLAB:polyfit:RepeatedPointsOrRescale;
t=dat(:,1);
V=dat(:,2);
if (resp == s)
    a=2;
    b=1;
else
    a=1;
    b=0;
end
i=n+1+b;
T=1;
while (T) >= 1.0
    ta1=t(a:i,1);
    Va1=V(a:i,1);
    ajuste1=polyfit(ta1,Va1,n);
    deriv0_1=abs(ajuste1(1,n));
    ta2=t(a:(i+1),1);
    Va2=V(a:(i+1),1);
    ajuste2=polyfit(ta2,Va2,n);
    deriv0_2=abs(ajuste2(1,n));
    t2=(abs(deriv0_2-deriv0_1)/deriv0_2)*100;
    ta3=t(a:(i+2),1);
    Va3=V(a:(i+2),1);
    ajuste3=polyfit(ta3,Va3,n);
    deriv0_3=abs(ajuste3(1,n));
```



```

t3=(abs(deriv0_3-deriv0_2)/deriv0_3)*100;
T=t2+t3;
i=i+1;
end
der=(deriv0_2+deriv0_3)/2;
der0(s,1)=der;
disp('Velocidad inicial (ml/s):');
disp(der)
disp('Numero de puntos:');
disp(i)
disp('Suma de las diferencias (%):');
disp(T)
tlimit=t(i,1);
tplot=linspace(0,tlimit,tlimit*100+1);
polF=(ajuste2+ajuste3)/2;
Vplot=polyval(polF,tplot);
texp=t(1:i,1);
Vexp=V(1:i,1);
rectax=[0,50];
rectay=(ajuste2(n+1)+ajuste3(n+1))/2,
(ajuste2(n+1)+ajuste3(n+1))/2+rectax(2)*(ajuste2(n)+ajuste3(n))/2];
subplot(2,1,1);
plot(texp,Vexp,'o',tplot,Vplot);
hold on;
plot(rectax,rectay,'r','LineWidth',2);
grid on;
xlabel('tiempo, s')
ylabel('Vol, mL')
tF=t(1:i,1);
calcul=polyval(polF,tF);
VF=V(1:i,1);
residuos=calcul-VF;
subplot(2,1,2);
plot(tF,residuos,'*')
grid on;
xlabel('tiempo, s')
ylabel('residuos')
res_cuad=residuos.^2;
suma=sum(res_cuad);
disp('Suma del cuadrado de los residuos: ');
disp(suma)
%borrar la matriz de datos "dat"
resp=input('Borrar matriz de datos? (s o ENTER para no) ');

```

```
if (resp == s)
  clear('dat');
end
```

ANEXO III: Programa en MatLab para el ajuste de las velocidades iniciales de hidrólisis de tributirina a la ecuación V.38

CARACTERÍSTICAS: El programa encuentra los valores de las constantes cinéticas k_2 y KM que minimizan la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. El primero de ellos, "ajustel", utiliza la función predefinida de MatLab "fminsearch", a la que se suministran como valores iniciales k_{20} y KM_0 , para encontrar el mínimo de la función "residuosl", definida en el segundo subprograma. La función "residuosl" calcula la diferencia entre los valores predichos por la ecuación V.38 y los experimentales. Finalmente se comparan gráficamente los valores calculados con los experimentales. Para aplicar las ecuaciones V.41 y V.49 basta introducir en la definición de la función "residuosl" dichas ecuaciones en vez de la V.38

LISTADO:

Programa "ajustel"

```
k20=input('valor inicial para k2: ');
KM0=input('valor inicial para KM: ');
global e0 cs0 r0 r0cal s
e0=dat(:,1);
cs0=dat(:,2);
r0=dat(:,3);
k0=[k20;KM0];
k=fminsearch('residuosl',k0);
residuosl(k);
k
residuosl(k)/length(r0)
plot(r0,r0cal,'o',r0,r0);
xlabel('r0 (experimental)');
ylabel('r0 (calculado)');
```

Programa "residuosl"

```
function s=residuosl(k)
global e0 cs0 r0 r0cal s
k2=k(1);KM=k(2);
r0cal=(k2*e0.*cs0)./(KM+cs0);
s=sum(abs(r0-r0cal));
```

ANEXO IV: Programa en MatLab para el ajuste de las velocidades iniciales de hidrólisis de tributirina a la ecuación V.79

CARACTERÍSTICAS: El programa encuentra los valores de las constantes cinéticas k_p y K_p y del parámetro A_m que minimizan la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. El primero de ellos, “ajuste”, utiliza la función predefinida de MatLab “fminsearch”, a la que se suministran como valores iniciales k_{p0} , K_{p0} y A_{m0} , para encontrar el mínimo de la función “residuos”, definida en el segundo subprograma. La función “residuos” calcula la diferencia entre los valores predichos por la ecuación V.79 y los experimentales. Finalmente se comparan gráficamente los valores calculados con los experimentales.

LISTADO:

Programa “Ajuste”

```

kap0=input('valor inicial para kap: ');
Kap0=input('valor inicial para Kap: ');
Am0=input('valor inicial para Am: ');
global e0 r0 aT S0 r0cal
e0=dat(:,1);
r0=dat(:,2);
aT=dat(:,3);
S0=3.337E-10;
k0=[kap0;Kap0;Am0];
options=optimset('MaxFunEvals',1000000,'MaxIter',10000);
k=fminsearch('residuos',k0,options);
residuos(k);
k
residuos(k)/length(r0)
plot(r0,r0cal,'o',r0,r0);
xlabel('r0 (experimental)');
ylabel('r0 (calculado)');

```

Programa “residuos”

```

function s=residuos(k)
global e0 r0 aT r0cal S0
kap=k(1);Kap=k(2);Am=k(3);
r0cal=(kap*e0)./(1+2*(1./(Kap*(aT.^2)))./((1-(1./(Kap*(aT.^2)))-Am*(e0./aT))+((1-(1./(Kap*(aT.^2)))-Am*(e0./aT)).^2+4*(1./(Kap*(aT.^2))).^0.5));
s=sum(abs(r0-r0cal));

```

ANEXO V: Programa en MatLab para la simulación del progreso de la reacción de hidrólisis.

CARACTERÍSTICAS: El programa simula el progreso de la reacción de hidrólisis utilizando los valores de las constantes cinéticas calculados mediante el ajuste de las velocidades iniciales y un valor supuesto del parámetro beta. Consta de dos subprogramas. El primero de ellos, "simulacion", usa la función predefinida de MatLab "ode45", la cual realiza la integración numérica de la ecuación V.99, que ha sido para ello definida en el otro subprograma, denominado "integracion". Finalmente los valores experimentales son comparado con la simulación realizada. Para introducir la ecuación que incorpora el coeficiente de reparto (V.108) o la expresión del mismo en función de la concentración de enzima, ecuación V.113, basta modificar el subprograma "integracion".

LISTADO:

Programa "simulacion"

```
global e0 alfa aT kap Kap Am beta ts xs xcal
kap=1.5588E+03;
Kap=5.0590E-05;
Am=3.198e9;
ts=dat(:,1);
xs=dat(:,2);
beta=input('Introducir el valor de beta: ');
e0=input('Introducir el valor de e0: ');
alfa=input('Introducir el valor de alfa: ');
aT=input('Introducir el valor de aT: ');
[t,x]=ode45('integracion',ts,[0]);
xcal=x(:,1);
plot(ts,xs,'o',ts,xcal);
```

Programa "integracion"

```
function yp=integracion(t,x)
global kap Kap Am e0 alfa aT beta
ya=((1-(1-beta+beta*(1-3*x)))/(Kap*(aT^2))-Am*e0/aT)+((1-(1-beta+beta*(1-3*x)))/(Kap*(aT^2))-Am*e0/aT).^2+4*(1-beta+beta*(1-3*x))/(Kap*(aT^2)).^0.5);
yp=kap*((1/10.26)*(e0/alfa)*(1-3*x))/(1-beta+beta*(1-3*x)+2./(Kap*(aT^2)*ya));
```

BIBLIOGRAFÍA

AASLYNG, D., GORMSEN, E. y MALMOS, H. (1991) Mechanistic studies of proteases and lipases for the detergent industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 50, 321-330

ABISMAÏL, B., CANSELIER, J.P., WILHELM, A.M., DELMAS, H. y GOURDON, C. (1999) Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 6, 75-83

AHMED, F.U., GOLDSCHMIDT, J.E. y LA COSSE, G.E. (1999) Enzymatic detergent composition and method for degrading and removing bacterial cellulose and glycerides. Patente de Estados Unidos, núm. US5975095

ALTMAJER-VAZ, D. (2004) Formulaciones detergentes biodegradables: ensayos de lavado. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España

AL-ZUHAIR, S., HASAN, M. y RAMACHANDRAN, K.B. (2003) Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, vol. 38, 1155-1163

AL-ZUHAIR, S., RAMACHANDRAN, K.B. y HASAN, M. (2004a) High enzyme concentration model for the kinetics of hydrolysis of oils by lipase. *Chemical Engineering Journal*, vol. 103, 7-11

AL-ZUHAIR, S., RAMACHANDRAN, K.B. y HASAN, M. (2004b) Unsteady-state kinetics of lipolytic hydrolysis of palm oil in a stirred bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 19, 81-86

ANDERSON, S.A., EL-SAYED, M.Y., LEISKE, D.R., WIERSEMA, R.J. y YANG, C. (1992) Lipase-surface complex and methods of formation and use. Patente Europea, núm. EP0476915

ARAKAWA, T. y TIMASHEFF, S.N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, vol. 47, 411-414

BAE, J. y MIN, S. (1996) Detergent composition and method for washing using the same. Patente de Canadá, núm. CA2182629

BAILEY, J.E. y OLLIS, D.F. (1986) Applied Enzyme Catalysis, en *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2ª ed., McGraw-Hill, New-York, 157-227

BALLOT, C., FAVRE-BONVIN, G. y WALLACH, J.M. (1982) Conductimetric assay of a bacterial lipase, using triacetin as a substrate. *Analytical Letters*, vol. 15, 1119-1129

BEAGLE, C.A., SCHERR, E.M., TAHA, R.A. y KNORR, J.R. (1997) Laundry detergent compositions. *Patente Internacional*, núm. WO9732959

BEHREND, O. y SCHUBERT, H. (2001) Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 8, 271-276

BEISSON, F., TISS, A., RIVIERE, C. y VERGER, R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 102, 133-153

BENZONANA, G. y DESNUELLE, P. (1965) Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 105, 121-136

BENZONANA, G. y DESNUELLE, P. (1968) Action of some effectors on the hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 164, 47-58

BEREUTER, T.L. y LORBEER, E. (1995) Monitoring of lipase-catalyzed cleavage of acylglycerols by high-temperature gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 697, 469-474

BERG, O.G., ROGERS, J., YU, B.Z., YAO, J., ROMSTED, L.S. y JAIN, M.K. (1997) Thermodynamic and kinetic basis of interfacial activation: resolution of binding and allosteric effects on Pancreatic Phospholipase A2 at zwitterionic interfaces. *Biochemistry*, vol. 36, 14512-14530

BERG, O.G., YU, B.Z., ROGERS, J. y JAIN, M.K. (1991) Interfacial catalysis by Phospholipase A2: determination of the interfacial kinetic rate constants. *Biochemistry*, vol. 30, 7283-7297

BERTILSSON, B. y CASSEL, E. (1994) Dishwasher detergent and use thereof. *Patente Internacional*, núm. WO9414941

BILYK, A., BISTLINE, R.G., HASS, M.J. y FEAIRHELLER, S.H. (1991) Lipase-catalyzed triglyceride hydrolysis in organic solvent. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 68, 320-323

BONRATH, W., KARGE, R. y NETSCHER, T. (2002) Lipase-catalyzed transformations as key-steps in the large-scale preparation of vitamins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 19-20. 67-72

BOS, J.W., FRENKEN, L.G., VERRIPS, C.T. y VISSER, C. (1998) Production of active *Pseudomonas glumae* lipase in homologous or heterologous hosts. Patente de Estados Unidos, núm. US5804409

BRADY, L., BRZOZOWSKI, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. y MENGE, U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, vol. 334, 767-770.

BROCKMAN, H.L. (1981) Triglyceride lipase from porcine pancreas. *Methods in Enzymology*, vol. 71, 619-627

BRU, R., SANCHEZ-FERRER, A. y GARCIA-CARMONA, F. (1995) Kinetic models in reverse micelles. *Biochemical Journal*, vol. 310, 721-739

CALDERBANK, P. H. (1958) Physical rate processes in industrial fermentation, Part I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Transactions of the Institute of Chemical Engineers*, vol. 36, 443

CAMACHO-PÁEZ, B. (2000) Obtención de lípidos estructurados por acidólisis con lipasas inmovilizadas. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, España

CAMACHO-PÁEZ, B., ROBLES-MEDINA, A., CAMACHO RUBIO, F., ESTEBAN CERDÁN, L. y MOLINA-GRIMA, E. (2003) Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 78, 461-470

CAMACHO-PÁEZ, B., ROBLES-MEDINA, A., CAMACHO RUBIO, F., GONZÁLEZ-MORENO, P. y MOLINA-GRIMA, E. (2002) Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a

packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Science*, vol. 57, 1237-1249

CARVALHO, C.M.L. y CABRAL, J.M.S. (2000) Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochemie*, vol. 82, 1063-1085

CERNIA, E., BATTINELLI, L. y SORO, S. (1996) Biocatalysed hydrolysis of triglycerides in emulsion and as monolayers. *Thin Solid Films*, vol. 284-285, 727-730

CHEMNITIUS, G.C., ERDMANN, H. y SCHMID, R.D. (1992) Solubilized substrates for the on-line measurement of lipases by flow injection analysis during chromatographic enzyme purification. *Analytical Biochemistry*, vol. 202, 16-24

CHEN, J.C. y CHANG, K.-C. (1993) Lipase-catalyzed hydrolysis of milk fat in lecithin reverse micelles. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 76, 98-104

CHRISTEN, G.L. y MARSHALL, R.T. (1984) Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *Journal of Dairy Science*, vol. 67, 1680-1687

CHRISTENSEN, M.W., HOLM, H.C. y ABE, K. (2003) Fat Splitting Process. *Patente Internacional*, núm. WO03040091

CHRISTIAN, T. (1991) Process for the biological degradation of fatty matter present in sewage, *Patente Francesa*, núm. FR2659645

CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J.S., DELORME, P y WILLEMOT, R.M. (1990) Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. *FEBS Letters*, vol. 276, 181-184

CYGLER, M. y SCHRAG, J.D. (1997) Structure and basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods in Enzymology*, vol. 284, 3-27

DA SILVA CRESPO, J., QUEIROZ, N., DA GRACA NASCIMENTO, M. y SOLDI, V. (2005) The use of lipases immobilized on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters. *Process Biochemistry*, vol. 40, 401-409

DAVID, M.H.L, LEMMENS, H.O.J., GUNTHER, H. y ROPER, H.W. (1989) Surface active compounds and a process for their preparation. *Patente Europea*, núm. EP334498

DE FELICE, B., PONTECORVO, G. y CARFAGNA, M. (1997) Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica*, vol. 17, 231-239

DE SMET, B.L.A., PLUYTER, J.G. y JONES, L.A. (1998) Detergent composition comprising lime soap dispersant and lipase enzymes. Patente de Estados Unidos, núm. US5772786

DEEMS, R.A., EATON, B.R. y DENNIS, E.A. (1975) Kinetic analysis of Phospholipase A2 activity toward mixed micelles and its implications for the study of lipolytic enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, 9013-9020

DEREWENDA, U., BRZOZOWSKI, A.M., LAWSON, D.M. y DEREWENDA, Z.S. (1992a) Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*, vol. 31, 1532-1541

DEREWENDA, U., SWENSON, L., GREEN, R., WEI, Y., YAMAGUCHI, S., JOERGER, R., HAAS, M.J. y DEREWENDA, Z.S. (1994) Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Engineering*, vol 7, 551-557

DEREWENDA, Z.S., DEREWENDA, U. y DODSON, G.G. (1992b) The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglycerol lipase at 1.9 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, vol. 227, 818-839

DESNUELLE, P. (1961) Pancreatic lipase. *Advances in Enzymology*, vol. 23, 129-161

DESNUELLE, P., SARDA, L. y AILHAUD, G. (1960) Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthyl-p-nitrophényl phosphate en emulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 37, 570-571

DICKINSON, E. (2003) Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, vol. 17, 25-39

DONKER, C.B. (1991) Enzyme-containing detergent compositions and their use. Patente Europea, núm. EP0425214

EGMONT, M.R., VAN DER HIJDEN, H.T., MUSTERS, W., PETERS, H., VERRIPS, C.T. y DE VLIEG, J. (1994) Modified cutinases, DNA, vector and host. Patente Internacional, núm. WO94/14963

ENOMOTO, M. y RIISGAARD, S. (1987) An enzymatic detergent additive, a detergent and a washing method. Patente Europea, núm. EP0214761

ENTRESSANGLES, B. y DESNUELLE, P. (1968) Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system. *Biochimica et Biophysica Acta-Enzymology*, vol. 159, 285-295

FERNÁNDEZ, A., SALAGER, J.L. y SCORZZA, C. (2004) Surfactantes IV: Surfactantes no iónicos. Cuaderno FIRP S303PP. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Disponible "on-line" en http://www.firp.ula.ve/cuadernos_firp.htm

FERRATO, F., CARRIERE, F., SARDA, L. y VERGER, R. (1997) A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods in Enzymology*, vol. 286, 327-347

FIGURIN, Y.V., SHESTAKOVA, I.S., MIRONOVA, T.F., SHTEJN, I.V., ARENDS, I.M. (1990) Method of processing raw skins. Patente de la Unión Soviética, núm. SU1567634

FLIPSEN, J.A.C., VAN DER HIJDEN, H.T.W.M., EGMOND, M.R. y VERHEIJ, H.M. (1996) Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to study lipase kinetics. *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 84, 105-115

FRITZ, G., WAGNER, E.M., LINDNER, H., HOFMANN, W., ZECHNER, R. y GLATTER, O. (2004) Dependence of lipoprotein-lipase-catalyzed triacylglycerol hydrolysis on droplet size of synthetic monodisperse emulsions measured with static light scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 275, 642-648

FUGLSANG, C.C., OKKELS, J.S., PETERSEN, D.A., PATKAR, S.A., THELLERSEN, M., SVENDSEN, A., BORCH, K., ROYER J.C., KRETZSCHMAR, T., HALKIER, T., VIND J. y JORGENSEN, S.T. (2002) Lipolytic enzymes. Patente de Estados Unidos, núm. US6495357

FUJII, T., TATARA, T. y MINAGAWA, M. (1986) Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency I. Effect of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 63, 796-799

GAN, Q., BAYKARA, F., RAHMAT, H. y WEATHERLEY, L.R. (2000) Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system. *Catalysis Today*, vol. 56, 179-190

GANDHI, N.N. (1997) Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 74, 621-634

GANDHI, N.N., SAVANT, S.B., y JOSHI, J.B. (1995) Studies on the Lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 46, 1-12

GE, K., LIU, D., CHEN, K., NIE, L. y YAO, S. (1995) Assay of pancreatic lipase with the surface acoustic wave sensor system. *Analytical Biochemistry*, vol. 226, 207-211

GHANEM, A. y ABOUL-ENEIN, H.Y. (2005) Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, vol. 17, 1-15

GOLDSTEIN, A.S. (1995) Dishwashing detergent comprising a secondary soap and lipase enzyme. *Patente Internacional*, núm. WO9504807

GONZÁLEZ-MORENO, P. (2002) Obtención de lípidos estructurados catalizada con lipasas inmovilizadas. Tesis Doctoral, Universidad de Almería, España.

GONZÁLEZ-MORENO, P.A., ROBLES-MEDINA, A., CAMACHO-RUBIO, F., CAMACHO-PÁEZ, B., ESTEBAN-CERDÁN, L. y MOLINA-GRIMA, E. (2005) Production of structured triacylglycerols in an immobilised lipase packed-bed reactor: batch mode operation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 80, 35-43

GONZÁLEZ-MORENO, P.A., ROBLES-MEDINA, A., CAMACHO-RUBIO, F., CAMACHO-PÁEZ, B y MOLINA-GRIMA, E. (2004) Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes. *Biotechnology Progress*, vol. 20, 1044-1052

GOODRUM, J.W. y EITEMAN, M.A. (1996). Physical properties of low molecular weight triglycerides for the development of bio-diesel fuel models. *Bioresource Technology*, vol. 56, 55-60.

GORMSEN, E., IKEGAMI, N., ABO, M., TAKAGI, S., TSUTSUMI, N. y HALKIER, T. (1996) Enzymatic detergent composition. *Patente Internacional*, núm. WO9613578

GROSS, R.A., KALRA, B. y KUMAR, A. (2001) Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 55, 655-660

GUIT, R.P.M., KLOOSTERMAN, M., MEINDERSMA, G.W., MAYER, M. y MEIJER, E.M. Lipase kinetics: hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 38, 727-732

GUPTA, N., RATHI, P. y GUPTA, R. (2002) Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry*, vol. 311, 98-99

GUPTA, R., RATHI, P., GUPTA, N. y BRADDOO, S. (2003) Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 37, 63-71

HAAS, M.J., ESPOSITO, D., y CICHOWICZ, D.J. (1995) A software package to streamline the titrimetric determination of lipase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 72, 1405-1406

HAN, D. y RHEE, J.S. (1986) Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reverse micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 28, 1250-1255

HELISTÖ, P. y KORPELA, T. (1998) Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 23, 113-117

HEMACHANDER, C. y PUVANAKRISHNAN, R. (2000) Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochemistry*, vol. 35, 809-814.

HOPPE, A. y THEIMER, R.R. (1996) Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions. *Phytochemistry*, vol. 42, 973-978

HOSSAIN, M.J., HAYASHI, Y., SHIMUZU, N. y KAWANISHI, T. (1996) A kinetic model for enzymatic reactions in a reverse micellar system, involving water-insoluble substrate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 67, 190-194

HOUDE, A., KADEMI, A. y LEBLANC, D. (2004) Lipases and their industrial applications. An overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 118, 155-170

HUBE, B., STEHR, F., BOSSENZ, M., MAZUR, A., KRETSCHMAR, M. y SCHÄFER, W. (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Archives of Microbiology*, vol. 174, 362-374

HUGE-JENSEN, I.B. (1988) Enzymatic detergent additive. Patente Europea, núm. EU258068

ISHIDA, R., SUZUKI, M., KOTSUKA, T. y SAKIMOTO, K. (1998) Lipase, microorganisms producing the lipase, method of producing the lipase and use of the lipase. Patente de Estados Unidos, núm. US5827718

ISO, M., CHEN, B., EGUCHI, M., KUDO, T. y SHRESTHA, S. (2001) Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 16, 53-58

IVANOVA, M., SVENDSEN, A., VERGER, R. y PANAIOTOV, I. (2002) Action of *Humicola lanuginosa* lipase on long-chain lipids substrates. 1. Hydrolysis of monoolein monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 26, 301-314

IWADARE, Y. (1995) Sterilizing and disinfecting method for contact lens. Patente Japonesa, núm. JP7140427

JAIN, M.K., GELB, M.H., ROGERS, J. y BERG, O.G. (1995) Kinetic basis for interfacial catalysis by Phospholipase A2. *Methods in Enzymology*, vol. 249, 567-614

JENSEN, R.G. (1983) Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, vol. 18, 650-657

JENSEN, R.G., FELICE, A.D. y CLARK, R.M. (1983) Determination of lipase specificity. *Lipids*, vol. 18, 239-252

JETTE, J.F. y ZIOMEK, E. (1994) Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical Biochemistry*, vol. 219, 256-260

JONES, E. y WEATHERLEY, L.R. (2003) Modelling the kinetics of lipase-catalysed oil hydrolysis in an electrically enhanced liquid-liquid system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 78, 194-198

JURADO-ALAMEDA, E., BRAVO-RODRÍGUEZ, V., BAILÓN-MORENO, R., NÚÑEZ-OLEA, J. y ALTMAJER-VAZ, D. (2003) Bath-Substrate-Flow method for evaluating the deterative and dispersant performance of hard-surface detergents. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 42, 4303-4310

KAIBARA, K., IWATA, E., EGUCHI, Y., SUZUKI, M. y MAEDA, H. (1997) Dispersion behaviour of oleic acid in aqueous media: from micelles to emulsions. *Colloid and Polymer Science*, vol. 275, 777-783

KANG, T.K. y RHEE, J.S. (1989) Characteristics of immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 33, 1469-1476

KAWASE, T., HASHIMOTO, T., FUJII, T. y MINAGAWA, M. (1985) Studies on the effects of surfactants on lipase activity. *Yakagaku*, vol. 34, 530-538

KIERKELS, J.G.T., VLEUGELS, L.F.W., KERN, J.H.A., MEIJER, E.M. y KLOOSTERMAN, M. (1990) Lipase kinetics: on-line measurement of the interfacial area of emulsions. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 12, 760-763

KIM, T. y CHUNG, K. (1989) Some characteristics of palm oil kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelle of AOT in isooctane and additive effects. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 11, 528-531

KLIVANOV, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, vol. 409, 241-246

KOIKE, T., MIWA, Y. y ARITA, H. (2000) Polysaccharide containing liquid agent for contact lens. *Patente Japonesa*, núm. JP2000109892

KOSUGI, Y., SUZUKI, H. y FUNADA, T. (1988) Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 31, 349-356

KOTTWITZ, B., POETHKOW, J. y UPADEK, H. (1995) Lipase containing textile detergent, *Patente Internacional*, núm. WO9527029

KOUKER, G. y JAEGER, K.E. (1987) Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, 211-213

KURAHASHI, N. y MATSUNAGA, K. (1994) Stabilization of enzyme in solution. Patente Japonesa, núm. JP6284886

KWON, D.Y. y RHEE, J.S. (1986) A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 63, 89-92

LABOURDENNE, S., CAGNA, A., DELORME, B., EXPOSITO, G., VERGER, R. y RIVIÈRE, C. (1997) Oil-drop tensiometer: application for studying the kinetics of lipase action. *Methods in Enzymology*, vol. 286, 306-326

LAPPAS, D., PANANDIKER, R.K., HORNER, T.W. y BOSWELL, R.W. (1999) Laundry detergent compositions containing lipolytic enzyme and amines. Patente de Estados Unidos, núm. US5935271

LAWRENCE, R.C., FRYER, T.F. y REITER, B. (1967) Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. *Nature*, vol. 213, 1264-1265

LAWSON, D.M., BRZOZOWSKI, A.M., RETY, S., VERMA, C. y DODSON, G.G. (1994) Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Engineering*, vol 7, 543-550

LEE, Y.K. y CHOO, C.L. (1989) The kinetics and mechanism of shear inactivation of lipase from *Candida cylindracea*. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 33, 183-190

LORTIE, R. (1997) Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnology Advances*, vol. 15, 1-15

MALCATA, F.X., HILL, C.G. y AMUNDSON, C.H. (1991) Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butteroil. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 38, 853-868

MARANGONI, A.G. (1994) Enzyme kinetics of lipolysis revisited: the role of lipase interfacial binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol 200, 1321-1328

MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M. y HULT, K. (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1258, 272-276

MARTINELLE, M., HOLMQUIST, M., CLAUSEN, I.G., PATKAR, S., SVENDSEN, A. y HULT, K. (1996) The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase. *Protein Engineering*, vol. 9, 519-524

MARTINEZ, O., WILHELM, A.M. y RIBA, J.P. (1992) Kinetic study of an enzymatic liquid-liquid reaction: the hydrolysis of tributyrin by *Candida cylindracea* lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 53, 373-378

MARTÍNEZ-GALLEGOS, J.F. (2005) Utilización de α -amilasas en la formulación de detergentes industriales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España

MAURICH, V., MONEGHINI, M., ZACCHIGNA, M., PITOTTI, A. y LENCIONIC, E. (1991) High-performance liquid chromatographic assay of pancreatic lipase activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 9, 427-431

MILED, N., BEISSON, F., DE CARO, J., DE CARO, A., ARONDEL, V. y VERGER, R. (2001) Interfacial catalysis by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 11, 165-171

MILLER, C., AUSTIN, H., POSORSKE, L. y GONZALEZ, J. (1988) Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 65, 927-931

MISSET, O. (1997) Development of new lipases, en: *Enzymes in Detergency*, editado por J.H. van Ee, O. Misset y E.J. Baas. Marcel Dekker, New York, 107-131

MORI, N., OSHITA, H., YOSHII, T., UBUSAWA, T. y TODA, H. (2001) Detergent composition for personal body. Patente Japonesa, núm. JP2001011487

NEVES PETERSEN, M.T., FOJAN, P. y PETERSEN, S.B. (2001) How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*, vol. 85, 115-147

NISHIOKA, M., JOKO, K., TAKAMA, M. y MATSUI, R. (1990) Novel lipase and production thereof. Patente Japonesa, núm. JP2092281

NOOR, I.M., HASAN, M. y RAMACHANDRAN, K.B. (2003) Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*, vol. 39, 13-20

NOVO-NORDISK (1991) Analytic method AF 95/6-GB, disponible previa solicitud.

NOVOZYMES A/S (2003) e-Handbook of enzymes. Información técnica suministrada a sus clientes por Novozymes A/S (<http://www.novozymes.com>)

NURY, S. PIÉRONI, G., RIVIÈRE, C., GARGOURY, Y., BOIS, A. y VERGER, R. (1987) Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface using surface tension measurements. *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 45, 27-37

OBENDORF, S.K., MEJLDAL, R., VARANASI, A. y THELLERSEN, M. (2001) Kinetic study of lipid distribution after washing with lipases: microscopy analysis. *Journal of Surfactant and Detergents*, vol. 4, 43-55

OCHOA-GÓMEZ, J.R., (1996) Formulaciones industriales, en: Detergentes, editor: A. Pérez-Dorado, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, 87–117.

OLSEN, H.S. (2004) Enzymes at work. Editado por Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Disponible “on-line” en la dirección <http://www.novozymes.com>

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N. y SOCCOL, V.T. (1999) The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 29, 19-31

PATIL, N.S., GHADGE, R.S., SAWANT, S.B. y JOSHI, J.B. (2000) Lipase deactivation at gas-liquid interface and its subsequent reactivation. *AIChE Journal*, vol. 46, 1280-1283

PENCREAC'H, G. y BARATTI, J.C. (1996) Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 18, 417-422

PENCREAC'H, G., GRAILLE, J., PINA, M. y VERGER, R. (2002) An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. *Analytical Biochemistry*, vol. 303, 17-24

PERSSON, C.M., KJELLIN, U.R.M. y ERIKSSON, J.C. (2003) Surface pressure effect of poly(ethylene oxide) and sugar head groups in liquid-expanded monolayers. *Langmuir*, vol. 19, 8152-8160

PIRAS, A., BRIGODIOT-IGNAZI, M. y LALOT, T. (1994) Method for the degradation of wastes of unsaturated polyesters in order to recycle such wastes. Patente Internacional, núm. WO9426812

PRACERES, D.M.F., LEMOS, F., GARCIA, F.A.P. y CABRAL, J.M.S. (1993) Modeling lipolysis in a reversed micellar system: Part I. Conventional batch reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 42, 759-764

PRONK, W., KERKHOF, P. J.A.M., VAN HELDEN, C. y VAN'T RIET, K. (1988) The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 32, 512-518

RAPP, P. (1995) Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, 832-838

RATHI, P., BRADDOO, S., SAXENA, R.K. y GUPTA, R. (2000) A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnology Letters*, vol. 22, 495-498

RATHI, P., SAXENA, R.K. y GUPTA, R. (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, vol. 37, 187-192

RAWYLER, A. y SIEGENTHALER, P. A. (1989) A single and continuous spectrophotometric assay for various lipolytic enzymes, using natural, non-labelled lipid substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1004, 337-344

REDDY, S.R. y FOGLER, H.S. (1982) Emulsion stability of acoustically formed emulsions. *Journal of Physical Chemistry*, vol. 84, 1570-1575

REYES, H.R. y HILL, C.G. (1994) Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 43, 171-182

ROGALSKA, E., NURY, S., DOUCHET, I. y VERGER, R. (1997) Lipase stereo- and regio-selectivity towards tri- and di-acylglycerols. *Biochemical Society Transactions*, vol. 25, 161-164

RÖHM, O. (1913) Verfahren zum reinigen wäschestücken aller art. Patente Alemana, núm. DE 283923

SABAHI, N. (2004) Caracterización de tensioactivos: poder espumante y tensiones superficiales. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España

SAKAI, N., SUZUKI, M., MIZUKOSHI, T., GOTO, Y., TANAKA, K., TAKAMA, M., MORIYA, N. y SAKIMOTO, K. (1995) Alkaline lipase, method for producing the same, microorganism producing the same and detergent composition containing alkaline lipase. Patente de Estados Unidos, núm. US5454971

SANTORO, M.M., LIU, Y., KHAN, S.M.A., HOU, L.X. y BOLEN, D.W. (1992) Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, vol. 31, 5278-5283

SARDA, L. y DESNUELLE, P. (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 30, 513-521

SCHONHEYDER, F. y VOLQVARTZ, K. (1945) On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 9, 57-67

SCHRAG, J.D. y CYGLER, M. (1997) Lipases and the α/β fold. *Methods in Enzymology*, vol. 284, 85-106

SCOTT, M.J. y JONES, M.N. (2000) Review: The biodegradation of surfactant in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1508, 235-251

SHARMA, R., CHISTI, Y. y BANERJEE, U.C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, vol. 19, 627-662

SKAGERLIND, P., JANSSON, M., BERGENSTAHL, B., y HULT, K. (1995) Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 4, 129-135

STOBIECKA, A., WY SOCKIA, S. y BRZOZOWSKI, A.M. (1998) Fluorescence study of fungal lipase from *Humicola lanuginosa*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 45, 95-102

STRAATHOF, A.J.J. (2003) Enzymatic catalysis via liquid-liquid interfaces. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 83, 371-375

SUZUKI, M., TAKAMA, M. y WADA, K. (1986) Stabilization of enzyme and stabilized composition. Patente Japonesa, núm. JP61108387

TALUKDER, M.M.R., ZAMAN, M.M., HAYASHI, Y., WU, J.C., KAWANISHI, T., OGINO, C. y SHIMUZU, N. (2004) Enzymatic kinetics for lipase-catalyzed hydrolysis of water-insoluble substrate in AOT reverse micelles, involving native and activated lipases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 79, 273-276

TANAKA, A. e IDE, K. (1999) Detergent composition for automatic dishwasher. Patente Japonesa, núm. JP11181475

TATARA, T., FUJII, T., KAWASE, T. y MINAGAWA, M. (1985) Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency II. Evaluation of adaptability of various kinds of lipases in practical laundry conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 62, 1053-1058

TAVSS, E.A. y EIGEN, E. (1988) Enzymatic hydrolysis of beef tallow. Patente Británica, núm. GB2196337

TAYLOR, F., PANZER, C.C., CRAIG, J. C. y O'BRIEN, D.J. (1986) Continuous hydrolysis of tallow with immobilized lipase in a microporous membrane. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 28, 1318-1322

TIPTON, K.F. (1992) Principles of enzyme assay and kinetic studies, en: *Enzyme assays, a practical approach*, editado por R. Eisenthal y M.J. Danson, Oxford University Press, Oxford, 1-58

TISS, A., CARRIÉRE, F. y VERGER, R. (2001) Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. *Analytical Biochemistry*, vol. 294, 36-43

TORRES, C.F., LIN, B., LESSARD, L.P. y HILL, C.G. (2005) Lipase-mediated transesterification of menhaden oil with the ethyl ester of conjugated linoleic acid: multi-response kinetics. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 23, 107-116

TSAI, S.W. y CHANG, C.S. (1993) Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 57, 147-154

TSAI, S.W. y 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*, vol. 38, 206-211

TSAI, S.W., WU, G.H. y CHIANG, C.L. (1991) Kinetics of enzymatic hydrolysis of olive oil in biphasic organic-aqueous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 38, 761-766

TSUZUKI, W., UE, A., NAGAO, A. y AKASAKA, K. (2002) Fluorimetric análisis of lipase hydrolysis of intermediate- and long-chain glycerides. *The Analyst*, vol. 127, 669-673

VAN DIJK, W.R. (1988) Enzymatic dishwashing and rinsing composition. Patente Europea, núm. EP0271155

VAN EE, J.H. (1997) Historical overview, en: *Enzymes in Detergency*, editado por J.H. van Ee, O. Misset y E.J. Baas. Marcel Dekker, New York, 1-10

VERGA, A., BENEDETTO, G. y SPERANDEO, F. (1984) Enzyme-based shampoo. Patente Europea, núm. EP0097810

VERGER, R. (1980) Enzyme kinetics of lipolysis. *Methods in Enzymology*, vol. 64, 341-392

VERGER, R. y DE HAAS, G.H. (1973a) Enzyme reaction in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 10, 127-136

VERGER, R., MIERAS, M.C.E. y DE HAAS, G.H. (1973b) Action of Phospholipase A at interfaces. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, 4023-4034

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

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J. y HAAS M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, vol. 9, 113-148

VIND, J., SVENDSEN, A., PATKAR, S.A., ANDERSEN, K.V., HALKIER, D.A. y BOJSEN, K. (2000) Lipase variant. Patente Internacional, núm. WO0060063

VON TIGERSTROM, R.G. y STELMASCHUK, S. (1989) The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 35, 511-514

- WALDE, P. y LUISI, P.L. (1989) A continuous assay for lipases in reverse micelles based on Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*, vol. 28, 3353-3360
- WANG, J., FAN, X. y TANG, S. (2004) Process for processing medical cotton by compound enzymes. Patente China, núm. CN1530488
- WANNERBERGER, K., WELIN-KLINTSTRÖM, S. y ARNEBRANT, T. (1997) Activity and adsorption of lipase from *Humicola lanuginosa* on surfaces with different wettabilities. *Langmuir*, vol. 13, 784-790
- WARMUTH, W., WENZIG, E. y MERSMANN, A. Reaction kinetics for the hydrolysis of tributyrin using an immobilized bacterial lipase. *Chemical Engineering Science*, vol. 49, 5087-5095
- WOLFF, A.M. y SHOWELL, M.S. (1997) Application of lipases in detergents, en: *Enzymes in Detergency*, editado por J.H. van Ee, O. Misset y E.J. Baas. Marcel Dekker, New York, 93-106
- WU, H.S. y TSAI, M.J. (2004) Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 35, 488-493
- XIA, J., CHEN, X. y NNANNA, I.A. (1996) Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 73, 115-120
- XIAN, C. y LUO, J. (1999) Shampoo containing no surfactant. Patente China, núm. CN1239655
- XU, X. (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 102, 287-303
- YAMAGUCHI, C., AKITA, M., ASAOKA, S. y OSADA, F. (1989) Hydrolysis of castor oil with lipase. Patente Japonesa, núm. JP1016594
- YOO, Y.E., TAKENAKA, N., BANDOW, H. NAGATA, Y. y MAEDA, Y. (1997) Characteristics of volatile fatty acids degradation in aqueous solution by the action of ultrasound. *Water Research*, vol. 31, 1532-1535

ZAKS, A. y KLIBANOV, A.M. (1984) Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. Science, vol. 224, 1249-1251

ZORN, H., TAKENBERG, M. y BERGER, R.G. (2004) Carotene-specific lipase. Patente Internacional, núm. WO2004022734