

Enzimas Inmovilizadas. Estudios para el Diseño de un Reactor Enzimático

Beatriz G. Maroto

**Tesis presentada para el grado de
Doctor en Ingeniería**

Dpto de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad Nacional de la Plata.

1998

*A mis hijas,
María Celina y Jorgelina*

Mi sincero agradecimiento:

Al Dr. Celso Camusso y la Dra. Noemí Zaritzky, por haberme brindado la posibilidad de trabajar bajo su dirección.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por el apoyo brindado y al FOMECA por la beca recibida.

Al Dpto de Ingeniería Química, a la Facultad de Ingeniería y la Universidad Nacional de La Plata , por ofrecerme la posibilidad de la realización de este trabajo.

Al CIDCA, por permitirme la ejecución de este trabajo en su ámbito.

Al Dpto de Química Industrial y Aplicada, FCEFyN por su aliento permanente y afecto invaluable.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Inmovilización de Enzimas.....	8
1.1.1. Usos de lipasas inmovilizadas en la modificación de grasas y aceites.....	9
1.1.2. Historia de la inmovilización de enzimas.....	12
1.1.3. Enzimas inmovilizadas.....	12
1.1.4. Tecnología de inmovilización de enzimas.....	13
1.1.4.1. Métodos físicos.....	14
1.1.4.2. Métodos químicos.....	16
1.1.5. Elección del método de inmovilización y del soporte.....	18
1.1.6. Características de las enzimas libres vs. inmovilizadas.....	19
1.1.7. Adsorción y formación de enlaces inorgánicos.....	20
1.1.7.1. Definición de adsorción.....	20
1.1.7.2. Mecanismo de adsorción.....	21
1.1.7.3. Factores que afectan la inmovilización de enzimas por adsorción.....	22
Sitio activo.....	22
pH y fuerza iónica.....	22
Concentración de enzima.....	23
Temperatura y tiempo.....	23
1.1.8. Elección del soporte.....	24
1.1.8.1. Inmovilización de enzimas sobre agar, agarosa y sephadex.....	24
1.1.8.2. Capacidad para retener la actividad enzimática.....	25

1.1.8.3. Usos industriales.....	25
1.2. Cinética Enzimática.....	26
1.2.1. Factores que afectan la velocidad de las re- acciones enzimáticas.....	26
1.2.1.1. Concentración de sustrato.....	26
1.2.1.2. Temperatura.....	30
1.2.1.3. pH.....	31
1.2.2. Cinética de enzimas inmovilizadas.....	32
1.2.2.1. Limitaciones difusionales internas y externas.....	33
Factores de efectividad.....	34
Efecto de resistencia a la transferencia de ma- sa externa.....	35
1.2.2.2. Evaluación de efectos de difusión ex- ternos.....	37
1.2.2.3. Análisis de difusión intrapartícula y reacción.....	39
1.2.2.4. Evaluación de efectos de difusión in- ternos.....	43
1.3. Diseño del Reactor.....	45
1.3.1. Reactores ideales.....	45
1.3.1.1. Dinámica de reactores.....	45
1.3.2. Reactores de flujo no ideal.....	48
1.3.2.1. Reactores que contienen sistemas de enzimas inmovilizadas.....	49
1.3.2.2. Reactores industriales y comerciales que emplean enzimas inmovilizadas.....	49
1.3.2.3. Distribución de tiempos de residencia.. Curva E.....	51
Curva F.....	52
Curva C.....	53
1.3.2.4. Cálculo de la conversión.....	54

1.4. Objetivos.....	56
2. INMOVILIZACION DE ENZIMA FOSFOLIPASA A ₂	58
2.1. Parte Experimental.....	58
2.1.1. Materiales.....	58
2.1.1.1. Enzima.....	58
2.1.1.2. Soporte.....	58
2.1.1.3. Reactivos.....	60
2.1.2. Metodologías.....	60
2.1.2.1. Cuantificación de Fosfolipasa A ₂	60
2.1.2.2. Técnica de inmovilización.....	61
2.1.2.3. Determinación del pH óptimo.....	62
2.1.2.4. Determinación del tiempo de inmovili- zación.....	62
2.1.2.5. Cálculo del rendimiento de inmoviliza- ción.....	62
2.2. Resultados y Discusión.....	63
3. CINÉTICA DE LA REACCION DE HIDROLISIS DE LECITINA DE SOJA.....	72
3.1. Parte Experimental.....	72
3.1.1. Materiales.....	72
3.1.1.1. Enzima Fosfolipasa soluble.....	72
3.1.1.2. Enzima Fosfolipasa A ₂ inmovilizada.....	72
3.1.1.3. Sustrato.....	73
3.1.2. Metodologías.....	74
3.1.2.1. Reacción de hidrólisis utilizando enzi- ma soluble.....	74

3.1.2.2.	Reacción de hidrólisis utilizando enzi- ma inmovilizada.....	75
3.1.2.3.	Extracción y determinación de ácidos grasos.....	75
3.1.2.4.	Cálculo de parámetros cinéticos para Fosfolipasa A ₂	75
3.1.2.5.	Cálculo de parámetros cinéticos intrín- secos para enzimas inmovilizadas.....	78
3.2.	Resultados y Discusión.....	80
4.	DISEÑO DEL REACTOR.....	104
4.1.	Parte Experimental.....	104
4.1.1.	Materiales.....	104
4.1.1.1.	Trazador.....	104
4.1.1.2.	Equipamiento.....	105
4.1.1.3.	Relleno.....	106
4.1.2.	Metodologías.....	106
4.1.2.1.	Flujo a través del reactor.....	106
4.1.2.2.	Respuestas del sistema.....	108
	Curva E.....	108
	Curva F.....	108
	Curva C.....	109
4.1.2.3.	Aplicación.....	109
	Modos de emplear la información sobre la dis- tribución de edades.....	109
	Determinación de la linealidad del sistema.....	110
	Cálculo de la fracción no convertida para un reactor de flujo en pistón a partir de los datos cinéticos (reactor ideal).....	110
	Cálculo directo de la conversión a partir de la información del trazador.....	111

• Cálculo de la fracción no convertida a partir de datos obtenidos del trazador y de la cinética de la reacción (reactor real).....	112
• Cálculo de la fracción no convertida según el modelo de dispersión cuando el grado de dispersión es grande.....	112
4.2. Resultados y Discusión.....	114
5. CONCLUSIONES.....	156
APÉNDICE.....	161
BIBLIOGRAFÍA.....	191
NOMENCLATURA.....	211

Capítulo I

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

La lecitina es un producto natural presente en diversas especies de oleaginosas y se obtiene como subproducto en el proceso de purificación del aceite. Durante la operación de desgomado del aceite de soja se obtienen las gomas crudas húmedas, las cuales luego de secadas tienen una composición aproximada del 65% de fosfolípidos, 30% de aceite y 5% de carbohidratos y componentes menores como pigmentos, tocoferoles y esteroides.

La lecitina pura es, fundamentalmente, una mezcla de tres fosfolípidos: Fosfatidilcolina, Fosfatidiletanolamina y Fosfatidilinositol (Lajara, 1969; 1970).

Estos compuestos presentan en su estructura grupos hidrófilos y grupos lipófilos y precisamente, esta circunstancia les confiere propiedades fisicoquímicas particulares, siendo posible su utilización como emulsionantes, humectantes y como agentes tensioactivos en general. La industria alimenticia en particular representa un vasto campo de aplicación para un producto de estas características.

La investigación en tecnología de alimentos es uno de los puntos de mayor impacto sobre la actividad socioeconómica del país. A ello contribuye, no sólo el hecho de poseer la República Argentina una importante producción primaria que requiere su industrialización, con el consiguiente aporte de tecnología, sino también porque el avance mundial en tecnología de alimentos se encuentra en un estado incipiente.

La producción de aceite de soja en la Provincia de Córdoba alcanza las 70.000 toneladas por año esto implica una producción de 4.000 toneladas por año de gomas crudas húmedas (lecitinas impuras) que deben ser procesadas o tratadas como efluentes contaminantes. Parte de estas gomas son deshidratadas y exportadas como tales, el resto es mezclado con harinas para su utilización como alimento balanceado (Desarrollo Agroindustrial de la Pcia. de Córdoba, 1984).

No existen en el país industrias que procesen las gomas crudas secas con el fin de obtener lecitina pura o refinada. La aceptación del producto Lecitina de Soja Pura en Polvo, no sólo está dada por su funcionalidad y calidad sino también por los costos que implica su purificación; de allí habría dos alternativas: una, el uso de gomas crudas secas y otra, el empleo de las lecitinas purificadas (Madoery y col., 1986).

1.1. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de una enzima presupone su confinamiento o localización de modo que pueda ser usada en forma continua. En procesos que utilizan enzimas en solución las enzimas conviven con el producto final y por lo tanto deben ser removidas, en cambio, en procesos con enzimas inmovilizadas éstas son retenidas dentro del reactor.

Las enzimas inmovilizadas pueden retener su actividad por mayor tiempo que aquellas en solución (Tosa, 1973), a la vez que una enzima puede ser fijada cerca de otras enzimas participantes de una secuencia catalítica, incrementando la eficiencia de la conversión.

Estas características hacen a las enzimas inmovilizadas atractivas si se quiere procesar continuamente una gran cantidad de sustrato o si las enzimas involucradas son costosas. Por otra parte, la capacidad para confinar una enzima en espacios predeterminados y bien definidos proporciona oportunidades para aplicaciones originales de las enzimas inmovilizadas.

1.1.1. USOS DE LIPASAS INMOVILIZADAS EN LA MODIFICACIÓN DE GRASAS Y ACEITES.

En los años recientes ha surgido un interés creciente en la química y la biotecnología de grasas y aceites. Esta tendencia se puede atribuir principalmente al hecho de que los oleoquímicos son derivados de fuentes renovables (aceites vegetales y sebo animal) y pueden eventualmente, ser producidos en cada país del mundo. La investigación básica y aplicada dirigida a la manufactura de productos derivados de lípidos alternativos a escala industrial se ha apoyado en el excedente de grasas y aceites de los países más desarrollados (Aunstrup, 1975; Boyce, 1984; Ishida, 1984; Neidelman y Geigert, 1984; Nielsen, 1984; Posorske, 1984; Nawar, 1985; Smith, 1985). En virtud de sus ventajas económicas y ecológicas, actualmente los oleoquímicos compiten exitosamente con los ácidos de cadena larga, los alcoholes y sus derivados de origen petroquímico (Werdelmann, 1974; Pride, 1979; Boelhouwer, 1980; Bindo y Smith, 1981; Klimmek, 1981; Stein, 1982).

Además, con los recientes avances en tecnología de bio-reactores e Ingeniería Genética, se han investigado muchas ideas nuevas e interesantes para producir oleoquímicos de grasas empleando biotecnología. Entre las rutas químicas más prometedoras de interés industrial están: la hidrólisis, síntesis de ésteres y reacción de interesterificación de lípidos catalizadas por lipasas (Werdelmann, 1974). Las lipasas bajan selectivamente la energía de activación de las reacciones químicas que ellas catalizan (Segel, 1975) y se logra más alta especificidad y un mejoramiento en las velocidades de reacción en relación a las reacciones no enzimáticas (Creighton, 1984; Walsh, 1984).

La hidrólisis total de enlaces ésteres en triglicéridos se puede llevar a cabo a altas temperaturas y presiones en presencia de vapor, o alternativamente a bajas temperaturas por la acción de lipasas no específicas en presencia de exceso de agua (Nawar, 1985). La posibilidad económica y técnica de la ruptura enzimática de grasas en condiciones suaves (Nisshin Oil Mills Ltd, 1970, 1971, 1976; Linfied y col., 1984; Meito Sangyo Co KK, 1971, 1979a,

1979b; Sonntag, 1979) se ha investigado en comparación con el proceso de hidrólisis en contracorriente de vapor a altas presiones, empleado en la práctica industrial (Nielsen, 1981).

Un ejemplo del uso de lipasas es la manufactura de quesos italianos (Farnham y Dairyland Food Laboratories Inc., 1950; Farnham y Dairyland Food Laboratories Inc., 1957), quesos americanos (Fukumoto, 1971; Kraftco Corp., 1971; Roberts y Kraftco Corp., 1971a; 1971b; 1971c) y queso Cheddar (Arbige y col., 1986).

Las reacciones de esterificación entre alcoholes polihídricos y ácidos grasos libres son, en esencia, la inversa de la reacción de hidrólisis de los glicéridos correspondientes. El equilibrio entre ambas es controlado usualmente por el contenido de agua en la mezcla de reacción. Se han obtenido buenos resultados usando lipasas en la síntesis de ésteres del ácido oleico con alcoholes primarios y secundarios, alifáticos y terpénicos (Iwai y col., 1979) y en la producción de geranil y metil ésteres de ácido butírico y ésteres del ácido laúrico y mentol (Marlot y col., 1985).

La aplicación de lipasas para la modificación de grasas y aceites por interesterificación tiende a tornarse una ruta paralela que involucra el uso de aceites de semillas para producir aceites y grasas con características deseadas (Coleman y Macrae, 1981; Nielsen, 1981; Tanaka y col., 1981). Un ejemplo es la producción de sustitutos de manteca de cacao a partir de materia prima de más bajo costo. Este procedimiento puede ser llevado a cabo mediante reacciones de interesterificación catalizadas por enzimas, entre:

- I. fracción media de aceite de palma y ácido esteárico (Macrae, 1985);
- II. aceite de oliva y de girasol y ácido esteárico (Tanaka y col., 1981; Matsuo y col., 1983);
- III. fracción media de aceite de palma y tristearato de glicerilo (Fuji Oil Co., 1981; Macrae, 1983).

Algunos de los mayores obstáculos para usar bio-reactores con enzimas inmovilizadas dentro de la industria oleoquímica, surgen porque el número de productos de alto valor agregado en la industria oleoquímica es limitado, las

enzimas involucradas en las biotransformaciones de los lípidos son costosas; y hay muchas dificultades resultantes de problemas de ingeniería de solventes a causa de la naturaleza heterogénea y/o microacuosa de algunas reacciones bioquímicas (Werdelmann y Schmid, 1982; Yamane, 1987). Al presente, las lipasas representan no más del 3% de todas las enzimas usadas en la industria. Sin embargo, los grandes costos de la energía obtenida de fuentes fósiles y el aumento de la demanda de productos de más alta calidad, sumados a las especificaciones de pureza, resultan nuevos incentivos para transformaciones bioquímicas de grasas y aceites. Por lo tanto, los procesos de enzima inmovilizada ofrecen un gran potencial para desarrollo futuro. Así por ejemplo, la hidrólisis de Lecitina de Soja, una mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, puede llevarse a cabo mediante el uso de enzima Fosfolipasa A₂ en la cual se libera al ácido graso de la posición C-2 y se obtiene un producto enriquecido en lisolectinas, con aplicaciones en la industria farmacéutica y de la panificación.

La reacción que ocurre se muestra en fig. 1.1.

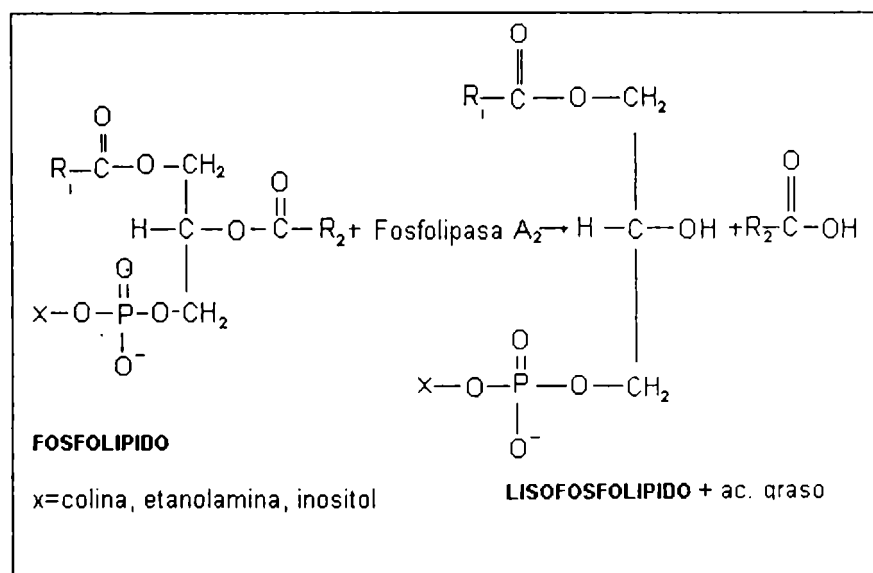


Fig. 1.1: Reacción de hidrólisis de una lecitina catalizada por Fosfolipasa A₂

1.1.2. HISTORIA DE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Las propiedades y reacciones de la catálisis enzimática fueron descubiertas por G.S.C. Kirchhoff en 1811, sin embargo, el término "catálisis" fué empleado por primera vez por Berzelius, en 1838. La palabra "enzima" fue propuesta por Kühne en 1878.

Si bien durante el siglo XIX fueron estudiadas y utilizadas numerosas reacciones de enzimas, los frutos de estas investigaciones tempranas no han sido aprovechados hasta el arribo del siglo XX. La química de enzimas moderna comienza con la hipótesis propuesta por los autores Michaelis-Menten y el aislamiento de una enzima, la ureasa por Sumner.

Nelson y Griffin en 1916 realizaron uno de los primeros trabajos con enzimas inmovilizadas. Efectuaron la adsorción de invertasa sobre carbón y alúmina y demostraron que esta enzima inmovilizada retenía su actividad. Aproximadamente 40 años transcurrieron antes de Katchalski, Mitz, McLaren y Zittle ganaran reconocimiento en esta área. Estos líderes en tecnología de enzimas inmovilizadas se tornaron bastante activos entre 1954 y 1961. McLaren y Zittle estuvieron ocupados con adsorción de enzimas en soportes inorgánicos. Katchalski obtuvo enzimas inmovilizadas por unión covalente a copolímeros orgánicos, y Mitz dirigió su atención hacia la unión covalente a celulosa (Messing, 1975).

1.1.3. ENZIMAS INMOVILIZADAS

Las ventajas del uso de enzimas inmovilizadas se pueden resumir en:

Posibilidad de uso múltiple o repetitivo de una carga de enzimas.

1. Disponibilidad de frenar la reacción rápidamente por remoción de la enzima de la solución de reacción.
2. En muchos casos, la enzima es estabilizada por enlaces covalentes.

3. La solución procesada no queda contaminada con las enzimas.

4. Larga vida media de la enzima con velocidades de decaimiento predecibles.

Cada uno de estos puntos contribuye a la creciente utilización de la tecnología de enzimas inmovilizadas.

Además de las ventajas económicas que pueden lograrse por la inmovilización de una enzima, se puede ejercer un control adicional sobre el grado de conversión de sustrato a productos. Cuando en una reacción se emplean enzimas solubles, la reacción se puede detener solo con la destrucción de la enzima o cambiando alguna de las condiciones del medio (pH, concentración de sal).

Cuando la enzima está inmovilizada, el grado de reacción se puede modificar alterando las velocidades de flujo de sustrato a través de enzima inmovilizada o removiendo la enzima de la solución. Estos controles se pueden ejercer rápidamente. Por otra parte, la enzima inmovilizada puede ser más precisa y rápidamente controlada que la enzima en solución.

1.1.4. TECNOLOGÍA DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Muchos métodos son adecuados para inmovilizar enzimas. Los métodos de inmovilización usados ejercen fuerte influencia sobre las propiedades de los biocatalizadores.

Por eso, la selección de la estrategia de inmovilización deriva de las especificaciones de los procesos para la catálisis incluyendo parámetros tales como la actividad catalítica, efectividad de la utilización de la reacción de catálisis, características de desactivación y regeneración y, por supuesto, el costo. Además, la toxicidad de los reactivos de la inmovilización estaría en conexión con la distribución de los residuos del proceso de inmovilización y la futura aplicación de la enzima inmovilizada como catalizador.

Los diversos métodos ideados para inmovilización de enzimas pueden ser divididos dentro de dos clases generales:

- a) Métodos físicos, donde están involucradas fuerzas de interacción débiles o entrapamiento de las enzimas.
- b) Métodos químicos, donde se forman enlaces covalentes con la enzima.

1.1.4.1. MÉTODOS FÍSICOS

Las enzimas pueden ser adsorbidas sobre una variedad de soportes (Tabla 1.1), ofreciendo en algunos casos la conveniencia práctica de la simple regeneración del soporte por remoción de la enzima desactivada y posibilidad de recarga con enzima fresca, catalíticamente activa. Las propiedades de cada soporte o material de entrapamiento particular, combinadas con las de la enzima y el procedimiento de inmovilización determinan todas las propiedades catalíticas.

La inmovilización de enzimas por entrapamiento físico tiene el beneficio de ser aplicable a muchas enzimas y provoca relativamente pequeñas perturbaciones de la estructura y función de la enzima.

Las estrategias de entrapamiento pueden dividirse en dos clases: la enzima es fijada en una red polimérica o la enzima en solución es retenida por una membrana permeable al sustrato, productos de reacción o ambos.

El sistema más usado para entrapamiento enzimático es un polímero enrejado del gel de poliacrilamida fabricado por polimerización de acrilamida en presencia de enzima. Los tamaños de poros de estos geles de inmovilización de enzimas preparados con estos reactivos están en el rango 100 - 400 nm, los que son lo suficientemente pequeños como para retener muchas enzimas que tienen diámetros moleculares en el rango de 300 a 2000 nm.

TABLA 1.1: Interacciones y soportes usados para inmovilización enzimática por adsorción.

Interacción	Adsorbente
Adsorción Física	Carbón activado, sílica gel, alúmina, almidón, vidrio, arcilla, etc. Materiales modificados: tanino, aminohehil celulosa, etc.
Enlace Iónico	Resinas de intercambio iónico: carboximetil celulosa, amberlite CG-50, Dowex-50, DEAE Celulosa, DEAE Sephadex, etc.

En el resto de los procedimientos de inmovilización, la enzima se aloja en la solución, pero esta solución está físicamente confinada, de modo que la enzima no pueda escaparse.

Otro método artificial de inmovilización es el de microencapsulamiento. Las enzimas son atrapadas en pequeñas cápsulas de diámetro por encima de 300 μm , las cuales están rodeadas por membranas esféricas que tienen poros lo suficientemente pequeños como para permitir la entrada y la salida de la cápsula, de pequeñas moléculas de sustrato y productos, no así de las enzimas y otras moléculas grandes.

Los métodos de microencapsulamiento ofrecen una superficie muy grande (por ejemplo, 2500 cm^2 por ml de solución enzimática) y la posibilidad de agregar especificidad: la membrana puede hacerse "a medida" en algunos casos para admitir selectivamente unos sustratos y excluir otros.

Las velocidades de transferencia de masa a través de éstas membranas son pequeñas y pueden limitar la velocidad total. Sin embargo, casi cualquier enzima o combinación de enzimas puede ser inmovilizada por este camino.

Este método de inmovilización no es ventajoso cuando el sustrato tiene alto peso molecular o es insoluble, situaciones donde los enlaces polímero-enzima pueden tener una eficiencia pequeña.

1.1.4.2. MÉTODOS QUÍMICOS

La selección de un soporte para inmovilización química o adsorción de una enzima depende primero de sus propiedades de superficie:

¿Se adsorberá la enzima sobre su superficie?

¿El material posee grupos funcionales que puedan enlazarse con la enzima?

¿Si la superficie nativa no es ideal, podemos modificarla químicamente o revestirla para facilitar el ataque enzimático?

En la tabla 1.2 se incluyen distintos materiales que pueden ser empleados para inmovilización covalente de enzimas y algunos de sus grupos funcionales superficiales de mayor interés. Se pueden utilizar otros materiales como soportes, tales como cerámicas, vidrios y algunos óxidos metálicos.

Los protocolos para inmovilización covalente de enzimas a menudo comienzan con una modificación superficial. Una estrategia muy usada para iniciar la modificación superficial de soportes inorgánicos es la silanización, que consiste en rodear la superficie con grupos funcionales orgánicos usando un reactivo organofuncional silano; por ejemplo, $(\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O})_3 \cdot \text{Si-(CH}_2)_3\text{-R}$ donde R es frecuentemente -NH_2 .

TABLA 1.2: Materiales y algunos de sus grupos funcionales superficiales usados para enlace covalente de enzimas

Soportes Naturales	Soportes Sintéticos
<ul style="list-style-type: none">• celulosa (-OH)• carboximetil-celulosa (COOH)• agarosa (sepharosa) (-OH)• dextrano (sephadex) (-OH)	<ul style="list-style-type: none">• derivados de poliacrilamida• (amino aromático)• poliamino poliestireno• (NH_2)• copolímeros de anhídrido maleico

Otra modificación comúnmente estudiada es la unión de otra molécula al soporte, (por ejemplo, n-propilamina), a la que la enzima es subsecuentemente enlazada. Esto puede dejar la superficie más flexible, de manera que se puede conformar la estructura de la enzima reteniendo la actividad catalítica nativa. Tales modificaciones pueden también ser aplicadas para alterar la hidrofobicidad de la superficie del soporte.

Existen ejemplos típicos de inmobilizaciones enzimáticas por métodos químicos que utilizan estas superficies funcionalizadas y aquellas que se muestran en la tabla 1.2.

Cada procedimiento en particular requiere condiciones de reacción adecuadamente ajustadas, incluyendo pH, fuerza iónica, y concentración de reactivos (Goldstein, 1964; Lilly y col., 1966; Kilara y col., 1976; Rakhimov y col., 1977; Venkatasubramanian y Harrow, 1979; Kobayashi y col., 1980; Omar y col., 1988; Tahoun, 1986; Kilara, 1981).

Los grupos funcionales de la proteína que están involucrados en los enlaces covalentes de la superficie del soporte obviamente dependen de la química de la inmobilización aplicada. Claro está, se tienden a evitar las uniones en los sitios activos de la enzima.

Las enzimas también pueden ser entrampadas o confinadas dentro de una red polimérica, utilizando distintos reactivos. El método más frecuente emplea glutaraldehído. Otros reactivos de entrecruzamiento incluyen el bisbiazol bencidina, y hexametileno-di-isocianato.

En todos los casos, la actividad enzimática denota la actividad catalítica intrínseca de la molécula de enzima inmobilizada en relación con la actividad de la enzima en solución. En general, los métodos de inmobilización química tienden a reducir la actividad en este sentido, ya que los enlaces covalentes formados como resultado de la inmobilización pueden perturbar la estructura terciaria de la enzima nativa. En otro orden, como las uniones covalentes proveen vínculos estables y fuertes, en muchos casos reducen las velocidades de desactivación de la enzima y usualmente alteran la especificidad enzimática. Los métodos de inmobilización de entrampamiento y adsorción

perturban mucho menos la enzima y consecuentemente presentan retención de propiedades que las hacen más semejantes a las de enzimas en solución.

1.1.5. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE INMOVILIZACIÓN Y DEL SOPORTE

En la elección del tipo de inmovilización, deberá considerarse que el manipuleo de algunas enzimas como el de algunos agentes enlazantes puede resultar tóxico, tanto durante la preparación de las enzimas inmovilizadas como en su uso posterior. Aparte de la adsorción y ciertos tipos de entrapamiento, todos los otros métodos de inmovilización involucran reacciones químicas. Los reactivos usados para uniones covalentes, especialmente los agentes bifuncionales, son intrínsecamente agentes de uniones proteicas y deben ser tratados con cuidado.

Muchas técnicas de inmovilización realizadas en el laboratorio no son útiles para la producción de grandes cantidades de enzimas inmovilizadas, por la dificultad del cambio de escala o por su alto costo. La elección se basa principalmente en el bajo costo y la mayor estabilidad de las enzimas inmovilizadas (Lilly y Dunnill, 1976).

Un método costoso de inmovilización es prometedor para una enzima barata sólo si la vida operacional de la enzima es muy larga o si hay importantes ventajas en el proceso. Igualmente, un soporte caro podría justificarse sólo por una prolongada vida operativa de la enzima inmovilizada o si el soporte es reusable. Sin embargo, el costo de producción de la enzima inmovilizada debe representar una muy pequeña proporción del costo total de producción, especialmente cuando los costos de marketing son altos. Algunos métodos de inmovilización son protegidos por patentes, pero sólo se justifica la obtención de la licencia cuando una cantidad razonable de conocimiento tecnológico está asociada con el proceso, puesto que la mayoría de las enzimas pueden ser inmovilizadas satisfactoriamente por más de un método.

En el diseño de un reactor la cantidad de catalizador activo por unidad de volumen de reactor es, a menudo, un factor importante, ya que determina el tamaño del reactor. La velocidad de reacción por unidad de volumen será una función del peso de la preparación de la enzima inmovilizada por unidad de volumen del reactor, del contenido de proteína de la preparación, de la actividad de la enzima inmovilizada y de la eficacia de utilización de esta actividad.

Se pueden obtener muy altos contenidos de proteína con soportes porosos, pero si la actividad por unidad de volumen de soporte es también alta, la eficacia de utilización de esta actividad será menor por limitaciones difusionales (Regan y col., 1974).

Claramente el menor tamaño de partícula es el mejor, pero el límite inferior es determinado por la posibilidad de retener estas partículas pequeñas en el reactor. Para un determinado tamaño de partícula, el contenido óptimo de enzima de la partícula será un compromiso económico entre un alto contenido, el cual dará una alta actividad por unidad de volumen de soporte, pero un bajo factor de eficiencia, y un bajo contenido, el cual dará una actividad baja, pero un uso más efectivo de una enzima cara.

1.1.6. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS LIBRES VS. INMOVILIZADAS

La principal diferencia entre enzima libre e inmovilizada es que una vez inmovilizada, la enzima no se encuentra completamente rodeada por un medio acuoso. Se puede suspender la enzima inmovilizada en una solución de sustrato, activadores u otros componentes a un pH y fuerza iónica particular, pero no se tiene la seguridad que las condiciones en el medio inmediatamente cercano a la enzima sean las mismas que aquellas en la solución. Realmente esas condiciones pueden ser bastante diferentes. Este fenómeno puede ser el

resultado de las cargas o las propiedades físico-químicas de la matriz soporte o puede resultar de limitaciones difusionales.

Muchas publicaciones muestran que la constante de Michaelis de una enzima cambia a raíz de la inmovilización. Es difícil determinar si estos cambios son causados por la influencia del microentorno o que estos fueron cambios de la constante intrínseca. Este último caso puede ocurrir si la inmovilización da lugar a una restricción conformacional de la enzima, que puede alterar la catálisis. Un resultado similar ocurriría si el sitio activo de la enzima fuera obstruido estéricamente (Goldstein, 1973). En otros casos, como en la inmovilización de lipasas sobre soportes hidrofóbicos, se preserva, y a veces se mejora la actividad de la lipasa, se incrementa su estabilidad térmica, se evita contaminación del producto modificado por lipasa con actividad residual; se incrementa la productividad del sistema por unidad de lipasa empleada y se permite el desarrollo de procesos continuos (Malcata y col., 1992; Bagi y col., 1997; Murray y col., 1997).

1.1.7. ADSORCIÓN Y FORMACIÓN DE ENLACES INORGÁNICOS

1.1.7.1. DEFINICIÓN DE ADSORCIÓN

De acuerdo a una definición aceptada y generalizada, adsorción es la adhesión o condensación de moléculas de soluto sobre la superficie de sólidos.

Esta definición no es totalmente aceptable para los propósitos de la discusión que sigue.

Si tuviésemos que adoptar una definición como la dada, las enzimas inmovilizadas sobre soportes que tienen grupos con enlaces covalentes unidos a la superficie, podrían considerarse adsorbidas, ya que la enzima podría estar acumulada o condensada sobre la superficie de un sólido desde la solución. En orden de resolver este dilema, se adoptará la siguiente definición:

“adsorción es la adhesión de una enzima a la superficie de un soporte que no ha sido específicamente preparado para el enlace covalente”.

1.1.7.2. MECANISMO DE ADSORCIÓN

Messing (1969) observó que cuando se utilizan membranas de vidrio poroso en procesos de diálisis, la proteína se pierde rápidamente de la solución contenida por la membrana; sin embargo, luego de pocos días la proteína aparece en la solución buffer circundando la membrana. El estudio de la cinética de inclusión de la proteína sobre vidrio poroso fue efectuado utilizando técnicas espectrofotométricas pero la inclusión inicial de proteína fue demasiado rápida para seguirla con cierto grado de precisión. Luego de 20 minutos, la velocidad de inclusión disminuyó considerablemente presentándose lineal con respecto al tiempo.

Estos resultados indican que hay una muy rápida inclusión que es dependiente de la carga superficial de la proteína y ello sugiere que en esta etapa están involucrados enlaces iónicos que se forman entre los grupos $-NH_2$ de la proteína y los grupos SiO^- del vidrio.

Este enlace proteína-vidrio es tan fuerte que reactivos tales como ácidos fuertes, NH_4OH y una variedad de soluciones buffer de fuerza iónica alta no son capaces de eluir la proteína; en cambio, una solución ácida de urea la libera.

Se podrían citar algunos problemas cuando se elige inmovilizar por adsorción proteínas conjugadas ya que ocurre la disociación de la fracción no proteica de la proteína fundamental. Se ha demostrado, por ejemplo, que por la exposición sobre vidrio poroso, la hemoglobina es disociada y el pequeño grupo prostético, porfirina, es adsorbido sustancialmente en mayor proporción que la proteína. La disociación de una enzima conjugada podría derivar entonces en una pérdida de actividad (Messing, 1976).

1.1.7.3. FACTORES QUE AFECTAN LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS POR ADSORCIÓN

Sitio Activo

Un riesgo adicional que habría que afrontar cuando se utiliza el método de adsorción para inmovilizar enzimas es la reacción en un residuo involucrado en el sitio activo de la enzima, tal es el caso de tripsina cuando se adsorbe sobre vidrio poroso con la aparente complicación de un residuo de histidina de su sitio activo (Messing, 1976).

pH y Fuerza iónica

Las enzimas inmovilizadas por adsorción requieren un estricto control del pH y de la fuerza iónica durante el proceso de aplicación. Si las uniones son predominantemente interacciones iónicas, con presencia de pocos enlaces puente de hidrógeno, entonces un simple cambio en el pH o la fuerza iónica podría intercambiar el ión proteico por otro ión, y así, ocurriría la desorción.

El control del pH y de la fuerza iónica no es tan crítico cuando las enzimas están unidas por enlaces covalentes. La importancia de las condiciones previas de la superficie con respecto al pH comienza a ser crítica cuando la enzima es particularmente sensible al pH.

La sílica porosa tiene cierta acidez en su superficie, resultando un pH 4, por eso una enzima que sería desnaturalizada a pH 4 no puede soportar este medio. Bajo estas condiciones, la sílica porosa debe ser tratada con un buffer antes de ser expuesta a la enzima. El buffer será elegido tal que su pH coincida con el de estabilidad óptima de la enzima. Aproximadamente 1 hora de equilibrio a 37°C usualmente es suficiente para acondicionar la superficie (Messing, 1976).

Concentración de enzima

El factor que influye en mayor medida en la cantidad de enzima adsorbida sobre el soporte es la concentración de enzima expuesta por unidad de superficie o peso del soporte durante el proceso de inmovilización.

El valor de la actividad enzimática aumenta con el incremento de la concentración de la solución enzimática, aproximándose el valor de saturación asintóticamente a una concentración alta de enzima. Diversos autores concluyen que la aproximación asintótica para un valor límite demuestra que hay un número finito de sitios de unión sobre el soporte.

Esto ha sido notado en todos los casos, pues si el soporte es sobrecargado con enzima, la cantidad de enzima aprovechable para reaccionar es restringida o limitada muchas veces por difusión, ya que la reacción predominante ocurre en las primeras capas de enzimas que son "vistas" por el sustrato. De este modo, la eficiencia de utilización de la enzima disminuiría si toda la enzima no está disponible para reaccionar (Hoq y col., 1984, 1985a, 1985b; Park y Lee, 1985; van der Padt y col., 1990).

Temperatura y Tiempo

Ambas consideraciones son importantes en la inmovilización por adsorción, y cuando el fenómeno ocurre en el interior de poros, difusión mediante, la inmovilización se realizará en un corto tiempo si la temperatura es elevada. Sin embargo, las altas temperaturas son contraindicadas por los efectos de desnaturalización sobre las proteínas.

Fue demostrado que si la enzima es adsorbida a la mayor temperatura permitida (donde el factor desnaturalización no es importante) los requerimientos de tiempo y pérdida de actividad son mínimos (Messing, 1976).

1.1.8. ELECCIÓN DEL SOPORTE

Cuando se selecciona un soporte para inmovilización de enzimas, se deben considerar los siguientes factores:

1. Propiedades mecánicas, tales como rigidez y durabilidad, ya que los productos están sujetos a la agitación mecánica, compresión, etc.
2. Forma física (gránulos, láminas, etc.)
3. Resistencia a los ataques químicos y microbianos.
4. Hidrofilicidad, como manifestación de la tendencia a incorporar agua dentro de su estructura.
5. Permeabilidad.
6. Facilidad de obtención con retención de los factores 1 a 5.
7. Costo y adecuación al uso.

1.1.8.1. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS SOBRE AGAR, AGAROSA Y SEPHADEX

Los soportes más importantes dentro de los polisacáridos son: celulosa, dextrano, almidón y agar. Desde el punto de vista meramente económico, la celulosa y el almidón son, tal vez, los materiales para inmovilización más atractivos (Brady y col., 1988; Pronk y col., 1988; van der Padt y col., 1990). Aunque su química es muy sencilla, ellos presentan diversas desventajas, por lo que resultan poco adecuados para inmovilización de enzimas granulares, la más seria de ellas es la estructura de macroporos y la susceptibilidad a la degradación microbiológica. El dextrano en su forma de enlaces cruzados, Sephadex (Kang y Rhee, 1988, 1989a, 1989b), es superior al almidón y a la celulosa bajo ciertas condiciones. Las enzimas inmovilizadas sobre Sephadex exhiben actividad relativa más alta que las correspondientes enzimas inmovilizadas sobre celulosa.

El almidón es más fácilmente atacado por microorganismos que el Sephadex. La agarosa ha sido catalogada como muy adecuada cuando se la utiliza como matriz para la producción de adsorbentes bioespecíficos (Kilara y col., 1977; Kilara, 1981). Aunque menos purificado, el agar puede resultar una mejor elección por razones económicas en las aplicaciones tecnológicas.

1.1.8.2. CAPACIDAD PARA RETENER LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad catalítica de las enzimas puede disminuir como consecuencia de la inmovilización, por los siguientes mecanismos: (1) deterioro de los centros activos por sustitución de los grupos necesarios para la acción catalítica; (2) bloqueo del sitio activo, lo que impide la formación del complejo sustrato-enzima; (3) cambios conformacionales de la enzima inducidos por interacción con los centros de adsorción en la matriz.

1.1.8.3. USOS INDUSTRIALES

Los reactores enzimáticos más avanzados están basados en las técnicas de inmovilización por adsorción iónica sobre Sephadex, como resina de intercambio iónico. Ellos fueron desarrollados, entre otros por Chibata y colaboradores (1976). La inmovilización por adsorción tiene la ventaja de poder recargar fácilmente el soporte con enzima libre cuando la capacidad de conversión de sustrato del reactor disminuye por debajo del nivel tolerable. Otro rasgo atractivo es la amplia capacidad de adsorción para una gran variedad de enzimas. También han resultado especialmente promisorios los éteres alifáticos y aromáticos derivados del agar (Karube y col., 1977 Kilara, 1981).

1.2. CINETICA ENZIMATICA

1.2.1. FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

1.2.1.1. CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

Si la reacción enzimática procede más allá de las etapas iniciales su velocidad decae. Esto se observa sobre curvas experimentales que muestran el progreso de la transformación enzimática del sustrato con el tiempo, tal el caso por ejemplo de la hidrólisis progresiva del aceite de oliva con lipasa fungal sobre un período de 40 hs (Fukumoto y col., 1963). La velocidad de reacción inicial está representada por la tangente a la curva de concentración versus tiempo en el punto de origen. En general, dichas curvas son lineales si no ha sido transformado más que un 10-20% de sustrato por reacción enzimática. El agotamiento del sustrato o la inhibición de la reacción por sus productos finales son mencionados como razones importantes para justificar la subsecuente disminución en la velocidad de la reacción enzimática.

El efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción enzimática es de gran importancia para estudiar el uso práctico de enzimas y para fundamentar la teoría de las reacciones enzimáticas.

La velocidad de reacción inicial para la hidrólisis de isomaltosa utilizando α -amiloglucosidasa es una función de la concentración de isomaltosa de malta (Reed, 1975), tiene forma hiperbólica y sugiere la posibilidad de que la reacción depende de alguna manera de una simple disociación.

La bien conocida teoría de Michaelis-Menten (1913) está basada en la idea de esta disociación. Esta teoría asume que la enzima forma un complejo con el sustrato y que el complejo se disocia en enzima libre y producto final de la reacción enzimática.

La formación del complejo enzima-sustrato puede ser representado por la ec. 1-1 y su ruptura a enzima libre y producto final por la ec. 1-2. Se supone que el complejo enzima-sustrato está en equilibrio con enzima libre y sustrato libre de acuerdo a la ley de acción de masas (ec.1-3).



$$\frac{(e - ES)(s - ES)}{ES} = K \quad (\text{ec. 1-3})$$

K es la constante de equilibrio de la disociación.

La cantidad de sustrato es usualmente muy grande comparada a la de enzima y el término (s - ES) puede, por lo tanto ser simplificado a s:

$$\frac{(e - ES) s}{ES} = K \quad (\text{ec. 1-4})$$

Reacomodando la ecuación resulta:

$$ES = \frac{(e)(s)}{K + s} \quad (\text{ec. 1-5})$$

La disociación de ES en e y P (como muestra la ec. 1-2) es la etapa limitante de la velocidad de todo el proceso y no afecta el equilibrio entre e + s y ES. La velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato está dado por la ec. 1-6 donde v es la velocidad de reacción y k es la constante de velocidad.

$$v = k ES \quad (\text{ec. 1-6})$$

Si en la ec. 1-6 ES es sustituida de la ec. 1-5 se obtiene:

$$v = k \frac{(e)(s)}{K + s} \quad (\text{ec. 1-7})$$

Si la concentración de sustrato se torna muy grande en relación a K, entonces v será igual a k.e. Esta velocidad que es la velocidad máxima de la reacción en concentraciones muy altas de sustrato puede ser designada con V.

Para este caso de reacción resulta:

$$v = \frac{V s}{K + s} \quad (\text{ec. 1-8})$$

La ec.1-8 puede ser escrita en una forma más general:

$$v = \frac{V s}{K_m + s} \quad (\text{ec. 1-9})$$

la cual es la fórmula standard de la ecuación de Michaelis-Menten con dos constantes, V, conocida como la velocidad máxima, y K_m , conocida como la constante de Michaelis. K_m tiene las mismas unidades que s; es una propiedad intrínseca de la enzima y es una constante sólo en condiciones específicas. Se define como la concentración de sustrato cuando la reacción alcanza la mitad de la velocidad máxima. Es una función de todas las constantes de velocidad para una reacción en particular.

La curva definida por la ec. 1-9 se muestra en la fig. 1.2. Es una hipérbola rectangular a través del origen con asíntotas: $s = -K_m$ y $v = V$.

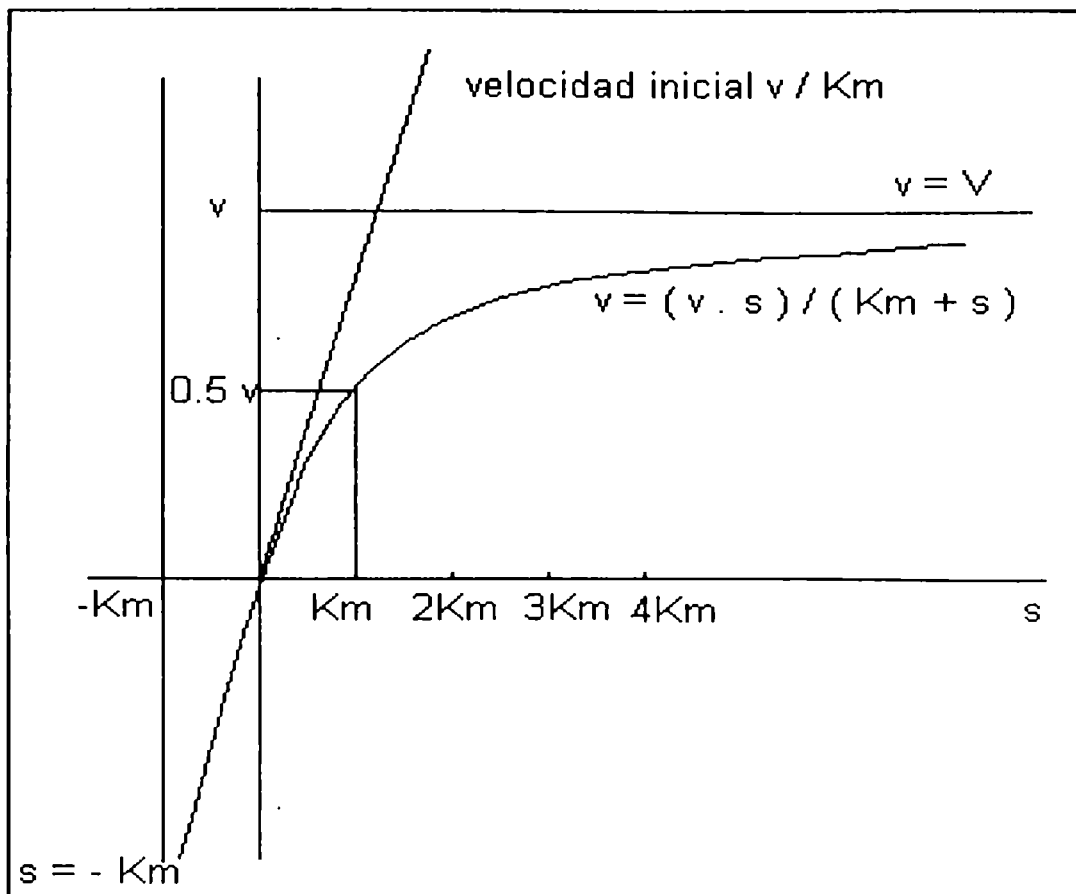


Fig. 1.2: Gráfica de velocidad en función de la concentración de sustrato, según la ecuación de Michaelis-Menten

Experimentalmente K_m es determinada de acuerdo al método de Lineweaver-Burk, en donde la representación de $1/v$ (la recíproca de la velocidad inicial) versus $1/s$ (la recíproca de la concentración de sustrato) es una recta en la que su intersección con el eje de ordenadas da $1/V$, la recíproca de la velocidad máxima, y la intersección con el eje de las abscisas da $1/K_m$, la recíproca de la constante de Michaelis.

Si bien la ecuación de Michaelis-Menten describe exitosamente la cinética de muchas reacciones catalizadas por enzimas, actualmente es considerada en general como no rigurosa.

Si la concentración de enzima es comparable a la de sustrato, usualmente no tenemos una justificación adecuada para simplificar el modelo cinético con la aproximación al estado estacionario. En situaciones donde pueden existir concentraciones relativamente altas de enzimas en distintos instantes, por ejemplo en el interior de un reactor enzimático operado bajo condiciones donde la mayoría del sustrato es convertido, s disminuye a valores comparables a e y

la ecuación de Michaelis-Menten resulta inapropiada para describir el estado final de la reacción.

También en el caso de reacciones enzimáticas que ocurren en las interfases, la concentración de sustrato en los alrededores de la enzima podría ser bastante pequeña. Aquí también debe ser considerada la velocidad de transporte del sustrato a la interfase. Más recientemente se han descrito experiencias que no pueden ser explicadas perfectamente con el modelo de Michaelis-Menten, pero aún así los postulados de equilibrio y la ecuación de velocidad todavía siguen siendo una herramienta comúnmente empleada (Frobisher, 1968).

En Ingeniería Química, la cinética descrita por la ec. 1-8 es llamada cinética Langmuir-Hinshelwood-Hougen-Watson y es usada generalmente para expresar la velocidad de muchas reacciones catalizadas por sólidos.

Las reacciones que involucran catalizadores sólidos sintéticos están extendidas a todas las industrias químicas y del petróleo, y ya que se ha puesto un gran empeño para el diseño y el análisis de reactores catalíticos, muchos de estos trabajos han empleado la cinética de Langmuir-Hinshelwood y es directamente aplicable para reacciones catalizadas por enzimas descritas por el modelo de Michaelis-Menten.

1.2.1.2. TEMPERATURA

La ecuación de Arrhenius, caracteriza el efecto de la temperatura absoluta, T , sobre la constante de velocidad de una reacción química:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{R T^2} \quad (\text{ec.1-10})$$

donde R es la constante absoluta de los gases y k es la constante de velocidad de la reacción. Su velocidad de cambio con la temperatura es proporcional a

E_a , la cual es designada energía de activación. Si E_a es grande, la constante de velocidad crece enormemente para un dado incremento en temperatura. Para valores pequeños de E_a el incremento de velocidad con incrementos de temperatura será pequeño.

El valor de E_a puede ser determinado midiendo la constante de velocidad a temperaturas diferentes. La representación gráfica de $\log k$ frente a $1/T$ dará una recta de pendiente $-E_a/2,303R$.

En general, las reacciones catalizadas por enzimas tienen energías de activación más bajas que las mismas reacciones catalizadas por catalizadores inorgánicos. La energía de activación para la hidrólisis enzimática de sacarosa por invertasa de levadura es 46 KJ/mol y con iones H^+ como catalizador, es 109 KJ/mol.

Las temperaturas más altas incrementan la velocidad de las reacciones enzimáticas, pero también incrementan la velocidad de inactivación de la enzima. Estos dos factores tienen efectos opuestos en la velocidad de la reacción enzimática (Yamamoto y col., 1962).

1.2.1.3. PH

Una enzima contiene grupos cargados positivos o negativos a un dado pH. Los grupos ionizables son aparentemente parte del sitio activo y para que la acción catalítica sea posible los grupos ionizables en tales sitios deberán poseer una carga particular, es decir, la actividad catalítica de la enzima existe sólo en un estado ionizado en particular (Laidler, 1958; Novo-Nordisk, 1989).

1.2.2. CINÉTICA DE ENZIMAS INMOVILIZADAS

Las propiedades catalíticas de una partícula que contiene enzimas inmovilizadas dependen de la interacción de dos factores: transporte de sustrato y producto, y actividad catalítica de la enzima.

A una considerable distancia de la partícula catalítica la concentración de sustrato y otras variables de proceso, como el pH, tienen valores que son los del seno de la mezcla y pueden ser determinados por los métodos analíticos corrientes.

Pero como el sustrato es consumido sobre la superficie del catalizador y el producto es formado allí, se establecen gradientes de concentración entre el seno de la mezcla y los sitios activos de las moléculas de enzima inmovilizada.

El sustrato, por ejemplo, debe ser transportado desde el seno del líquido a la superficie del catalizador y si la mezcla de reacción está en reposo, el transporte se produce por difusión molecular. Normalmente, el mezclado o el flujo de la solución introduce contribuciones de transporte convectivo.

Si no existe enzima ocluída en el interior de los poros de la partícula de soporte o si el sustrato no penetra en el interior de los mismos sólo se está en presencia de un fenómeno de transporte de masa externo.

Por el contrario, si la enzima está localizada en el interior de la partícula soporte, y el sustrato se debe movilizar desde la superficie al interior, donde la reacción pueda ocurrir, el fenómeno es de transporte de masa interno.

Ya que la reacción enzimática ocurre a una velocidad que viene determinada por la concentración de sustrato y debido a los gradientes de concentración descritos, la velocidad de reacción local varía en función de la posición considerada y la velocidad total de consumo de sustrato será la suma de todas las velocidades de consumo de sustrato en el catalizador. En el estado estacionario la velocidad de reacción será igual a la velocidad de transporte de sustrato al catalizador.

En esta situación, entonces, la velocidad promedio depende de la interacción entre procesos de transporte y reacción catalítica. El desarrollo de un modelo analítico para la descripción de estos procesos interactivos y de un criterio para evaluar su importancia es uno de los problemas centrales en la ingeniería de las reacciones químicas (Giorno y Drioli, 1997).

1.2.2.1. LIMITACIONES DIFUSIONALES INTERNAS Y EXTERNAS

Cuando una cantidad relativamente alta de enzima está inmovilizada dentro de una matriz porosa, la difusión de sustrato resulta limitante y, como resultado, la concentración del mismo decrece gradualmente desde el seno de la solución al interior de la matriz.

Es posible evaluar la contribución cinética del gradiente de concentración de sustrato, ya que esta proporciona suficiente información cuantitativa de la capacidad del sustrato para difundir desde el seno de la solución hacia la enzima. El transporte del sustrato por difusión molecular y convección turbulenta hacia la superficie externa está generalmente expresado por el coeficiente de transferencia de masa externo: k_s .

El valor de k_s puede ser determinado utilizando las correlaciones que se detallan más adelante.

La velocidad de difusión interna es expresada por la ley de difusión de Fick usando una difusividad efectiva de sustrato, D_{es} , (dentro del poro). Ella se obtiene evaluando la difusividad en el seno de la solución, D_{so} , de acuerdo a la siguiente relación:

$$D_{es} = \frac{D_{so} \cdot \epsilon_p}{\tau} \quad (\text{ec. 1-11})$$

La porosidad, ϵ_p , representa la fracción de volumen del poro ocupado por el líquido y depende de la estructura y de la forma de la matriz. La tortuosidad, τ , tiene en consideración la geometría no lineal del poro.

Factores de efectividad

Debido a los gradientes de concentración de sustrato en la vecindad de la enzima enlazada y dentro de los poros de la partícula soporte, la velocidad de reacción, v , es generalmente menor que la actividad medida en ausencia de cualquier limitación a la difusión, por ejemplo para una concentración de sustrato uniforme igual a la concentración en el seno de la solución.

Para cuantificar esta disminución de la actividad enzimática, definimos el factor de efectividad η como:

$$\eta = \frac{v}{V} \quad (\text{ec. 1-12})$$

De acuerdo a esto η es menor que uno, y se aproxima a la unidad en ausencia de efectos difusionales.

Las contribuciones a la disminución de la actividad respecto de los gradientes de concentración externos e internos se pueden separar definiendo un factor de efectividad externo, η_e , y otro factor de efectividad interno, η_i , tal que:

$$\eta = \eta_e \cdot \eta_i \quad (\text{ec. 1-13})$$

Los valores de los factores de efectividad externa e interna se pueden calcular y tabular para parámetros de transporte conocidos y constantes cinéticas intrínsecas, lo que demanda el desarrollo de métodos numéricos ad-hoc.

Desde el punto de vista práctico, se dispone de dos series de curvas que permiten la determinación gráfica de η_e y η_i , teniendo la velocidad de reacción medida, la concentración de sustrato del medio, s_0 y los parámetros de transporte k_s y D_{es} (Engasser, 1978). Conociendo η_e y η_i , se obtiene el factor de efectividad η de la ec.1-13 y subsecuentemente, la actividad enzimática en ausencia de limitaciones difusionales. V_0 simplemente es calculada de la ec. 1-12.

Efecto de resistencia a la transferencia de masa externa

En este caso se supone que la enzima está sólo fijada a la superficie externa de una partícula de soporte y en consecuencia sólo se deberá considerar transporte de masa desde el seno de la solución hacia la superficie del soporte y reacción en ese lugar.

El movimiento de N moles de sustrato por unidad de tiempo y área desde la solución a la interfase viene dado por un modelo llamado capa de difusión de Nernst:

$$N_s = k_s(S_0 - s) \quad (\text{ec. 1-14})$$

s = concentración de sustrato en la interfase solución-partícula.

S_0 = concentración de sustrato en la solución.

k_s = coeficiente de transferencia de masa externo.

El valor de k_s puede ser calculado utilizando las siguientes ecuaciones:

A) para partículas esféricas en solución (Brian y Hales, 1969).

$$\left(\frac{k_s \cdot dp}{D_{so}} \right)^2 = 4 + 1,21 \cdot \left(\frac{dp \cdot U}{D_{so}} \right)^3 \quad (\text{ec. 1-15})$$

donde dp = diámetro de partícula.

D_{so} = difusividad del sustrato en el seno de la solución.

U = velocidad relativa entre la partícula y el fluido.

$$U = \frac{g \ dp^2 \ \Delta \rho}{18 \ \mu} \quad (\text{ec 1-16})$$

donde

$\Delta \rho$ = diferencia de densidad entre la partícula y el fluido.

g = aceleración de la gravedad.

μ = viscosidad del fluido.

B) para partículas empacadas en una columna (Willianson y col., 1963).

$$\left(\frac{k_s \cdot \mu}{U \cdot \delta \cdot D_{so}} \right)^{\frac{2}{3}} = 2,5 \cdot \left(\frac{dp \cdot U \cdot \delta}{D_{so}} \right)^{-0,6} \quad (\text{ec. 1-17})$$

donde

U = la velocidad promedio del fluido en la columna.

δ = la densidad del fluido.

En el estado estacionario el sustrato no se acumula en la interfase ya que la velocidad de aporte de sustrato por transferencia de masa debe ser exactamente contrabalanceada por la velocidad de consumo de sustrato en la interfase.

En el caso de cinética de Michaelis-Menten y si v es la velocidad de reacción (moles por unidad de tiempo por unidad de área) se obtiene la ec. 1-18 que resulta de igualar ec. 1-9 y ec. 1-14.

$$A_p k_s (S_0 - s) = v = \frac{V_s}{(K_m + s)} \quad (\text{ec. 1-18})$$

1.2.2.2. EVALUACIÓN DE EFECTOS DE DIFUSIÓN EXTERNOS

La tabla 1.3 resume las variables y parámetros que deben ser considerados o estudiados antes de determinar la magnitud de los efectos de difusión del sustrato (Engasser, 1978).

Para evaluar la importancia de la difusión externa, además de la actividad observada v , la concentración de sustrato en el seno de la solución S_0 , y el coeficiente de transporte externo k_s , es necesario hacer una estimación del área superficial externa de la partícula y del valor intrínseco de K_m de la enzima enlazada.

El área para una partícula esférica es el área superficial externa de la esfera (A_p).

El valor intrínseco de K_m de la enzima enlazada puede ser tomado, como una primera aproximación, igual a K_m de la enzima soluble (Engasser, 1978).

Con los valores de los parámetros anteriores es posible calcular la relación de la actividad observada, v , y la velocidad máxima de transporte de sustrato externo $A_p k_s S_0$ y consecuentemente determinar a partir de la fig. 1.3 el factor de eficiencia externo, η_e , para una dada concentración normalizada del seno de la solución, S_0/K_m .

Por supuesto, cuando el valor de η_e es cercano a la unidad, los efectos de difusión externos son despreciables.

Tabla 1.3: Variables y parámetros necesarios para determinar la magnitud de fenómenos de difusión.

Efectos de difusión externos	Efectos de difusión internos y externos
<ul style="list-style-type: none"> • Actividad Enzimática. • Concentración de sustrato en el seno de la solución, S_0 • Área superficial externa A_p • Coeficiente de transporte externo del sustrato, k_s • Constante de Michaelis para enzima enlazada, K_m 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad Enzimática • Concentración de sustrato en el seno de la solución, S_0 • Área superficial externa A_p • Coeficiente de transporte externo del sustrato, k_s • Constante de Michaelis para enzima enlazada, K_m • Radio de la partícula, R • Volumen medio del poro, v_p • Difusividad interna del sustrato, D_{es}

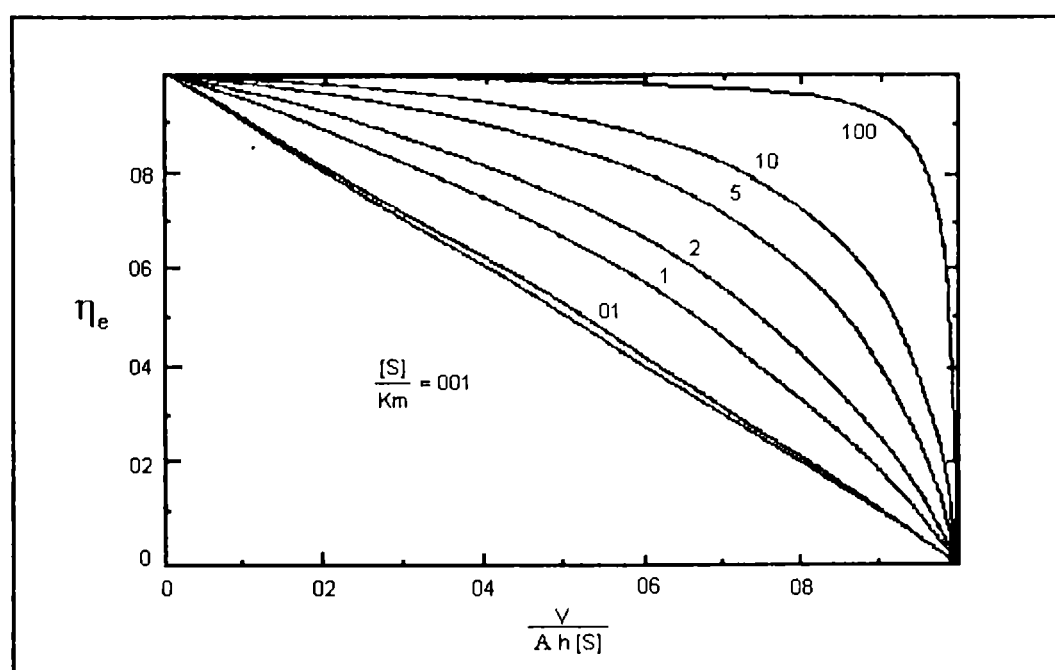


Fig. 1.3: Diagrama para la evaluación del factor de eficiencia externo con una cinética de Michaelis Menten, transcripto de Engasser (1978).

1.2.2.3. ANÁLISIS DE DIFUSIÓN INTRAPARTÍCULA Y REACCIÓN

Como ya fue discutido antes, las enzimas están generalmente inmovilizadas en la superficie interna de los soportes porosos o confinadas en matrices por donde el sustrato puede difundir.

En tales sistemas, el cálculo de la velocidad de desaparición de sustrato (v) requiere la evaluación de su perfil de concentración y debe comenzarse planteando un balance de masa en el estado estacionario para una partícula del catalizador.

Consideremos concretamente una partícula esférica de un catalizador poroso de radio R (fig. 1.4). Esta partícula está en un reactor catalítico que es atravesado por una corriente que contiene la sustancia reaccionante y el producto de reacción. En las inmediaciones de la partícula catalítica que estamos considerando se supone que la concentración de reaccionante es s moles por unidad de volumen, que difunde a través del camino tortuoso existente en el catalizador y se convierte en producto en la superficie del mismo.

Comenzamos aplicando un balance de materia para la especie reaccionante a una envoltura esférica de espesor Δr situada en el interior de una partícula catalítica:

$$N_s \Big|_r \cdot 4\pi r^2 - N_s \Big|_{r+\Delta r} \cdot 4\pi (r+\Delta r)^2 + v 4\pi r^2 \Delta r = 0$$

Dividiendo por $4\pi \Delta r$ y tomando $\lim \Delta r \rightarrow 0$

$$\lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{(r^2 N_s) \Big|_{r+\Delta r} - (r^2 N_s) \Big|_r}{\Delta r} = r^2 v$$

$$\frac{d (r^2 N_s)}{dr} = r^2 v \quad (\text{ec. 1-19})$$

Teniendo en cuenta que el medio es granular, no homogéneo, N_s y v no pueden interpretarse como magnitudes que poseen un valor representativo de un punto, sino valores medios de un pequeño entorno del punto considerado.

Definimos ahora una "difusividad" efectiva para la especie reaccionante en el medio poroso:

$$N_s = -D_{es} \frac{ds}{dr} \quad (\text{ec. 1-20})$$

Introduciendo la expresión anterior en la ec. 1-19 para difusividad constante, se llega a

$$-D_{es} \cdot \frac{1}{r^2} \cdot \frac{d}{dr} \left(r^2 \cdot \frac{ds}{dr} \right) = v \quad (\text{ec. 1-21})$$

$$-D_{es} \cdot \frac{2}{r} \cdot \frac{ds}{dr} + \frac{d^2 s}{d^2 r} = v \quad (\text{ec. 1-22})$$

Las velocidades de difusión de todas las especies a través del soporte están sujetas a las influencias que se detallan:

1. Algunas de las secciones de la partícula están ocupadas por sólidos y en consecuencia no están disponibles para transporte difusivo (parámetro: porosidad de la partícula, ϵ_p).
2. La red de poros es compleja y la difusión ocurre en direcciones cambiantes y sólo cuando es permitida (parámetro: factor de tortuosidad, τ).

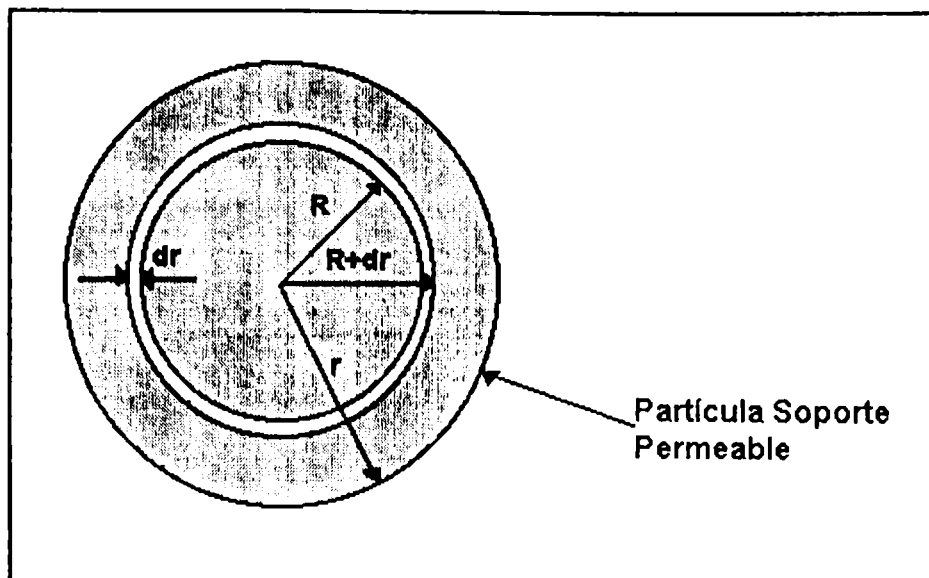


Fig. 1.4: Partícula esférica de un catalizador poroso, en la que tiene lugar la difusión a través del espesor Δr .

El coeficiente de difusión efectivo para el sustrato D_{es} puede ser escrito como:

$$D_{es} = D_{so} \cdot \frac{\epsilon_p}{\tau} \quad (\text{ec 1-11})$$

donde D_{so} es la difusividad del sustrato en el seno de la solución.

El parámetro de porosidad ϵ_p puede ser determinado para el soporte en cuestión, y generalmente los valores oscilan entre 0,3 y 0,8 (Froment y Bischoff, 1979). El factor de tortuosidad τ es un valor que se asume en el rango 1,4-7 (Froment y Bischoff, 1979; Bailey y Ollis, 1986).

El valor de D_{es} resulta entre 1/2 y 1/5 de D_{so} (Engasser, 1978).

La cinética intrínseca puede determinarse cuando son despreciables los efectos de transferencia de masa. Para el caso en que la cinética de reacción sea la limitante de la velocidad, se sigue el siguiente análisis.

El balance de material en el estado estacionario para el sustrato desarrollado en la fig.1.4 es la ecuación diferencial de segundo orden (ec. 1-22):

$$D_{es} \left(\frac{d^2s}{dr^2} + 2 \frac{ds}{r dr} \right) = v \quad (\text{ec 1-22})$$

Las condiciones de contorno son

$$\left. \frac{ds}{dr} \right|_{r=0} = 0$$

Se asumirá en primera instancia que la concentración de sustrato en la superficie externa del soporte es igual a la concentración del sustrato S_0 en el medio líquido que baña la partícula (el caso de incluir resistencia a la transferencia de masa en el film e intrapartícula se tratará después). Consecuentemente:

$$s \Big|_{r=R} = S_0$$

La velocidad volumétrica promedio de utilización de sustrato v_0 es proporcional al flujo de sustrato difusivo en el soporte. Expresada en moles por volumen de soporte por unidad de tiempo, v_0 es (Bailey y Ollis, 1986):

$$v_0 = \frac{A_p}{V_p} \left(D_{es} \frac{ds}{dr} \right) \Big|_{r=R}$$

donde V_p y A_p representan el volumen de la partícula y el área superficial externa respectivamente.

Para medir la disminución de la velocidad de reacción debido a la resistencia por difusión en el poro definimos la magnitud η_i denominada factor de efectividad interno del siguiente modo:

$$\eta_i = \frac{\text{velocidad real de reacción dentro del poro}}{\text{veloc. sin tener en cuenta la disminución por difusión en el poro}} \quad (\text{ec 1-23})$$

El factor de efectividad no puede ser evaluado analíticamente cuando v tiene la forma no lineal descrita por la ecuación de Michaelis-Menten (ec. 1-9).

En esta situación, es necesario resolver numéricamente la ec. 1-22 con sus consideraciones. Los resultados obtenidos por Bailey y Ollis, 1986 se muestran en la fig. 1.5 y se emplean para la obtención del η_i .

1.2.2.4. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIFUSIÓN INTERNOS

De acuerdo a la tabla 1.3, para determinar la contribución cinética debida a difusión interna, es también necesario conocer el radio de la partícula, r , el volumen total medio del poro v_p y el valor de difusividad efectiva de sustrato D_{es} .

En un primer paso, la concentración de sustrato en la superficie externa de la partícula s , es calculada como:

$$s = S_0 - \frac{v}{A_p k_s} \quad (\text{ec. 1-24})$$

Después de calcular el valor de la abscisa, se determina el factor de efectividad interno para una partícula esférica, y se puede observar que la importancia de los efectos de difusión dependen del valor de la concentración de sustrato normalizada en la superficie, s/K_m (fig. 1.5).

Teniendo así evaluados los respectivos efectos de difusión externos e internos es posible calcular el factor de efectividad promedio, η , como el producto de η_e y η_i y consecuentemente estimar la actividad que podría ser medida en la ausencia de cualquier limitación a la difusión como la relación de la actividad medida al factor de efectividad promedio.

Los valores de factores de efectividad interna y externa han sido calculados previamente y tabulados para parámetros de transporte conocidos y

constantes cinéticas intrínsecas de reacción enzimática (Moo-Young y Kobayashi, 1972; Engasser y Horwath, 1973; Fink y col., 1973).

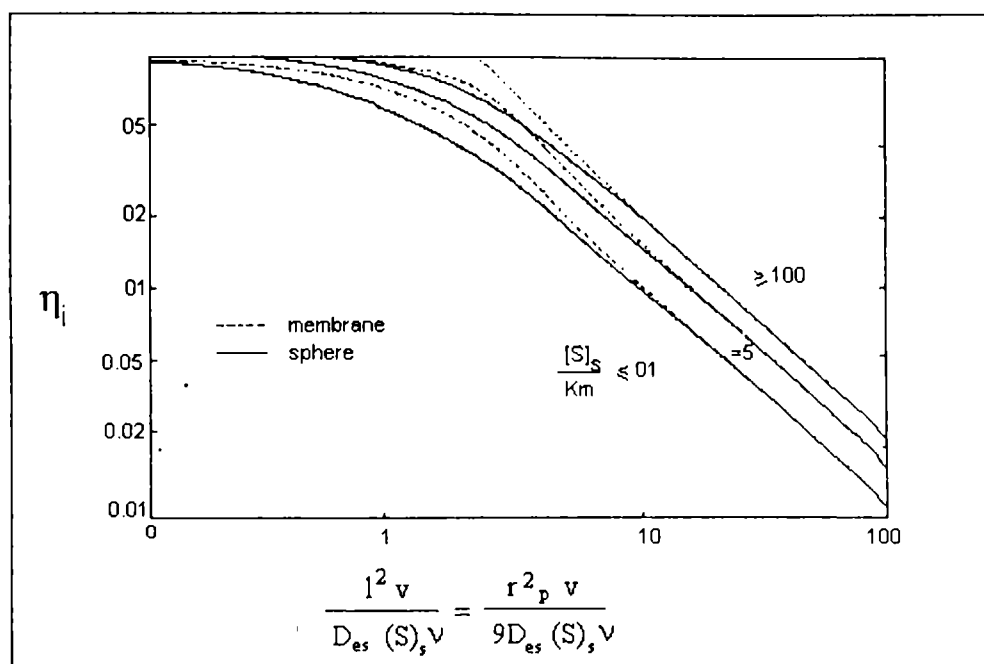


Fig. 1.5: Diagrama para la evaluación del factor de eficiencia interno con cinética de Michaelis-Menten (transcripto de S. M. Engasser , (1978))

Estas curvas, se ha demostrado, pueden ser utilizadas para evaluar también efectos difusionales para reacción enzimática con dos sustratos (Bodalo y col., 1986; Abureesh, 1997).

1.3. INTRODUCCION AL DISEÑO DEL REACTOR

1.3.1. REACTORES IDEALES

En un reactor agitado discontinuo los reactantes se introducen en el reactor, se mezclan, se deja que reaccionen un tiempo determinado, y finalmente se descarga la mezcla. Esta es una operación no estacionaria en que la composición va variando con el tiempo, aunque en cada instante es uniforme en todos los puntos del reactor.

En un reactor continuo ideal perfectamente agitado la composición en cada instante es la misma en todos los puntos del reactor, y la corriente de salida tiene la misma composición que la del fluido contenido en el mismo.

Un reactor de flujo en pistón o de flujo tubular ideal se caracteriza porque el flujo de fluido a través del mismo es ordenado, sin que ningún elemento del mismo sobrepase o se mezcle con cualquier otro elemento situado antes o después de aquel; en realidad, en este reactor puede haber mezcla lateral de fluido, pero nunca ha de existir mezcla o difusión a lo largo de la trayectoria de flujo. La condición necesaria y suficiente para que exista flujo en pistón es que el tiempo de residencia en el reactor sea el mismo para todos los elementos del fluido.

1.3.1.1. DINÁMICA DE REACTORES

Para el diseño y el análisis de un sistema reaccionante, es esencial conocer la expresión matemática que da la velocidad de reacción (consumo de moles de reactante por unidad de tiempo por unidad de volumen) en términos de la composición, temperatura y presión de la mezcla de reacción. La estrategia para la obtención de expresiones de velocidad de reacción

razonables pasa primero por la realización de una suposición acerca de reacciones elementales que ocurren a escala molecular (Bailey y Ollis, 1986).

La velocidad de reacción para un reactante i es una magnitud intensiva y nos dice con qué rapidez se forma o desaparece el componente i en un entorno dado en función de las condiciones allí existentes, es decir:

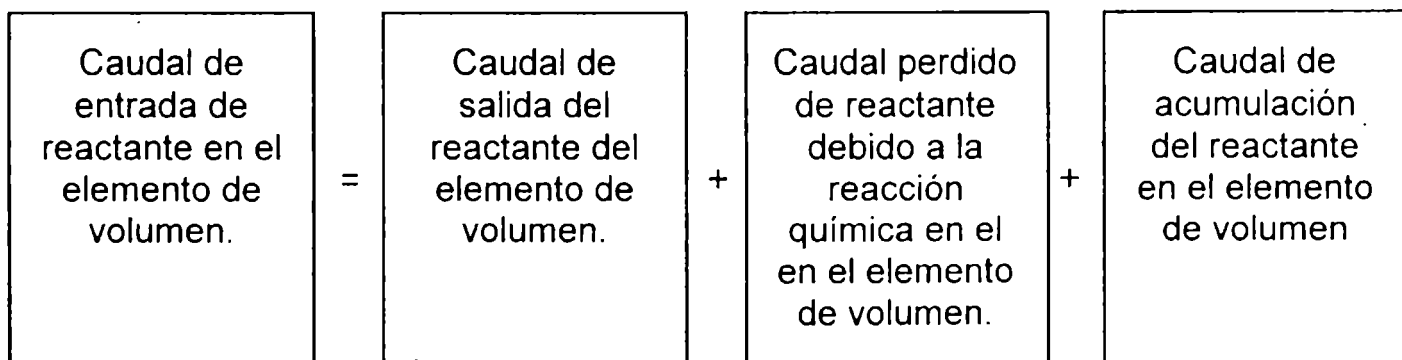
$$v = \frac{1}{V_{ol}} \cdot \left(\frac{dN_i}{dt} \right) \text{ por reacción} = f(\text{condición en la región de volumen } V_{ol})$$

por lo tanto, la expresión cinética es diferencial.

Para el diseño de un reactor se debe conocer el tamaño y tipo de reactor, y las condiciones de operación más adecuadas para el fin propuesto. Es necesario efectuar la integración correcta de la ecuación cinética para las condiciones de operación, debido a que la temperatura y la composición del fluido reaccionante pueden variar de un punto a otro del reactor.

Por otra parte, las características geométricas del reactor determinan la trayectoria del fluido a través del mismo, y fijan las condiciones de mezclado que contribuyen a diluir la alimentación y distribuir la materia y el calor.

El punto de partida para el diseño es un balance de materia referido a cualquier reactante (o producto). Por consiguiente, como se indica a continuación, se tiene:



Si la composición en el reactor es uniforme, el balance de materia puede hacerse refiriéndolo a todo el reactor, pero cuando la composición no es uniforme, el balance de materia se refiere a un elemento diferencial de volumen y después se efectúa la integración extendida a todo el reactor para

las condiciones apropiadas de flujo y concentración. La expresión resultante; una vez integrada, da la ecuación básica de diseño para aquel tipo de unidad.

Para estudios dinámicos la ecuación de conservación de un componente dado para un reactor de tanque agitado es:

$$\boxed{\text{velocidad de adición al reactor}} = \boxed{\text{velocidad de remoción del reactor}} - \boxed{\text{velocidad de formación en el reactor}}$$

(ec. 1-25)

y debe ser modificada para dar la ecuación de balance de masa en el estado no-estacionario:

$$\frac{d(\text{cantidad total en el reactor})}{dt} = \text{velocidad de adición al reactor} - \text{velocidad de remoción del reactor} + \text{velocidad de formación en el reactor}$$

(ec. 1-26)

El balance de materia en un reactor continuo en estado no estacionario es el punto de partida para la caracterización de la dinámica de un reactor:

$$\frac{d(V_{ol} \cdot s)}{dt} = Vol \cdot v + F(s_o - s) \quad (\text{ec. 1-27})$$

donde

F = caudal volumétrico de alimentación y a la salida del reactor

(vol/tiempo).

v = velocidad de formación.

Vol = volumen del reactor.

Asumiendo que las velocidades de ingreso y de salida del reactor son iguales y siendo el volumen del reactor constante, resulta:

$$\frac{ds}{dt} = \delta(s_o - s) + v$$

(ec. 1-28)

ya que: $\delta = F / \text{Vol}$

donde δ es la velocidad de dilución y representa el número de veces que un volumen de líquido igual al del reactor pasa por él en la unidad de tiempo, es decir, es la inversa del tiempo de residencia.

Esta ecuación se aplica a cada componente y en el caso más simple, la dinámica del reactor viene dada por una serie de ecuaciones de la forma de la ec. 1-28 la cual consta de un término de velocidad de formación v .

Aunque aquí se ha focalizado la dinámica de un reactor de tanque agitado, los conceptos y principios introducidos pueden ser aplicados a reactores de otras configuraciones (Bailey y Ollis, 1986), en nuestro caso a un reactor de flujo en pistón.

1.3.2. REACTORES DE FLUJO NO IDEAL

Aunque el comportamiento real de los reactores nunca se ajusta exactamente a las situaciones idealizadas, en muchos casos se aproxima tanto a esas condiciones que podemos admitir este comportamiento ideal sin incurrir en error apreciable. En otros casos las desviaciones pueden ser muy grandes y se deben a la formación de canalizaciones, recirculación del fluido o formación de zonas estancadas o muertas en el reactor.

Los problemas del flujo no ideal están íntimamente relacionados con los de cambio de escala, ya que la decisión de si ha de ensayarse o no en planta piloto depende, en gran parte, de nuestro control sobre las variables más importantes del proceso.

1.3.2.1. REACTORES QUE CONTIENEN SISTEMAS DE ENZIMA INMOVILIZADA

Las partículas enzimáticamente activas descritas antes poseen características que son de importancia con respecto a la selección de las configuraciones apropiadas del reactor y a los procedimientos de operación. Estas incluyen: pesos específicos a menudo sólo ligeramente en exceso sobre el agua y tamaños de partícula que pueden seleccionarse arbitrariamente y que dependen solamente del método de su preparación.

En los reactores de tipo tanque agitado, la retención de partículas se puede conseguir suministrando zonas de reposo, dispositivos de sedimentación o centrifugación, o mediante el uso de lechos fluidizados y estacionarios en configuraciones tubulares. Con lechos fijos debe tenerse en cuenta la probabilidad de que las partículas se deformen bajo su propio peso, y, con lechos fluidizados, cuando hay una diferencia pequeña de densidad entre las partículas y el fluido, se necesitan partículas grandes para conseguir flujos razonables (Atkinson, 1986; Mirayawa y Shiraishi, 1997).

1.3.2.2. REACTORES INDUSTRIALES Y COMERCIALES QUE EMPLEAN ENZIMAS INMOVILIZADAS

El uso de lipasas inmovilizadas para la modificación de grasas y aceites es actualmente objeto de gran interés y fundamentalmente es debido a que el proceso es más económico cuando las enzimas se encuentran inmovilizadas que cuando están en forma libre.

Las nuevas tecnologías han posibilitado el desarrollo de procesos comerciales, continuos y en gran escala (Chibata y Tosa, 1976).

Los reactores de lecho fijo son los más utilizados para reacciones de hidrólisis y de esterificación en donde se emplean enzimas inmovilizadas (Patterson y col., 1979; Bell y Col., 1981; Lavayre y Barath, 1982; Kimura y

col., 1983; Macrae, 1983,1985; Brady y col., 1986, 1987,1988; Wisdom y col., 1987; Omar y col., 1988).

La hidrólisis total de enlaces ésteres en triglicéridos puede ser llevada a cabo a altas temperaturas y presiones en presencia de vapor, o alternativamente a bajas temperaturas por la acción de lipasas no específicas en la presencia de exceso de agua (Sonntag, 1979; Nielsen, 1981; Linfield y col., 1984; Nawar, 1985).

La alta especificidad de lipasas hacia triglicéridos con respecto al tipo y posición estereoespecífica de los residuos ácidos grasos han impulsado un número de aplicaciones especiales dentro del campo de alimentos. Por hidrólisis parcial de triglicéridos han sido cambiados y/o mejorados los sabores para uso en alimentos para humanos y consumo animal (Day, 1966; Nelson, 1972; Dwivedi, 1973; Arnold y col., 1975; Shahani y col., 1976; Fox, 1980). La producción de sabores lipolizados merece mención especial. Los procedimientos comerciales incluyen la modificación enzimática de grasa en leche (Otting y M&R Dietetic Labs Inc 1934, 1939; Kilara, 1985) tanto como el desarrollo de un número de preparaciones de enzimas para uso en la manufactura de quesos (Arbige y col., 1986).

Con los avances recientes en tecnología de bio-reactores e ingeniería genética, se han investigado muchas ideas nuevas e interesantes empleando biotecnología para producir oleoquímicos de grasas. Entre las rutas químicas más prometedoras de interés industrial están la hidrólisis, síntesis de ésteres y reacción de interesterificación de lípidos causados por lipasas (Werdelmann, 1974; Segel, 1975; Creighton, 1984; Walsh, 1984).

Hay dos condicionamientos operacionales los cuales deben ser considerados cuando se opera con reactores de lecho empacado:

- I) limitaciones sobre velocidades de reacción por fenómenos de difusión intrapartícula; y
- II) caída de presión a través del reactor.

Las limitaciones difusionales pueden ser aliviadas si se utilizan partículas de soporte más pequeñas. Sin embargo, dan más altas caídas de presión. Si

no se usan solventes, el efecto de la viscosidad puede ser minimizado sólo a expensas de tener que emplear temperaturas más altas, pero producen velocidades de inactivación de enzima más rápidas. Consideraciones de índole económica requieren el compromiso entre todos estos efectos.

La bibliografía registra la hidrólisis de triglicéridos del aceite de oliva, en presencia de un buffer acuoso (Brady y col., 1988) y la síntesis de glicéridos desde ácidos grasos y glicerol disuelto en di-isopropil éter (Patterson y col., 1979) utilizando un reactor de tanque agitado continuo.

Se han empleado también los reactores de lecho fluido para efectuar la hidrólisis de glicéridos ya que este tipo de reactor tiene varias ventajas sobre un reactor de lecho fijo, especialmente, una menor caída de presión, menor canalización, reducida coalescencia de partículas de emulsión, y facilidad de simulación debido a la ausencia de gradientes de concentración.

Para reacciones de interesterificación, se han usado extensamente los reactores tipo batch agitados en los cuales la lipasa está inmovilizada sobre soportes en polvo (Brandenberger, 1956; Brockman y col., 1973; Kosugi y Suzuki, 1974; Kawashima y Umeda, 1976; Kilara y col, 1976; Rakhimov y col., 1977; Kilara, 1981; Macrae, 1984; Wisdom y col., 1984; Marlot y col., 1985; Park y Lee, 1985; Wisdom y col., 1985; Tahoun, 1986; Kwon y col., 1987; Schuch y Mukherjee, 1987; Omar y col., 1988; Jensen y col., 1988; Miller, 1988;).

1.3.2.3. DISTRIBUCIÓN DEL TIEMPO DE RESIDENCIA DE LOS FLUIDOS EN LOS REACTORES

Si se conoce exactamente lo que sucede en el interior del reactor, es decir, si se dispone de una representación completa de la distribución de velocidades del fluido, se puede predecir el comportamiento del reactor. Aunque esta técnica sería magnífica, la complejidad que implica es tal que resulta impracticable.

En muchos casos sólo se necesita conocer cuanto tiempo permanece cada una de las moléculas en el recipiente o más exactamente la distribución de tiempos de residencia de la corriente del fluido. Esta información se determina fácil y directamente por el método estímulo-respuesta.

Curva E

Los distintas moléculas del fluido seguirán diferentes caminos a lo largo del reactor y tardarán en consecuencia tiempos diferentes en pasar a través del mismo. La distribución de estos tiempos en la corriente de fluido que sale del recipiente se denomina distribución de la edad a la salida E, o distribución del tiempo de residencia (DTR) del fluido.

Es conveniente representar la DTR de tal manera que el área bajo la curva sea la unidad. Esta curva es la distribución que ha de tenerse en cuenta en el flujo no ideal (fig. 1.6):

$$\int_0^{\infty} E dt = 1 \quad (\text{ec 1-29})$$

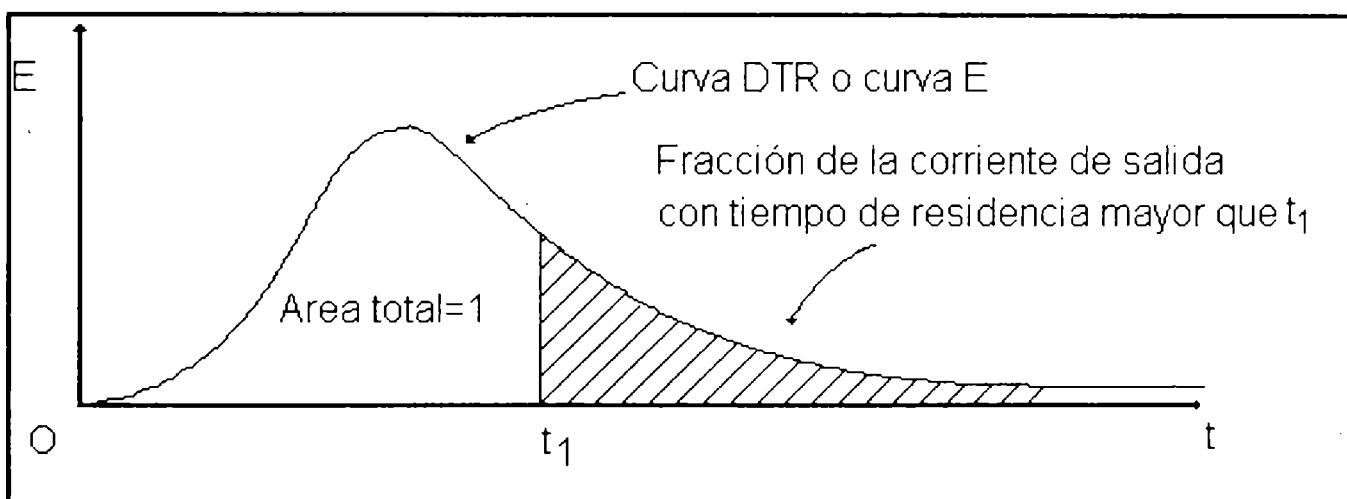


Fig. 1.6: Curva de distribución de edades a la salida E, para el fluido que pase a través de un recipiente.

Curva F

Se denomina curva F a la curva representativa de la concentración de las moléculas que entran al reactor, medidas a la salida del recipiente, frente al tiempo cuando esas moléculas se hacen ingresar constantemente al reactor bajo la forma de una solución (señal en escalón). La curva toma valores desde 0 hasta 1 ya que la concentración de las moléculas a la salida se mide en función de su concentración al ingreso al reactor, s/s_0 frente al tiempo (fig.1.7).

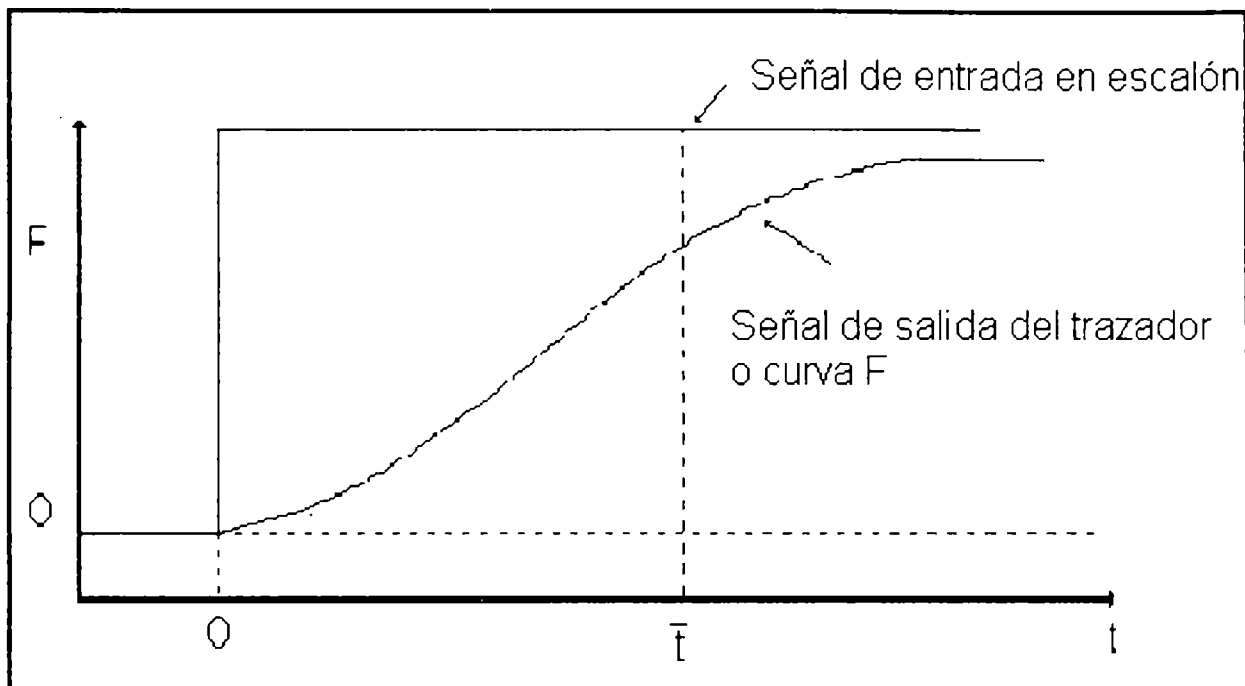


Fig. 1.7: Curva que corresponde a la respuesta de una señal de entrada en escalón.

Curva C

Se denomina curva C a la respuesta normalizada del trazador en la corriente de salida en función del tiempo, cuando todas las moléculas de trazador se hacen ingresar al reactor de modo virtualmente instantáneo (pulso).

$$\int_0^{\infty} s \, dt \quad (\text{ec. 1-30})$$

La curva C se expresa en forma normalizada, y se obtiene dividiendo la concentración por Q que es el área total bajo la curva concentración-tiempo (fig.1.8).

Area bajo la curva $Q = \int_0^{\infty} s dt$

(ec. 1-31)

$\int_0^{\infty} \frac{s}{Q} dt = 1$ Area normalizada

(ec. 1-32)

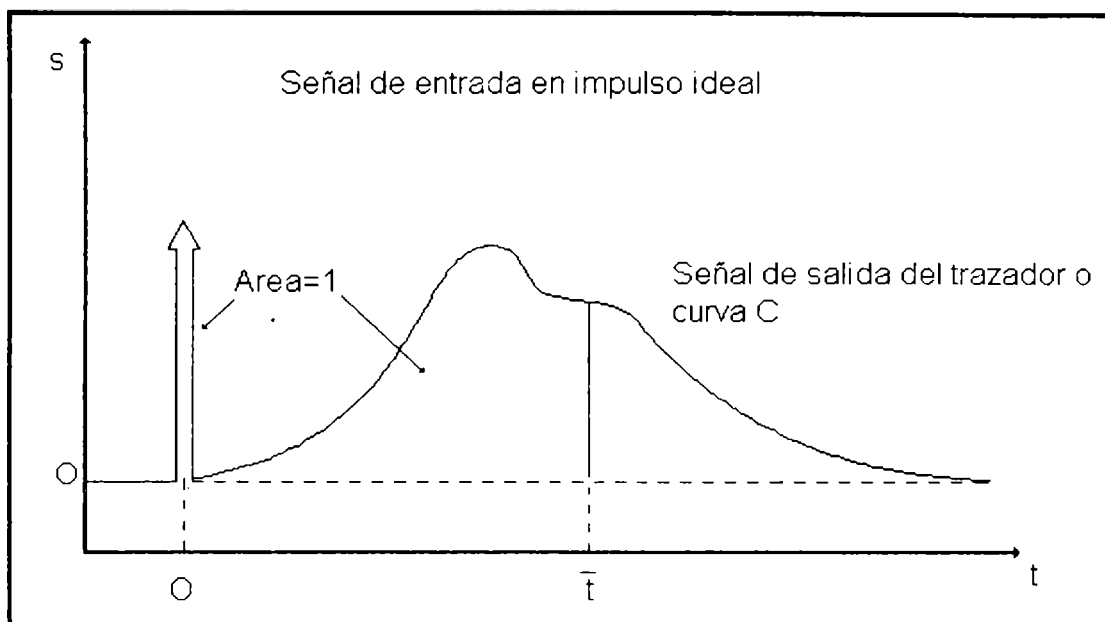
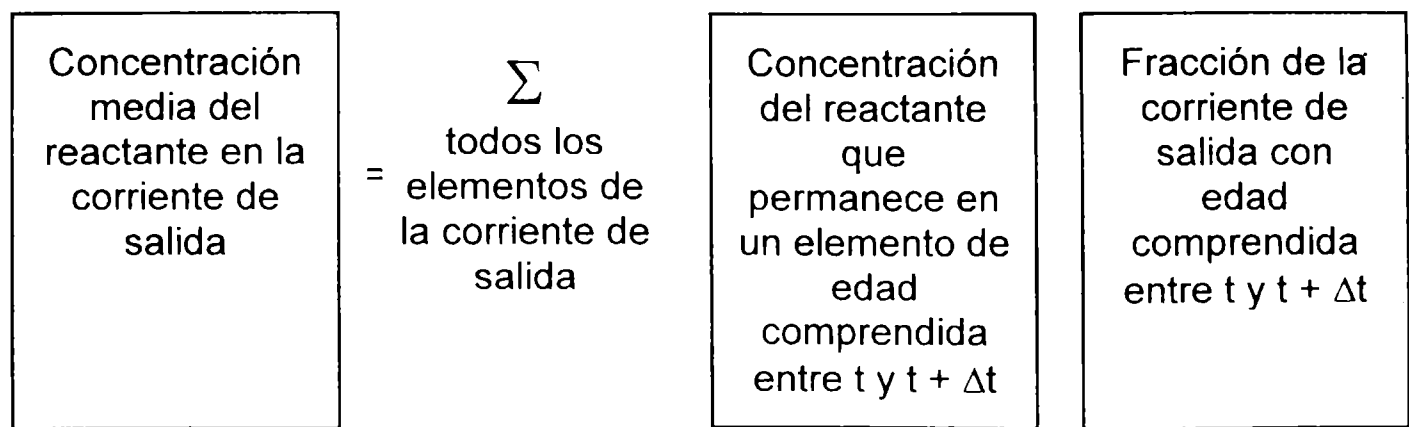


Fig. 1.8: Curva que corresponde a la respuesta de una señal en pulsación

1.3.2.4. CÁLCULO DE LA CONVERSIÓN

Si cada elemento del fluido pasa a través del recipiente de reacción sin entremezclarse con los elementos adyacentes y la distribución de edades del material en la corriente de salida nos indica cuánto tiempo ha permanecido en el reactor cada uno de los elementos individuales, para el reactante A en la corriente de salida se tiene:



o bien

$$S_a = \int_0^{\infty} S_i \cdot E \, dt \quad (\text{ec.1-33})$$

Entonces el diseño del reactor de fluido no ideal puede efectuarse conociendo la distribución del tiempo de residencia del fluido y los coeficientes cinéticos obtenidos experimentalmente (Levenspiel, 1972).

1.4. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de tesis son:

1. Explorar la posibilidad de inmovilizar la enzima Fosfolipasa A₂ sobre un soporte inerte.
2. Estudiar la hidrólisis de Lecitina de Soja mediante el uso de enzima Fosfolipasa A₂.
3. Evaluar los efectos de la difusión sobre los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis.
4. Efectuar estudios para diseñar un sistema de reacción continuo en el cual la enzima esté bajo la forma insoluble y el sustrato en forma soluble.
5. Investigar la hidrodinámica de operación, que incluye estudios de empaquetado, de velocidades de fluidos y evaluación de los efectos sobre la conversión de sustrato y la productividad del reactor.
6. Comparar diferentes modelos de flujo con los datos obtenidos experimentalmente.

Capítulo II

Inmovilización de Enzima Fosfolipasa A₂

2. INMOVILIZACION DE ENZIMA

FOSFOLIPASA A₂

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. MATERIALES

2.1.1.1. ENZIMA

La Enzima empleada fue una preparación comercial de Fosfolipasa A₂ (fosfatido-2-acil-hidrolasa E.C. 3.1.1.4) denominada Lecitasa 100-S de 11000 UI/ml obtenida por NOVO-NORDISK (1989) a partir de páncreas de cerdo. Esta enzima actúa estereoespecíficamente sobre los 3sn-fosfoglicéridos clivando la unión éster del ácido graso y glicerol en la posición del C-2 (ver fig. 1.1).

La enzima Fosfolipasa A₂ es de bajo Peso Molecular, con alto grado de enlaces por puente disulfuro y con disposición esférica, todo lo cual contribuye a definir su alta estabilidad frente al calor y a los agentes desnaturalizantes (De Hass y col., 1968).

2.1.1.2. SOPORTE

Para la inmovilización de la enzima se ensayaron los siguientes soportes:

1. DEAE Sephadex A-25 (Dietilaminoetilsephadex)(Sigma.USA) Perlas de 40-125 µm.

-
2. Sílica gel 60 70/270 mesh (Macherey, Nagel Co).
 3. Sílica gel > 100 mesh (Macherey, Nagel Co).
 4. Sílica gel 60 80/100 mesh (Macherey, Nagel Co).
 5. Alúmina 70/230 (Macherey, Nagel Co).
 6. Dowex 1 (Fluka, AG): Son resinas de intercambio aniónico fuertemente básicas con trimetilbenzilamonio como grupo catiónico, producido por polimerización cruzada con un 8% de divinilbenceno. Son esferas de 16-100 mesh.
 7. Dowex 21.K (Fluka, AG): similar al anterior pero con un porcentaje no definido de divinilbenceno. Son esferas de 16-30 mesh.
 8. Dowex 50W (Fluka, AG): Es una resina de intercambio catiónica fuertemente ácida producida por polimerización cruzada con 8% de divinilbenceno. El grupo activo es ácido sulfónico y son esferas de 0,3-0,04 mm de diámetro.
 9. Dowex 16/40 mesh (Fluka, AG)
 10. Amberlita IRA.400S (BDH Chemicals Ltd): Es un copolímero de estireno y divinilbenceno con propiedades de intercambiador de aniones fuertemente básico, con funcionalidad de amonio cuaternario:

$$\delta_{\text{aparente}} = 0,70 \text{ g/ml}$$

$$\text{tamaño} = 0,4-0,5 \text{ mm}$$

11. Amberlita IRC.50AR 16.50 mesh (Carlo Erba): Es un copolímero de ácido metaacrílico y divinilbenceno. Es una resina de intercambio catiónico débilmente ácida con funcionalismo de ácido carboxílico:

$$\delta_{\text{aparente}} = 0,69 \text{ g/ml}$$

$$\text{tamaño} = 0,33-0,50 \text{ mm.}$$

12. Tamiz Molecular 5A, perlas 2 mm (Merck)
13. Tamiz Molecular 10A, perlas 2 mm (Merck)
14. Tamiz Molecular 4A, perlas 2 mm (Merck)

-
15. Tamiz Molecular 3A, perlas 2 mm (Merck)
 16. Chromosorb P/AW DMCS 80.100 mesh (Merck): A base de tierra sílica (tierra de diatomeas) con superficie específica [m²/g] que disminuye en el orden P.A.W.G. El tipo P (de "pink" debido a su ligera coloración rosada) muestra la máxima capacidad de impregnación con fases estacionarias utilizadas en cromatografía gaseosa (hasta el 30%).
AW.DMCS: material lavado con ácido y tratado con diclorodimetilsilano. Es de superficie dura y no se rompe con el manipuleo.
 17. Piedra Pómez 80-100 mesh
 18. Perlita
 19. Perlas de vidrio TMS.silanizado 140/270 mesh (Sigma).

2.1.1.3 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

- Buffer Tris-HCl pH 7,55; 8,00; 8,45 y 8,65 (Tabelle per il Laboratorio. Carlo Erba). Se controlaron utilizando un pH-metro BM 201 Biometric con electrodo de vidrio combinado, sensibilidad 0,05 unidades de pH.

2.1.2. METODOLOGÍAS

2.1.2.1. CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLIPASA A₂

La concentración de Fosfolipasa A₂ en solución fue evaluada mediante mediciones de absorción de radiación ultravioleta utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Spectronic 21 Bausch & Lomb.

Se determinó la absorbancia a distintas longitudes de onda para las siguientes soluciones de Fosfolipasa A₂:

185 UI/ml, 277,5 UI/ml y 370 UI/ml. Se realizó un barrido de longitudes de onda entre 270 y 320 nm.

La curva de calibración Absorbancia vs. Concentración de Fosfolipasa A₂ se determinó para valores de concentración entre 20 y 200 UI/ml.

2.1.2.2. TÉCNICA DE INMOVILIZACIÓN

Entre los distintos métodos de inmovilización posibles se escogió el de adsorción (Kennedy y White, 1985; Reimerdes, 1989; Sardar y col., 1997).

El procedimiento seguido en la etapa de inmovilización fue el siguiente:

A una solución enzimática preparada con 5 ml de buffer Tris-HCl de pH 8.65 + 50 µl de Fosfolipasa A₂ se la puso en contacto con 50 mg de soporte y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 90 min. Se centrifugó 2 min a 1500 rpm. Para cada ensayo de inmovilización se evaluó la concentración de enzima midiendo la Absorbancia de la solución a 280 nm, y luego se leyó la concentración correspondiente en la curva de calibración.

La cantidad de Fosfolipasa inmovilizada, resultó de la diferencia entre las concentraciones en la solución, antes y después de ser puesta en contacto con el soporte. El sólido fue lavado con 5 ml de buffer Tris-HCl y centrifugado nuevamente. El líquido se descartó y el soporte más la enzima inmovilizada se empleó en la reacción de hidrólisis.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los soportes.

2.1.2.3. DETERMINACIÓN DEL PH ÓPTIMO

Con el fin de optimizar la inmovilización, y dentro del rango de pH recomendado por la bibliografía para máxima actividad de Fosfolipasa A₂, se realizaron determinaciones a los siguientes valores de pH: 7,55; 8,00; 8,45 y 8,65. Se prepararon las soluciones en buffer Tris-HCl correspondientes a cada uno de ellos y se realizaron las curvas de calibración para cada pH (ver 2.1.2.1) y las determinaciones de inmovilización según 2.1.2.2.

2.1.2.4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE INMOVILIZACIÓN

Se evaluaron los siguientes tiempos de inmovilización: 30, 60, 90 y 120 minutos.

Los ensayos se llevaron a cabo poniendo en contacto 5 ml de una solución de 111 UI/ml de Fosfolipasa A₂ en buffer Tris-HCl pH 8,65 con 50 mg de soporte y manteniendo una agitación suave a 48° C. La solución enzimática fue cuantificada antes y después de la inmovilización. Este procedimiento se repitió para cada uno de los tiempos evaluados.

2.1.2.5. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN

Se realizaron ensayos de inmovilización a pH 8,65, agitando suavemente durante 90 min, con soluciones de Fosfolipasa A₂ en buffer Tris-HCl cuya concentración de enzima variaba entre 20-200 UI/ml (equivale a 10.90 µIE/5ml buffer) con 50 mg de soporte. En cada ensayo se evaluó la cantidad de enzima adsorbida en UI/mg de soporte.

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Enzima Fosfolipasa A_2 presenta un espectro de absorción en la región del UV cercano con absorción característica a 210-220 y 260-280 nm, como resultado de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los anillos aromáticos de los aminoácidos triptofano, tirosina y fenilalanina (Rao, 1970).

La fig. 2.1 muestra la curva de absorción UV para Lecitase 100S a tres concentraciones distintas de Enzima.

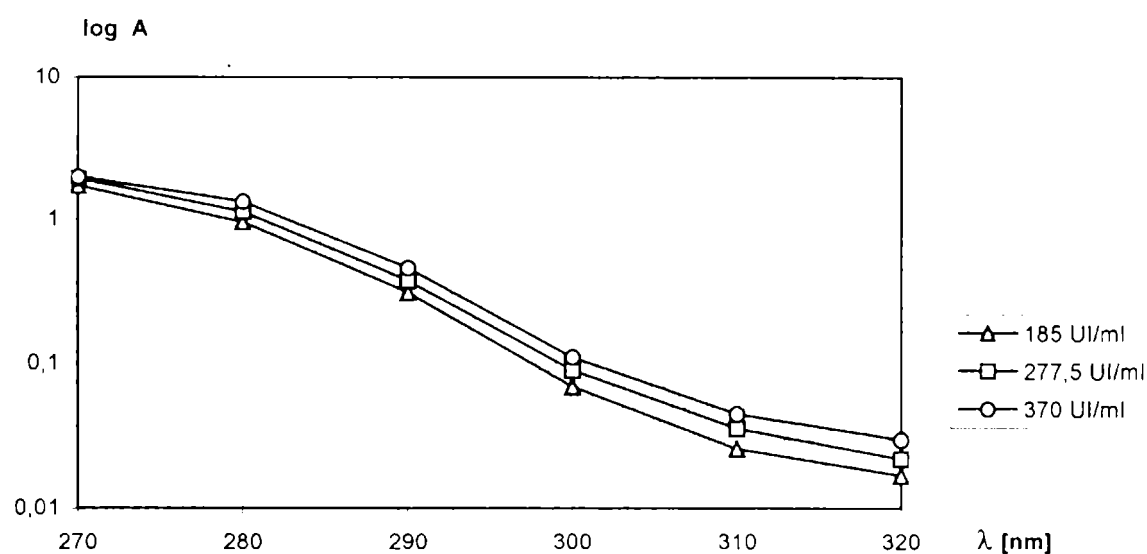


Fig. 2.1: Espectro de absorción UV para distintas concentraciones de Fosfolipasa A_2 (Lecitase 100S).

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65.

La relación de Absorbancias $A_{280\text{nm}}/A_{250\text{nm}}$ determinada fue 1,80. La literatura (De Hass y col., 1968) indica para $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}=1,72$ y para $A_{280\text{nm}}/A_{253\text{nm}}=1,97$.

La curva de calibración (Absorbancia vs. concentración de enzima) resulta una línea recta en el intervalo estudiado: 20-200 UI/ml Fosfolipasa A_2 (fig. 2.2). En este trabajo, se midió la Absorbancia a 280 nm de los grupos aromáticos de la cadena proteica para el seguimiento del proceso de inmovilización.

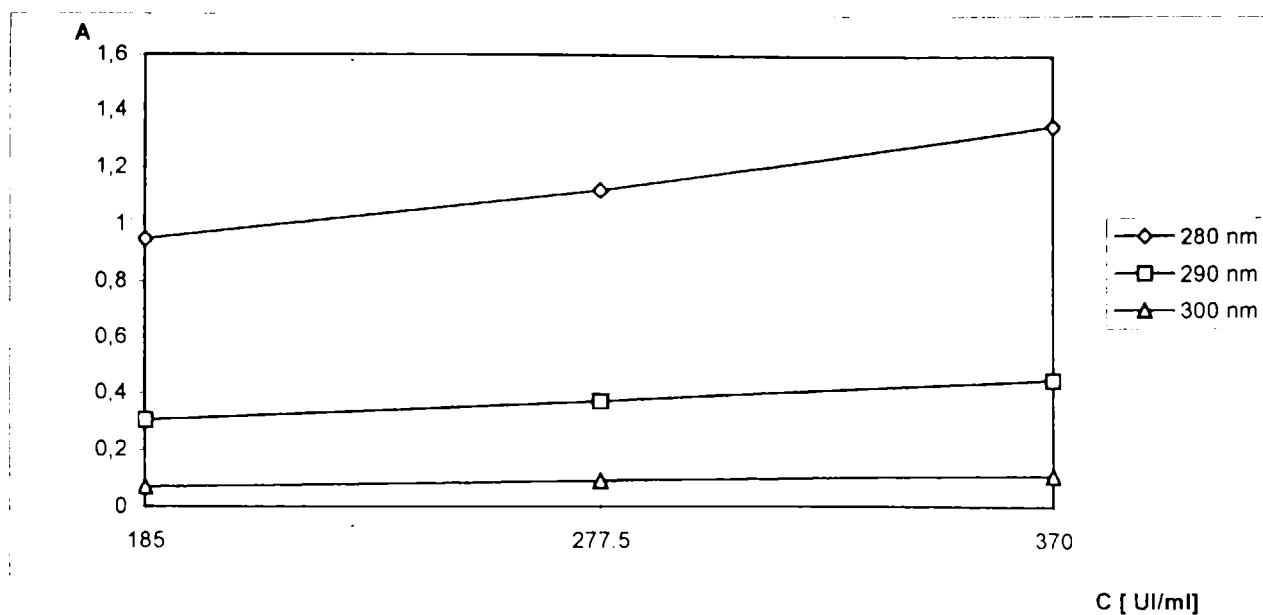


Fig. 2.2: Curva de calibración para la Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S) para distintas longitudes de onda.

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65.

Otros autores utilizaron también este procedimiento. Hertzberg y col. (1992) midieron la liberación de Lipasa confinada en perlas de alginato midiendo la absorción de la solución acuosa a 280 nm.

En el procedimiento de inmovilización de Fosfolipasa A₂ sobre Agarosa se efectúa el seguimiento determinando la Absorbancia a 220nm (Lombardo y Dennis, 1965).

Las figuras 2.3.a / 2.3.e muestran los resultados de inmovilización sobre distintos soportes de acuerdo al procedimiento indicado en 2.1.2.2.

Todas las experiencias de inmovilización se realizaron a pH 8,65 ya que la bibliografía cita el intervalo de pH entre 8 y 9 como adecuado para las reacciones de hidrólisis enzimática, ya sea que la Fosfolipasa A₂ se encuentre libre (NOVO-NORDISK, 1989) o inmovilizada (Lombardo y Dennis, 1965).

De los soportes enumerados en 2.1.1.2 y para los cuales no se indican resultados de inmovilización la razón se debió a alguno de los siguientes factores:

-
- a) no se detectó adsorción de enzima en las condiciones experimentales descritas (sec. 2.1.2.2). Tal es el caso cuando se ensayaron los soportes Chromosorb, Dowex 50W, tamiz molecular y Amberlite IRC-50.
 - b) el soporte produce una turbidez que hace impracticable la lectura espectrofotométrica. Fue el caso de perlita, piedra pómez y perlas de vidrio silanizado.

Debe remarcarse que las dos resinas de intercambio catiónico utilizadas (Dowex 50W y Amberlite IRC-50) no rindieron ningún porcentaje de adsorción de enzima.

La figura 2.4 de selección de pH realizada para el soporte DEAE-Sephadex muestra que se logra la mayor adsorción de enzima precisamente en el intervalo de pH 8-9.

Este resultado debe considerarse muy importante pues se logra el mayor porcentaje de adsorción al mismo intervalo de pH para el cual la Enzima muestra la mayor actividad en reacciones de hidrólisis (Bagi y col., 1997).

Este hecho resulta en una ventaja ya que se disminuyen los fenómenos de desorción que normalmente se producen con enzimas adsorbidas y en condiciones de proceso.

De acuerdo a la fig. 2.5 se determinó que el tiempo de inmovilización no puede ser menor de 90 min.

Los soportes ensayados y que resultaron efectivos en distinto grado para la inmovilización fueron los siguientes: Alúmina (fig. 2.3.a), Amberlite IRA-400s (fig. 2.3.b), Sílica gel de distintas granulometrías (fig. 2.3.c), DEAE-Sephadex A25 (fig. 2.3.d) y Dowex (fig. 2.3.e).

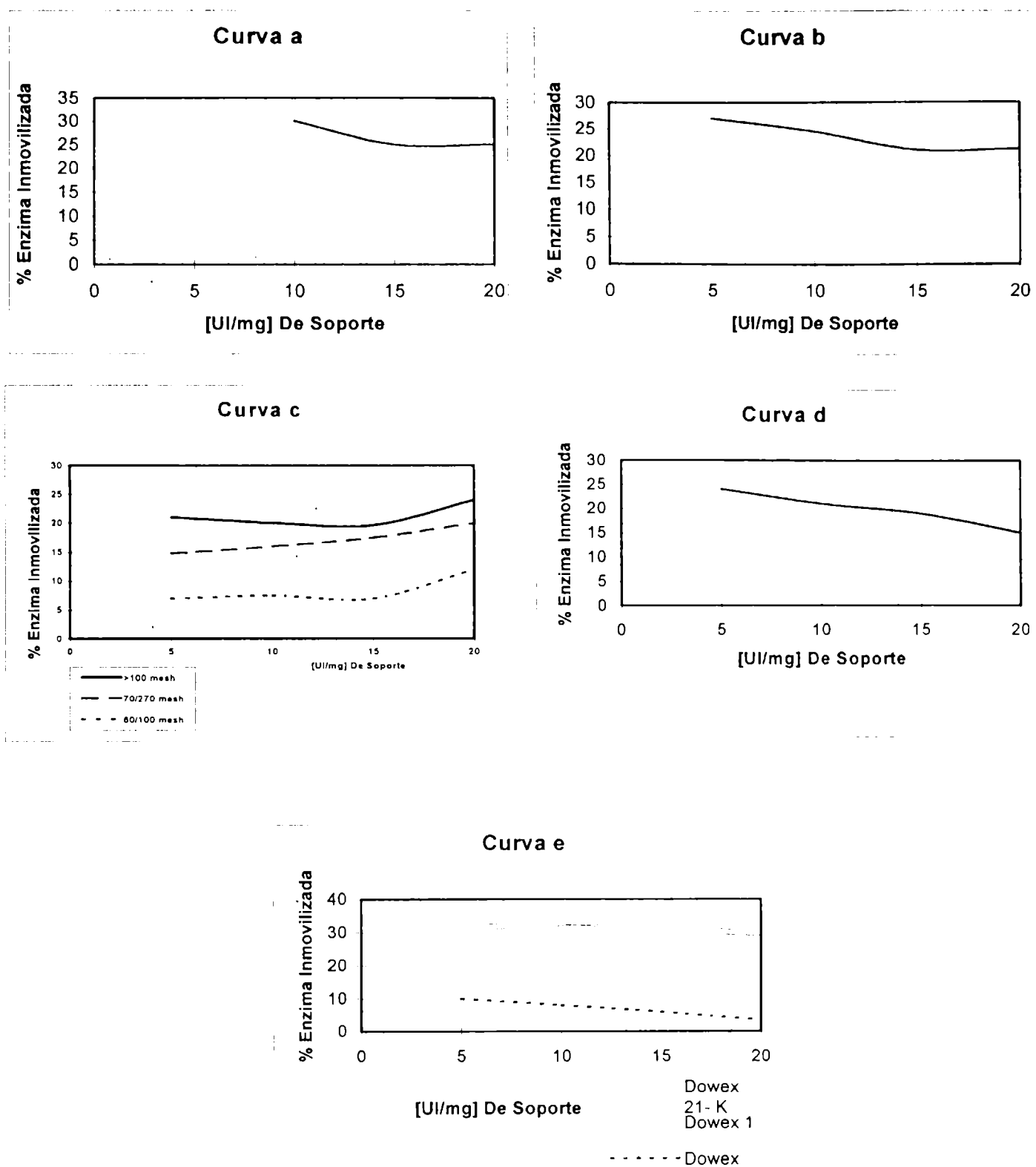


Fig. 2.3: Porcentaje de Enzima Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S) inmovilizada en distintos soportes:

- a) Alumina
- b) Amberlita IRA-400s
- c) Silica Gel
- d) DEAE – Sephadex
- e) Dowex

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65.

Procedimiento Experimental según descrito en 2.1.2.2.

Se observó que excepto para el caso de sílica gel de mayor granulometría (60-100 mesh)(fig. 2.3.c) y para Dowex (fig. 2.3.e) todos los resultados que muestran el porcentaje de enzima inmovilizada son similares y se ubicaron en una franja que va desde el 15% al 30%, por lo que la elección de alguno de los soportes como el más adecuado para los ensayos subsiguientes resultaría de otras consideraciones distintas a las que se indican en fig. 2.3.a/e.

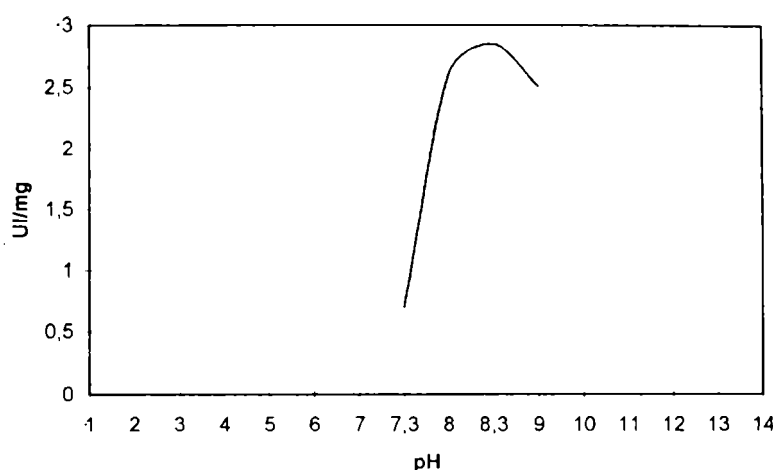


Fig. 2.4: Influencia de pH sobre la Inmovilización de Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S).

Soporte DEAE – Sephadex.

Solvente: Buffer Tris-ClH.

Procedimiento Experimental según descrito en 2.1.2.3.

La enzima Fosfolipasa A₂ se mantiene adsorbida al soporte por largos períodos de tiempo y esta situación es similar a la descrita por Hoq y col. (1985) durante la adsorción de lipasa proveniente de *Cándida cylindracea* sobre films de polipropileno microporoso (Bohnert y Horbett, 1988). Esto indicaría que la adsorción física de Fosfolipasa A₂ sobre Sephadex por ejemplo, es un proceso cuasi-irreversible y en ese sentido se adecua a la hipótesis que formulan Malcata y col. (1992), que proponen que la molécula de proteína-enzima contacta con la superficie del soporte en un sitio determinado al comienzo del proceso de adsorción y luego comienza un plegado de la misma llegando a una situación donde la proteína queda ligada por varios sitios de unión.

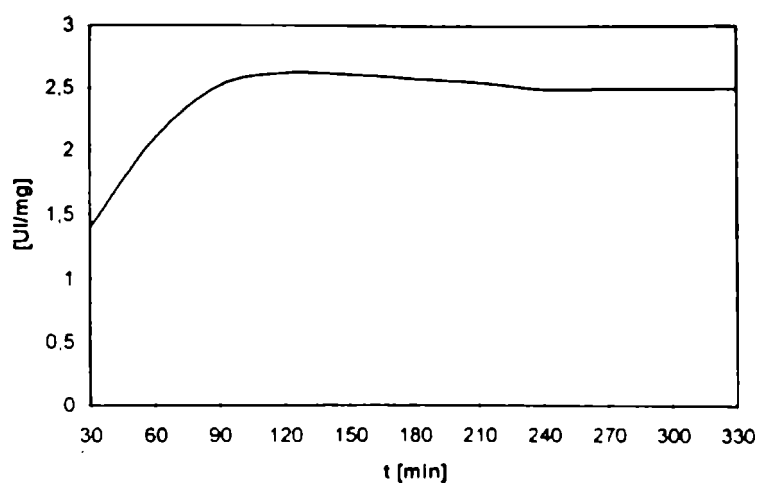


Fig. 2.5: Influencia del tiempo sobre la Inmovilización de Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S).

Soporte DEAE – Sephadex.

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8.65.

Procedimiento Experimental según descrito en 2.1.2.4.

De esta manera, si se produce la ruptura de uno de tales enlaces, es poco probable que se efectúe simultáneamente en todos y la enzima se desprenda.

Este proceso fue bien estudiado junto con el reemplazo de una proteína adsorbida, por otra de mayor energía libre de adsorción que compite con la primera por los sitios de unión sobre el soporte (Norde y col., 1986; Van der Padt y col., 1990).

La determinación de los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada para la reacción de hidrólisis de los fosfolípidos de la Lecitina de Soja utilizando DEAE- Sephadex A-25 y alúmina como soportes se describe en el capítulo 3. La elección de ellos entre todos los soportes que resultaron efectivos para la inmovilización se efectuó en consideración a las excelentes propiedades mecánicas (rigidez y durabilidad) (ver sección 1.1.8), teniendo en cuenta que las reacciones de hidrólisis se realizarían en un reactor de tanque agitado. Por otra parte, tanto el DEAE- Sephadex como la alúmina han sido empleados a escala industrial (Chibata y col. (1976).

La utilización de 50 μ l de Enzima en la técnica de inmovilización descrita en 2.1.2.2 resultó de los ensayos de rendimiento de inmovilización realizados

según las condiciones indicadas en 2.1.2.5 y cuyos resultados se muestran en las tablas 2.1 para inmovilización sobre DEAE-Sephadex y 2.2 para inmovilización sobre alúmina.

Se observa en ambos casos que la cantidad de enzima adsorbida por unidad de masa de soporte (expresada en mg), va aumentando conforme se incrementa la concentración de enzima de la solución hasta que la cantidad de enzima agregada llega a 50 μ l (corresponde a 111 UI/ml de solución). A partir de aquí, un incremento en la concentración de enzima no ocasiona un aumento en la cantidad de enzima adsorbida, por lo cual se considera que el soporte se encuentra en estado de "saturación".

Tabla 2.1: Rendimiento de la inmovilización de Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S) sobre DEAE-Sephadex.

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65.

Procedimiento experimental: descrito en Sec. 2.1.2.5

Concentración de fosfolipasa A₂ [UI/ml]	Enzima adsorbida por mg de soporte [UI/mg]
22,2	0,3
44,4	0,7
66,6	1,35
88,8	2,22
111,0	2,65
133,2	2,63
155,4	2,60
177,6	2,56
199,8	2,60

Tabla 2.2: Rendimiento de la inmovilización de Fosfolipasa A₂ (Lecitase 100S) sobre Alúmina.

Solvente: Buffer Tris-ClH pH 8,65.

Procedimiento experimental: descrito en Sec. 2.1.2.5.

Concentración de Fosfolipasa A₂ [UI/ml]	Enzima adsorbida por mg de soporte [UI/ml]
22,2	0,3
44,4	0,8
66,6	1,21
88,8	2,02
111,0	2,62
133,2	2,60
155,4	2,56
177,6	2,60
199,8	2,60

Capítulo III

Cinética de la Reacción de Hidrólisis de Lecitina de Soja

3. CINETICA DE LA REACCION DE HIDROLISIS DE LECITINA DE SOJA

3.1. PARTE EXPERIMENTAL

La reacción de hidrólisis de Lecitina de Soja se efectuó a través del uso de Fosfolipasa A₂ según el esquema planteado en la Fig. 1.1.

Como se ve en la estequiometría, la hidrólisis de un mol de fosfolípido, cualquiera sea, produce un mol de lisofosfolípido y un mol de ácido graso, el cual es fácilmente valorable por titulación ácido-base.

Se determinó la constante de velocidad específica para la reacción, los parámetros de la reacción enzimática y se evaluaron los efectos de difusión de sustrato sobre la reacción.

3.1.1. MATERIALES

3.1.1.1. ENZIMA FOSFOLIPASA SOLUBLE

Se empleó Fosfolipasa A₂ Novo-Nordisk (ver 2.1.1.1).

3.1.1.2. ENZIMA FOSFOLIPASA A₂ INMOVILIZADA

- sobre DEAE-Sephadex
- sobre Alúmina

Se prepararon como se ha indicado en la sección 2.1.2.2.

3.1.1.3. SUSTRATO

El sustrato, Lecitina de Soja pura en polvo fue obtenido en nuestro laboratorio a partir de las gomas crudas secas que constituyen un subproducto de la industria aceitera.

Se extrajeron las gomas crudas secas con acetona en un sistema de agitación-extracción (Abril y col., 1987; Madoery y col., 1987; Maroto y col., 1990; 1991; Camusso y Maroto, 1995) y el producto se secó en estufa de vacío a 60° C.

La composición y características físico-químicas se indican en tablas 3.1, 3.2 y 3.3.

Tabla 3.1: Composición y propiedades de Lecitina de Soja Pura en Polvo.

Determinación	Resultados
Insolubles en acetona	96% (fosfolípidos totales)
Insolubles en tolueno	1,5%
Aceites	0,2% (lípidos neutros)
Acidez	27,3 mg KOH/g
Humedad	1%
Índice de Peróxidos	2,2 mEq/Kg
Fósforo total	3,2%

Tabla 3.2: Análisis cuantitativo de fosfolípidos (en %)

Fosfatidilcolina	30,4
Fosfatidiletanolamina	26,1
Fosfatidilinositol	27,0
Acido Fosfatídico	7,6
Lisofosfatidiletanolamina	2,9
No Determinados	6,0

Tabla 3.3: Análisis de ácidos grasos presentes en cada fosfolípido (en %)

	16:0	18:0	18:1	18:2
Fosfatidilcolina	25	2	1	72
Fosfatidiletanolamina	7	1	1	91
Fosfatidilinositol	6	2	1	91
Ac. Fosfatídico	2	1	-	97
Lisofosfatidiletanolamina	1	1	1	97

Ver sección Apéndice para un detalle de las condiciones experimentales utilizadas en la preparación de Lecitina de Soja Pura en Polvo y del proceso de purificación y metodologías de análisis.

3.1.2. METODOLOGÍAS

3.1.2.1. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS UTILIZANDO ENZIMA SOLUBLE

En un recipiente provisto de agitación magnética y termostatzado a 48°C se colocaron 20 ml de buffer Tris-HCl pH 8,65, Lecitina pura y solución de CaCl₂ para lograr la concentración de Ca⁺⁺ = 6 mM.

A la suspensión se le agregó 5 µl de enzima y se mantuvo la agitación durante toda la experiencia.

En cada alícuota de 2 ml extraída en función del tiempo, se detuvo la reacción de hidrólisis disminuyendo el pH hasta 2 utilizando H₂SO₄ 1N. Los ácidos grasos liberados fueron extraídos y valorados por titulación (Dole y Meitnertz, 1960).

Las cantidades de lecitina utilizadas como sustrato fueron 90, 180, 270 y 360 mg.

3.1.2.2. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS UTILIZANDO ENZIMA INMOVILIZADA

En un sistema similar al antes descrito se repitió la experiencia utilizando como fuente de enzima la preparación inmovilizada sobre DEAE-Sephadex o sobre Alúmina. Se extrajeron las muestras y se valoraron los ácidos grasos liberados.

3.1.2.3. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Cada alícuota de reacción de hidrólisis fue tratada con 10 ml de solvente de extracción (H_2SO_4 1 N - hexano - isopropanol: 0,1:1:4).

Se agitó vigorosamente, se dejó reposar y se agregaron 4 ml de agua y 6 ml de hexano.

Se agitó nuevamente y se facilitó la separación de las fases por centrifugación.

El sobrenadante fue titulado con NaOH 10^{-3} N frente a 1 ml de azul de timol 0,01% como indicador (Dole y Meitnertz, 1960).

3.1.2.4. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA FOSFOLIPASA A_2

Tanto la expresión de Michaelis-Menten (ec.1-9) como su representación gráfica (fig.1.2) permiten distinguir tres regiones bien diferenciadas donde la velocidad de reacción responde en forma distinta según se incrementa la concentración de sustrato.

Para concentraciones muy bajas de sustrato la curva v vs. $[s]$ es esencialmente lineal, esto es, la velocidad para todos los propósitos prácticos es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Es la región que corresponde a una cinética de primer orden.

A concentraciones muy altas de sustrato la velocidad es esencialmente independiente de la concentración de sustrato. Es la región que se corresponde con una cinética de orden cero.

Para concentraciones de sustrato intermedias la relación v vs. $[s]$ no responde a cinética de primer orden ni cinética de orden cero (Segel, 1993).

De acuerdo a la bibliografía (Barman, 1969) la constante de Michaelis para Fosfolipasa A_2 soluble sobre lecitina de huevo es $K_m = 10^{-2}$ M. Las concentraciones de sustrato deben ser elegidas en la vecindad de K_m y preferentemente en el rango de 0,3 - 2,0 K_m , indicado como óptimo para la determinación de las constantes cinéticas (Segel, 1993).

De aquí surge la elección de las cuatro concentraciones de sustrato empleadas: $6,34 \cdot 10^{-3}$ M; $12,7 \cdot 10^{-3}$ M; $19 \cdot 10^{-3}$ M y $25 \cdot 10^{-3}$ M. Valores superiores a estos no pudieron ensayarse debido a que se alcanza el límite de solubilidad de la lecitina en el medio de reacción.

Se efectuaron las reacciones de hidrólisis enzimática trabajando según lo indicado en las secciones 3.1.2.1 y 3.1.2.2, tratando de describir la cinética de la reacción por una ecuación cinética sencilla de primer orden u orden cero, para lo cual se empleó análisis integral.

La secuencia de trabajo fue la siguiente:

1. Experimentalmente se obtuvieron los valores de concentración-tiempo para cada una de las condiciones de reacción especificadas más arriba.
2. Se determinó si los datos respondían a una cinética de primer orden o de orden cero.

a) Para cinética de primer orden:

Cuando $t = 0$ $s = s_0$

$P = 0$

A cada tiempo

$s = s_0 - P$

La velocidad de formación de producto P, o de desaparición de sustrato s, es:

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{ds}{dt} = k \cdot s$$

$$\int_{s_0}^s \frac{1}{s} ds = \int_0^t -k dt$$

$$-\ln s \Big|_{s_0}^s = -k \cdot t$$

$$\ln s - \ln s_0 = -k \cdot t$$

$$\ln \frac{s}{s_0} = -k \cdot t$$

$$\ln \frac{s_0 - P}{s_0} = -k \cdot t$$

b) Para reacciones de orden cero:

A concentraciones altas de sustrato

Cuando $t = 0$ $s = s_0$

$P = 0$

A cada tiempo

$s = s_0 - P$

La velocidad de formación de producto P, o de desaparición de sustrato s, es:

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{ds}{dt} = k$$

3. Se calcularon y representaron los valores de $\ln [(s_0 - P)/ s_0]$ y de s frente al tiempo, para cinética de primer orden y orden cero respectivamente. Si alguna de estas representaciones ajustaba a una recta, nos determinaba que la reacción transcurría con cinética de orden cero u orden uno, según correspondía. La pendiente de dichas rectas era la constante de velocidad específica k, en ambos casos.
4. La representación de los valores de velocidad v vs. s_0 condujo a una curva que correspondía a la representación gráfica de la ec. 1-9 (fig. 1.2). Los valores de velocidad se obtuvieron a partir de $v = k.(s_0)$ para cinética de primer orden y $v = k$ para cinética de orden cero.

3.1.2.5. CÁLCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS INTRÍNSECOS PARA ENZIMAS INMOVILIZADAS

a) Determinación del coeficiente de transporte externo (k_s)

Se utilizaron las ecuaciones 1-15 y 1-16.

$$\left(\frac{k_s \cdot dp}{D_{s_0}}\right)^2 = 4 + 1.21 \cdot \left(\frac{U \cdot dp}{D_{s_0}}\right)^{\frac{2}{3}} \quad (\text{ec. 1-15})$$

$$U = \frac{g \cdot dp^2 \cdot \Delta\rho}{18 \mu} \quad (\text{ec. 1-16})$$

b) Determinación de K_m y V .

Resulta generalmente imposible efectuar el muestreo adecuado de los fluidos en la interfase ya que las diferencias de concentración tienen lugar a distancias extremadamente pequeñas.

El muestreo y el análisis proporcionan sólo las concentraciones de los componentes en la masa total del fluido.

En bibliografía (Treybal, 1968) se describen perfectamente los conceptos teóricos para procesos de transferencia de masa, principios estos que pueden aplicarse a cualquier operación de transferencia de masa y que aplicaremos a la transferencia de sustrato y producto de reacción entre el seno de la solución y la superficie de la partícula catalítica.

La primera igualdad de la ec. 1-18 nos permite calcular la concentración de sustrato s en la superficie de la partícula catalítica como una función de la concentración s_0 del medio de reacción y de la velocidad observada:

$$s = f(s_0, v)$$

La segunda igualdad de la ec. 1-18 se reescribe en términos de Lineweaver y Burk (1934):

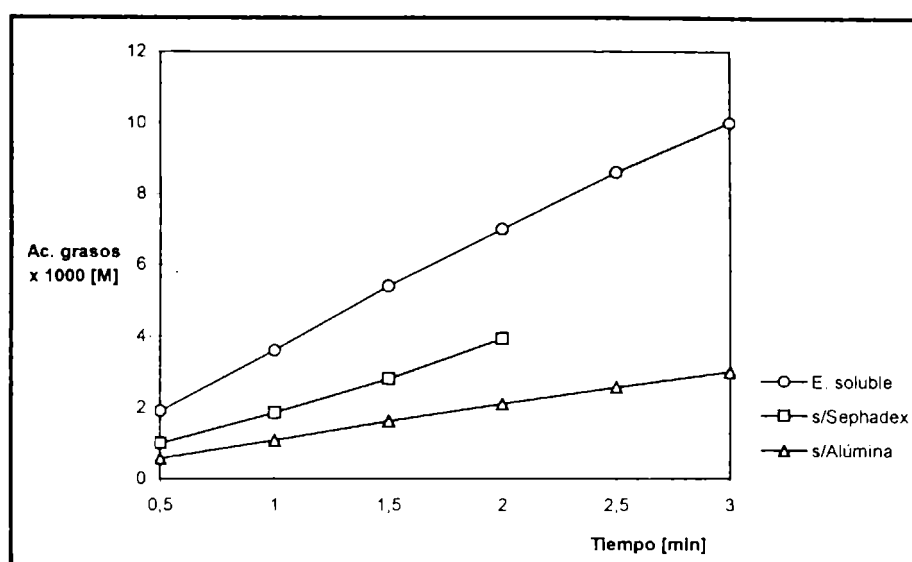
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V \cdot s} + \frac{1}{V}$$

(ec. 3-1)

donde la representación de $1/v$ vs. $1/s$ conduce a una línea recta de pendiente K_m/V y ordenada al origen $1/V$.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 3.1 muestra los resultados comparativos entre dos reacciones de hidrólisis efectuadas bajo las condiciones indicadas en 3.1.2.1 (sustrato + enzima soluble) y en 3.1.2.2 (sustrato + enzima inmovilizada).



Acidos grasos x 1000 M			
E. inmovilizada			
Tiempo[min]	E. soluble	s/Sephadex	s/Alúmina
0,5	1,9	1,00	0,57
1	3,6	1,85	1,08
1,5	5,4	2,80	1,62
2	7,0	3,93	2,1
2,5	8,6		2,57
3	10		3

Fig. 3.1: Progreso de la reacción de hidrólisis en función del tiempo para los sistemas:

- Sustrato + enzima soluble
- Sustrato + enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex
- Sustrato + enzima inmovilizada sobre Alúmina

Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo; 0,0127 M.

Condiciones experimentales: Según lo descrito en 3.1.2.1 y 3.1.2.2.

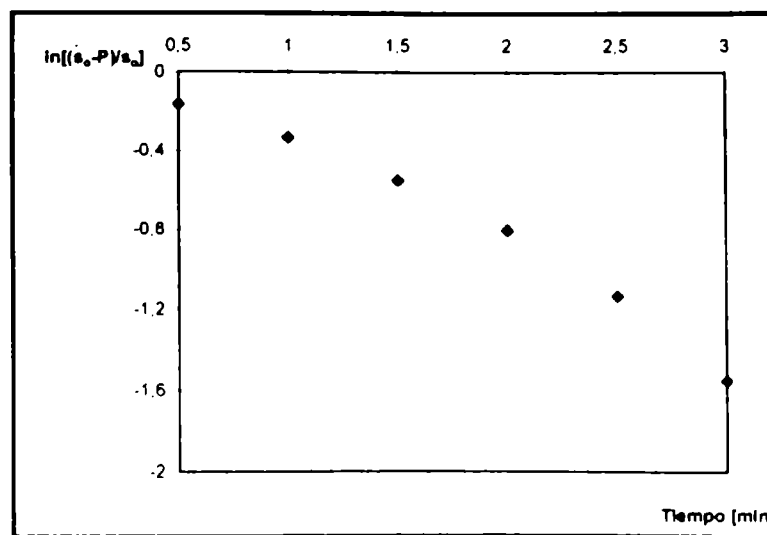
Si se comparan ambos comportamientos se ve que en la segunda se manifiesta un descenso de la actividad enzimática, fenómeno éste que ya ha sido descrito de una manera general y para el cual se indicaron cuatro razones principales por las cuales la cinética de las enzimas inmovilizadas difiere de la cinética de las enzimas en solución, a saber (Bunting y Laidler, 1972; Giorno y Drioli, 1997):

- a) las enzimas pueden estar en una configuración diferente cuando se encuentran inmovilizadas y en consecuencia, con sus constantes cinéticas, K_m y V , modificadas.
- b) en un soporte, la interacción entre la enzima y el sustrato tiene lugar con un entorno distinto al existente en solución. Este efecto también modifica las constantes.
- c) habrá partición del sustrato entre el soporte y la solución tal que la concentración del mismo en la vecindad de la enzima puede ser diferente de la que existe en solución.
- d) la reacción en el soporte sólido puede ser, en alguna medida, controlada por difusión.

La fig. 3.2a es el resultado de aplicar el procedimiento explicado en 3.1.2.4 a los datos obtenidos para la reacción de hidrólisis con enzima soluble mostrados en la fig. 3.1. Se encontró que los datos cinéticos ajustaban correctamente para una cinética de primer orden, ya que la representación de $\ln [(s_0 - P)/ s_0]$ vs. t es una recta. La pendiente de la misma es la constante de velocidad, $k = 0,547 \text{ min}^{-1}$.

Luego del cálculo de $v = k \cdot s$, se realizó la representación gráfica de Lineweaver-Burk para la enzima soluble, procedimiento indicado en 3.1.2.5. En donde:

$$\frac{1}{s} = \frac{1}{s_0} - \frac{P}{s_0} \quad y \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{k \cdot s}$$



Tiempo [min]	$\ln[(s_0-P)/s_0]$
0,5	-0,162
1,0	-0,333
1,5	-0,553
2,0	-0,801
2,5	-1,130
3,0	-1,548

Fig.3.2a: Obtención de la constante de velocidad de la enzima soluble para cinética de primer orden.

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo; 0,0127 M.

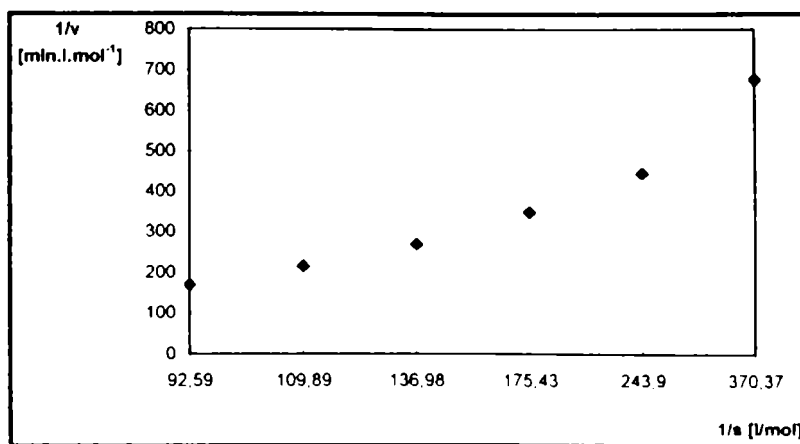
Condiciones experimentales: según lo descrito en 3.1.2.1 y 3.1.2.2

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (k) = $-0,547 \text{ min}^{-1}$

Coefficiente de correlación = $-0,987$

En este caso, s es la diferencia entre la cantidad de sustrato inicial y el producto formado a un tiempo dado. Los resultados se muestran en la fig.3.2b.

El valor hallado de velocidad máxima es $V = 0,052 \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y la constante de Michaelis para la enzima soluble es $K_m = 0,093 \text{ mol.l}^{-1}$.



1/s	1/v
92,59	169,27
109,89	215
136,98	270
175,43	350
243,90	445,89
370,37	677,09

Fig. 3.2b: Gráfico de Lineweaver-Burk para la enzima soluble

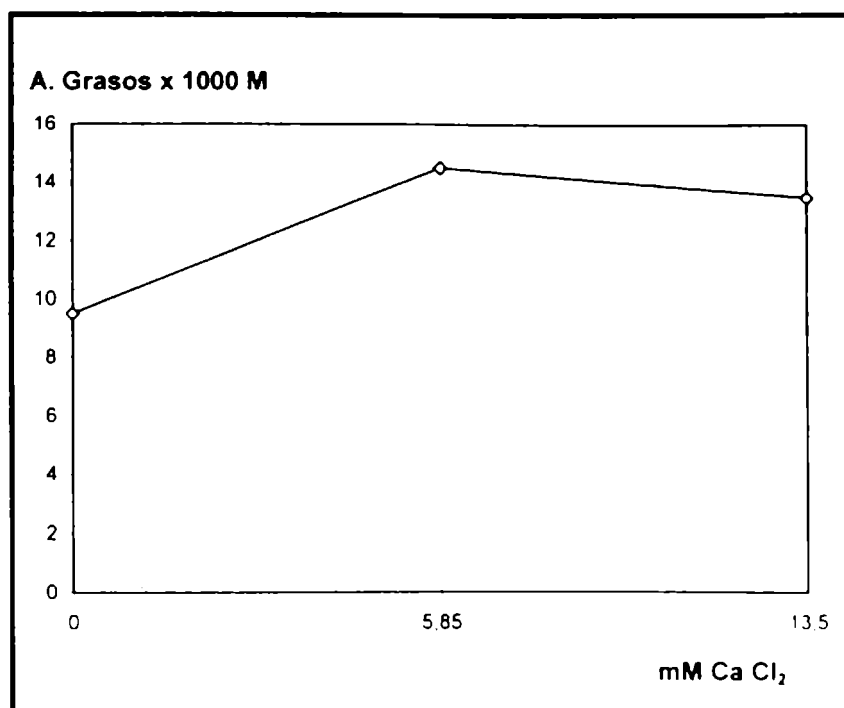
Estimación de parámetros: Pendiente (K_m/V) = 1,7824

Ordenada al origen ($1/V$) = 19,087

Coefficiente de correlación = 0,998

El efecto de la concentración de iones calcio sobre la reacción de hidrólisis se resume en la fig. 3.3a de donde surge que la concentración de iones calcio más adecuada es 6 mM. En la fig. 3.3b se observa el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex; el mismo indicó que dicha actividad persiste inalterada por tiempos mucho mayores que los tiempos de reacción estudiados en este capítulo. En la fig. 3.4 se puede observar que la temperatura óptima para el progreso de la reacción fue 50° C.

Las experiencias indicadas antes justifican utilizar los valores de temperatura de trabajo y concentración de iones calcio como 50° C y 6 mM respectivamente.



Ca Cl ₂ mM	A. Grasos x 1000 M
0	9,5
5,85	14,5
13,5	13,5

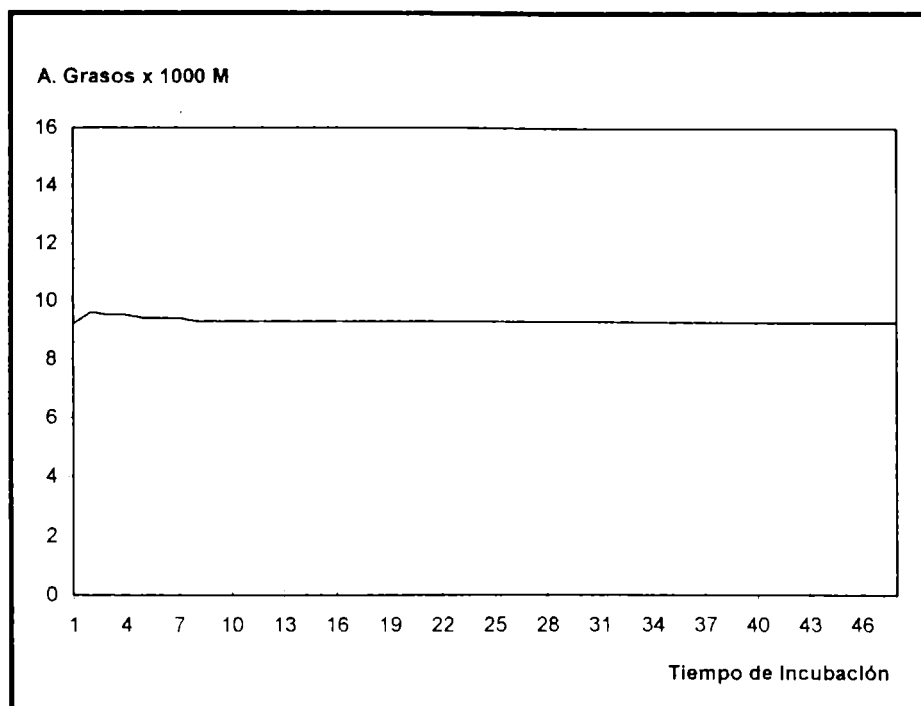
Fig. 3.3a: Efecto de la concentración de iones calcio sobre la reacción de hidrólisis de Enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato :Lecitina de Soja pura en polvo. 0,025 M.

Tiempo de reacción: 15 min.

Condiciones experimentales: Según lo descripto en 3.1.2.2



Tiempo de incubación , hs	A. Grasos x 1000 M
1	9,2
2	9,6
3	9,5
20	9,3
48	9,3

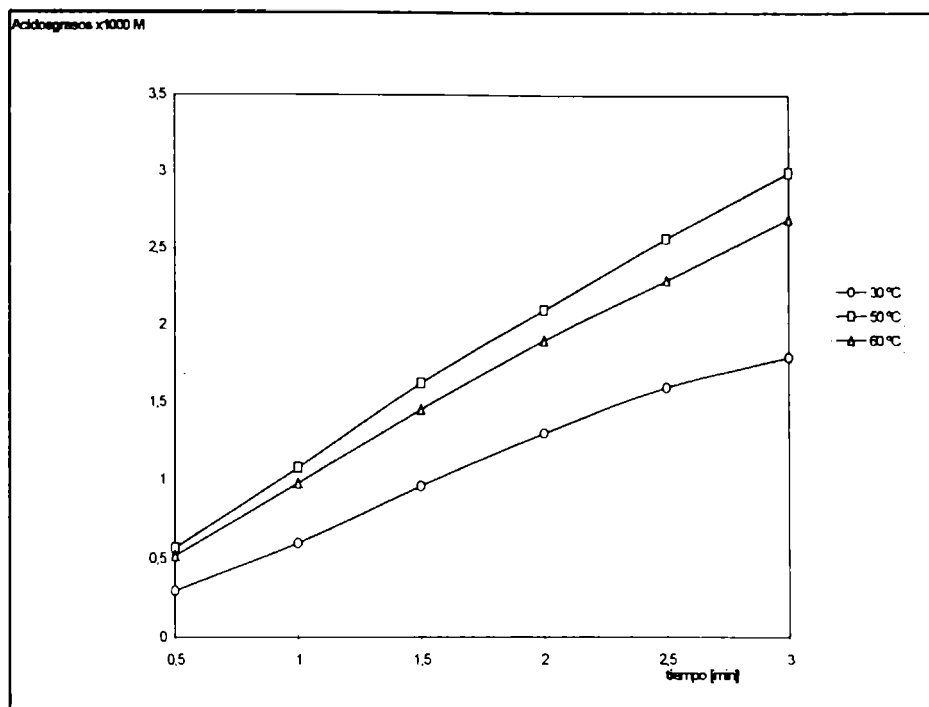
Fig. 3.3b: Efecto del tiempo de incubación de la Enzima inmovilizada sobre DEAE - Sephadex para la reacción de hidrólisis .

Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo, 0,019 M.

Tiempo de reacción: 10 min.

Condiciones experimentales: Según lo descrito en 3.1.2.2



Tiempo [min]	Acidos grasos x 1000 M		
	30° C	50° C	60° C
0,5	0,3	0,57	0,52
1	0,6	1,08	0,98
1,5	0,96	1,62	1,45
2	1,3	2,1	1,9
2,5	1,6	2,57	2,3
3	1,8	3	2,7

Fig. 3.4: Efecto de la temperatura sobre la reacción de hidrólisis para Enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex.

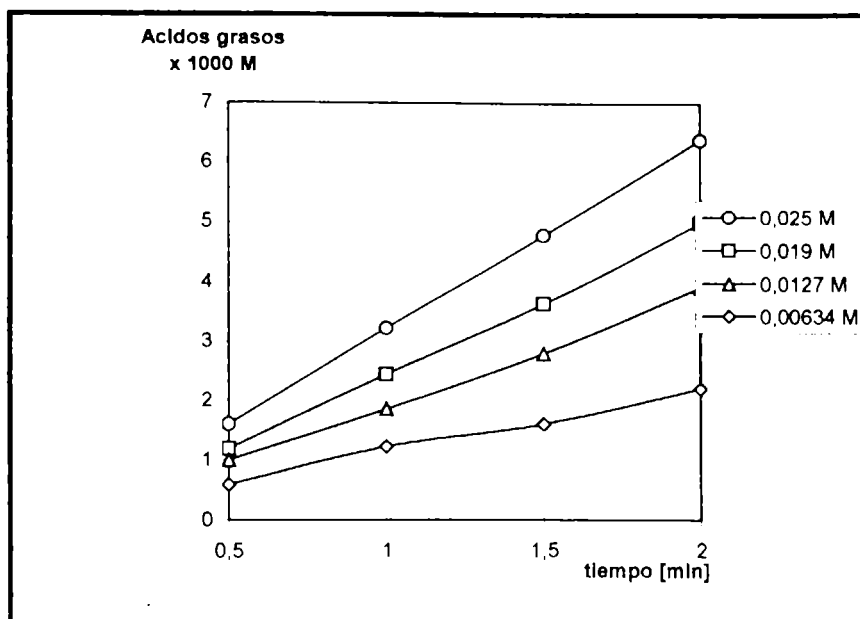
Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo, 0,0127 M.

Condiciones experimentales: Según lo descrito en 3.1.2.2

Se observa también que la enzima inmovilizada sobre DEAE Sephadex no disminuye su actividad por el solo efecto del tiempo de incubación, al menos bajo las condiciones de trabajo utilizadas.

Las fig. 3.5 y 3.6 muestran el efecto de la variación de la concentración sobre el progreso de la reacción de hidrólisis utilizando enzima inmovilizada sobre Sephadex y sobre sílica gel respectivamente.



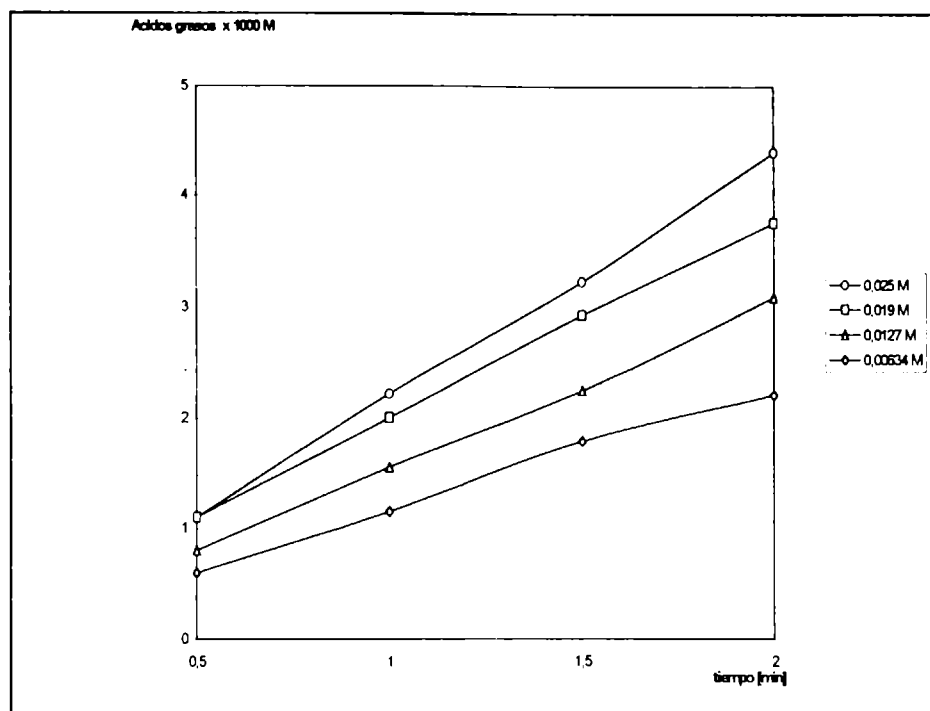
Tiempo [min]	Acidos grasos x 1000 M			
	0,025 M	0,019 M	0,0127 M	0,00634 M
0,5	1,6	1,19	1	0,59
1	3,22	2,44	1,85	1,22
1,5	4,78	3,64	2,8	1,6
2	6,38	5	3,93	2,22

Fig. 3.5: Progreso de la reacción de hidrólisis para Enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex a cuatro concentraciones diferentes de sustrato.

Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2



Acidos grasos x 1000 M				
Tiempo [min.]	0,025 M	0,019 M	0,0127 M	0,00634 M
0,5	1,1	1,1	0,8	0,6
1	2,22	2	1,55	1,15
1,5	3,23	2,93	2,25	1,79
2	4,4	3,76	3,1	2,22

Fig. 3.6: Progreso de la reacción de hidrólisis para Enzima inmovilizada sobre Silica gel (80- 100 mesh) a cuatro concentraciones diferentes de sustrato.

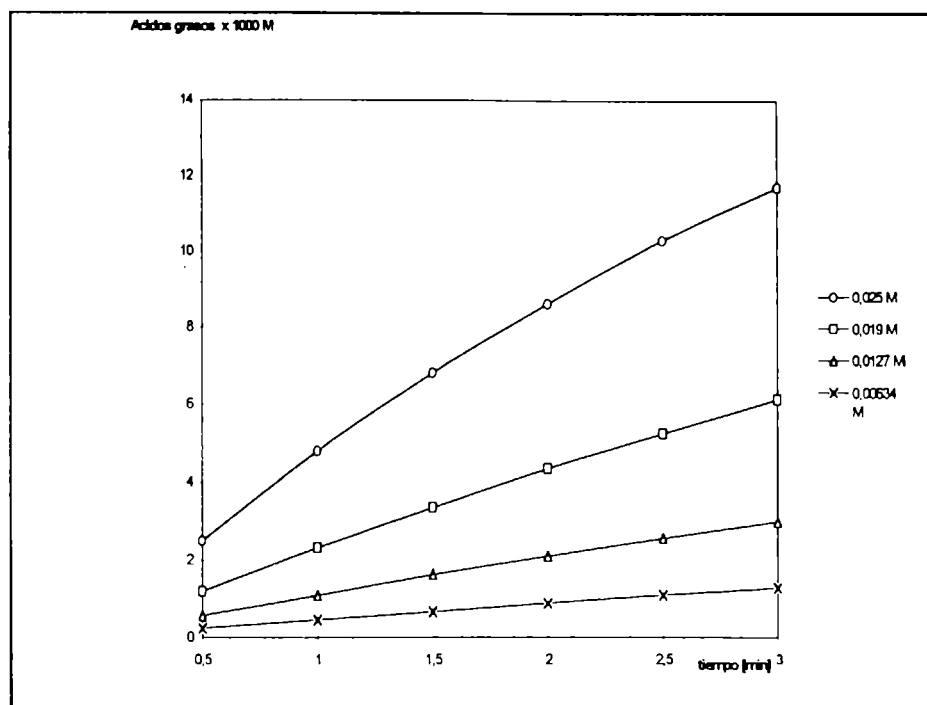
Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2

La fig. 3.7 representa el mismo estudio cuando la enzima estaba inmovilizada sobre Alúmina.

En todas estas figuras se observó que, a concentración de enzima constante, las curvas son lineales al comienzo de la reacción.



Tiempo [min]	Concentración de sustrato			
	0,025 M	0,019 M	0,0127 M	0,00634 M
	Acidos grasos x 1000 M			
0,5	2,5	1,19	0,57	0,24
1	4,8	2,32	1,08	0,45
1,5	6,8	3,35	1,62	0,66
2	8,6	4,35	2,1	0,88
2,5	10,3	5,26	2,57	1,09
3	11,7	6,15	3	1,29

Fig. 3.7: Progreso de la reacción de hidrólisis de Enzima inmovilizada sobre Alúmina a cuatro concentraciones diferentes de sustrato.

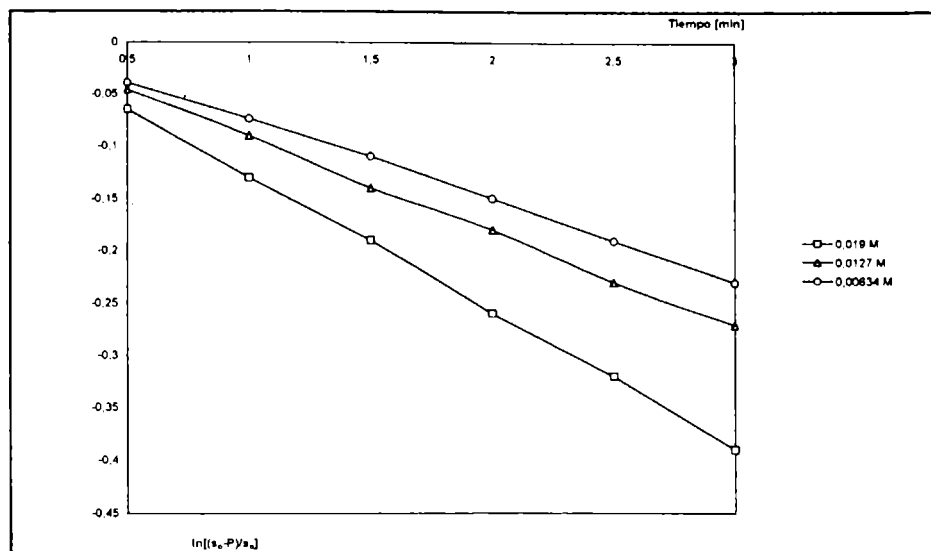
Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2

Se aplicó el procedimiento indicado en 3.1.2.4 a los resultados obtenidos para la enzima inmovilizada sobre Alúmina y sobre DEAE-Sephadex.

Se graficó $\ln[(s_0-P)/s_0]$ vs. tiempo, en ambos casos y para las concentraciones iniciales de sustrato: $6,34 \cdot 10^{-3}$ M; $12,7 \cdot 10^{-3}$ M y $19 \cdot 10^{-3}$ M, los datos ajustaron a una recta de pendiente $k = 9,88 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para Alúmina y $k = 1,766 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para DEAE-Sephadex; para una cinética de primer orden (fig. 3.8a y 3.8b).



	Concentración de sustrato		
	0,019 M	0,0127 M	0,00634 M
Tiempo [min]	ln[(s _o -P)/s _o]		
0,5	-0,065	-0,046	-0,039
1	-0,13	-0,09	-0,074
1,5	-0,19	-0,14	-0,11
2	-0,26	-0,18	-0,15
2,5	-0,32	-0,23	-0,19
3	-0,39	-0,27	-0,23

Fig. 3.8a: Obtención de la constante de velocidad con enzima inmovilizada sobre Alúmina para cinética de primer orden.

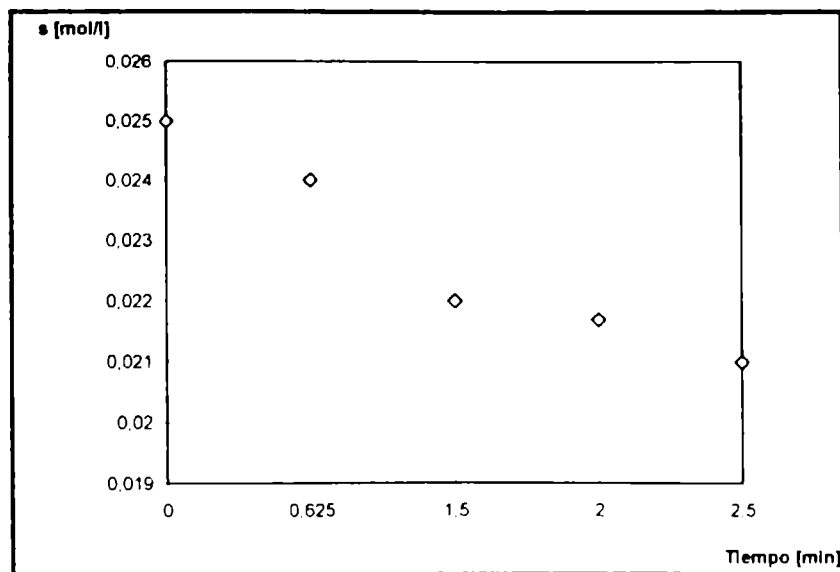
Solvente Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (k) = $-0,0988 \text{ min}^{-1}$

Coefficiente de correlación: $-0,999$



Tiempo [min]	s [mol/l]
0	0,025
0,625	0,024
1,5	0,022
2	0,0217
2,5	0,021

Fig. 3.8b: Obtención de la constante de velocidad con enzima inmovilizada sobre Alúmina para cinética de orden cero.

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65.

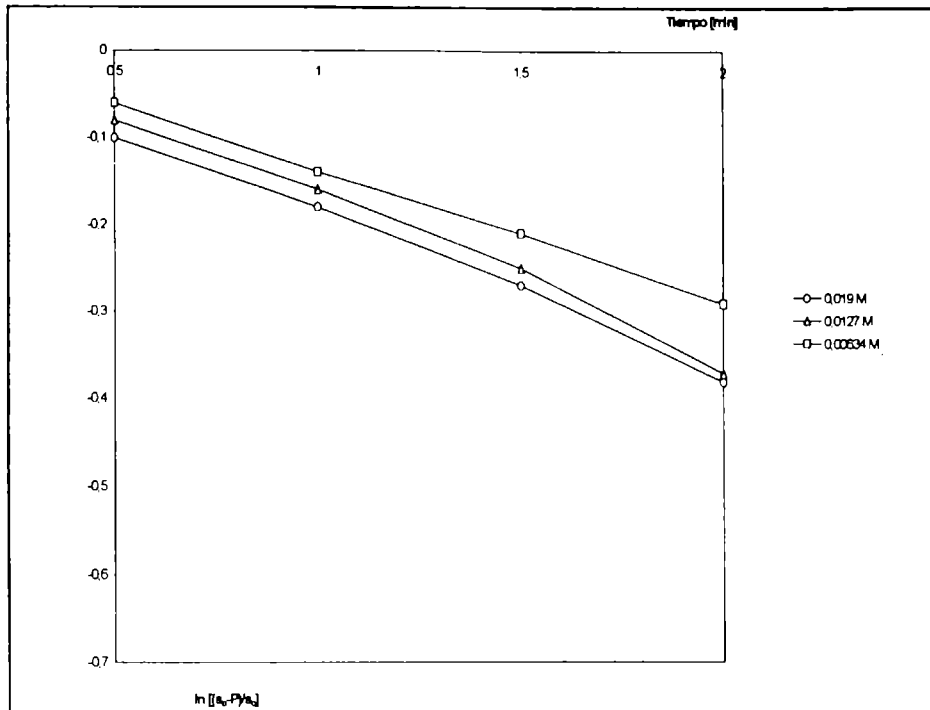
Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2.

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (k)= - 0,00162 mol.l⁻¹ min⁻¹

Coefficiente de correlación = - 0,988

En cambio, para la concentración inicial de sustrato de $25 \cdot 10^{-3}$ M se graficó s vs. tiempo y los datos ajustaron a una recta de pendiente $k = 1,62 \cdot 10^{-3}$ mol. l⁻¹. min⁻¹ para Alúmina y $k = 3,58 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹. min⁻¹ para DEAE-Sephadex; para una cinética de orden cero (fig. 3.9a y 3.9b).



Tiempo[min]	Concentración de sustrato		
	0,019 M	0,0127 M	0,00634
	ln[(s ₀ -P)/s ₀]		
0,5	-0,1	-0,08	-0,06
1	-0,18	-0,16	-0,14
1,5	-0,27	-0,25	-0,21
2	-0,38	-0,37	-0,29

Fig. 3.9a: Obtención de la constante de velocidad con enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex para cinética de primer orden.

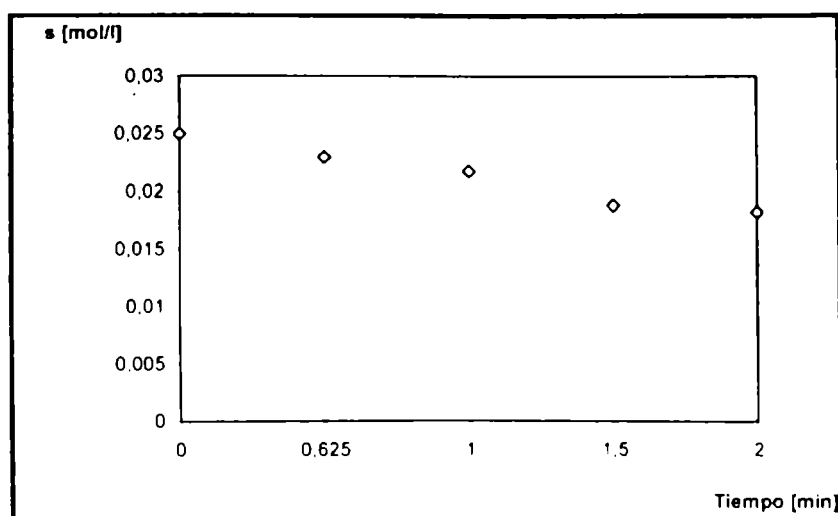
Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2.

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (k) = -0,1766 min⁻¹

Coefficiente de correlación = -0,998



Tiempo [min]	s [mol/l]
0	0,025
0,6	0,023
1	0,0218
1,5	0,0189
2	0,0183

Fig. 3.9b: Obtención de la constante de velocidad con enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex para cinética de orden cero

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65.

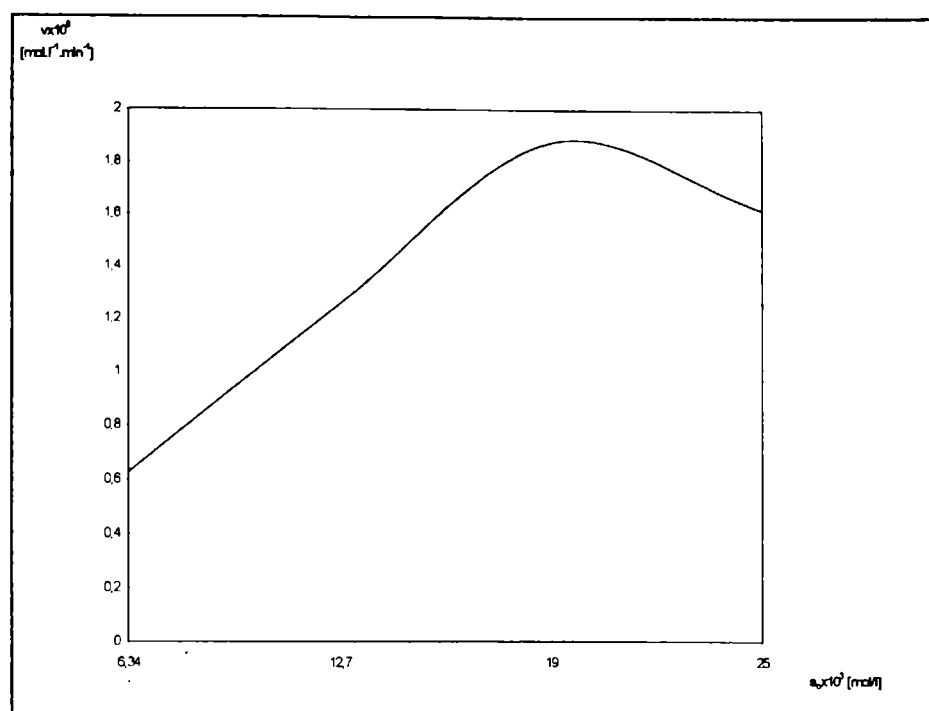
Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 3.1.2.2.

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (k) = $-0,00358 \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Coefficiente de correlación = -0,985

Los resultados obtenidos para la enzima soluble y para la enzima inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex se reúnen en la tabla 3.4.



$s_0 \times 10^3$ [mol/l]	$v \times 10^5$ [mol.min ⁻¹ .l ⁻¹]
6,34	0,626
12,7	1,254
19	1,877
25	1,62

Fig. 3.10: Velocidad de hidrólisis con Enzima inmovilizada sobre Alúmina como una función de la concentración de sustrato.

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Condiciones experimentales: Según lo descrito en 3.1.2.2.

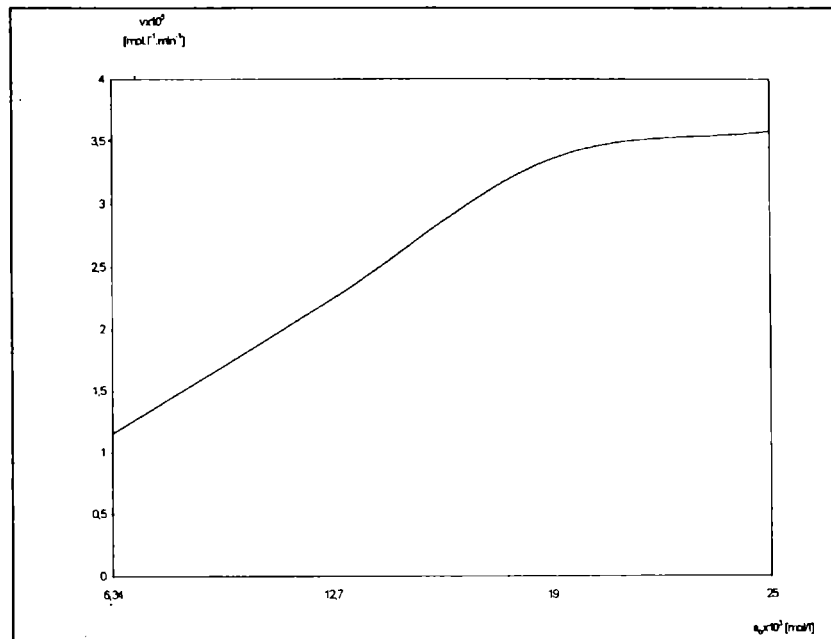
Tabla 3.4: Constantes de velocidad específica para enzima soluble e inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex.

		Constante de velocidad (k)
Enzima inmovilizada sobre Alúmina	Primer orden	$9,88 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
	Orden cero	$1,62 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$
Enzima inmovilizada sobre Sephadex	Primer orden	$1,766 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$
	Orden cero	$3,58 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$
Enzima soluble	Primer orden	$5,47 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Valores experimentales obtenidos en las fig. 3.2a; 3.8a/b y 3.9a/b.

La representación de v vs. s_0 se muestra en las figuras 3.10 y 3.11. En una representación similar y para los instantes iniciales de la reacción Hendrickson y Denis (1984) observaron que la curva era sigmoidea, y lo atribuyeron a posibles enlazamientos secundarios de la enzima con más de un fosfolípido en la interfase o con otra molécula de enzima en forma cooperativa.



$s_0 \times 10^3$ [mol/l]	$v \times 10^5$ [mol.min ⁻¹ .l ⁻¹]
6,34	1,155
12,7	2,243
19	3,355
25	3,58

Fig. 3.11: Velocidad de hidrólisis con enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex como una función de la concentración de sustrato.

Solvente: Buffer Tris-HCl pH 8,65

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo.

Condiciones experimentales: según lo descrito en 3.1.2.2.

CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE TRANSPORTE EXTERNO (k_s):

Se utilizaron las ecuaciones 1-15, 1-16 y la correlación de Wilke - Chang, la cual se emplea para estimar los coeficientes de difusión de pequeñas moléculas en solventes de bajo peso molecular (ec 3-2) (Liley y Gambill, 1982; Bailey y Ollis, 1986).

$$\left(\frac{k_s \cdot dp}{D_{S_0}}\right)^2 = 4 + 1,21 \cdot \left(\frac{dp \cdot U}{D_{S_0}}\right)^{\frac{2}{3}}$$

(ec.1-15)

$$U = \frac{g \cdot dp^2 \cdot \Delta\rho}{18 \cdot \mu}$$

(ec. 1-16)

$$\frac{D_{S_0} \cdot \mu}{T} = 7,4 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{(x \cdot M)^{0,5}}{V_b^{0,6}}$$

(ec. 3-2)

Con los datos indicados en la tabla 3.5 resultan los valores de coeficiente de transporte externo (k_s) de $1,52 \cdot 10^{-3}$ y $1,30 \cdot 10^{-3}$ cm s^{-1} para enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex y sobre Alúmina, respectivamente. Consecuentemente tenemos:

$k_s \cdot Ap = 0,0182 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ para la enzima inmovilizada sobre Sephadex y

$k_s \cdot Ap = 0,027 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ cuando la enzima estaba inmovilizada sobre Alúmina.

Tabla 3.5: Cálculo del coeficiente de transporte externo.

	SOPORTE	
	DEAE-Sephadex	Alúmina
g	981 cm s ⁻²	
dp	8 · 10 ⁻³ cm	10,5 · 10 ⁻³ cm
Δρ	0,25 g cm ⁻³	
μ (50 °C)	0,549 g cm ⁻¹ s ⁻¹ (a)	
Vb	710 / 0,96 = 740	
M	18	
T	323 K	
X	1,9 (b)	
D _{so} (calculado)	4,83 · 10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹	
U (calculado)	1,59 · 10 ⁻³ cm s ⁻¹	

a) Lange, M. A. (1969).

b) Liley, P. E. y Gambill, W. R. (1982).

CÁLCULO DE K_m Y V:

De la primera igualdad de la ec. 1-18 se obtienen los valores de la concentración de sustrato en la superficie catalítica. El valor de k_s debe multiplicarse por el área superficial de la partícula soporte para que concuerden las dimensiones de las velocidades igualadas. Se calcula entonces:

$$s = s_o \frac{v}{k_s \cdot A_p} \quad (\text{ec. 1-24})$$

Los valores de v son los indicados en las fig. 3.10 y 3.11 para enzima inmovilizada sobre Alúmina y sobre DEAE-Sephadex, respectivamente.

Los resultados se muestran en la tabla 3.6 para enzima inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex.

Tabla 3.6: Determinación de la concentración de sustrato (s) en la superficie catalítica.

v [mol.l ⁻¹ . min ⁻¹]	s_0 [mol.l ⁻¹]	s [mol.l ⁻¹]
$1,62 \cdot 10^{-5}$	0,025	0,0244
$1,877 \cdot 10^{-5}$	0,019	0,0183
$1,254 \cdot 10^{-5}$	0,0127	0,0122
$0,626 \cdot 10^{-5}$	0,00634	0,0061

a) para Alúmina ($A_p = 3,46 \cdot 10^{-4}$ cm²).

v [mol.l ⁻¹ . min ⁻¹]	s_0 [mol.l ⁻¹]	s [mol.l ⁻¹]
$3,58 \cdot 10^{-5}$	0,025	0,018
$3,355 \cdot 10^{-5}$	0,019	0,0171
$2,243 \cdot 10^{-5}$	0,0127	0,0114
$1,155 \cdot 10^{-5}$	0,00634	0,0057

b) para DEAE-Sephadex ($A_p = 2,0 \cdot 10^{-4}$ cm²).

Reescribiendo la segunda igualdad de la ec. 1-18 se obtienen las fig. 3.12 y 3.13 que representan la gráfica de Lineweaver-Burk. Los parámetros cinéticos obtenidos para fosfolipasa A₂ inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex, libre de efectos difusionales externos se resumen en la tabla 3.7 y se comparan con los obtenidos para la enzima soluble.

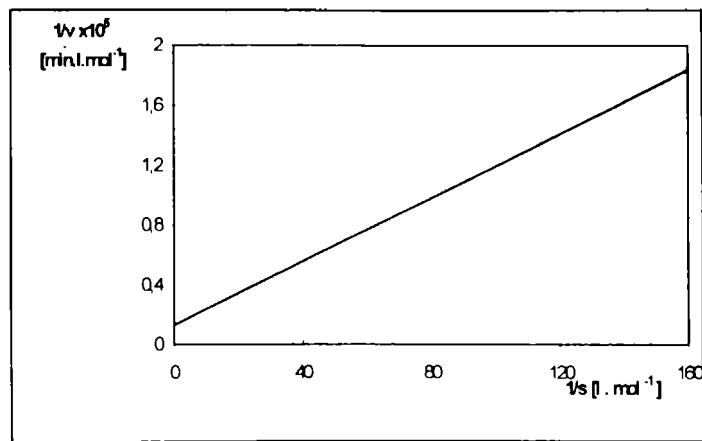


Fig. 3.12: Gráfico de Lineweaver-Burk para la enzima inmovilizada sobre Alúmina.

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (K_m/V) = 1067,22

Ordenada al origen ($1/V$) = 12971

Coefficiente de correlación = 0,995

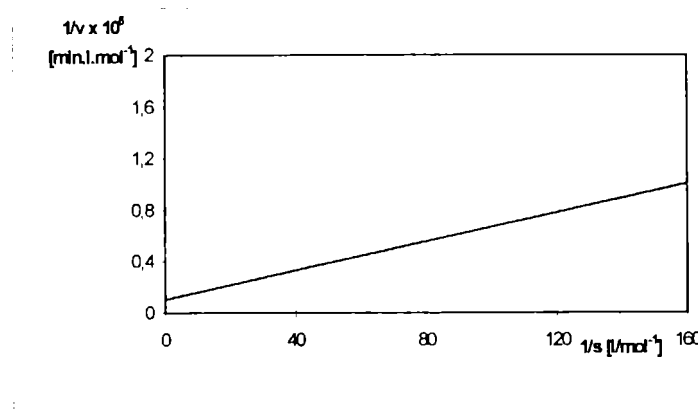


Fig. 3.13: Gráfico de Lineweaver-Burk para la enzima inmovilizada sobre DEAE-Sephadex.

Estimación de parámetros lineales: Pendiente (K_m/V) = 564,27

Ordenada al origen ($1/V$) = 10527,25

Coefficiente de correlación = 0,986

Tabla 3.7: Resumen de parámetros cinéticos para Fosfolipasa A₂.

		Km [mol/l]	V [mol.l ⁻¹ .min ⁻¹]
Enzima soluble		9,34 x 10 ⁻²	5,24 x 10 ⁻²
Enzima inmovilizada	s/Alúmina	8,2 x 10 ⁻²	7,7 x 10 ⁻⁵
	s/DEAE-Sephadex	5,36 x 10 ⁻²	9,5 x 10 ⁻⁵

Sustrato: Lecitina de Soja pura en polvo

Valores experimentales obtenidos en las fig. 3.2b; 3.12 y 3.13.

La evaluación de los factores de efectividad externa e interna se resume en la tabla 3.8 y fue realizada de acuerdo al procedimiento indicado en sec. 1.2.2.2 y 1.2.2.3.

Tabla 3.8: Factores de efectividad externo, interno y global para Fosfolipasa A₂ inmovilizada sobre Alúmina y DEAE-Sephadex.

	Alúmina	DEAE-Sephadex
η_e	0,99	0,99
η_i	0,28	0,38
η	0,277	0,376

Se obtuvieron los valores de V a partir de la ec. 1-12:

$$V = \frac{v}{\eta}$$

$$V_{\text{Alúmina}} = 6,78 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$V_{\text{DEAE-Sephadex}} = 8,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

CONCLUSIONES

La suma de los efectos descritos al comienzo de la sección 3.2, y fundamentalmente los de los puntos a y b sobre los parámetros cinéticos, hacen que el valor de V esté disminuido en la enzima inmovilizada, con respecto al de la enzima soluble (Tabla 3.7). El valor de K_m para la enzima soluble es similar a los valores obtenidos para la enzima inmovilizada indicados más arriba para Alúmina y DEAE-Sephadex. Barman (1969) obtuvo valores del mismo orden de K_m y V para enzima soluble.

La determinación del verdadero valor de K_m juega un importante papel en el modelo de difusión-reacción ya que es una característica del sitio enzimático. La determinación de su valor, por lo tanto, constituye una parte integral del estudio comparativo de una propiedad enzimática en solución y en fase insoluble (Bunting y Laidler, 1972; Kobayashi y Moo-Young, 1973).

Como ya se había explicado antes, la solución Michaeliana es sólo válida para un medio isotrópico, homogéneo y suficientemente agitado. En un sistema heterogéneo, la cinética promedio puede no ser hiperbólica o Michaeliana.

El resultado no deja de ser un valor teórico y debido a la relativa complejidad matemática del problema, son muy pocas las referencias bibliográficas en las que se realiza un tratamiento cuantitativo del efecto combinado de la disminución de sustrato y la acumulación de producto en el microentorno y su repercusión en el comportamiento cinético de enzima inmovilizada (Moo-Young y Kobayashi, 1972; Ramachandran, 1975; Guisan y col., 1981).

Tampoco se han encontrado trabajos que realicen un análisis de diseño de reactor heterogéneo con sistemas de enzima inmovilizada que obedezcan a este tipo de cinética (Bodaló Santoyo y col., 1986).

De todas maneras, aún con las limitaciones del error experimental y sin efectuar un estudio cinético riguroso, los resultados están en concordancia con las previsiones teóricas (Thomas y col., 1972).

El fenómeno de difusión externa puede ser llevado a una magnitud despreciable merced a un buen agitado de la solución y entonces, el fenómeno de difusión interna, de naturaleza más compleja debe recibir una consideración más importante, particularmente cuando el fenómeno está acoplado a una reacción química.

Cuando la reacción ocurre simultáneamente a la transferencia de masa en la estructura porosa, no todas las moléculas de enzima adsorbida en el interior de los poros de la partícula estarán en contacto con el sustrato al mismo nivel de concentración que existe en la superficie. Por ello, la reacción promedio es menor que la que ocurriría en ausencia de efectos difusionales y el fenómeno al final resulta cuantitativamente expresado por el factor de eficiencia (ver 1-2-2-6) (Bodaló y col., 1986).

Puede observarse que los valores de $V_{\text{Alúmina}}$ y $V_{\text{DEAE-Sephadex}}$ obtenidos a partir del cálculo del factor de efectividad están en el mismo orden que los obtenidos mediante la metodología de Lineweaver-Burk.

Se puede concluir de acuerdo a los datos experimentales que la inmovilización altera las propiedades intrínsecas en la enzima. La inmovilización altera la forma de la ecuación que describe los efectos de los parámetros de reacción sobre la actividad intrínseca de la enzima .

El principal propósito del estudio descrito en este capítulo fue puntualizar la influencia que el proceso de transporte de masa puede tener sobre la relación entre la actividad catalítica aparente y el medio ambiente del catalizador, enzima inmovilizada. Las conclusiones que se alcanzan acerca de la respuesta de la enzima inmovilizada sólo son válidas para la formulación dada del catalizador y debe tenerse bien presente que cualquier cambio en la composición del sustrato, cambio en el tamaño de la partícula, en el diámetro de los poros o cambio en la cantidad de enzima adsorbida sobre la partícula o en su distribución, alterará la respuesta del catalizador en lo referente a los valores determinados previamente.

Capítulo IV

Diseño del Reactor

4. DISEÑO DEL REACTOR

4.1. PARTE EXPERIMENTAL

El comportamiento real del reactor en algunos casos se acerca al comportamiento ideal y en otros casos las desviaciones pueden ser apreciables; las mismas se originan por canalizaciones del flujo, por recirculación del fluido o por formación de zonas estancas o muertas en el reactor.

Los problemas de flujo no ideal están íntimamente relacionados con los de cambios de escala y la decisión de tal cambio depende, en gran parte, de nuestro control sobre las variables más importantes del proceso.

Para poder predecir el comportamiento del reactor y disponer de datos suficientes para el diseño, se realizó un estudio de la distribución del tiempo de residencia de los fluidos en el reactor.

4.1.1. MATERIALES

4.1.1.1. TRAZADOR

- Solución de electrolito: 1% de NaCl.

4.1.1.2. EQUIPAMIENTO

El reactor empleado estaba constituido por una columna de vidrio rellena, de 20 mm de diámetro y 135 mm de largo provista de camisa de circulación de agua (fig. 4.1).

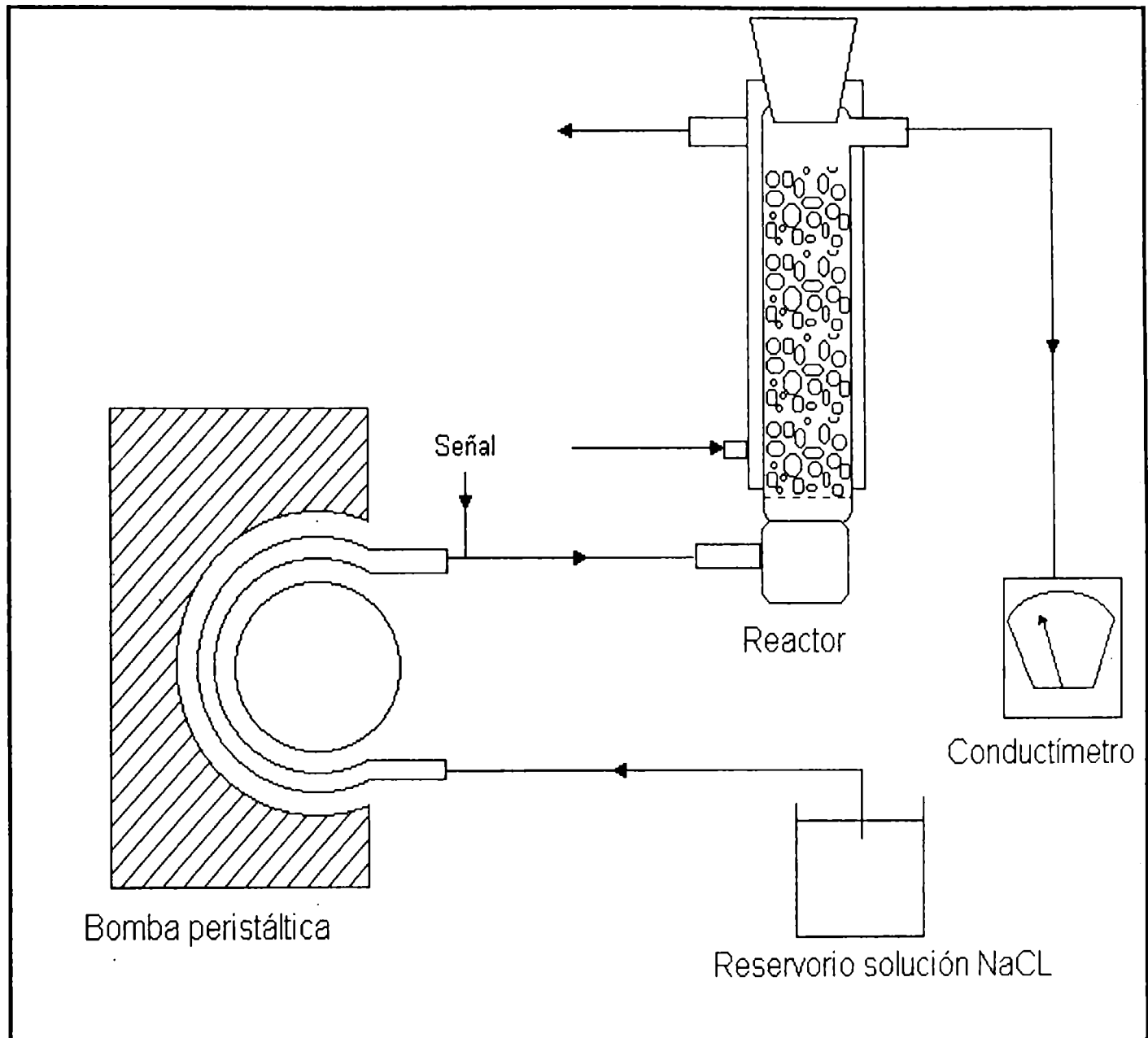


Fig. 4.1: Sistemas de reacción para estudios de flujo.

4.1.1.3. RELLENO

- Soporte Inerte: Alúmina 70/230 mesh Macherey, Nagel Co.,
- Elemento de Sostén: perlas de vidrio de 3.5 mm de diámetro.

4.1.2. METODOLOGÍAS

En este capítulo se considerará que la reacción química transcurre según una cinética de primer orden, ya que en el capítulo anterior se pudo comprobar que la reacción enzimática considerada muestra este comportamiento en un amplio rango de concentraciones estudiadas. Los datos cinéticos que se usarán corresponden a los obtenidos en el capítulo 3 para Fosfolipasa A₂ inmovilizada sobre Alúmina, ya que este será el soporte empleado en las experiencias a realizar para el estudio del reactor.

4.1.2.1. FLUJO A TRAVÉS DEL REACTOR

A continuación se describe el estudio realizado con el objeto de conocer el comportamiento del flujo a través del reactor y su alejamiento o no de un sistema ideal de flujo en pistón. Para ello se determinó la distribución de tiempos de residencia de la corriente del fluido. Esta información se obtuvo por el método experimental estímulo-respuesta, caracterizando el grado de flujo no ideal por medio de la función de distribución de salida. Se estimuló al sistema mediante una perturbación y se observó la respuesta a este estímulo. El análisis de la respuesta dio información sobre el sistema.

En este trabajo el estímulo es la inyección del trazador en el fluido que entra al recipiente, mientras que la respuesta es una representación del trazador a la salida del recipiente frente al tiempo.

El sistema empleado se representa esquemáticamente en la fig. 4.1. Se trata de una columna de relleno de una capacidad volumétrica de 90 cm³ a través de la cual circula el fluido de abajo hacia arriba impulsado por una bomba peristáltica, operando a 50° C.

A causa de la pequeña granulometría del soporte inerte empleado (alúmina 70/230 mesh) se produjeron taponamientos en la columna que impedían el flujo constante a través de ella. Debido a esto se ensayaron diversos elementos, que actuaban como sostén del soporte inerte, tales como cilindros, perlas de vidrio, etc. Se evitaron así grandes canalizaciones del flujo originadas por zonas estancadas o muertas que dan lugar a amplias desviaciones del comportamiento ideal, todo lo cual originaría una serie de dificultades adicionales en la operatividad del sistema.

Se eligieron perlas de vidrio y ambos, las perlas de vidrio y la alúmina, se encontraban entremezclados a lo largo de la columna.

A través de la columna se hizo circular agua a 50° C a tres diferentes caudales utilizando una bomba peristáltica Technicon de velocidad constante, incorporando luego la inyección del trazador, (una solución de NaCl 1 %) en forma de escalón y de inyección por pulso (tabla 4.1).

De acuerdo a la respuesta obtenida a partir del trazador, se pudo observar la existencia de contacto y flujo defectuosos. Se midió la concentración a la salida de la columna por conductimetría utilizando un conductímetro HI 8733 HANNA Instruments.

Tabla 4.1: Cargas de columna (elemento de sostén + soporte) y caudales de trabajo.

Carga de la columna (g de perlas de vidrio + g de Alúmina)	Caudales (ml/min.)
80 + 40	
60 + 24	2,22
40 + 28	4,76
20 + 37	6,94
0 + 40	

4.1.2.2. RESPUESTA DEL SISTEMA

Curva E

Es evidente que los distintos elementos del fluido pueden seguir o siguen diferentes caminos a lo largo del reactor y en consecuencia los tiempos para atravesar el reactor serán distintos.

La distribución de estos tiempos en la corriente de fluido que sale del recipiente se denomina distribución de la edad a la salida E o distribución del tiempo de residencia (DTR) del fluido.

Para obtener la distribución de la edad a la salida E o DTR se realizó una inyección instantánea de 2 ml de trazador en la corriente de alimentación del reactor, repitiéndose el mismo procedimiento para todas las combinaciones posibles entre las diferentes composiciones de carga de la columna y los caudales preestablecidos para la circulación del fluido (ver tabla 4.1).

Curva F

Cuando la corriente de fluido que entra al reactor no contiene trazador alguno, y le imponemos una señal trazadora en escalón, de concentración s_0 en la corriente de fluido que entra al reactor, se denomina curva F a la curva

representativa de la concentración del trazador a la salida del recipiente (midiendo esta concentración a la salida en función de su concentración a la entrada, s/s_0) frente al tiempo.

En nuestro caso, para los distintos caudales y cargas de columnas $s_0=1\%$ NaCl según se especificó anteriormente.

Curva C

Cuando la corriente de fluido que entra al recipiente no contiene trazador alguno, y le imponemos una señal trazadora que se inyecta de modo virtualmente instantáneo (2 ml de solución 1% NaCl) y que frecuentemente se conoce con el nombre de función delta o pulsación, se denomina curva C a la respuesta normalizada del trazador en la corriente de salida frente al tiempo.

Para efectuar esta normalización dividimos la concentración por Q (el área bajo la curva concentración vs. tiempo). Se efectuó la normalización de los datos obtenidos para la curva E, calculando el área bajo dicha curva mediante integración gráfica, resultado éste que se representa con Q. Luego se divide cada ordenada de la curva E, para intervalos de 2 min por el valor Q, con lo cual obtenemos la curva C, o bien la curva E normalizada.

4.1.2.3. APLICACIÓN

Modos de emplear la información sobre la distribución de edades.

La información obtenida con el trazador se emplea directamente o en unión de los modelos de flujo, para predecir el funcionamiento del reactor de flujo.

El método usado depende, en gran parte, de que si el reactor puede considerarse como sistema lineal o se trata de un sistema no lineal.

Determinación de la linealidad del sistema

Se realizó la inyección por pulso de 2 ml de una solución al 2 % de NaCl, con un flujo de 4,76 ml/min, midiendo la conductividad en la corriente de salida.

Cálculo de la fracción no convertida para un reactor de flujo en pistón a partir de los datos cinéticos (reactor ideal)

En un proceso lineal, cualquier cambio en la magnitud del estímulo, genera un cambio proporcional en la magnitud de la respuesta. Además los distintos modelos de flujo conducen a la misma conversión.

En este caso, suponemos que cada elemento del fluido atraviesa la columna sin entremezclarse con los elementos adyacentes y la distribución de edades del material en la corriente de salida, nos indica cuánto tiempo ha permanecido en el reactor cada uno de los elementos individuales. En consecuencia, para el reactante "a" en la corriente de salida, según la ec. 4-1, tenemos:

$$S_a = \int_0^{\infty} s_i \cdot E \, dt \quad (\text{ec. 4-1})$$

Por otro lado, para reacciones irreversibles de primer orden, sin variación de densidad, la concentración del reactante en cualquier elemento varía con el tiempo de residencia según:

$$s = s_0 e^{-kt} \quad (\text{ec. 4-2})$$

De las experiencias descritas en el capítulo 3 para enzima inmovilizada sobre Alúmina, resultó:

$$k \text{ (primer orden)} = 0,0988 \text{ min}^{-1}.$$

Luego se calcula la fracción no convertida $s/s_0 = e^{-kt}$ para dicha constante de velocidad, obteniendo así la fracción no convertida para un reactor ideal de Flujo en Pistón.

Cálculo directo de la conversión a partir de la información del trazador

En el ítem anterior se calculó el rendimiento (fracción no convertida) del reactor considerando su comportamiento como el de un reactor de flujo en pistón. Luego se aplicaron dos modelos de flujo diferentes para comparar con el caso ideal:

- Cálculo de la fracción no convertida a partir de los datos obtenidos con el trazador y de la cinética de la reacción.
- Cálculo de la fracción no convertida según el modelo de dispersión cuando el grado de dispersión es grande.

Cálculo de la fracción no convertida a partir de los datos obtenidos con el trazador y de la cinética de la reacción (reactor real)

Para el reactor real considerado, la fracción no convertida, de acuerdo a las ec. 4-1 y ec. 4-2, está dada por:

$$\frac{s}{s_0} = e^{-kt} \cdot E \Delta t$$

Se calcularon las fracciones no convertidas para las experiencias realizadas con las variaciones de carga de columna y caudales (los valores de E corresponden a los normalizados).

Cálculo de la fracción no convertida según el modelo de dispersión cuando el grado de dispersión es grande.

Pueden emplearse diversos tipos de modelos para caracterizar los tipos de flujo no ideal en los recipientes.

En uno de los modelos se establece la analogía entre la mezcla en flujo real y la mezcla en los procesos difusionales; dicho modelo se denomina "de dispersión".

La retromezcla de fluido que circula en dirección x se puede describir como:

$$\frac{\delta C}{\delta t} = D \cdot \frac{\delta^2 C}{\delta x^2}$$

siendo D = coeficiente de dispersión axial.

Si se adimensionaliza la expresión

$$z = \frac{x}{L} \quad ; \quad \theta = \frac{t}{t_{\text{resid}}} = \frac{D \cdot u}{L}$$

surge el grupo adimensional D/uL .

Luego:

$$\frac{D}{uL} \rightarrow 0 \quad \text{flujo pistón}$$

$$\frac{D}{uL} \rightarrow \infty \quad \text{gran dispersión}$$

En este caso, debido a que la curva C (ver sec.1.3.2.3) es ancha y asimétrica, se aplicó el modelo antes descrito para un grado de dispersión grande en un recipiente cerrado. Por medio del cálculo del grupo adimensional D/uL , denominado "módulo de dispersión del recipiente", es posible conocer el grado de dispersión axial.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Mientras que en el capítulo 3 el objetivo fue la reacción química y su cinética, en este capítulo el objetivo primario es el estudio del reactor químico y sus condiciones de operación.

La extensión de una reacción isotérmica depende de la magnitud de la constante de velocidad, de la concentración y del tiempo de contacto.

En el caso de un reactor continuo como el nuestro, una porción del reactante se mantiene en condiciones de reacción por tiempo menor que t y otras porciones se mantendrán por un tiempo mayor, debido a esto, para nuestra reacción de primer orden, con k conocido, no es conveniente predecir la conversión usando la siguiente ecuación cinética:

$$s / s_0 = e^{-kt}$$

sin antes comprobar el apartamiento o no de las condiciones de idealidad del sistema, ya que podríamos estar incurriendo en un error apreciable, mientras que, si se conoce exactamente la distribución del tiempo de residencia o tiempo de contacto entonces se puede predecir correctamente la conversión. Para el caso de un reactor continuo de flujo en pistón todas las moléculas tienen el mismo tiempo de residencia y la respuesta detectada en el efluente será la representada en la fig. 4.2 para una señal impulso y escalón.

Los datos obtenidos a partir de las determinaciones conductimétricas de la concentración de electrolito a la salida del reactor fueron representados gráficamente en función del tiempo. Dicha representación se realizó para la respuesta de la señal impulso, (curvas E). Para la obtención de las curvas F se graficó el cociente s/s_0 (concentración instantánea/concentración inicial) vs. tiempo, tal como se describió en 4.1.2.2.

Las experiencias realizadas se reúnen en la tabla 4.2 y se muestran en las fig. 4.3 para la curva E y fig. 4.4 para la curva F.

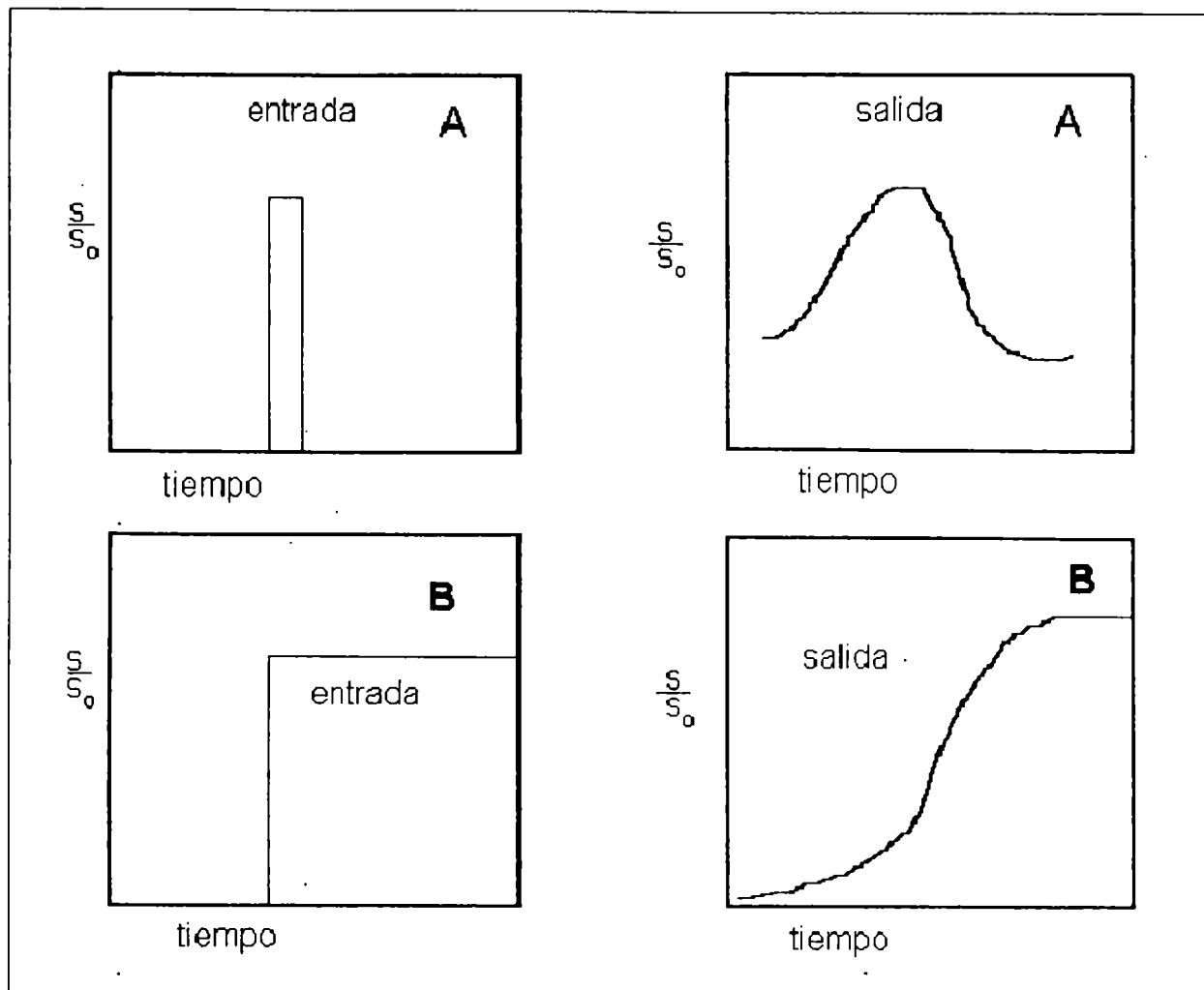


Fig. 4.2: Respuesta general de un reactor continuo de flujo en pistón: A) a un pulso de trazador, B) a una fracción escalón de un trazador (Carberry, 1980).

Tabla 4.2: Detalle de las figuras referidas a estudios de flujo en reactor (curvas E y F) para distintas cargas y caudales.

Carga de la Columna (g de Perlas de vidrio+g de Alumina)	Caudales [ml/min]					
	2,2		4,76		6,94	
	Curva E	Curva F	Curva E	Curva F	Curva E	Curva F
80 + 18	E1 fig. 4.3	F1 fig. 4.4	E6 fig. 4.3	F6 fig. 4.4	E11 fig. 4.3	F11 fig. 4.4
60 + 24	E2 " "	F2 " "	E7 " "	F7 " "	E12 " "	F12 " "
40 + 28	E3 " "	F3 " "	E8 " "	F8 " "	E13 " "	F13 " "
20 + 37	E4 " "	F4 " "	E9 " "	F9 " "	E14 " "	F14 " "
0 + 40	E5 " "	F5 " "	E10 " "	F10 " "	E15 " "	F15 " "

Procedimiento experimental: según se describe en 4.1.2.2.

Para proceder a la normalización de la curva E y así obtener la curva C (Descrita en 4.1.2.2), se calcula:

$$Q = \sum C \Delta t \quad \text{para las fig. 4.3}$$

luego

$$E_i = C_i / Q$$

CURVA NORMALIZADA = $\frac{\text{CONCENTRACION DE TRAZADOR A LA SALIDA}}{\text{CANTIDAD TOTAL DEL TRAZADOR}}$

Los resultados se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Determinación de los tiempos de residencia.

Procedimiento experimental: Según lo descrito en 4.1.2.2
 $E_i = C_i / Q$, $Q = \sum C \Delta t$, $Q =$ Cantidad total de trazador

t	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀	E ₁₁	E ₁₂	E ₁₃	E ₁₄	E ₁₅	t ²
0	0,00667	0,00729	0,0073	0,0049	0,0076	0,00492	0,0068	0,0078	0,0042	0,0198	0,0043	0,0063	0,0058	0,00429	0,00636	0
2	0,00622	0,00813	0,0084	0,0061	0,0076	0,00984	0,0059	0,0071	0,0038	0,027	0,0251	0,0072	0,0124	0,00717	0,00845	4
4	0,00622	0,00813	0,0073	0,0063	0,0076	0,021	0,0226	0,0142	0,005	0,0347	0,1166	0,056	0,0656	0,071	0,0239	16
6	0,00636	0,00729	0,0073	0,0067	0,0076	0,054	0,0587	0,0482	0,0067	0,0464	0,082	0,1	0,071	0,0766	0,0557	36
8	0,00714	0,0067	0,0073	0,0084	0,0068	0,059	0,0496	0,0507	0,0267	0,0446	0,055	0,077	0,043	0,054	0,0576	64
10	0,00939	0,00691	0,0077	0,011	0,0068	0,0492	0,041	0,0447	0,0443	0,0347	0,033	0,05	0,0393	0,0366	0,0567	100
12	0,0143	0,00729	0,0077	0,013	0,0076	0,036	0,0355	0,0386	0,05	0,0284	0,0276	0,036	0,0496	0,028	0,0477	144
14	0,0248	0,00854	0,008	0,0155	0,0076	0,0334	0,0338	0,0389	0,0451	0,0203	0,0213	0,0289	0,0467	0,0237	0,0408	196
16	0,034	0,014	0,008	0,0203	0,0087	0,0279	0,0307	0,036	0,0392	0,0169	0,019	0,023	0,033	0,0267	0,035	256
18	0,041	0,0228	0,008	0,0203	0,011	0,0235	0,025	0,033	0,036	0,0158	0,015	0,019	0,025	0,0258	0,0293	324
20	0,0376	0,037	0,0088	0,0155	0,014	0,0195	0,0226	0,0294	0,0322	0,067	0,014	0,016	0,0182	0,024	0,0239	400
22	0,035	0,0455	0,015	0,0144	0,016	0,0167	0,0208	0,0254	0,0284	0,018	0,0123	0,0126	0,0138	0,0208	0,0199	484
24	0,0315	0,0435	0,0226	0,015	0,023	0,0145	0,0208	0,0218	0,0251	0,0189	0,01	0,0099	0,01	0,017	0,0156	576
26	0,0263	0,0366	0,0292	0,02	0,0255	0,0138	0,0203	0,0187	0,0217	0,0207	0,0093	0,0081	0,0088	0,0153	0,0127	676
28	0,026	0,034	0,0379	0,0238	0,028	0,0138	0,0189	0,0171	0,02	0,0207	0,0088	0,0072	0,008	0,0112	0,01	784
30	0,024	0,0293	0,04	0,029	0,032	0,014	0,017	0,0145	0,0184	0,0198	0,0075	0,0063	0,0073	0,00926	0,00897	900
32	0,021	0,0356	0,035	0,0309	0,031	0,014	0,0155	0,0124	0,0171	0,0185	0,0075	0,006	0,0066	0,00865	0,00815	1024
34	0,0197	0,0138	0,035	0,0387	0,03	0,0138	0,0135	0,0102	0,0159	0,017	0,007	0,0056	0,0066	0,00789	0,00722	1156
36	0,018	0,0215	0,0322	0,044	0,0255	0,0133	0,0113	0,0086	0,015	0,015	0,0155	0,0063	0,0061	0,00718	0,00693	1296
38	0,0158	0,02	0,0285	0,031	0,0287	0,013	0,0094	0,0069	0,0134	0,0141	0,0058	0,0051	0,0058	0,00703	0,00686	1444
40	0,0158	0,018	0,0277	0,0244	0,029	0,0123	0,0078	0,0058	0,0115	0,012	0,005	0,005	0,0058	0,00645	0,00626	1600
42	0,015	0,017	0,0263	0,0232	0,0279	0,0117	0,0071	0,0052	0,01	0,0099	0,005	0,0049	0,0058	0,00574	0,00596	1764
44	0,0147	0,0163	0,0234	0,0215	0,0273	0,011	0,0064	0,0048	0,01	0,0086	0,0038	0,004	0,0055	0,00528	0,00557	1936
46	0,0144	0,0154	0,0219	0,02	0,027											2116
48	0,0143	0,0148	0,02	0,018	0,0273											2304
50	0,0146	0,0138	0,0197	0,0167	0,0279											2500
	1478,76	1919,46	1370	1292,8	1323,4	2032,06	2216	1970,3	1995,8	2017,4	1246,3	1231,4	1286,1	1305,92	1571,56	
	Q ₁	Q ₂	Q ₃	Q ₄	Q ₅	Q ₆	Q ₇	Q ₈	Q ₉	Q ₁₀	Q ₁₁	Q ₁₂	Q ₁₃	Q ₁₄	Q ₁₅	

La curva C nos pueden informar sobre la existencia de contacto y flujos defectuosos en nuestro equipo de proceso. Las gráficas de las curvas E₁ a la E₃ de las fig. 4.3 nos conducen, por medio de la normalización, a una curva C en la posición correcta con un ancho no demasiado grande, por consiguiente no presenta anomalía alguna.

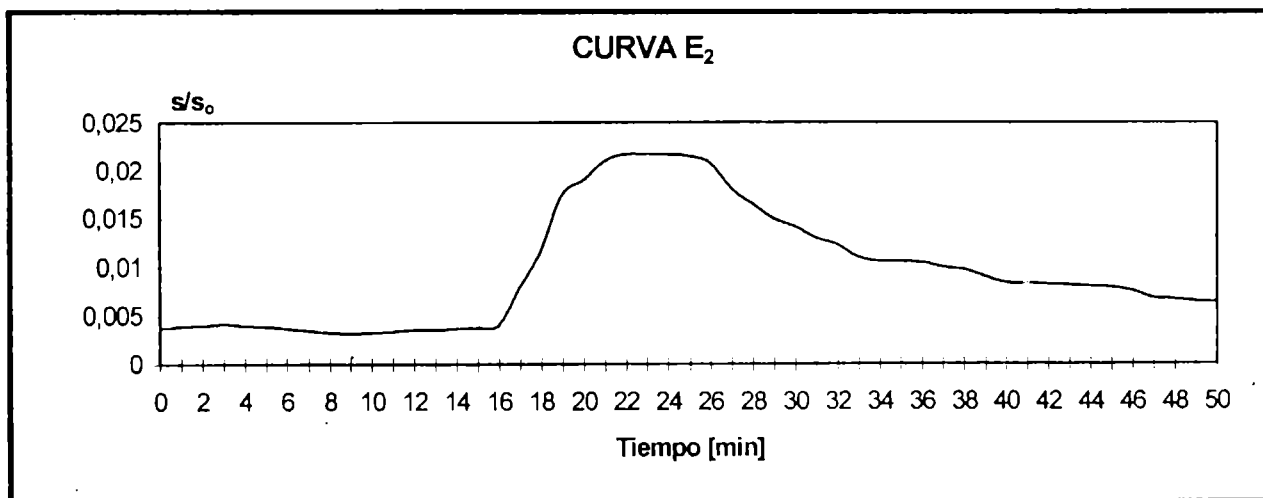
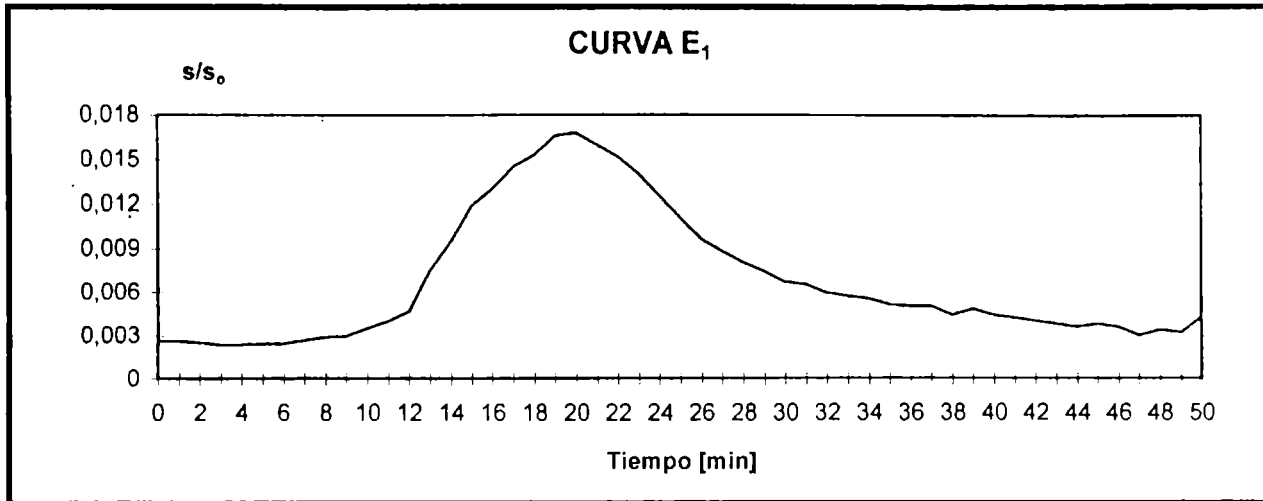


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

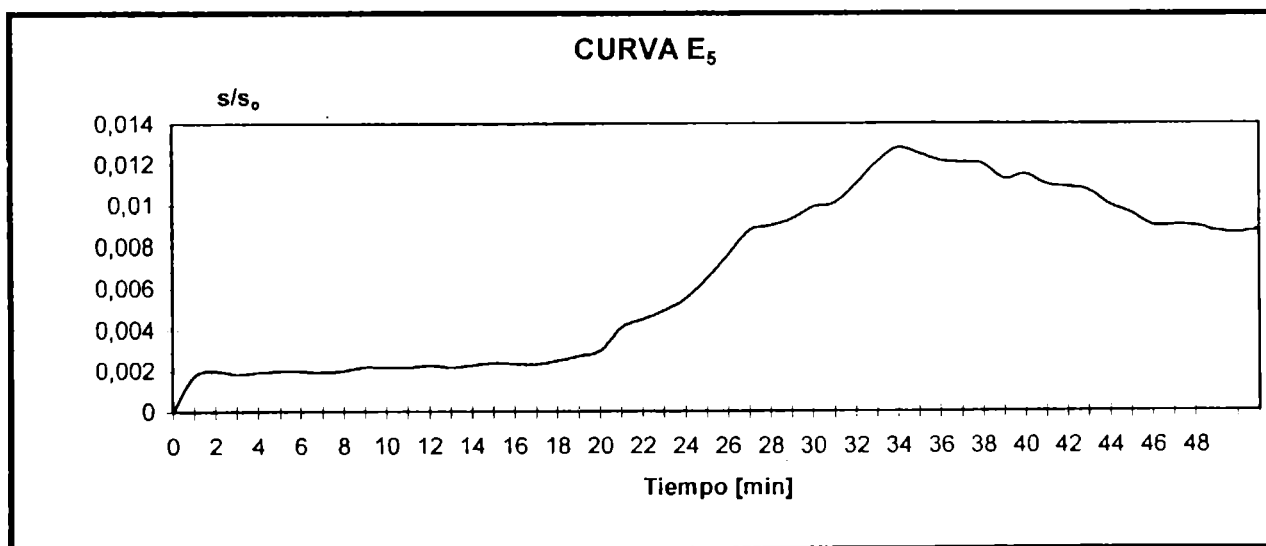
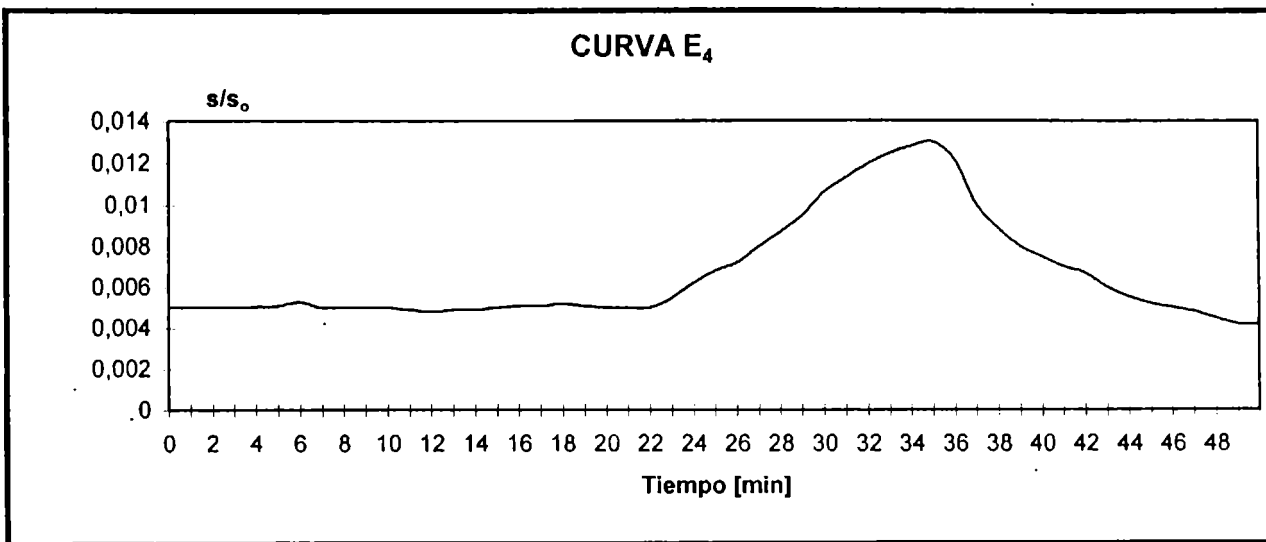
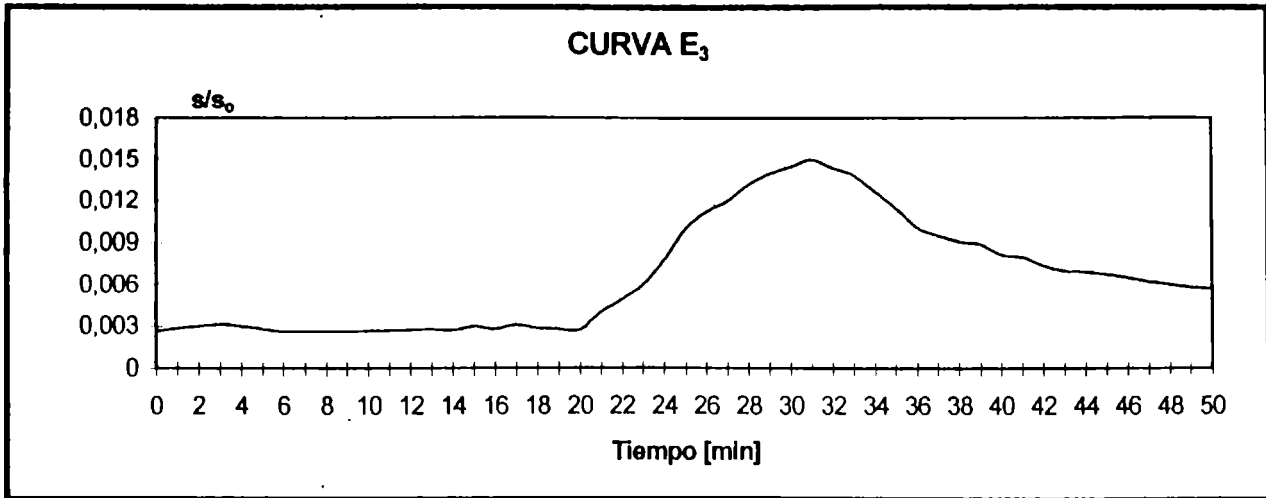


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

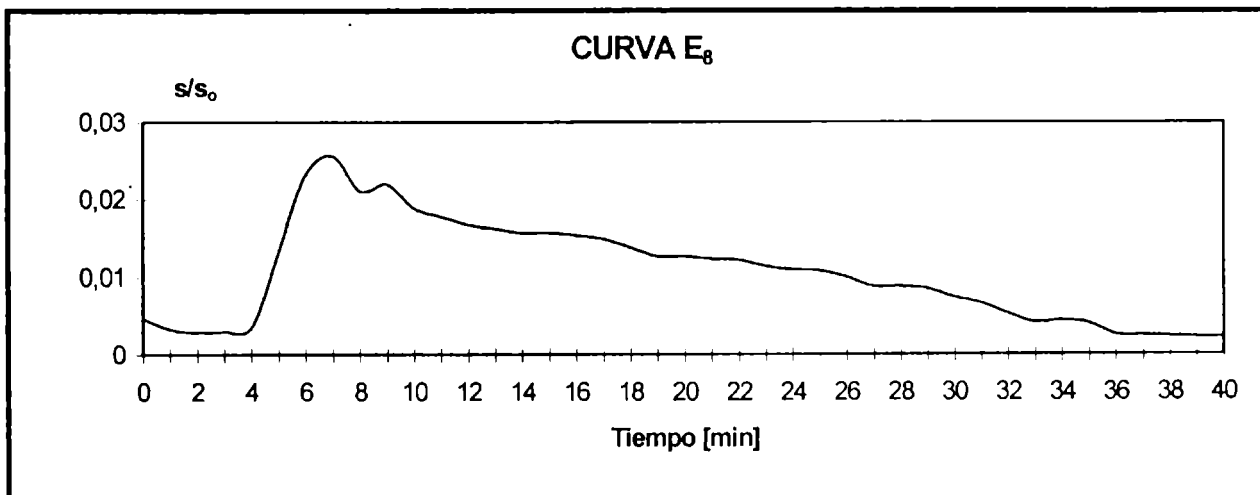
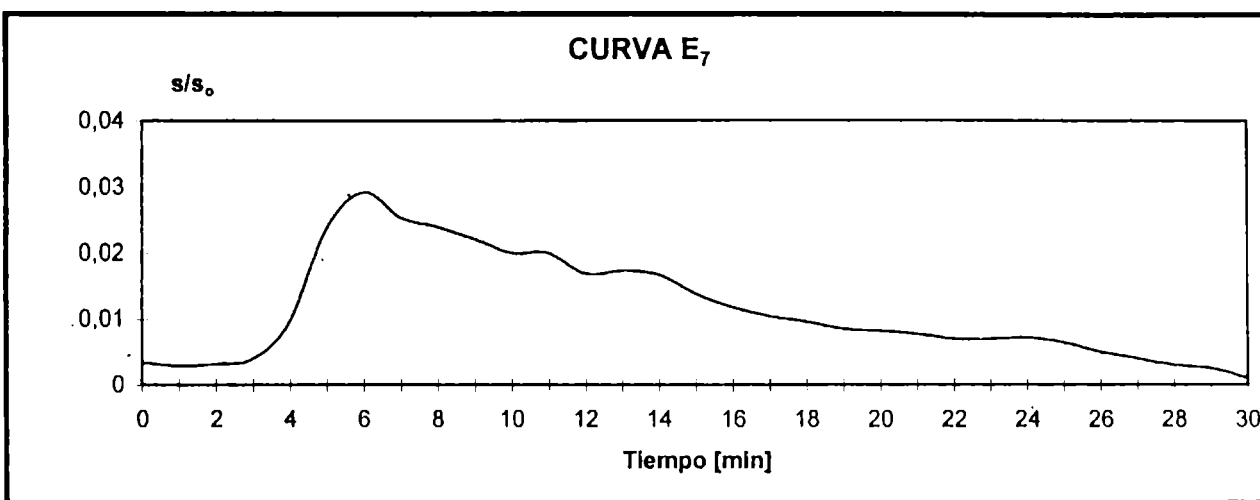
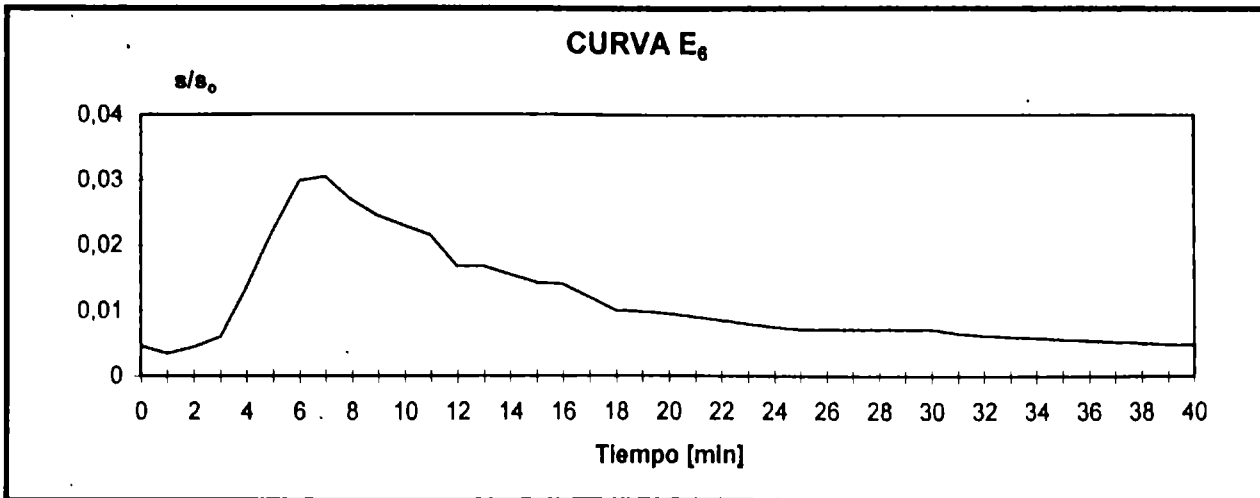


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

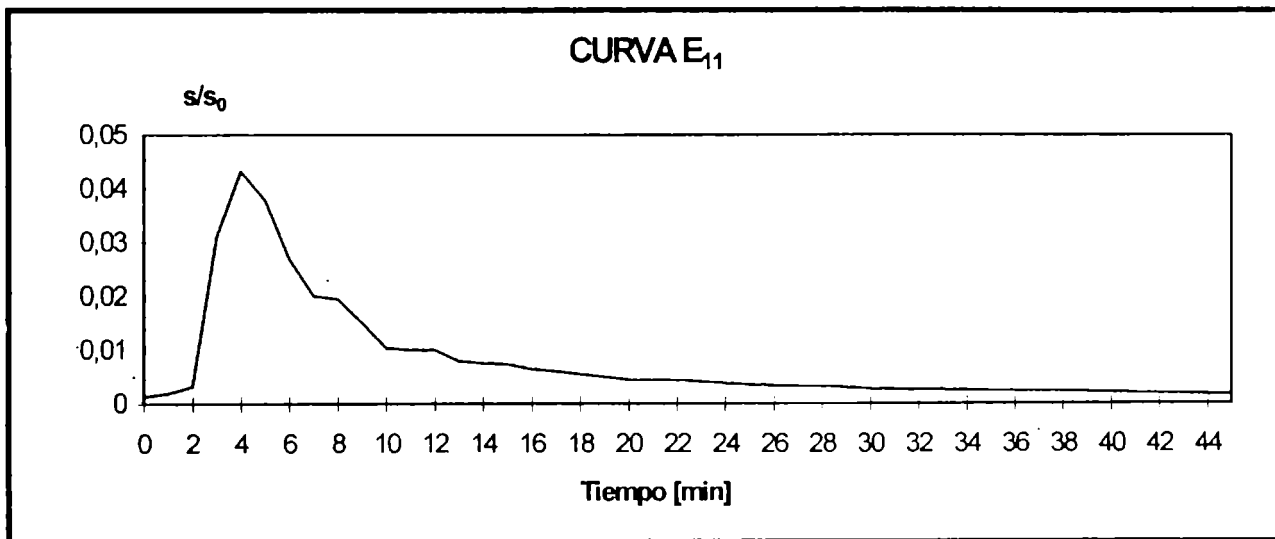
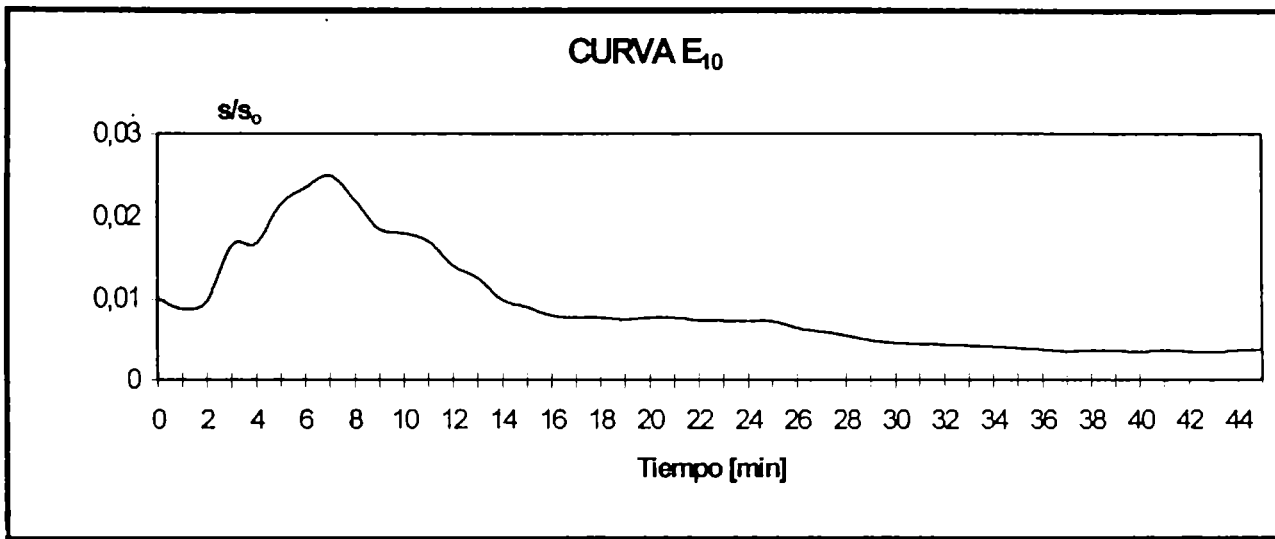
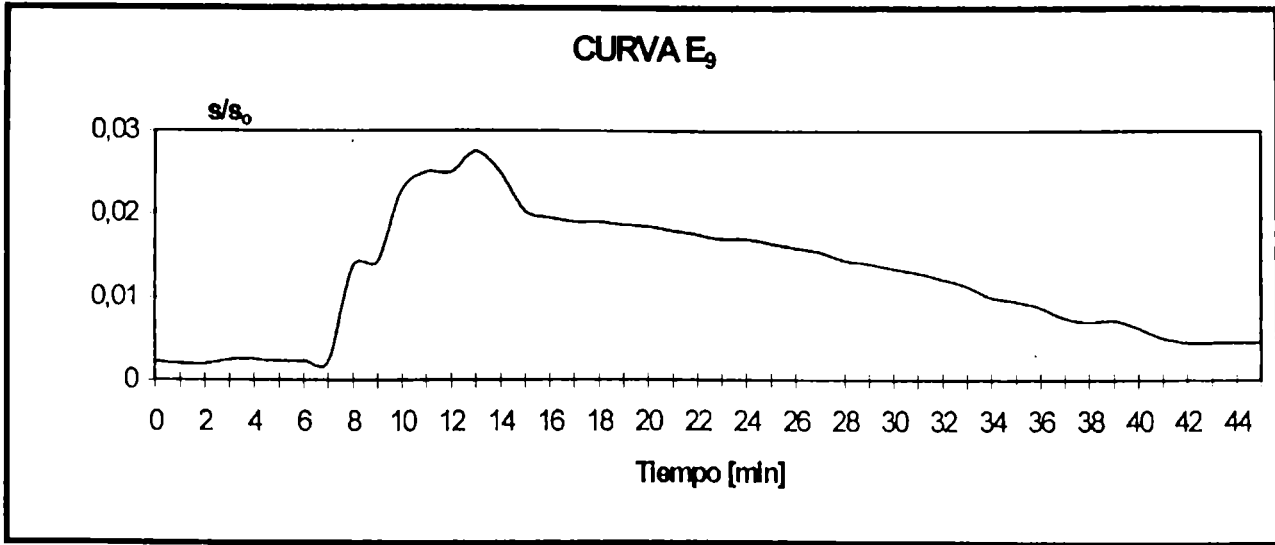


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

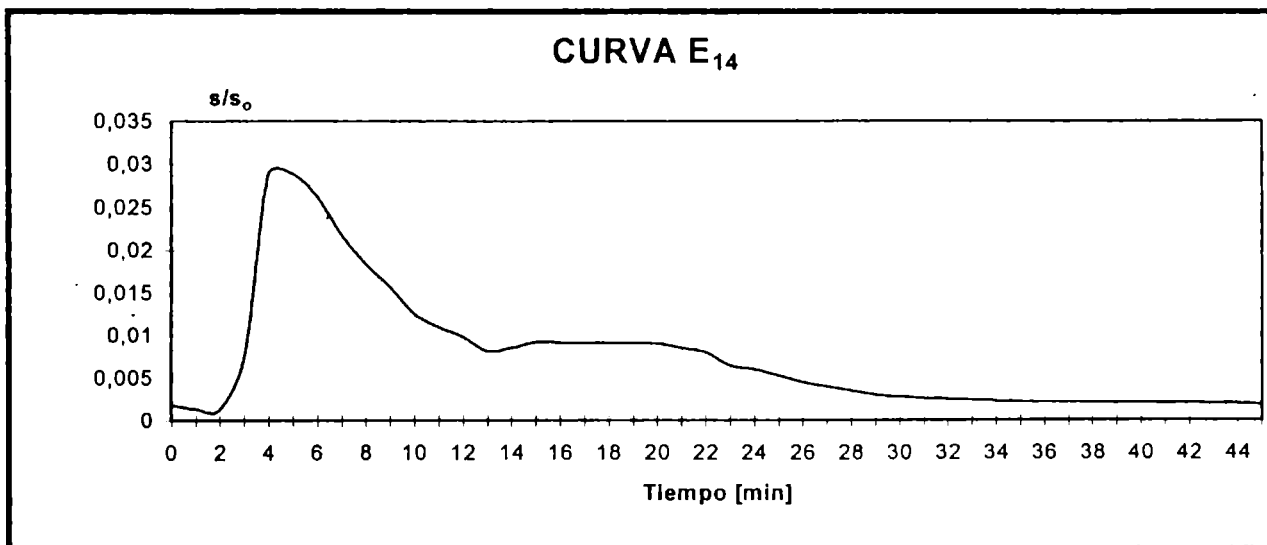
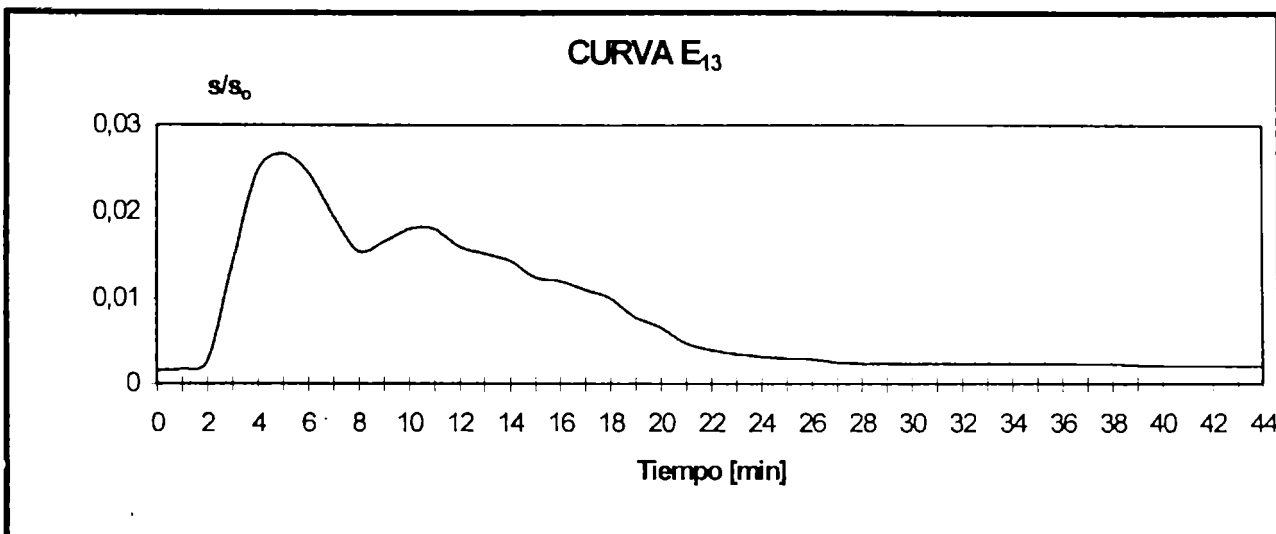
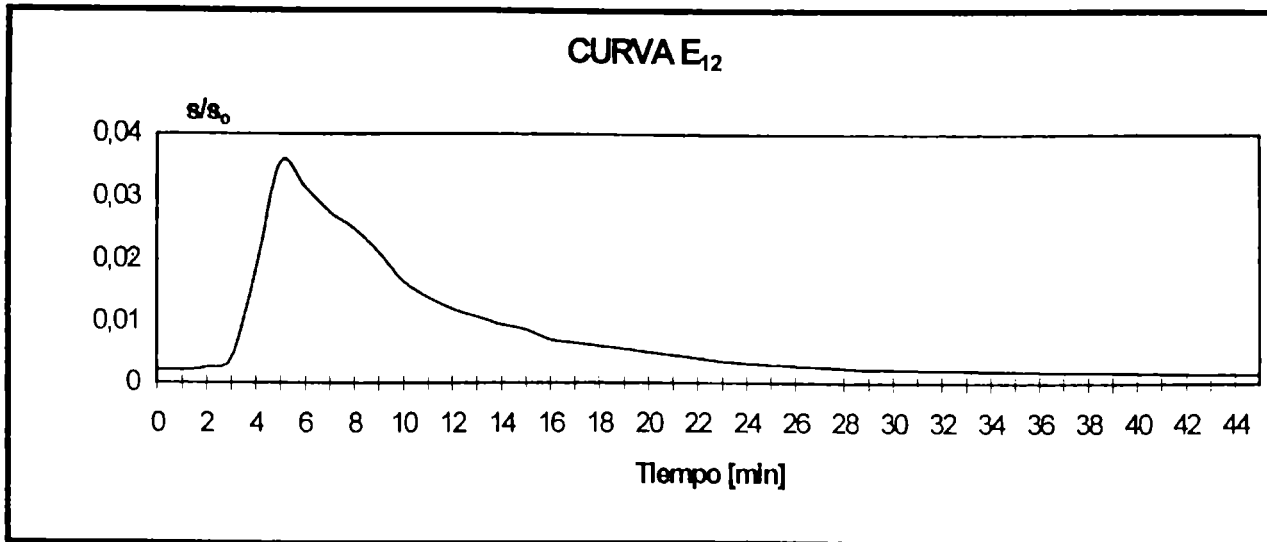


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

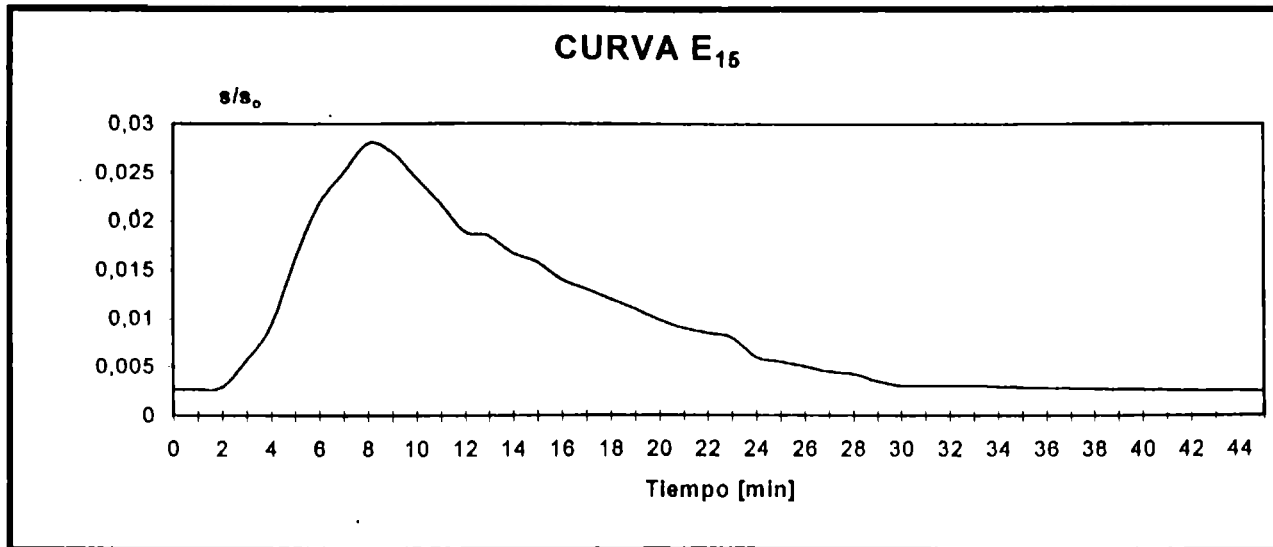


Figura 4.3: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas E).

Referencia en tabla 4.2

En las gráficas 4.3 E₆ a la E₁₅ el trazador aparece antes de lo esperado lo que indica que el flujo pasa a través de canalizaciones y existen regiones estancadas en el reactor.

En las gráficas 4.3 E₄ y E₅ se muestra que el trazador aparece después de lo esperado y se pueden dar tres explicaciones a este comportamiento: el error en la medida del caudal, error en el volumen disponible para el fluido (es posible que no se haya tenido en cuenta la fracción hueca o el volumen de las conducciones que van al aparato de medida), o el trazador no es inerte sino que es absorbido o retenido en la superficie.

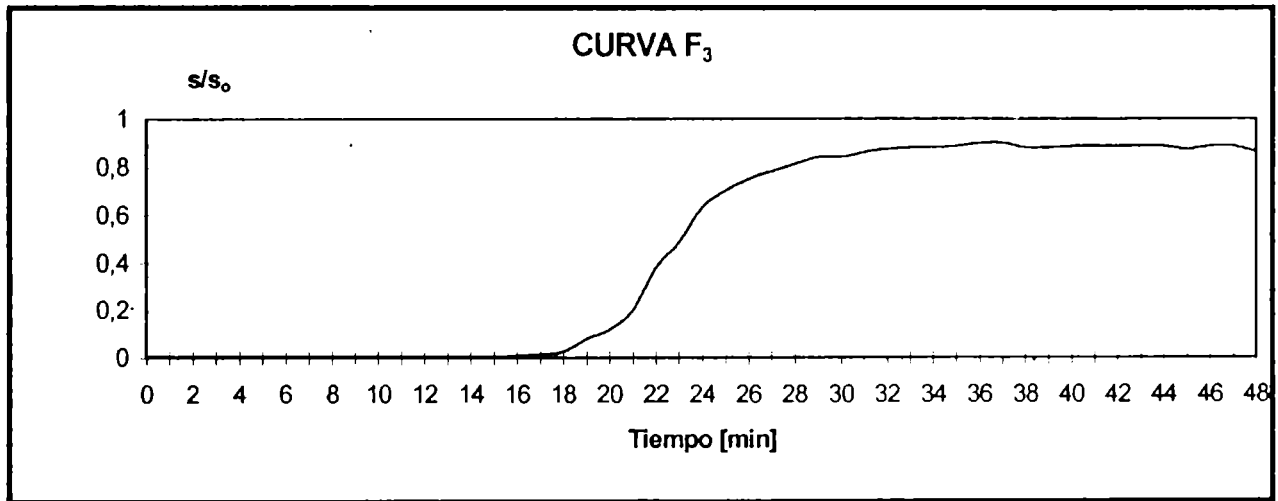
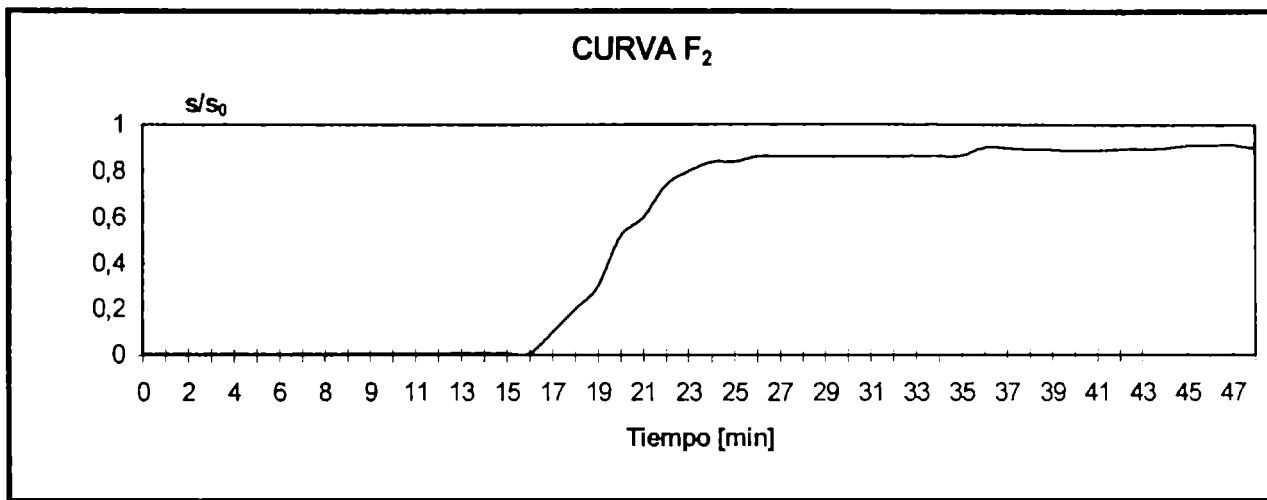
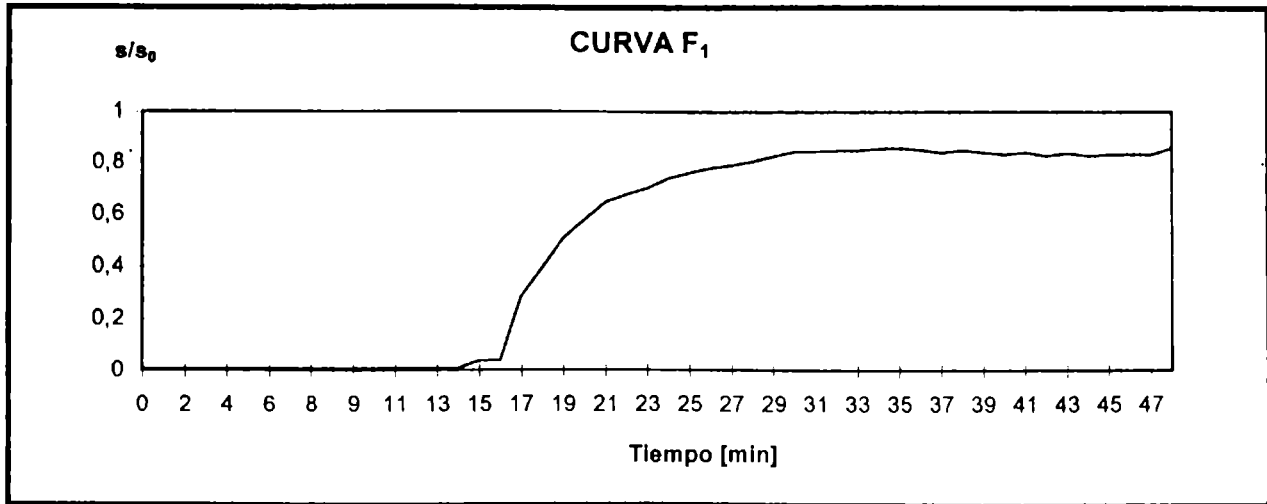


Fig. 4.4: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas F).

Referencias en tabla 4.2.

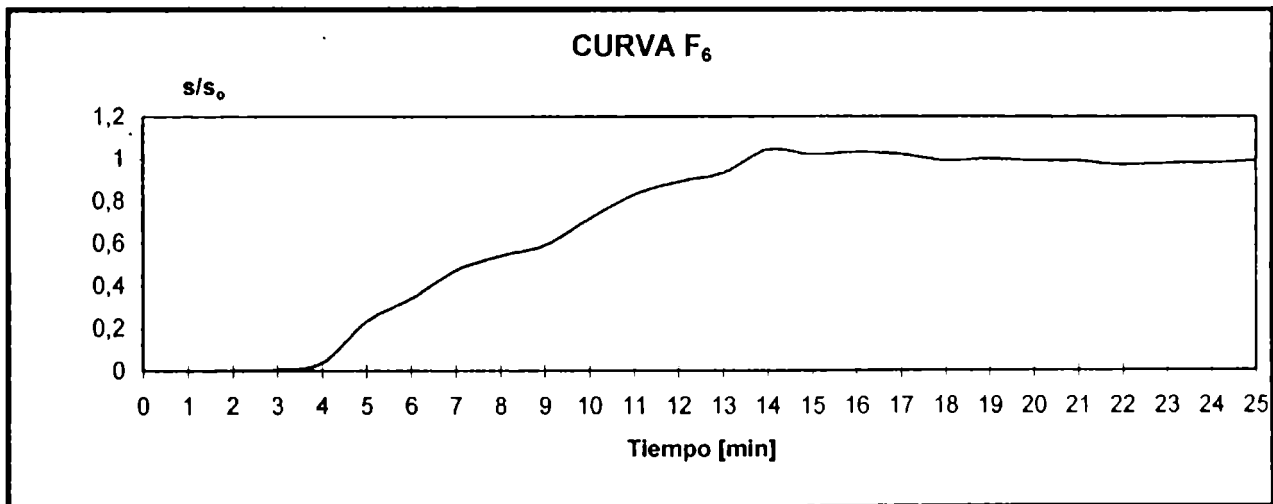
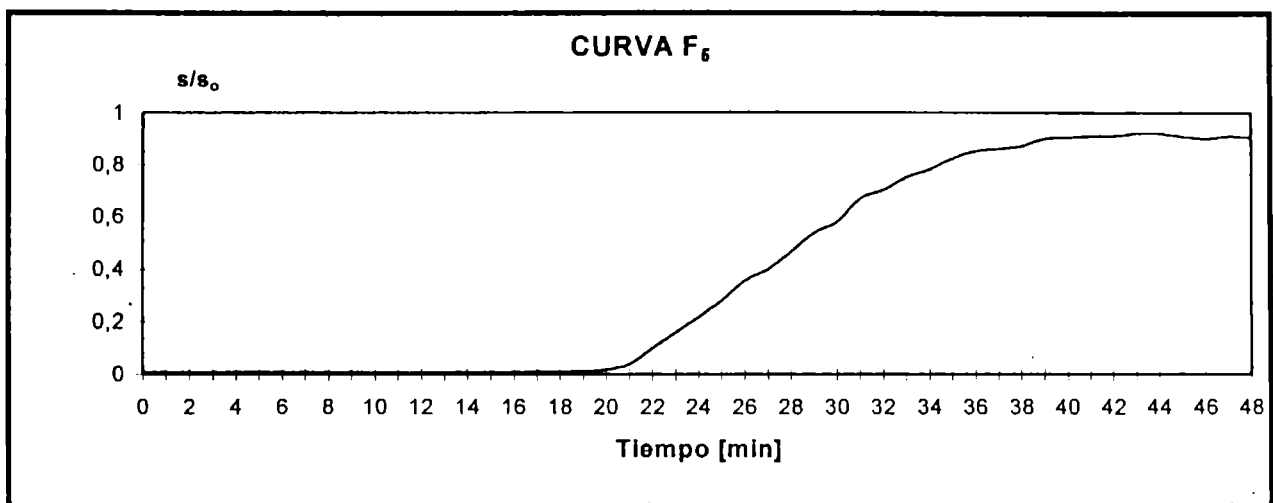
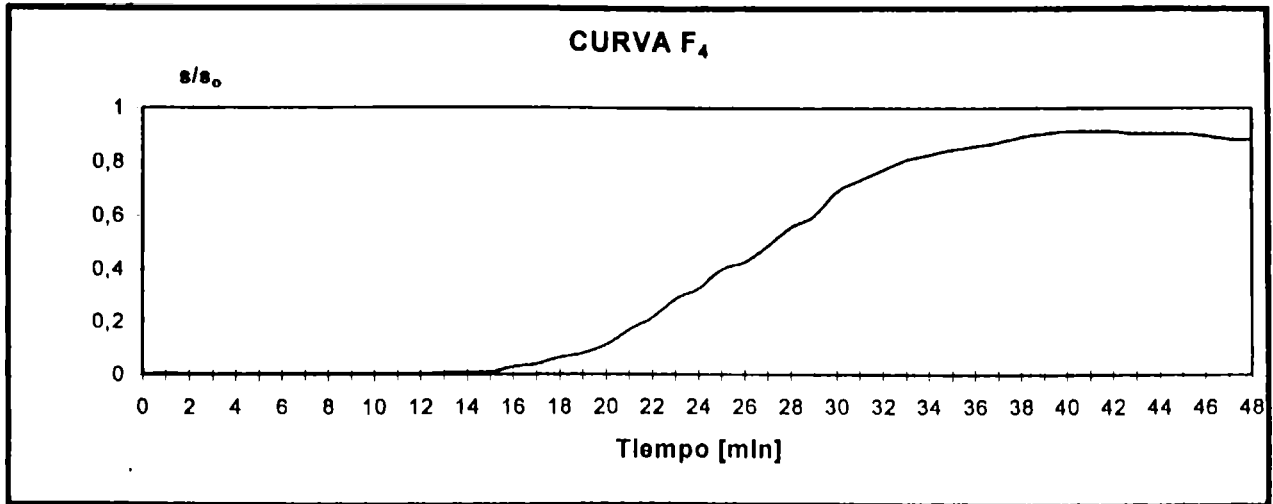


Fig. 4.4: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas F).

Referencias en tabla 4.2.

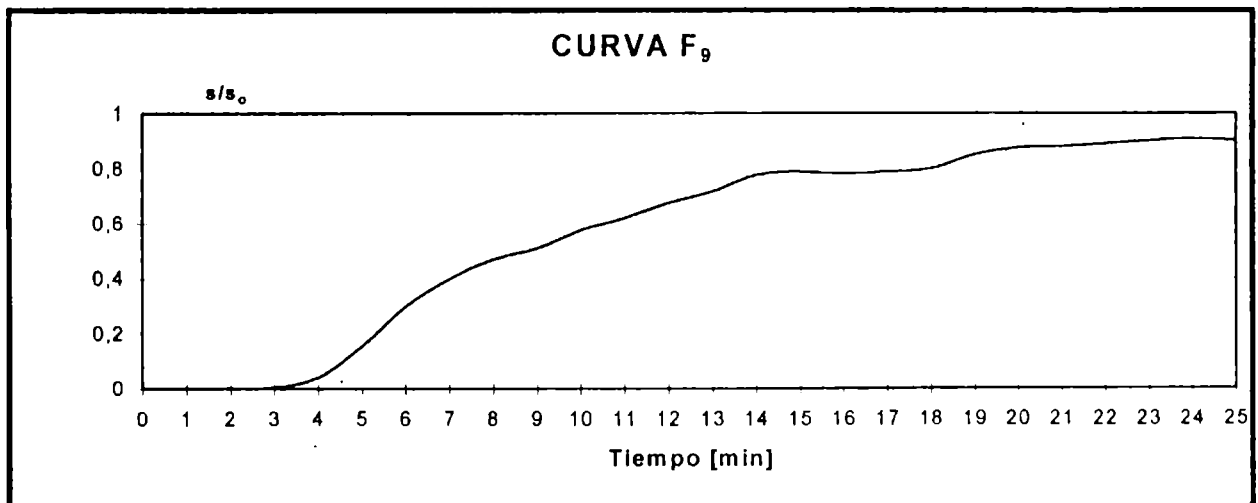
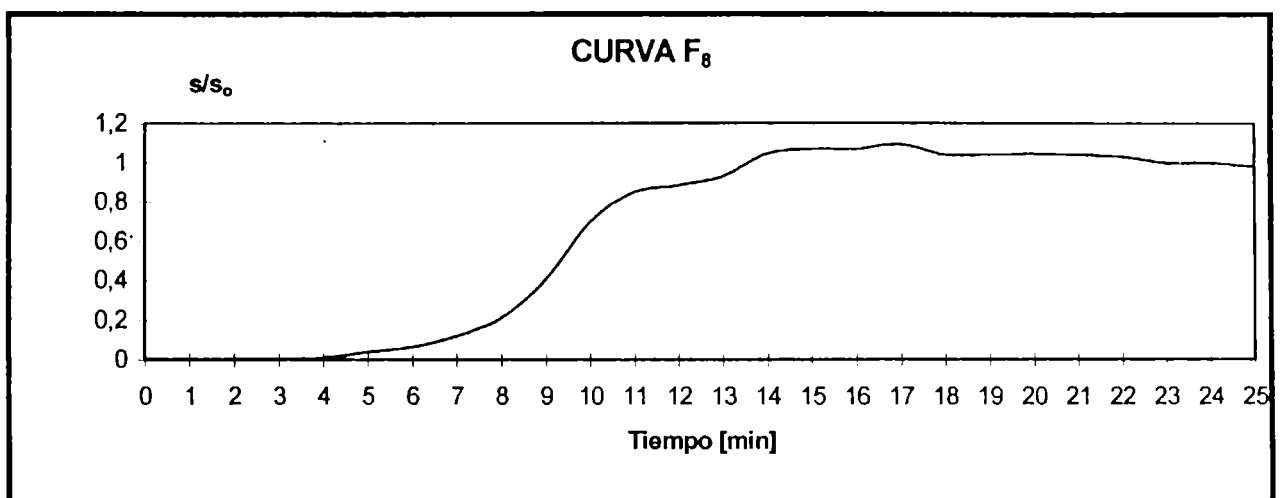
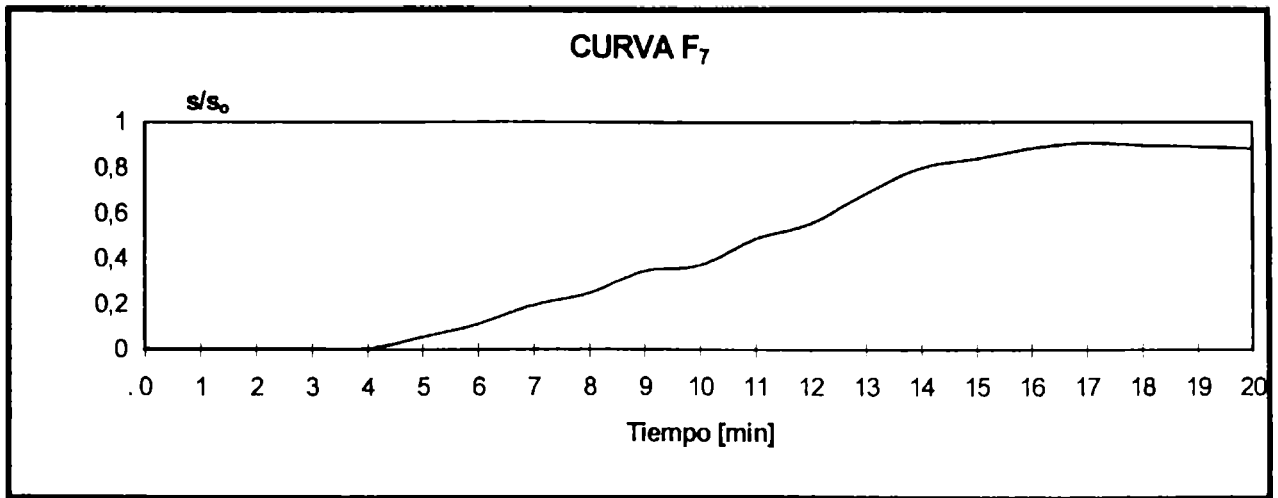


Fig. 4.4: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas F).

Referencias en tabla 4.2.

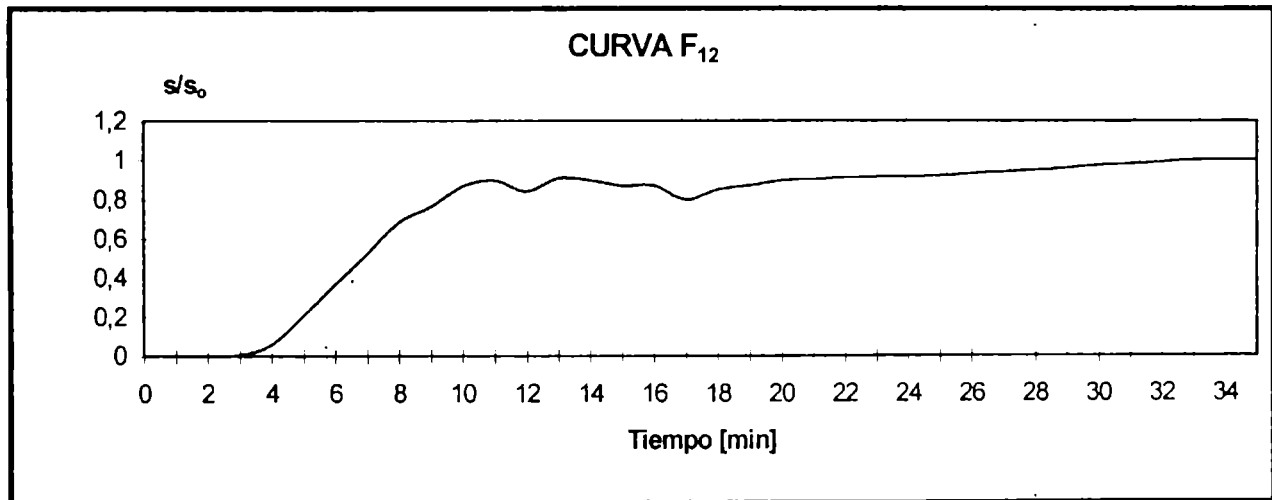
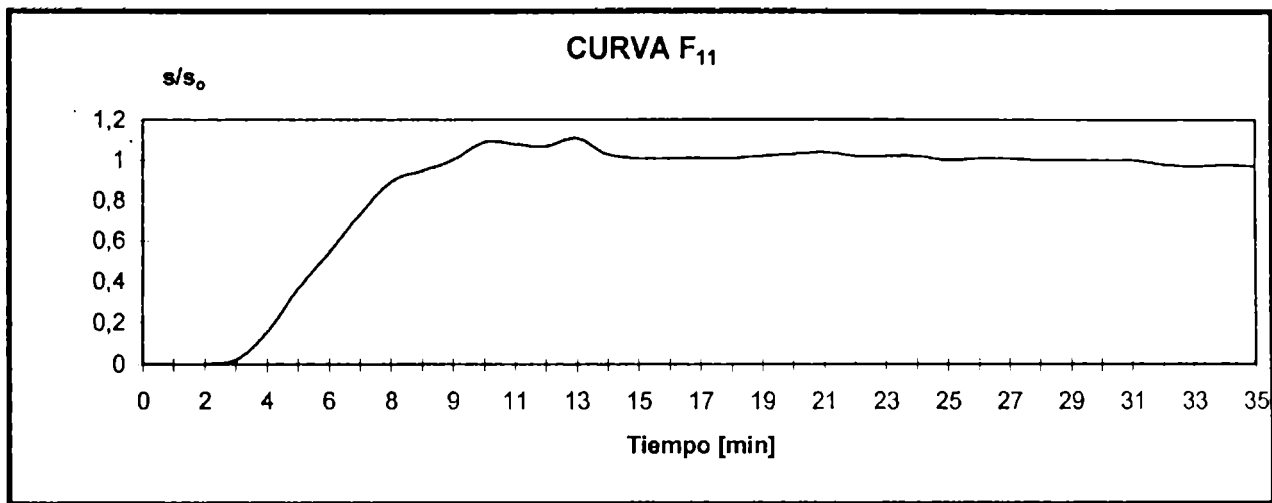
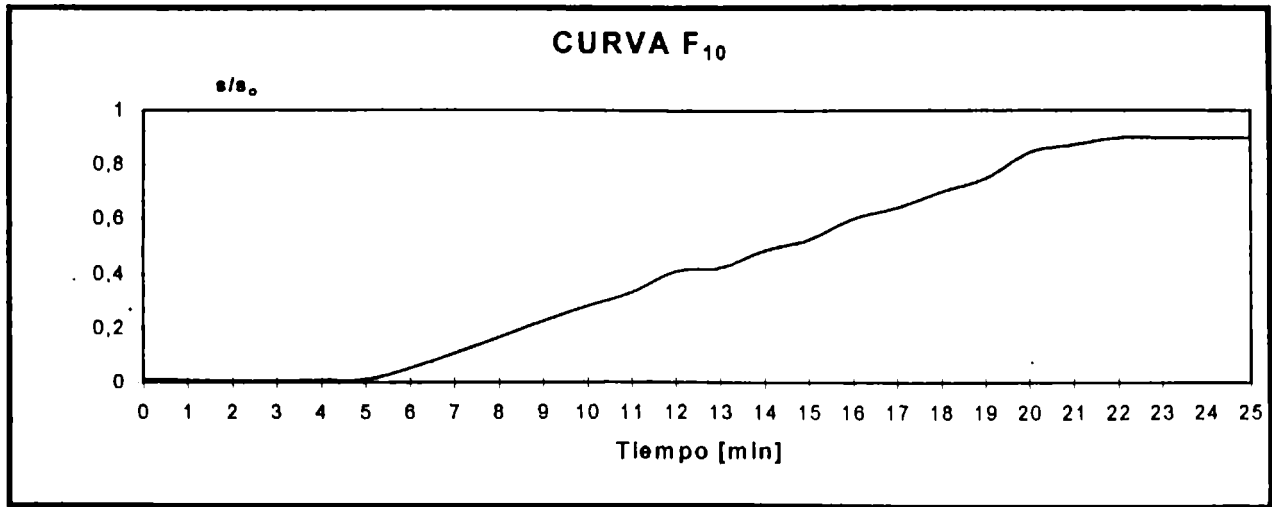


Fig. 4.4: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas F).

Referencias en tabla 4.2.

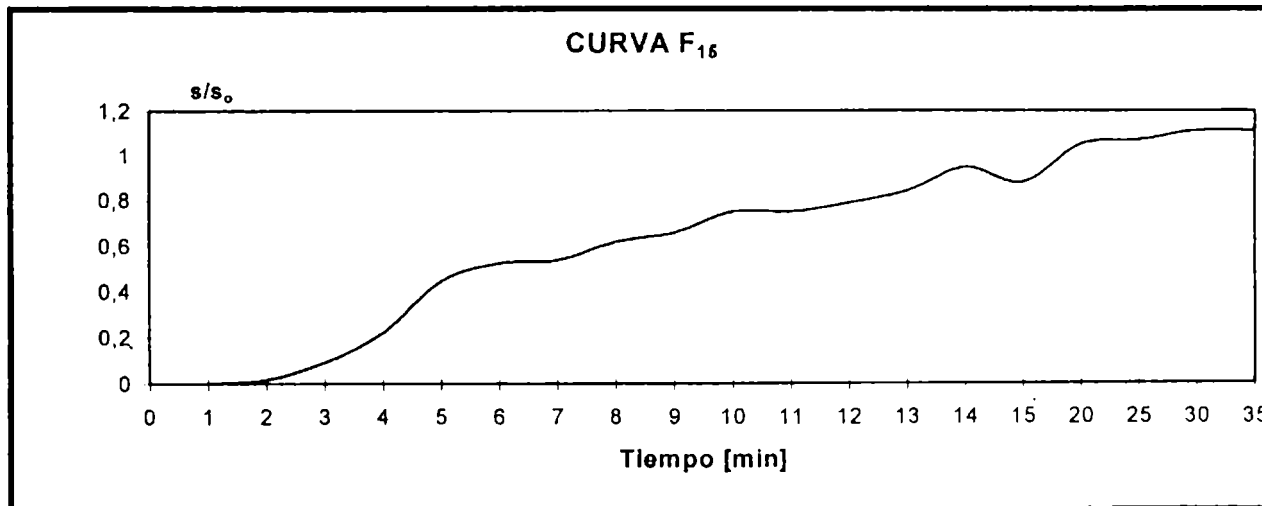
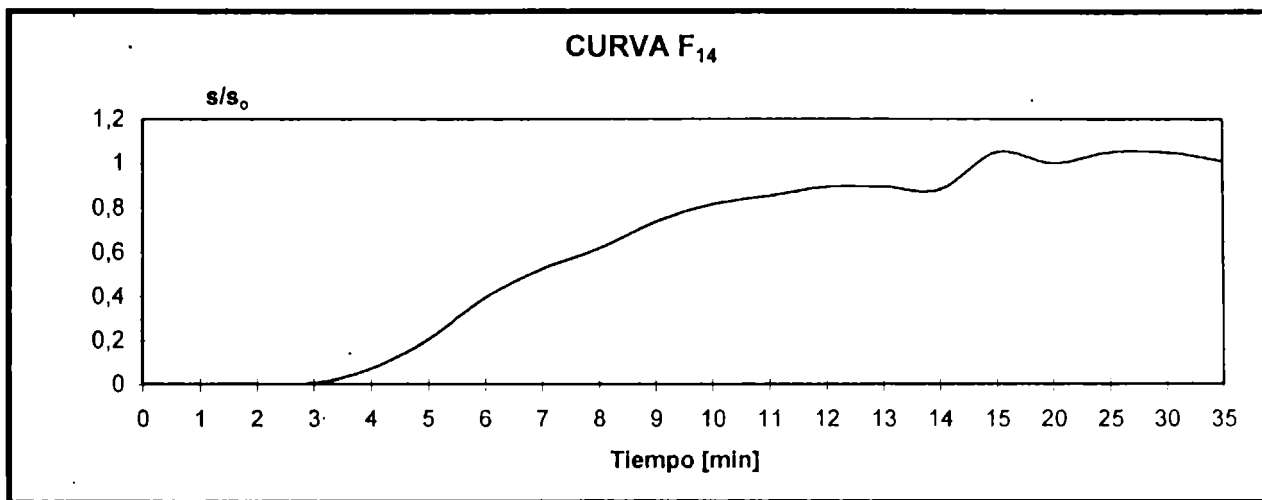
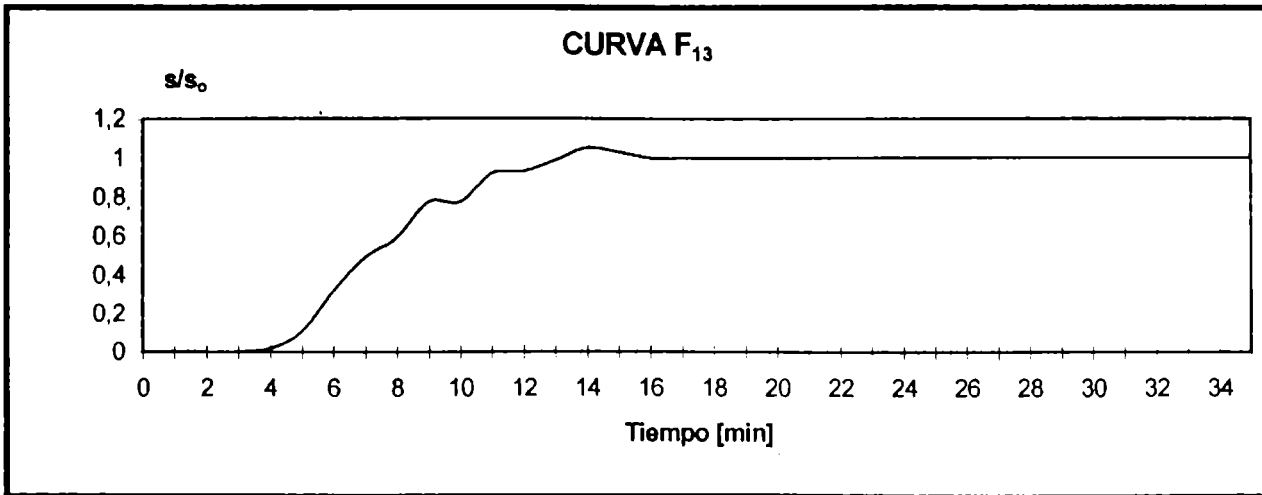


Fig. 4.4: Estudios de flujo para distintas cargas y caudales (Curvas F).

Referencias en tabla 4.2.

DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL PROCESO.

Un proceso es lineal si cualquier cambio en la magnitud del estímulo produce un cambio proporcional en la magnitud de la respuesta. Es decir:

$$\frac{d(\text{respuesta})}{d(\text{estímulo})} = \text{CONSTANTE}$$

Los procesos lineales presentan la propiedad siguiente, de gran utilidad para el cálculo de reactores: si en un sistema ocurren simultáneamente varios procesos lineales independientes, el efecto global también será un proceso lineal. Por otra parte, el efecto total de estos procesos lineales individuales que ocurren simultáneamente en un sistema, pueden analizarse estudiando separadamente cada uno de los procesos. Esta propiedad no la presentan los procesos no lineales, de aquí que éstos hayan de estudiarse en su situación total y su comportamiento no pueda predecirse a partir de cada uno de sus procesos constituyentes.

Se realizó la experiencia indicada en 4.1.2.3 y como puede observar en la fig. 4.5, la concentración del trazador a la salida se duplica cuando se duplica la concentración de entrada, lo que nos permitió afirmar que el sistema tiene comportamiento lineal.

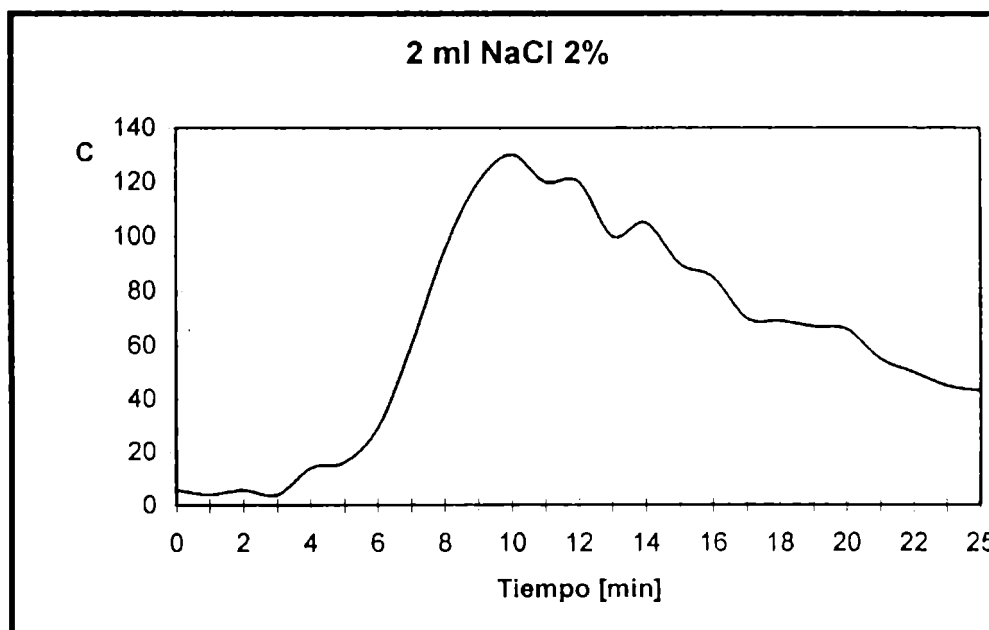
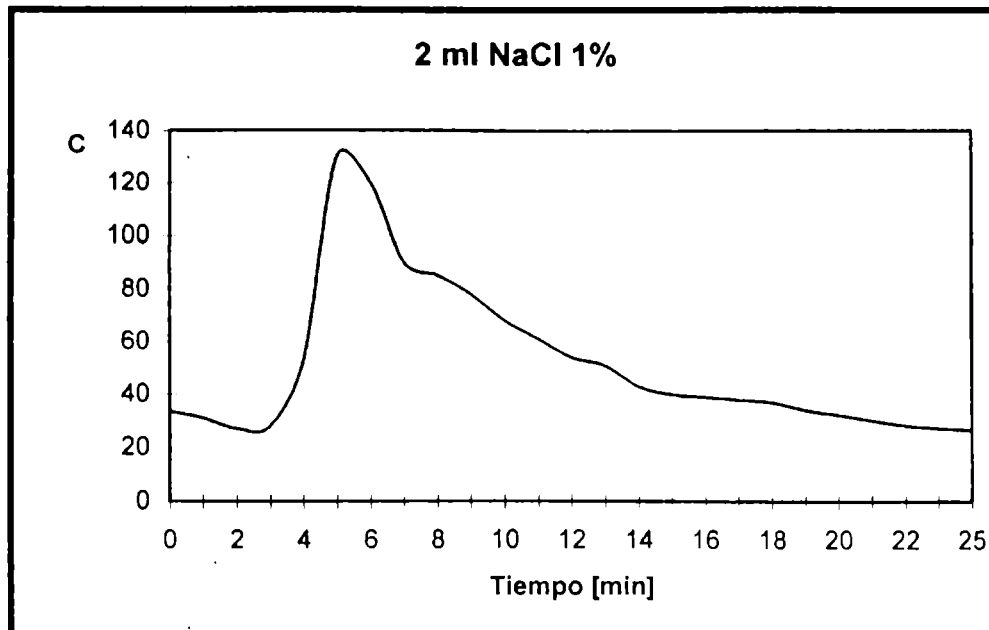


Fig. 4.5: Determinación de la linealidad de la respuesta del reactor.

Procedimiento experimental: Según descrito en 4.1.2.3

ANALISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL FLUJO A TRAVES DEL REACTOR

Los datos obtenidos al circular el trazador por nuestro reactor, nos dan idea del comportamiento real del mismo.

Para poder medir el apartamiento de la idealidad, se realizó la siguiente comparación:

Se calculó la fracción no convertida s/s_0 para el caso de un reactor de flujo en pistón (caso ideal) para la cinética de primer orden obtenida según 3.1.2.4 para el caso de enzimas inmovilizadas sobre Alúmina.

Como se dijo anteriormente, la ecuación para cinética de primer orden y en el caso de un reactor de flujo en pistón es:

$$s/s_0 = e^{-kt}$$

Ya que la respuesta del trazador se analiza por un período de 52 min en todos los casos, se tomó un tiempo medio de 26 min, obteniéndose:

$$s/s_0 = 0,0766$$

Este valor de fracción no convertida correspondería a la cinética de primer orden propuesta si el comportamiento fuese ideal. Dicha fracción no convertida es la mínima posible de obtener con esa cinética.

Luego se midió el apartamiento de la idealidad del comportamiento de nuestro reactor comparando los resultados de fracción no convertida del caso ideal con dos modelos de flujo:

- A) Se calculó la fracción no convertida s/s_0 a partir de los datos obtenidos para nuestro reactor mediante la información proporcionada por el trazador (tabla 4.3), y empleando la constante de velocidad obtenida anteriormente en el capítulo 3:

$$s/s_0 = e^{-k \cdot E \cdot \Delta t}$$

En las tablas 4.4 se muestran los valores de fracción no convertida s/s_0 para todos los caudales y composiciones de relleno de columna (curvas E normalizadas en la tabla 4.3). Como puede observarse, los valores de fracción no convertida para nuestro reactor, según los ensayos realizados con el trazador, difieren bastante de la s/s_0 calculada suponiendo comportamiento ideal; basándonos en la cinética de la reacción de hidrólisis, con la constante de velocidad obtenida en el capítulo 3. Este comportamiento se ve acentuado con el aumento del caudal de circulación a través de la columna.

La tabla 4.5 resume los valores de fracción no convertida para todas las condiciones antes mencionados (los indicados en tabla 4.2). El valor de s/s_0 se calcula realizando la sumatoria de las fracciones no convertidas para cada Δt desde $t=0$ hasta el final de cada ensayo.

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁.

t	E ₁	exp(-k.t)Δt.E
0	0,00667	0
2	0,00622	0,01020948
4	0,00622	0,0083789
6	0,00636	0,00703133
8	0,00714	0,00647831
10	0,00939	0,00699218
12	0,0143	0,0087391
14	0,0248	0,01243843
16	0,034	0,01399511
18	0,041	0,01385047
20	0,0376	0,01042442
22	0,035	0,00796371
24	0,0315	0,00588222
26	0,0263	0,0040306
28	0,026	0,00327018
30	0,024	0,00247738
32	0,021	0,00177903
34	0,0197	0,00136966
36	0,018	0,00102708
38	0,0158	0,0007399
40	0,0158	0,00060723
42	0,015	0,00047312
44	0,0147	0,00038052
46	0,0144	0,00030592
48	0,0143	0,00024933
50	0,0146	0,00020891
	Σ s/s₀	0,12930254

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₂.

t	E₂	exp(-kt)Δt.E
0	0,00729	0
2	0,00813	0,01334455
4	0,00813	0,01095185
6	0,00729	0,00805949
8	0,0067	0,00607909
10	0,00691	0,00514547
12	0,00729	0,00445511
14	0,00854	0,00428323
16	0,014	0,00576269
18	0,0228	0,00770221
20	0,037	0,01025807
22	0,0455	0,01035283
24	0,0435	0,00812307
26	0,0366	0,00560913
28	0,034	0,00427638
30	0,0293	0,00302447
32	0,0356	0,00301588
34	0,0138	0,00095946
36	0,0215	0,00122679
38	0,02	0,00093658
40	0,018	0,00069178
42	0,017	0,0005362
44	0,0163	0,00042194
46	0,0154	0,00032717
48	0,0148	0,00025804
50	0,0138	0,00019747
	Σ s/s₀	0,11599896

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₃.

t	E ₃	exp(-kt)Δt.E
0	0,0073	0
2	0,00839	0,01377131
4	0,0073	0,00983376
6	0,0073	0,00807055
8	0,0073	0,00662348
10	0,00766	0,00570395
12	0,00766	0,00468122
14	0,00803	0,00402744
16	0,00803	0,00330531
18	0,00803	0,00271267
20	0,00876	0,00242867
22	0,015	0,00341302
24	0,0226	0,00422026
26	0,0292	0,00447504
28	0,0379	0,00476691
30	0,04	0,00412896
32	0,035	0,00296505
34	0,035	0,00243341
36	0,0322	0,00183733
38	0,0285	0,00133463
40	0,0277	0,00106458
42	0,0263	0,00082954
44	0,0234	0,00060573
46	0,0219	0,00046526
48	0,02	0,00034871
50	0,0197	0,00028189
	Σ s/s₀	0,0943287

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₄.

t	E ₄	exp(-kt)Δt.E
0	0,00487	0
2	0,00611	0,01002893
4	0,00634	0,00854055
6	0,00673	0,00744038
8	0,00843	0,00764876
10	0,011	0,00819105
12	0,013	0,00794463
14	0,0155	0,00777402
16	0,0203	0,0083559
18	0,0203	0,00685767
20	0,0155	0,0042973
22	0,0144	0,0032765
24	0,015	0,00280106
26	0,02	0,0030651
28	0,0238	0,00299347
30	0,029	0,0029935
32	0,0309	0,00261772
34	0,0387	0,00269066
36	0,044	0,00251064
38	0,031	0,0014517
40	0,0244	0,00093775
42	0,0232	0,00073176
44	0,0215	0,00055655
46	0,02	0,00042489
48	0,018	0,00031384
50	0,0167	0,00023896
	Σ s/s_o	0,1046833

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E_s.

t	E _s	exp(-kt)Δt.E
0	0,0076	0
2	0,0076	0,01247461
4	0,0076	0,01023789
6	0,00756	0,00835799
8	0,0068	0,00616982
10	0,0068	0,00506356
12	0,00756	0,00462011
14	0,00756	0,00379171
16	0,00869	0,00357698
18	0,011	0,00371598
20	0,014	0,00388143
22	0,016	0,00364055
24	0,023	0,00429496
26	0,0255	0,003908
28	0,028	0,00352173
30	0,032	0,00330317
32	0,031	0,00262619
34	0,03	0,00208578
36	0,0255	0,00145503
38	0,0287	0,00134399
40	0,029	0,00111454
42	0,0279	0,00088001
44	0,0273	0,00070669
46	0,027	0,0005736
48	0,0273	0,00047599
50	0,0279	0,00039923
	Σ s/s_o	0,09221955

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E_6 .

t	E_6	$\exp(-kt)\Delta t.E$
0	0,00492	0
2	0,00984	0,01615134
4	0,021	0,0282889
6	0,054	0,05969995
8	0,059	0,05353227
10	0,0492	0,03663635
12	0,036	0,02200052
14	0,0334	0,01675176
16	0,0279	0,01148422
18	0,0235	0,00793868
20	0,0195	0,00540628
22	0,0167	0,00379983
24	0,0145	0,00270769
26	0,0138	0,00211492
28	0,0138	0,00173571
30	0,014	0,00144514
32	0,014	0,00118602
34	0,0138	0,00095946
36	0,0133	0,0007589
38	0,013	0,00060878
40	0,0123	0,00047272
42	0,0117	0,00036903
44	0,011	0,00028475
	$\Sigma s/s_0$	0,27433321

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₇.

t	E₇	exp(-kt)Δt.E
0	0,00677	0
2	0,00587	0,009635
4	0,0226	0,03044425
6	0,0587	0,06489606
8	0,0496	0,0450034
10	0,041	0,03053029
12	0,0355	0,02169496
14	0,0338	0,01695238
16	0,0307	0,01263676
18	0,025	0,00844541
20	0,0226	0,00626574
22	0,0208	0,00473272
24	0,0208	0,00388413
26	0,0203	0,00311107
28	0,0189	0,00237717
30	0,017	0,00175481
32	0,0155	0,0013131
34	0,0135	0,0009386
36	0,0113	0,00064478
38	0,00936	0,00043832
40	0,00778	0,000299
42	0,0071	0,00022394
44	0,00643	0,00016645
	Σ s/s_o	0,26638833

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E_8 .

t	E_8	$\exp(-kt)\Delta t.E$
0	0,00782	0
2	0,00711	0,01167033
4	0,0142	0,01912869
6	0,0482	0,05328774
8	0,0507	0,04600146
10	0,0447	0,03328546
12	0,0386	0,02358945
14	0,0389	0,01951028
16	0,036	0,01481835
18	0,033	0,01114794
20	0,0294	0,00815101
22	0,0254	0,00577938
24	0,0218	0,00407087
26	0,0187	0,00286587
28	0,0171	0,00215077
30	0,0145	0,00149675
32	0,0124	0,00105048
34	0,0102	0,00070917
36	0,00858	0,00048957
38	0,00685	0,00032078
40	0,00579	0,00022252
42	0,00523	0,00016496
44	0,00481	0,00012451
	$\Sigma s/s_0$	0,26003632

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E_g.

t	E _g	exp(-kt)Δt.E
0	0,00417	0
2	0,00376	0,00617165
4	0,00501	0,00674892
6	0,00666	0,00736299
8	0,0267	0,02422562
10	0,0443	0,0329876
12	0,05	0,03055628
14	0,0451	0,02261989
16	0,0392	0,01613553
18	0,036	0,01216139
20	0,0322	0,0089273
22	0,0284	0,00646198
24	0,0251	0,0046871
26	0,0217	0,00332563
28	0,02	0,00251552
30	0,0184	0,00189932
32	0,0171	0,00144864
34	0,0159	0,00110547
36	0,015	0,0008559
38	0,0134	0,00062751
40	0,0115	0,00044197
42	0,01	0,00031541
44	0,01	0,00025886
	Σ s/s_o	0,1918405

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₀.

t	E ₁₀	exp(-kt)Δt.E
0	0,0198	0
2	0,027	0,0443177
4	0,0347	0,04674404
6	0,0464	0,05129774
8	0,0446	0,04046677
10	0,0347	0,02583905
12	0,0284	0,01735597
14	0,0203	0,01018146
16	0,0169	0,00695639
18	0,0158	0,0053375
20	0,067	0,01857543
22	0,018	0,00409562
24	0,0189	0,00352933
26	0,0207	0,00317238
28	0,0207	0,00260356
30	0,0198	0,00204384
32	0,0185	0,00156724
34	0,017	0,00118194
36	0,015	0,0008559
38	0,0141	0,00066029
40	0,012	0,00046119
42	0,00991	0,00031258
44	0,00858	0,0002221
	Σ s/s₀	0,28777801

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₁.

t	E ₁₁	exp(-kt)Δt.E
0	0,00425	0
2	0,0251	0,04119904
4	0,1166	0,15707077
6	0,082	0,09065548
8	0,055	0,04990296
10	0,033	0,02457316
12	0,0276	0,01686707
14	0,0213	0,01068301
16	0,019	0,00782079
18	0,015	0,00506725
20	0,014	0,00388143
22	0,0123	0,00279868
24	0,01	0,00186737
26	0,00927	0,00142067
28	0,00877	0,00110306
30	0,00752	0,00077625
32	0,00752	0,00063706
34	0,00702	0,00048807
36	0,0155	0,00088443
38	0,00577	0,0002702
40	0,00502	0,00019293
42	0,00496	0,00015645
44	0,00376	9,7331E-05
	Σ s/s₀	0,41841346

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₂.

t	E ₁₂	exp(-kt)Δt.E
0	0,00632	0
2	0,00721	0,01183447
4	0,056	0,07543708
6	0,1	0,11055547
8	0,077	0,06986415
10	0,05	0,03723206
12	0,036	0,02200052
14	0,0289	0,01449478
16	0,023	0,00946728
18	0,019	0,00641851
20	0,016	0,00443592
22	0,0126	0,00286694
24	0,0099	0,0018487
26	0,00812	0,00124443
28	0,00722	0,0009081
30	0,00631	0,00065134
32	0,00595	0,00050406
34	0,00559	0,00038865
36	0,00627	0,00035777
38	0,00505	0,00023649
40	0,00496	0,00019063
42	0,0049	0,00015455
44	0,00396	0,00010251
	Σ s/s_o	0,37119439

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₃.

t	E₁₃	exp(-kt)Δt.E
0	0,00583	0
2	0,0124	0,02035331
4	0,0656	0,08836915
6	0,071	0,07849438
8	0,043	0,03901504
10	0,0393	0,0292644
12	0,0496	0,03031183
14	0,0467	0,02342237
16	0,033	0,01358349
18	0,025	0,00844541
20	0,0182	0,00504586
22	0,0138	0,00313998
24	0,01	0,00186737
26	0,00875	0,00134098
28	0,00802	0,00100872
30	0,00729	0,0007525
32	0,00656	0,00055574
34	0,00656	0,00045609
36	0,00613	0,00034978
38	0,00583	0,00027301
40	0,00583	0,00022406
42	0,00583	0,00018389
44	0,00554	0,00014341
	Σ s/s_o	0,34660076

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₄.

t	E₁₄	exp(-kt)Δt.E
0	0,00429	0
2	0,00717	0,01176881
4	0,071	0,09564343
6	0,0766	0,08468549
8	0,054	0,04899564
10	0,0366	0,02725387
12	0,028	0,01711152
14	0,0237	0,01188672
16	0,0267	0,01099027
18	0,0258	0,00871566
20	0,024	0,00665389
22	0,0208	0,00473272
24	0,017	0,00317453
26	0,0153	0,0023448
28	0,0112	0,00140869
30	0,00926	0,00095586
32	0,00865	0,00073279
34	0,00789	0,00054856
36	0,00718	0,00040969
38	0,00703	0,00032921
40	0,00645	0,00024789
42	0,00574	0,00018105
44	0,00528	0,00013668
	Σ s/s_o	0,33890777

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.4: Cálculo de la fracción no convertida para la curva E₁₆.

t	E₁₆	exp(-kt)·t.E
0	0,00636	0
2	0,00845	0,0138698
4	0,0239	0,03219547
6	0,0557	0,0615794
8	0,0576	0,05226201
10	0,0567	0,04222115
12	0,0477	0,02915069
14	0,0408	0,02046322
16	0,035	0,01440673
18	0,0293	0,00989802
20	0,0239	0,00662616
22	0,0199	0,00452794
24	0,0156	0,0029131
26	0,0127	0,00194634
28	0,01	0,00125776
30	0,00897	0,00092592
32	0,00815	0,00069043
34	0,00722	0,00050198
36	0,00693	0,00039543
38	0,00686	0,00032125
40	0,00626	0,00024059
42	0,00596	0,00018799
44	0,00557	0,00014419
	Σ s/s₀	0,29672555

Referencias en tabla 4.2

Tabla 4.5: Fracciones no convertidas (curvas E) para cada carga de columna y para distintos caudales.

Carga *	Caudal [ml/min]		
	2,22	4,70	6,94
80 + 18	0,1293	0,2743	0,4184
60 + 24	0,1159	0,2663	0,3711
40 + 28	0,0943	0,2600	0,3466
20 + 37	0,1046	0,1918	0,3389
0 + 40	0,0922	0,2877	0,2967

* Carga de la columna en g de perlas de vidrio + g de alúmina.

B) Calculando la fracción no convertida empleando un modelo de dispersión sobre la conversión.

Con los datos obtenidos en la tabla 4.3, correspondientes a la normalización de las curvas E, se calcula el módulo de dispersión D/uL , que nos dará una medida del alejamiento de la idealidad de nuestro sistema de flujo.

El procedimiento empleado corresponde a un sistema de flujo con un grado de dispersión elevado, lo cual se asume luego del gran apartamiento de la idealidad demostrado recientemente en A.

Se muestra a continuación el método de cálculo empleado para la obtención de la tabla 4.6, tomando como ejemplo la curva E_2 (caudal: 2,22 ml/min; carga: 60 g de perlas + 24 g de Alúmina).

Tabla 4.6: Cálculo de D/uL para curvas E

	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	E ₇	E ₈	E ₉	E ₁₀	E ₁₁	E ₁₂	E ₁₃	E ₁₄	E ₁₅
ΣE _i	0,4998	0,50918	0,5002	0,4987	0,4989	0,50016	0,5009	0,5	0,4996	0,5488	0,5103	0,5003	0,4998	0,49964	0,49953
ΣE _i .t _i	13,0149	14,0267	15,517	14,944	15,839	8,78868	8,6871	8,4363	10,235	9,7757	6,3159	6,3149	6,8526	7,25222	7,63724
ΣE _i .t _i ²	411,081	455,567	555,09	524,08	583,64	222,397	209,46	191,81	262,29	252,3	135,13	124,59	142,67	159,929	164,664
σ ²	144,399	135,84	147,33	152,93	161,89	135,886	117,38	98,924	105,29	142,43	111,62	89,711	97,458	109,407	95,8889
(σ _o ²) ₁	0,21361	0,20095	0,2179	0,2262	0,2395	0,20102	0,1736	0,1463	0,1558	0,2107	0,1651	0,1327	0,1442	0,16184	0,14185
(D/uL) ₁	0,1068	0,10047	0,109	0,1131	0,1197	0,10051	0,0868	0,0732	0,0779	0,1053	0,0826	0,0664	0,0721	0,08092	0,07092
(D/uL) ₂	0,585	0,573	0,591	0,6	0,613	0,574	0,544	0,514	0,524	0,584	0,535	0,497	0,511	0,531	0,507
(σ _o ²) ₂	0,21174	0,2001	0,2177	0,2267	0,2399	0,20106	0,1731	0,1469	0,1554	0,2108	0,1651	0,1329	0,1444	0,16153	0,14107
σ _o ²	0,21361	0,20095	0,2179	0,2262	0,2395	0,20102	0,1736	0,1463	0,1558	0,2107	0,1651	0,1327	0,1442	0,16184	0,14185
D/uL	0,585	0,573	0,591	0,6	0,613	0,574	0,544	0,514	0,524	0,584	0,535	0,497	0,511	0,531	0,507

D/uL _{PROMEDIO}
0,5522

$$(D/uL)_1 = 1/2 \cdot \sigma_o^2$$

$$(D/uL)_2 = \text{obtenido por cálculo iterativo hasta que } (\sigma_o^2)_1 = (\sigma_o^2)_2$$

La varianza σ^2 de la distribución de edades a la salida del reactor es la magnitud descriptiva que hemos de emplear para la determinación del módulo de dispersión. La varianza de una distribución continua medida en un número finito, de puntos equidistantes viene dada por (Chapman y Hall, 1993):

$$\Sigma E_i = 0,5092 \text{ g/l}$$

$$\Sigma t_i E_i = 14,027 \text{ g.min/l}$$

$$\Sigma t_i^2 E_i = 455,57 \text{ g.min}^2/\text{l}$$

$$\sigma^2 = \text{varianza de la curva C}$$

$$E = 26 \text{ min}$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum t_i^2 \cdot C_i}{\sum C_i} - \left[\frac{\sum t_i \cdot C_i}{\sum C_i} \right]^2$$

$$\sigma^2 = 135,84 \text{ min}^2$$

$$\sigma_{\theta^2} = \frac{\sigma^2}{t^2} \Rightarrow \sigma_{\theta^2} = 0,2009$$

$$\sigma_{\theta^2} = 2 \cdot \frac{D}{uL} - 2 \cdot \frac{D}{uL} \cdot \left(1 - e^{-\frac{uL}{D}} \right)$$

Si se desprecia el segundo término del segundo miembro:

$$\frac{D}{uL} \cong 0,1005$$

Teniendo en cuenta el término antes despreciado y por cálculo iterativo

$$\text{Si } D/uL = 0,1005 \quad \Rightarrow \quad \sigma_{\theta^2} = 1,0 \times 10^{-5}$$

$$\text{Si } D/uL = 0,8 \quad \Rightarrow \quad \sigma_{\theta^2} = 0,4584$$

$$\text{Si } D/uL = 0,573 \quad \Rightarrow \quad \sigma_{\theta^2} = 0,2009$$

De la misma manera se calcula D/uL para las demás curvas (ver tablas 4.6 y 4.2).

Considerando el flujo estacionario dentro del reactor de longitud L, a través del cual circula fluido con velocidad constante m, y en el cual el material se mezcla axialmente con un coeficiente de dispersión D, la expresión:

$$\frac{s}{s_0} = \frac{4 \cdot a \cdot e^{-\left(\frac{1-uL}{2D}\right)}}{(1+a)^2 \cdot e^{-\left(\frac{a \cdot uL}{2D}\right)} - (1-a)^2 \cdot e^{-\left(\frac{a \cdot uL}{2D}\right)}} \quad (\text{ec. 4-3})$$

donde

$$a = \sqrt{1 + 4 \cdot k \cdot t \cdot \left(\frac{D}{uL}\right)}$$

fue obtenida por Wehmen y Wilhelm (1956) y nos proporciona la fracción no convertida para una reacción de primer orden. La tabla 4.7 muestra los valores de fracción no convertida para los distintos valores de D/uL.

En la fig. 4.6 se muestra la curva C para recipientes cerrados calculada por métodos numéricos. Se observa que a medida que aumenta el D/uL la curva se va haciendo más asimétrica. Hemos trazado la curva C para nuestro $D/uL_{\text{PROMEDIO}} = 0,5522$ y se observa que el comportamiento de nuestro reactor es intermedio entre reactor de mezcla completa y reactor de flujo en pistón, presentando "grado de dispersión" grande, ya que:

$$D/uL > 0,2$$

Tabla 4.7: Fracciones no convertidas para constante de velocidad $k = 0,0988 \text{ min}^{-1}$.

	D/uL	a	$(1+a)^2$	$(a/2).(uL/D)$	$(1-a)^2$	s/s_0
Curva E ₁	0,585	2,6478	13,3066	2,3102	2,7153	0,1860
Curva E ₂	0,573	2,6244	13,1366	2,2898	2,6388	0,1941
Curva E ₃	0,591	2,6594	13,3915	2,3204	2,7538	0,1822
Curva E ₄	0,6	2,6768	13,5187	2,3355	2,8116	0,1767
Curva E ₅	0,613	2,7016	13,7019	2,3572	2,8955	0,1691
Curva E ₆	0,574	2,6264	13,1508	2,2915	2,6452	0,1934
Curva E ₇	0,544	2,5670	12,7238	2,2397	2,4556	0,2159
Curva E ₈	0,514	2,5063	12,2940	2,1867	2,2689	0,2428
Curva E ₉	0,524	2,5267	12,4376	2,2045	2,3308	0,2333
Curva E ₁₀	0,584	2,6459	13,2925	2,3085	2,7089	0,1867
Curva E ₁₁	0,535	2,5490	12,5952	2,2240	2,3993	0,2235
Curva E ₁₂	0,497	2,4712	12,0492	2,1561	2,1644	0,2604
Curva E ₁₃	0,511	2,5001	12,2509	2,1814	2,2504	0,2457
Curva E ₁₄	0,531	2,5409	12,5379	2,2169	2,3743	0,2270
Curva E ₁₅	0,507	2,4919	12,1933	2,1742	2,2257	0,2498

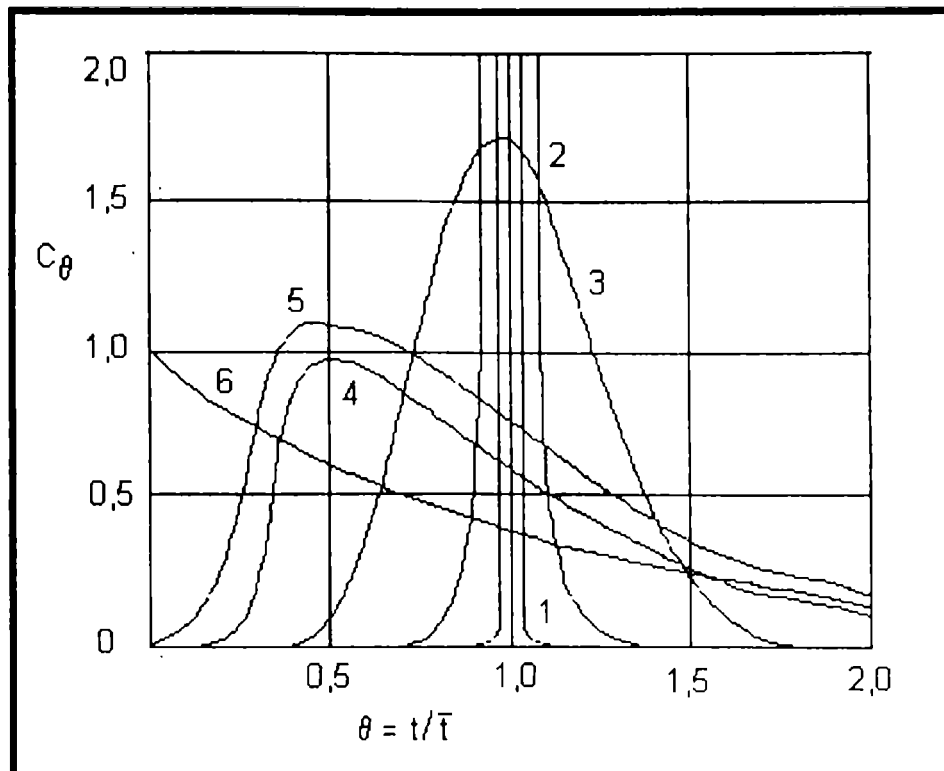


Fig. 4.6: Curva C en recipientes cerrados para distintas intensidades de retromezcla predichas por el modelo de dispersión. (O. Levenspiel, 1972).

donde $\bar{\tau}$ = tiempo medio de residencia.

- 1)Flujo Pistón $D/uL=0$;
- 2)Dispersión Pequeña $D/uL=0,002$;
- 3)Dispersión Media $D/uL=0,025$;
- 4)Dispersión Grande $D/uL= 0,2$;
- 5)Nuestro caso $D/uL=0,5522$;
- 6)Flujo en mezcla completa $D/uL = \infty$.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las fracciones no convertidas para el reactor real presentan ligeras discrepancias, en comparación con las obtenidas para un reactor de flujo en pistón, lo que se debería a las canalizaciones y cortocircuitos que se generan en el interior de la columna (Suresh y Chidambaram, 1997).

Las máximas conversiones se logran para el menor caudal de alimentación. El aumento del caudal hace que la circulación del fluido sea elevada y no permita a la enzima actuar sobre el sustrato.

Respecto a la interpretación del valor calculado del módulo de dispersión del reactor se puede afirmar que la suposición del grado de dispersión elevado fue correcto. El D/uL es bastante mayor al límite que presenta una curva de tipo gaussiana.

Con el alejamiento del valor cero, por parte del módulo de dispersión del recipiente, el comportamiento del reactor se aleja del ideal y tiende a comportarse como un reactor de mezcla completa.

Los resultados observados permiten concluir que el grado de retromezcla, la formación de remolinos y de zonas de redistribución de la materia por deslizamiento, es importante.

La columna de relleno donde se producirá la hidrólisis enzimática de la Lecitina de Soja, presenta un alejamiento importante del comportamiento como reactor en flujo pistón atribuibles a las interferencias del flujo (taponamientos, zonas muertas, canalizaciones y/o a la interacción de tipo axial de las partículas que circulan por el reactor (Weatherley y col., 1997)).

El comportamiento del trazador a lo largo de la columna difiere de acuerdo al caudal y relleno, manifestándose en la respuesta a la salida como un adelanto o atraso respecto del tiempo esperado (tiempo medio).

El tiempo de residencia de las partículas de trazador coincide con el tiempo medio esperado para bajos caudales y alto porcentaje de perlas de vidrio en el relleno de la columna. El mismo se encuentra en atraso para los ensayos de bajos caudales y bajo porcentaje de perlas de vidrio; y adelantado para el caso de caudales más elevados.

El sistema tiene comportamiento lineal (midiendo una de las variables se puede interpretar el comportamiento de las demás) (Abureesh, 1997; Miyakawa y Shiraishi, 1997).

Si comparamos los modelos ensayados: reactor de flujo en pistón y modelo de dispersión, con los resultados obtenidos en el reactor real podemos observar que:

-
- Para bajos caudales, la fracción no convertida se aproxima más a la correspondiente al modelo de reactor de flujo en pistón.
 - Para caudales elevados, el modelo de dispersión podría emplearse para definir el flujo real con más aproximación.

Esto puede verificarse por comparación de los resultados mostrados en las tablas 4.5 y 4.7 con la fracción no convertida obtenida para el caso de reactor ideal de flujo en pistón.

Capítulo V

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- Se seleccionó y se puso a punto un procedimiento para el seguimiento de la adsorción de enzima Fosfolipasa A₂ sobre el soporte lo que permitió realizar en una forma sencilla las determinaciones para la elección del pH óptimo de adsorción (entre 8 y 9) de tiempo mínimo de inmovilización (90 minutos) para el soporte y la metodología de trabajo descripta.
- Se ensayaron distintos soportes resultando efectivos para la inmovilización: Alúmina, Amberlita IRA-400 S, Sílica Gel, DEAE-Sephadex y Dowex. Se presentaron problemas de turbidez incompatibles con las determinaciones espectrofotométricas o no se detectó adsorción de enzima en los siguientes casos: Chromosorb, Dowex 50W, tamiz molecular, Amberlita IRC-50, perlita, piedra pomez y perlas de vidrio silanizado.
- Los porcentajes de enzima inmovilizada (entre 15 y 30%) fueron similares para todos los soportes que resultaron efectivos. Sílica Gel 60-100 mesh y Dowex presentaron menores índices de absorción.
- Se seleccionó DEAE-Sephadex y alúmina como los soportes más adecuados para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima inmovilizada en reacción de hidrólisis de los fosfolípidos de la Lecitina de Soja en consideración al buen porcentaje de inmovilización y excelentes propiedades mecánicas.

-
- Se seleccionó una temperatura de trabajo de 45-48°C como temperatura de trabajo y una concentración de iones calcio de 6mM respectivamente para la enzima inmovilizada sobre Sephadex y sobre alúmina. El tiempo de incubación no disminuye la actividad de la enzima inmovilizada.
 - Se verificó que se desfavorece la actividad hidrolítica de la enzima Fosfolipasa A₂ adsorbida sobre Sephadex o sobre Alúmina frente a Lecitina de Soja en comparación con la actividad de la enzima soluble.
 - Se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima inmovilizada sobre Sephadex y sobre Alúmina frente a Lecitina de Soja en las condiciones de reacción elegidas. Como la reacción ocurre simultáneamente a la transferencia de masa de sustrato hacia la partícula soporte, la velocidad de reacción promedio es menor que la que ocurre en ausencia de estos fenómenos difusionales. Se determinaron también los nuevos parámetros cinéticos libres de efectos difusionales.
 - Se construyó un reactor que permite la circulación del fluido a través del soporte. Se seleccionó Alúmina como partícula soporte por sus buenas propiedades mecánicas y fundamentalmente por su bajo costo.
 - Se analizó el comportamiento de flujo a través del reactor y su alejamiento del modelo de reactor ideal de flujo en pistón, inyectando como trazador una solución de NaCl de concentración conocida y luego de pasar por el reactor se detectaba la concentración de salida por conductimetría en función del tiempo de residencia. De acuerdo a las experiencias realizadas, las mediciones de conductividad resultaron adecuadas para la determinación de los tiempos de residencia. El sistema mostró comportamiento lineal.

-
- Se analizaron los tiempos de residencia en el reactor experimental construido a tal efecto para distintos arreglos de carga (partícula soporte + carga inerte) y a distintos caudales. Al más bajo caudal estudiado ($2,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) y altas proporciones de soporte las gráficas no presentan anomalías. Para caudales mayores ($4,76$ y $6,94 \text{ ml}/\text{min}$) y para todos los arreglos de carga el trazador aparece antes del tiempo previsto, lo que indica la presencia de canalizaciones en el reactor.
 - Se calcularon las fracciones no convertidas para el reactor real y se observaron diferencias en los resultados, en comparación a los de un reactor de flujo en pistón, precisamente a causa de canalizadores y cortocircuitos que se generan en el interior de la columna.
 - Se lograron máximas conversiones en las experiencias realizadas a mayor concentración de sustrato y para un menor caudal de alimentación.
 - El módulo de dispersión resultó bastante mayor al límite que presenta una curva de tipo gaussiana, por lo que la suposición de grado de dispersión elevada fue correcta. El reactor tendía a comportarse como un reactor de mezcla completa y se concluye que el grado de retromezcla, la formación de remolinos y zonas de redistribución de materia por deslizamiento son importantes.

Algunas perspectivas que se abren a partir de este trabajo comprenden:

- ◆ Profundizar los estudios de inmovilización de Fosfolipasa, por la ventaja que presupone el uso de tales enzimas bajo la forma inmovilizada y por las importantes posibilidades de uso en distintas áreas (química

analítica, química orgánica de síntesis, biosensores, medicina, producción de alimentos, medicamentos, etc.).

- ◆ Medir en condiciones de operación, las variables de trabajo como: rendimiento de producto, decaimiento de la actividad, etc.

- ◆ Continuar la exploración sobre inmovilización por adsorción de lipasas en general pensando en sus aplicaciones para la modificación de lípidos.

- ◆ Exploración de otros tipos de reactores u otras configuraciones a los fines de disminuir efectos indeseados.

- ◆ Construcción de reactores cargados con enzima inmovilizada y mediciones en operación de transformación química (variables de trabajo, rendimiento de producto, decaimiento de actividad, etc.).

Apéndice

APENDICE

A.1. OBTENCIÓN DE LECITINA DE SOJA PURA EN POLVO

Se han preparado fosfátidos en polvo a partir de aceite de soja por un procedimiento que parte del desgomado, el centrifugado, el secado y la precipitación con acetona de los fosfátidos, resultando un polvo amarillento (Kristappa y col., 1976; Van Nieuwenhuyzen, 1976; Madoery y col., 1987).

Para la obtención de Lecitina de Soja Pura en Polvo se desarrolló un proceso de purificación a nivel de laboratorio factible de ser trasladado a escala industrial en una etapa posterior. El procedimiento de purificación se logra purificando las gomas crudas secas con sucesivas extracciones con acetona, obteniéndose, la cual fue caracterizada químicamente (Abril y col., 1987).

En el presente apartado se describe el diseño y optimización en operación de un equipo de agitación-extracción para la obtención de lecitina pura en polvo.

El problema consistió en la extracción del aceite de soja utilizando acetona como solvente, pero teniendo en cuenta que el sistema en una primera etapa se comportaba como monofásico perfecto, y a medida que se avanzaba en el proceso de purificación la viscosidad aumentaba dificultando la extracción. La estructura líquido-cristalina de los fosfolípidos, que les permite adoptar diferentes disposiciones según sea la concentración lipídica, sería la responsable de este comportamiento (Chapman, 1972).

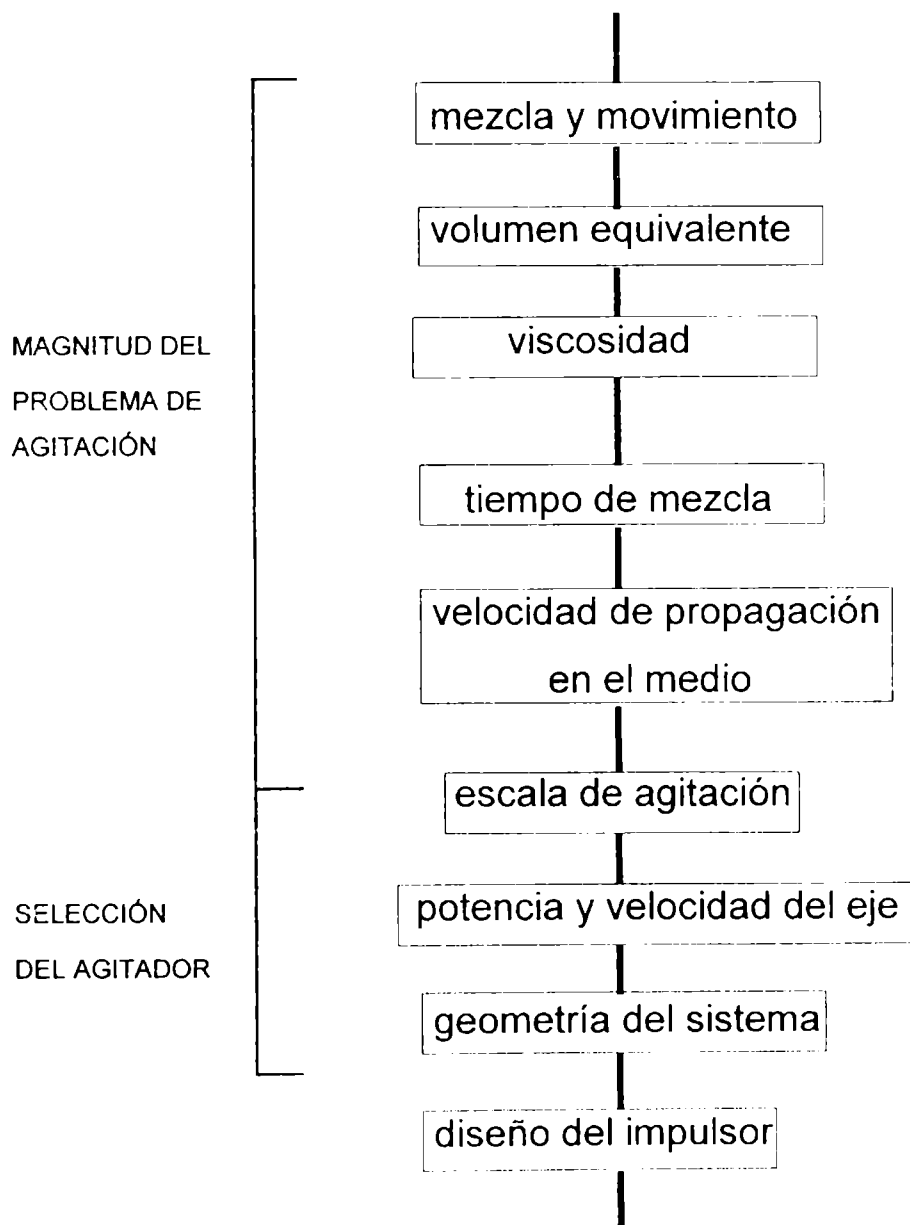
Para cumplir con la condición de mantener el mismo nivel de agitación en todas y cada una de las etapas, a pesar de ese brusco incremento de la viscosidad que se experimenta en una etapa intermedia de la extracción, el tratamiento del diseño y cambio de escala para el equipo en discontinuo (micro-planta piloto), debió contemplar el diseño del sistema impulsor y del sistema

agitador. Cumplida esta etapa del diseño y optimización del equipo de agitación-extracción se obtuvieron los valores de equilibrio en operación para el sistema fosfolípidos/aceite de soja/acetona.

A.2. DISEÑO DEL EQUIPO

Se siguieron las etapas de diseño especificadas en diversos trabajos (Gates y col., 1975; Dickey y Fenic, 1976; Dickey y Hicks, 1976; Hicks y col., 1976) y que se resumen en el diagrama de bloques de la fig. A.1 cuyo desarrollo se incluye más adelante.

Fig. A.1: Diagrama de bloques para el diseño del equipo de agitación extracción.



A.3. MATERIALES Y MÉTODOS

El equipo de agitación-extracción se construyó enteramente en acero inoxidable. Está constituido por un tanque de agitación cilíndrico con fondo torisférico y concéntrico con él, y en posición vertical, posee un eje accionado por un motor-reductor a pulea en cuyo extremo se encuentra la turbina de agitación, con cuatro paletas inclinadas a 45°.

Todas las operaciones de carga y descarga se realizaron por el extremo abierto del tanque y siempre bajo campana extractora de gases.

El porcentaje de agua en el solvente de extracción se determinó por conductimetría. Se siguió la evolución de la extracción cuantificando insolubles en acetona (IA) (Lucas Meyer-AME 22, 1973).

Se utilizaron gomas crudas secas comerciales con la siguiente composición promedio:

- Fosfolípidos totales (insolubles en acetona) 60-65 %
- Aceites 30-35 %
- Humedad 2 %
- Impurezas 3 %

Por experiencias previas (Kristappa y col., 1976; Van Nieuwenhuyzen, 1976; Madoery y col., 1987), se pudo determinar que el solvente extractor más conveniente para este proceso era acetona, en sus grados comercial y bidestilado, así como la relación sólido/líquido y el número de extracciones, para un sistema a escala laboratorio de operación manual.

El producto obtenido, **LECITINA PURA EN POLVO**, rindió 97 % de fosfolípidos totales y fue desolventizado en estufa de vacío a 50° C.

A.4. CINÉTICA DE LA EXTRACCIÓN

La composición y características físico-químicas del producto obtenido se indica en las tablas A.1, A.2 y A.3.

Tabla A.1: Composición y propiedades de Lecitina Pura en Polvo.

Determinación	Método de análisis	Resultados
Insolubles en acetona	D-1	96 % (fosfolípidos totales)
Insolubles en tolueno	D-2	1,5%
Aceites	D-3	0,2% (lípidos neutros)
Acidez	D-4	27,3 mg KOH/g
Humedad	D-5	2 %
Índice de Peróxidos	D-6	2,2 mEq/Kg
Fósforo total	D-7	3,2%

Tabla A.2: Análisis cuantitativo de fosfolípidos (*)

Fosfatidilcolina	30,4 %
Fosfatidiletanolamina	26,1 %
Fosfatidilinositol	27,0 %
Ácido Fosfatídico	7,6 %
Lisofosfatidiletanolamina	2,9 %
No determinados	6,0 %

(*) Métodos de Análisis: D-8

Tabla A.3: Análisis de ácidos grasos presentes en cada fosfolípido (#)

	16:0	18:0	18:1	18:2
Fosfatidilcolina	25	2	1	72
Fosfatidiletanolamina	7	1	1	91
Fosfatidilinositol	6	2	1	91
Ac. Fosfatídico	2	1	-	97
Lisofosfatidiletanolamina	1	1	1	97

(#) Métodos de Análisis: D-9

Se programaron dos series de ensayos:

a) Operaciones tipo A:

Para cada operación de extracción se realizaron cinco etapas consecutivas, empleando en todos los casos una relación sólido/líquido 1:1 (1250 g de lecitina: 1250 ml de acetona) y con tiempos de agitación variables, de 15 y 30 minutos por etapa.

b) Operación tipo B:

Se realizaron cinco etapas de extracción con tiempos de 15 y 30 minutos por etapa, pero la diferencia con las operaciones tipo A radica en la relación sólido/líquido, que no fue constante a lo largo de todo el proceso.

La relación sólido/líquido elegida fue 1:0,75 para la primera etapa de extracción y luego 1:0,5 para las etapas siguientes. Se determinó que la relación 1:0,75 fue la mínima posible para la primera etapa, que permitió una separación adecuada de las fases.

Los resultados obtenidos en las operaciones tipo A se resumen en la Tabla A.4, para las etapas de 15 minutos y en la Tabla A.5 para las etapas de 30 minutos.

Tabla A.4: Operaciones tipo "A" Extracciones de 15 minutos cada etapa. Relación sólido/líquido 1:1

N ^o de extrac.	Tiempo	IA
0	0	60
1	15	71
2	30	82
3	45	89
4	60	93
5	75	95
6	90	97

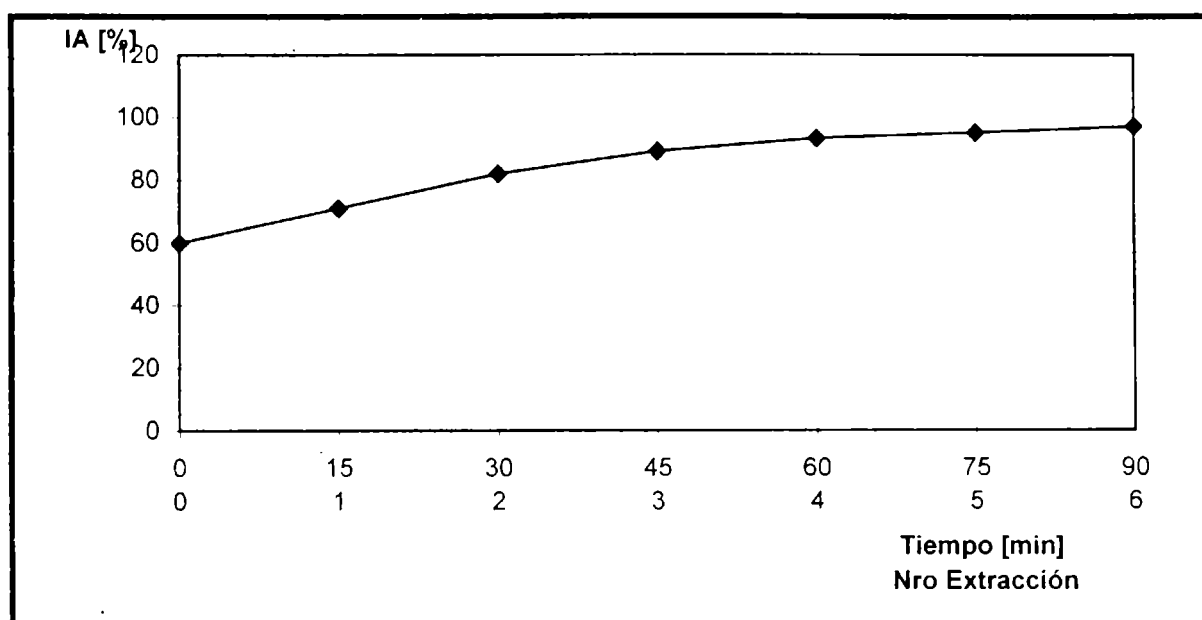
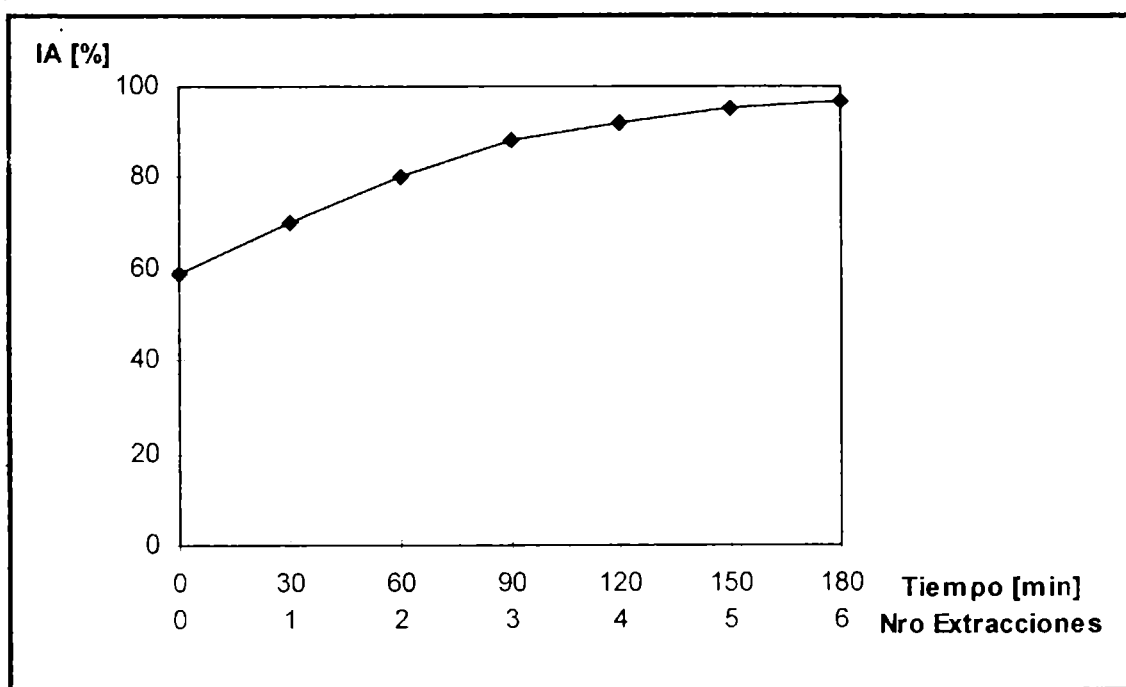


Tabla A.5: Operaciones Tipo "A". Extracciones de 30 minutos cada etapa. Relación sólido/líquido 1:1

N ^o Extrac.	Tiempo [min]	IA [%]
0	0	59
1	30	70
2	60	80
3	90	88
4	120	92
5	150	95
6	180	97



Los resultados obtenidos en las operaciones tipo B se resumen en la Tabla A.6 para las etapas de 15 minutos y en la Tabla A.7 para las etapas de 30 minutos.

Tabla A.6: Operaciones Tipo "B". Extracciones de 15 minutos cada etapa. Relación sólido/líquido 1:0,5 (excepto la primera etapa 1:0,75)

N ^{ro} Extrac.	Tiempo [min]	IA [%]
0	0	60
1	15	70
2	30	78
3	45	85
4	60	90
5	75	94
6	90	97

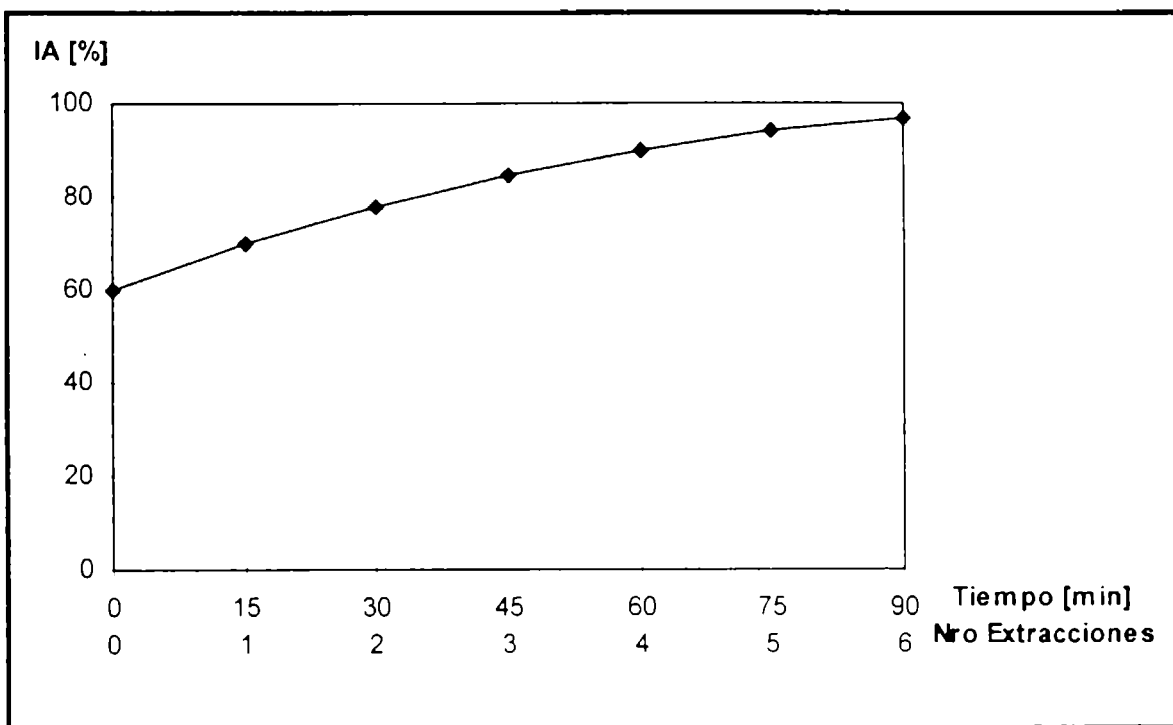
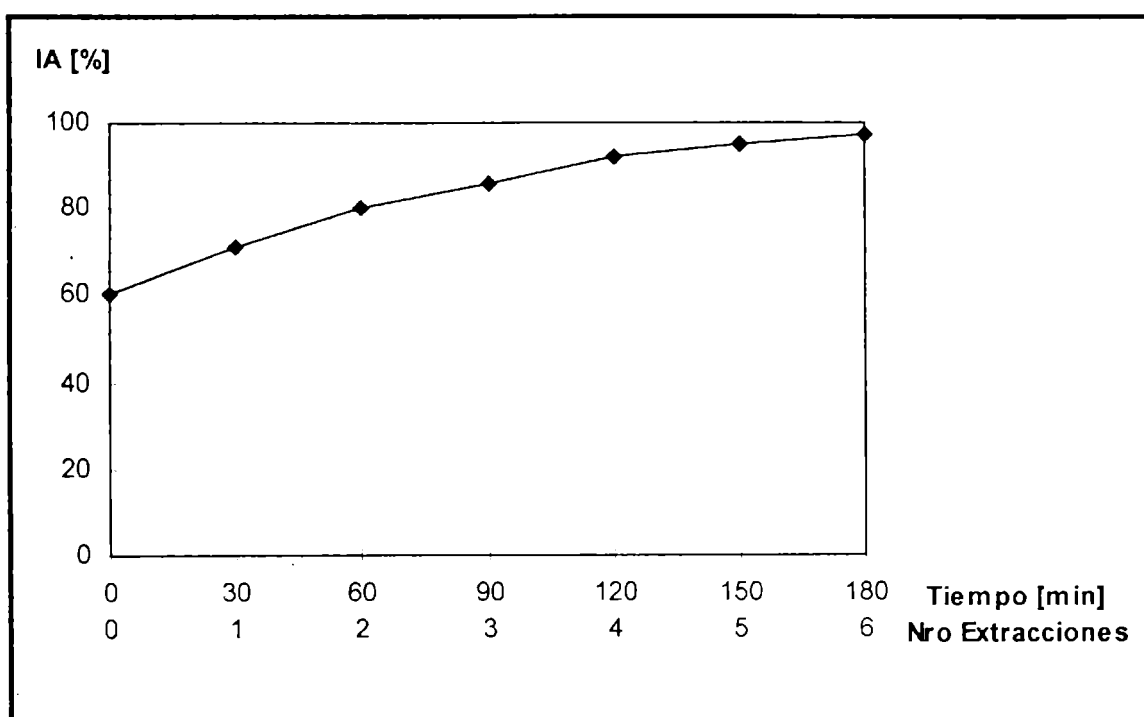


Tabla A.7: Operaciones Tipo "B". Extracciones de 30 minutos cada etapa. Relación sólido/líquido 1:0,5 (excepto la primera 1:0,75)

N ^o Extrac.	Tiempo [min]	IA [%]
0	0	60
1	30	71
2	60	80
3	90	86
4	120	92
5	150	95
6	180	97



La representación gráfica de las Tablas A.4 y A.5, como de las Tablas A.6 y A.7, conducen a curvas de tipo exponencial, que tienden a un valor asintótico próximo al 97 % de IA (fosfolípidos totales), cuando se representa IA frente al tiempo de agitación. Estos valores experimentales se ajustan perfectamente a una ecuación como la siguiente, en que se ha rectificado la expresión de la curva:

$$\ln (100 - IA_t) = mt + \ln (IA_{t_0})$$

donde IA corresponde al porcentaje de fosfolípidos obtenidos hasta esa etapa y m al coeficiente angular de la recta.

Analizando los resultados anteriormente expuestos, se concluye que el proceso de extracción no depende del mayor o menor tiempo por etapa y sí, del número de ellas.

De la ecuación anterior, se deduce el tiempo teórico necesario para obtener el 100 % de Lecitina de Soja, en cada serie de experiencias, resultando:

- para extracciones de 15 minutos cada etapa: tiempo total de extracción 136 minutos.
- para extracciones de 30 minutos cada etapa: tiempo total de extracción 262 minutos.

Se infiere entonces, que el proceso de extracción discontinuo óptimo para el sistema extractor sería el indicado en la fig. A.2, ya que en él se ven optimizados tanto los tiempos de extracción, como la relación sólido/líquido (Tablas A.4 y A.6).

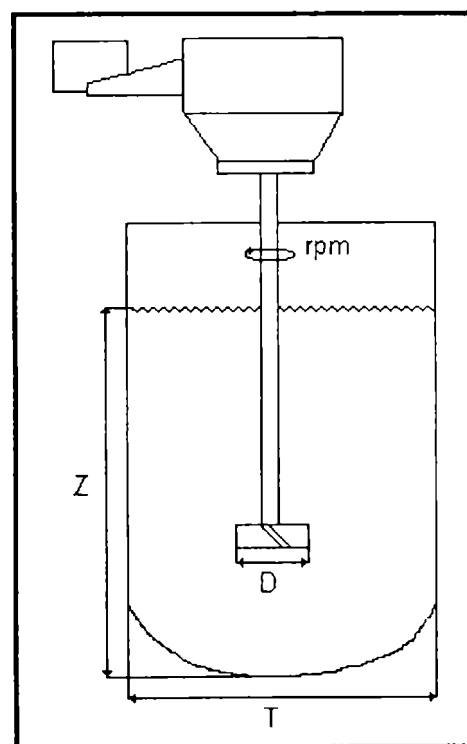


Fig. A.2: Esquema del equipo extractor

A.5. MEDICIÓN DE VALORES DE EQUILIBRIO

Teniendo en cuenta el sistema óptimo de extracción del aceite de soja con acetona (fig. A.3) se analizó el contenido de acetona, aceite de soja y fosfolípidos en los extractos y refinados provenientes de cada etapa de extracción, así como el producto obtenido, para luego resumirlos en la fig. A.4, en la que se representa por medio de un diagrama rectangular, en ordenadas: Kg de inerte/Kg de disolución, ($N = B/(A+C)$); y en abcisas: Kg de soluto/Kg de disolución, ($X, Y=C/(A+C)$) (Ocon-Tojo, 1970).

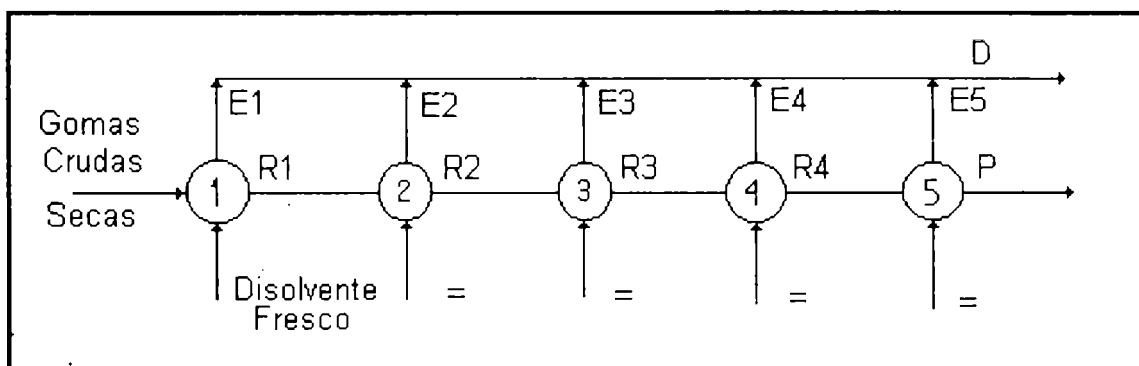


Fig. A.3: Esquema del proceso de extracción

Donde:

- 1,2,3,4,5 representan una etapa de extracción de 15 minutos.
- R1, R2, R3, R4 producto refinado proveniente de cada etapa de extracción
- E1,E2, E3, E4, E5 los extractos que provienen de las correspondientes etapas de extracción.
- P es la Lecitina de Soja que se envía a la etapa de secado.
- D es la suma de los extractos que se envía a la etapa de recuperación.

Fig. A.4: Equilibrio práctico para el sistema aceite de soja/fosfolípidos/acetona

$$N = B/(A + C) = \text{Kg. de inerte/Kg. de disolución}$$

$$X, Y = C/(A + C) = \text{Kg. de soluto/Kg. de disolución.}$$

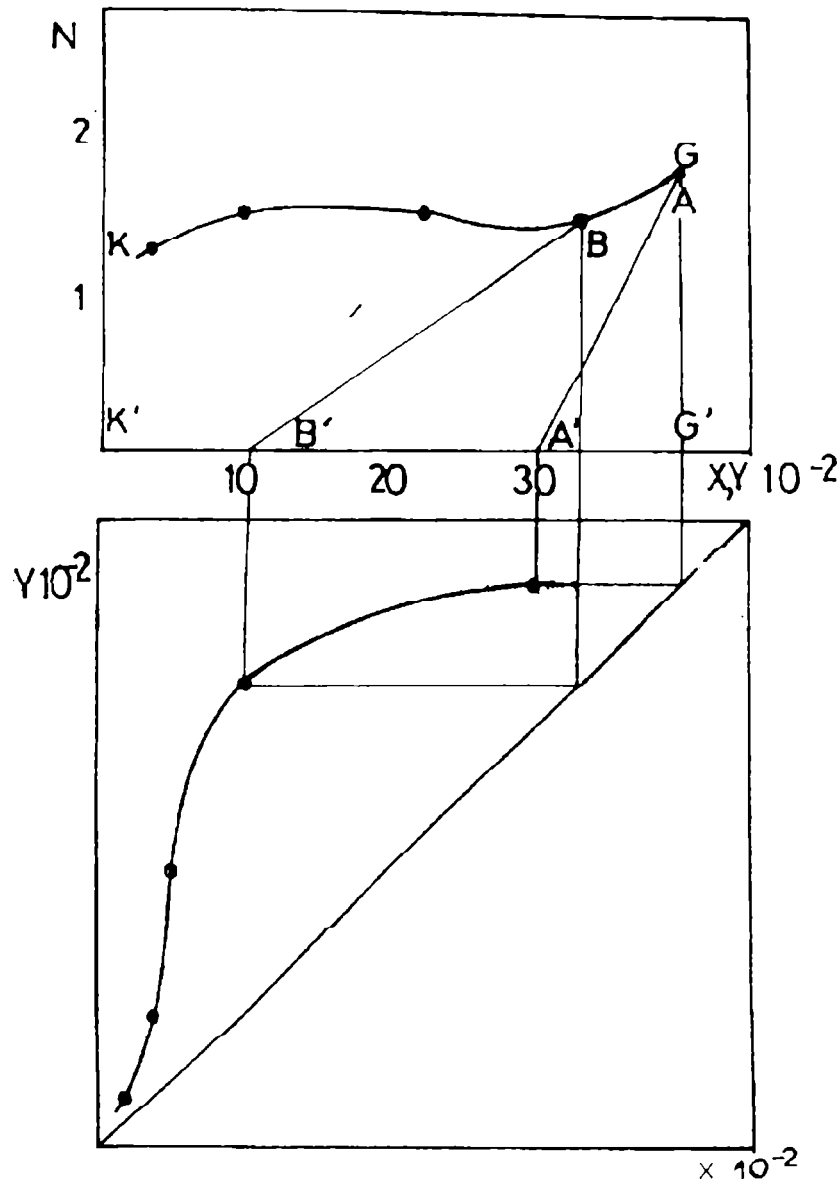


Fig. A.5: Composición de equilibrio para el sistema aceite de soja-fosfolípidos-acetona

$$Y = C/(A + C) = \text{Kg. de soluto/Kg. de disolución, en los lodos.}$$

$$X = C/(A + C) = \text{Kg. de soluto/Kg. de disolución, en la solución.}$$

Considerándose a los fosfolípidos como el inerte B que no puede extraerse con acetona, C el soluto a extraer, aceite de soja, y A el solvente extractor, acetona.

La disolución retenida por unidad de sólido inerte viene representada por la curva KG. La línea K'G' representa la composición de las soluciones

provenientes de las distintas etapas. Los segmentos tales como AA', BB', etc., representan las líneas de unión que permiten construir la figura A-5, es decir, Y frente a X ($C/(A+C)$) en los lodos frente a $C/(A+C)$ en la solución.

A.6. CONSIDERACIONES FINALES

A partir de los ensayos realizados, se concluye que el factor determinante en el proceso de extracción de aceite de soja de las gomas crudas secas, no es la solubilidad del aceite en la acetona. Esta afirmación surge de observar que si el aceite se encontrara simplemente disuelto en la lecitina, un simple contacto entre las gomas crudas secas y el disolvente, haría sencilla su extracción. La experiencia nos demuestra, que se hace necesaria una agitación efectiva para extraer el aceite. Algo similar ocurre en la extracción de orujos procedentes del sistema ALFIN, donde se ha observado que al ponerse en contacto el orujo con el disolvente, el "aceite suelto" se disuelve en forma casi instantánea, pero para extraer el "aceite ocluido" se hace necesaria una agitación efectiva, hasta que a tiempo infinito se lograría un equilibrio cuando la micela exterior tuviese la misma concentración que la interior (Flores Luque y col., 1968).

Se deduce entonces, que una porción de aceite efectivamente se encuentra disuelto en la lecitina, pero otra fracción bastante importante se halla relacionada con ella interaccionando química o físico-químicamente, lo que impide que el simple contacto con el solvente haga posible su separación de los fosfolípidos que integran las gomas crudas secas.

Del análisis de las fig. A.4 y A.5 surge (Treybal, 1968) que:

- el aceite de soja es infinitamente soluble en la acetona, de forma tal que X e Y puedan tomar valores que van de 0 a 1.

-
- la curva KG representa el sólido separado en las condiciones reales previstas para la práctica, como ya se dijo, y nos indica que los sólidos no poseen el mismo grado de sedimentación o drenaje en todas las concentraciones de soluto.
 - K'G' nos indica que la solución no contiene sustancia B, ni disuelta ni suspendida.
 - las líneas de unión no son verticales, esto ocurre ya sea, porque hay absorción preferente de soluto o, porque el soluto es soluble en el sólido B y no se distribuye por igual entre las fases líquida y sólida en el equilibrio.

B. INTERACCIÓN FOSFOLÍPIDOS-LÍPIDOS

Se presume que capas bimoleculares de fosfolípidos y otros lípidos son absorbidos a través de sus grupos polares a capas de proteínas formando así la estructura de las interfases biológicas en las biomembranas.

La composición lipídica y la estructura específica de la fracción polar y la no polar del grupo fosfolipídico juega un rol esencial en como funciona un fosfolípido en una membrana.

Al mismo tiempo, la distribución asimétrica de las cadenas de ácidos grasos del fosfolípido crea una bioimplicancia estructural ya que el fosfolípido se adsorbe a otros lípidos y proteínas formando complicados complejos en las biomembranas (Van Deenen y col., 1962)

Interacciones similares ocurren en Lecitina de Soja comercial (gomas crudas secas) que se utilizan en tecnología de alimentos como un dispersante para compuestos insolubles en agua, y está compuesto de 60-65 % de fosfolípidos y 35-40 % de triglicéridos.

La interacción entre mezclas de triglicéridos naturales y fosfolípidos ha sido examinada en monocapas sobre agua (Desnuelle y col., 1951) y en sistemas

macro (Larsson, 1968). Sin embargo, además sin desconocer su importancia obvia, la interacción entre fosfolípidos de soja y triglicéridos no ha sido muy ampliamente estudiada.

Los triglicéridos son lípidos levemente polares y tienen una muy baja solubilidad en agua pero se disponen sobre superficies acuosas formando monocapas estables.

Estudios de balance superficial de monocapas mixtas con triglicéridos bien caracterizados y lecitina de huevo mostraron grandes diferencias entre las propiedades de superficie de diferentes triglicéridos en films mezclas. Por espectrofotometría infrarroja una mezcla 1:3 triestearina-lecitina de huevo mostró una banda debido al grupo carbonilo corrida a menor longitud de onda por 50 cm^{-1} indicando enlace de hidrógeno. Sin embargo, no hay interacciones promovidas entre triestearina y lecitina cuando se examinó por análisis térmico diferencial o por difracción de rayos X (Ekman y Lundberg, 1978).

Se discuten aquí las interacciones entre triglicéridos de soja y fosfolípidos en un medio no acuoso.

Los triglicéridos de soja y la acetona son solubles en todas las proporciones ya que todas las combinaciones de la mezcla fueron ensayadas (ver curva KG de fig. A.4).

De acuerdo a estas observaciones, el simple contacto entre las gomas crudas secas y la acetona debería ser suficiente para separar triglicéridos de los fosfolípidos. Sin embargo, en las extracciones del tipo A también como en las del tipo B, fue necesario una intensa agitación para poner en contacto las gomas crudas secas con la acetona y varios estados de extracción fueron necesarios para obtener el nivel deseado del 97 % de fosfolípidos.

Hay una interacción química o fisicoquímica entre fosfolípidos y triglicéridos. La presencia de una fracción no polar en la molécula de fosfolípido puede sugerir que la interacción observada en este estudio fue hidrofóbica y ocurre entre la cadena hidrofóbica que constituye los fosfolípidos y los triglicéridos.

El origen y significancia de estas interacciones han sido estudiadas por numerosos autores.

Demel y col. (1967) encontraron que el comportamiento de films mixtos de colesterol-fosfolípidos está gobernado por un número de factores tales como interacciones de van der Waals, entropía configuracional y alteraciones en la estructura de la capa de agua adyacente a la monocapa.

Cornwel y col.(1968) y Lecuyer y Dervichian (1969) determinaron que el área molecular media en la capa de colesterol-lecitina es más pequeña que el área que podría esperarse de una simple regla de aditividad. Esta aparente contracción ha sido explicada en términos de interacciones y atracciones moleculares y han sido definidas como "efecto de condensación".

Este fenómeno de condensación es visto como el resultado de un balance de factores, principalmente términos de configuración de cadena, interacciones de Van der Waals y cambios en la estructura del agua (Demel, 1968).

Este efecto depende de la temperatura, longitud e inclinación de la cadena y de la capacidad resultante de interacción unas con otras, con colesterol y con agua (Demel, 1968).

Por ejemplo, fosfoglicéridos de cadena saturada corta sufren pequeñas interacciones de Van der Waals y por lo tanto son menos capaces de dar "**efecto de condensación**" (Demel, 1968). Sin embargo, también han sido observadas interacciones hidrofóbicas entre proteínas y cadenas lipídicas (Marcelja, 1976) sugiriendo que también pueden existir interacciones similares entre fosfolípidos y triglicéridos.

En la fig. A.4 la línea AA' y BB' representan los datos del equilibrio para cada etapa de purificación.

Estas líneas no resultaron verticales indicando que la composición de triglicéridos fue mayor en los lodos que en el extracto para todas las etapas. Esta mayor concentración fue el resultado de la presencia de triglicéridos libres y triglicéridos enlazados a los fosfolípidos, los cuales incrementaron la concentración de triglicéridos en los lodos.

La solución en el lodo tiene la misma composición que la de la solución obtenida de los extractos, por lo tanto las interacciones entre los triglicéridos y los fosfolípidos parecen ser una buena explicación para la mayor concentración de triglicéridos en los lodos. La curva KG no fue paralela al eje X el cual mostró que los sólidos no tienen el mismo grado de sedimentación o drenaje para todas las concentraciones de soluto (fig. A.3).

Esto también fue confirmado en las extracciones A y B donde la separación de extracto y lodos fue dificultosa a una alta concentración de triglicéridos.

Sin embargo, según el proceso de extracción se desarrolla, la separación se hace más fácil.

La línea K'G' corresponde a extractos y coincide con el eje X (fig. A.3), mostrando que el proceso de separación ha sido apropiado porque no hubo sólidos en suspensión.

Una explicación de que la ordenada de la línea KG no sea nula podría ser que los fosfolípidos sean solubles en acetona.

Desnuelle y col. (1951) trabajaron con capas mixtas de fosfolípidos-triglicéridos en agua, las cuales fueron puestas bajo variaciones de presión hasta que fueron eyectadas a la superficie. La presión de eyección dependerá de la concentración de fosfolípidos. Ellos observaron que la sustancia menos hidrofílica no fue eyectada a la superficie cuando alcanzó su presión de vaporización normal. La sustancia fue mantenida en la superficie por las fuerzas de cohesión lateral ejercidas por las materias hidrofílicas. Esta demora es más importante según la concentración de la sustancia hidrofílica se incrementa.

Parece que las moléculas de fosfolípidos están fuertemente ancladas al agua a través de sus porciones hidrofílicas, mientras las moléculas de gliceridos se mantienen sobre la superficie enlazadas a la fracción hidrofóbica.

Las fuerzas de cohesión son probablemente ejercidas entre las cadenas parafínicas de los triglicéridos y los fosfolípidos (Desnuelle y col., 1951).

En el presente estudio, cuando la concentración de fosfolípidos alcanzó el 80 % en las extracciones A y B, la viscosidad del sistema se incrementó desde

33 a 15.000 cp. Esta observación concuerda con el trabajo de Desnuelle y col.(1951) y Demel (1968) quienes observaron los cambios claros en la presión de eyección de la concentración de fosfolípidos alcanzando 25-30 % y 60-80 % (Desnuelle y col., 1951; Demel, 1968).

De estos resultados se puede concluir que hay interacción entre los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos de soja y las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos.

C. DISEÑO DEL EQUIPO DE MEZCLADO

El sistema extractor fue diseñado según (fig. A.5) y puede resumirse en el diagrama de bloques de la fig. A.1.

Se caracterizó al sistema como de mezcla y movimiento, a los fines de mantener el mismo nivel de agitación en todo el recipiente, ya que el procedimiento de diseño para mezcla y movimiento, se aplica tanto para sistemas monofásicos como para sistemas bifásicos que muestran un comportamiento monofásico, tal como el caso de nuestra mezcla aceite-fosfolípidos-acetona.

Dentro de esta clasificación, se encuadran los sistemas en los que la viscosidad del líquido es la variable primaria.

La agitación efectiva de los líquidos para mezcla y movimiento, requiere un análisis detallado del tamaño, viscosidad y respuesta dinámica para el fluido, a fin de hallar la potencia y velocidad del eje del agitador, y las dimensiones correspondientes del impulsor de la turbina.

Para evaluar el problema de mezcla y movimiento, se hace necesario definir el volumen equivalente (V_{eq}) que está dado por el producto máximo del peso específico del líquido y el volumen que debe agitarse.

$$V_{eq} = \rho \cdot V$$

El volumen con que se trabajó fue de 2500 ml, la densidad de la lecitina es de $1,0305 \text{ g.ml}^{-1}$, por lo tanto el V_{eq} resultó 2576,75.

La principal característica en este proceso de extracción, es la variación de viscosidad que alcanza un valor crítico en una etapa intermedia, dificultando la agitación e impidiendo un buen contacto entre el disolvente y el producto a extraer.

Tomando como referencia la pureza de la Lecitina de Soja Pura, de origen alemán, se pretendió obtener una lecitina con una pureza mayor o igual al 97 % de fosfolípidos (Chapman, 1972).

La cantidad de solvente extractor empleado en cada etapa constituyó una variable de proceso y se analizó en la etapa de optimización. También el tiempo de extracción y la relación sólido-líquido fueron variables de proceso a optimizar.

La lógica del diseño comienza con la selección de una respuesta dinámica apropiada seguida del diseño de agitadores que sean capaces de dar esta respuesta. El nivel de agitación se escogió teniendo en cuenta que la viscosidad de la lecitina es menor que 100.000 veces la viscosidad de la acetona, de esta manera, la velocidad de propagación en el medio líquido es de 54 ft.min^{-1} . Se utilizaron datos de bibliografía (Gates y col., 1975; Dickey y Fenic, 1976; Dickey y Hicks, 1976; Hicks y col., 1976), para realizar una primera aproximación de potencia y velocidad del agitador a turbina. Ya que la viscosidad era de 15.000 cp, se debió hacer una interpolación entre los valores de 5.000 y 25.000 cp.

El menor de los V_{eq} que figuran en bibliografía es 500 gal, por lo tanto se efectúa la selección para éste, y luego se realiza el cambio de escala correspondiente.

Resultan los siguientes pares alternativos:

16,25 HP	12,5 HP	12,5 HP
155 rpm	112,5 rpm	104,5 rpm

Tomando como parámetro la viscosidad, se determinó que la relación Z/T debe ser 0,72 (Garrison, 1983).

De acuerdo con esto:

$$V = \frac{\pi \times T^3 \times 0,72}{4}$$

$$T^3 = \frac{1835,5 \times 4}{\pi \times 0,72}$$

$$T = 148 \text{ cm}$$

$$T = 58''$$

$$Z = 42''$$

Para un Z/T máximo de 1,4 y μ hasta 25.000 cp se empleará un impulsor separado $Z/3$ de la superficie inferior (B).

$$Z/3 = 14''$$

Para calcular el diámetro del impulsor se empleó la siguiente expresión, para cada uno de los pares HP/rpm.

$$Dt = 394 \frac{\text{HP}}{n \text{ Pe } N^3}^{1/5}$$

$$Dt1 = (33,18)''$$

$$Dt2 = (38,16)''$$

$$Dt3 = (39,88)''$$

el Re del impulsor se calcula con la expresión:

$$Re = \frac{10,7 \times Pe \times N \times D^2}{\mu}$$

$$Re1 = 125$$

$$Re2 = 120,4$$

$$Re3 = 122,17$$

El factor de corrección Cf, para el Re calculado se obtiene en función del Re (Gates y col., 1975; Dickey y Fenic, 1976; Dickey y Hicks, 1976; Hicks y col., 1976), resultando:

$$Cf1 = 0,92$$

$$Cf2 = 0,912$$

$$Cf3 = 0,919$$

Luego se calculó el diámetro corregido:

$$Di = Dti \cdot Cfi$$

$$D1 = (30,53)''$$

$$D2 = (35,03)''$$

$$D3 = (36,65)''$$

En función del volumen y la μ , se determina el número y disposición de los deflectores y su geometría.

Se deberán emplear entonces:

- 4 paletas a 90°
- ancho T/12 = (4,83)"
- off set T/72 = (0,66)"

CAMBIO DE ESCALA

Para el cambio de escala, se sigue el procedimiento descrito en (Rautzen y col., 1976). La raíz cúbica de la relación lineal de escala para la similaridad geométrica.

$$R = \sqrt[3]{\frac{V_2}{V_1}}$$

La elección de un exponente de cambio de escala, es similar a la clasificación de un problema de agitación, para el procedimiento de diseño.

Se escoge "Régimen de transferencia de masa equivalente" ($n = 2/3$), que se puede aplicar para disolución de líquidos y para transferencia de masa entre fases líquidas.

La potencia por volumen equivalente, con similaridad geométrica, es equivalente a un exponente de cambio de escala $2/3 = n$. Si la potencia por volumen se mantiene constante en dos sistemas de dimensiones diferentes, la velocidad del agitador debe variar en relación al diámetro de la turbina.

$$P/V \propto N^3 \times V^2$$

$$P/V = N_1^3 \times D_1^2 = N_2^2 \times D_2^2$$

Reordenando:

$$N_2 = N_1 \cdot \frac{D_1^2}{D_2^2} = N_1 \cdot \frac{1}{R^2}$$

Los agitadores de pequeña escala, se pueden describir en función del diámetro de la turbina y la velocidad del agitador; el equipo de proceso se especifica de manera más conveniente, mediante potencia y velocidad.

CALCULO DE LA RELACION DE ESCALA:

$$R = \left(\frac{V_2}{V_1} \right)^3$$

$$R = \frac{485.2^3}{0.6605^3} = 9.023$$

$$HP = \frac{D \cdot T^5}{394} \cdot P_e \cdot N^3$$

El resultado del cambio de escala, es el que se resume en la tabla A.8, donde las columnas 1,2 y 3, corresponden a los valores indicados para cada una de las tres relaciones HP/rpm encontradas en la etapa de diseño y los subíndices 2 y 1 a las escalas ampliada y reducida respectivamente.

Tabla A.8: Cuadro resumen de cambio de escalas.

	1	2	3	
V ₂	485,2	485,2	485,2	galones
D ₂	30,53	35,03	36,65	pulgadas
T ₂	58	58	58	pulgadas
Re ₂	125	120,4	122,17	
Z ₂	42	42	42	pulgadas
N ₂	155	112,5	104,5	rpm
HP ₂	16,25	12,5	12,5	HP
ancho baffles	4,83	4,83	4,83	pulgadas
off set	0,66	0,66	0,66	pulgadas
V ₁	0,6605	0,6605	0,6605	galones
D ₁	3,38	3,88	4,06	pulgadas
T ₁	6,43	6,43	6,43	pulgadas
Re ₁	125	120,4	122,17	
Z ₁	4,65	4,65	4,65	pulgadas
N ₁	671,8	487,6	452,9	rpm
HP ₁	0,0145	0,011	0,0111	HP
ancho baffles	0,535	0,535	0,535	pulgadas
off set	0,073	0,073	0,073	pulgadas
ancho paletas	0,563	0,646	0,676	pulgadas

Nomenclatura

- Cf:** Factor de corrección para el diámetro de turbinas con paso de alabes regulables.
D: Diámetro del impulsor en pulgadas.
Dt: Diámetro del impulsor para régimen turbulento en pulgadas.
HP: Potencia del impulsor en HP.
Re: Número de Reynolds del impulsor.
Pe: Peso específico.
T: Diámetro del recipiente en pulgadas.
V: Volumen en galones.
Z: Profundidad de la carga del líquido en pulgadas.
 μ : Viscosidad en centipoises.

D. METODOS DE ANALISIS

D.1. DETERMINACIÓN DE INSOLUBLES EN ACETONA

Este valor es una medida del contenido de fosfolípidos (lecitina pura) en una preparación.

El valor de insolubles en acetona (IA) permite determinar gravimétricamente todos aquellos constituyentes que no son solubles en acetona y se fundamenta en la remoción del aceite de la muestra simplemente por mojado con unos pocos ml de acetona fría y seca, proceso éste que se repite aproximadamente 4-5 veces hasta que el sólido resultante se presenta disgregado y como un polvo fino.

Se seca y se determina gravimétricamente (Lucas Meyer-AME 22, 1973).

D.2. INSOLUBLES EN TOLUENO

Su determinación permite conocer la presencia de impurezas en una muestra de lecitina (residuos de proteínas y carbohidratos).

Se procede de la misma forma como para insolubles en acetona pero en este caso el tolueno remueve los fosfolípidos y el aceite quedando como insolubles las impurezas que se secan y se determinan gravimétricamente (Lucas Meyer-AME 36, 1973).

D.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACEITE

El método permite determinar el porcentaje de aceites en muestras de lecitina cruda o lecitina pura, y ya que el aceite está formado por lípidos no polares el método se basa en la adsorción de ellos en una columna de sílica gel desactivada cuando la muestra ha sido disuelta en éter etílico.

La determinación es gravimétrica (Lucas Meyer-AME 39, 1973).

D.4. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ.

Este valor indica la cantidad de ácidos grasos libres presentes en una muestra. Se expresa como el número de mg de KOH necesarios para neutralizar 1g de muestra disuelto en una mezcla de cloroformo-etanol (Lucas Meyer-AME 28, 1973).

D.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Se determina por destilación con tolueno en un equipo de Dean-Stark (Horwitz, 1975).

D.6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El nivel de peróxidos provee una indicación de la extensión de oxidación, y está relacionado a las calidades sensoriales del producto. El índice de peróxidos indica los miliequivalentes de oxígeno peroxídicamente enlazado en 1 Kg de muestra. El índice de peróxidos se fundamenta en la determinación volumétrica con tiosulfato de sodio del iodo liberado luego de la reacción entre los peróxidos presentes y el ioduro de potasio que se agrega en medio ácido (Lucas Meyer-AME 24, 1973).

D.7. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FÓSFORO TOTAL

El método hace posible calcular el contenido de fosfolípidos asumiendo que todo el fósforo presente está orgánicamente enlazado.

El fósforo es determinado espectrofotométricamente midiendo la intensidad del color azul desarrollado por reacción entre el ácido fosfomolibdico y el agente reductor (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico).

Las muestras fueron previamente mineralizadas por digestión en medio ácido perclórico a 225° C en un equipo digestor TECHNICON BD-40.

La determinación espectrofotométrica se realiza en un equipo Spectronic 21-Bausch & Lomb.

La curva de calibración se realizó utilizando se realizó utilizando soluciones de fosfato ácido de sodio de concentración conocida (Dittmer y Wells, 1973).

D.8. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FOSFOLÍPIDOS Y DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FÓSFORO.

Se efectúa separación por cromatografía en capa delgada preparativa bidimensional sobre sílica gel (Parsons y Patton, 1967).

Los solventes de desarrollo son:

1. Cloroformo-metanol-agua-amoniaco (130:70:8:0,5)
2. Cloroformo-acetona-metanol-ác. acético-agua (100:40:20:20:10)

Las distintas fracciones fueron visualizadas con vapores de yodo y con reveladores específicos: ninhidrina 0,2 % en etanol para fosfolípidos con grupo amino libre y reactivo de Dragendorff para fosfolípidos con colina (Krebs y col., 1969).

La remoción de las distintas fracciones se realizó según la técnica de Skipski (Skipski y col., 1964) y la elución de los fosfolípidos adsorbidos en la sílica fue realizado con una mezcla cloroformo-metanol-agua 10:5:1 (Burkhardt, 1969).

En el material extraído es analizado el contenido de fósforo según la técnica descrita en D.7.

El contenido de cada fosfolípido fue calculado usando el factor de conversión correspondiente que resultan de considerar los siguientes pesos moleculares:

Fosfatidilcolina (PC) = 764

Fosfatidilinositol (PI) = 721

Fosfatidiletanolamina (PE) = 835

Ácido Fosfatídico (PA) = 678

Lisofosfatidiletanolamina (LPE) = 451

D.9. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Se efectúa la separación cuantitativa de fosfolípidos por cromatografía en capa delgada bidimensional según se describió en D.8.

Las distintas fracciones fosfolipídicas extraídas fueron sometidas a un proceso de metilación refluendo durante 15 minutos con KOH 1N metanólico y luego por otros 15 minutos con H₂SO₄ 2N metanólico.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se determinaron por cromatografía gaseosa (equipo VARIAN 3700) utilizando una columna de 1,8 mm de acero inoxidable rellena con dietilenglicol succinato (DEGS) al 10% sobre SUPELCOPORT 80-100 mesh, operando isotérmicamente a 170° C, inyector a 180° C, detector FID a 220oC y transportador Helio (Goodman y Berry, 1986). El equipo utilizado fue VARIAN 3700 con computadora CDS-111 y registrador.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- A. ABRIL; C. CAMUSSO y R. MADDOERY - "Procedimiento para la obtención de Lecitina Pura en Polvo a partir de Gomas Crudas Secas" - Secretaría de Comercio Exterior; Ministerio de Economía - Acta N° 309509 (1987).
- I. M. ABUREESH - "Predicting the Performance of Immobilized Enzyme Reactors Using Reversible Michaelis-Menten Kinetics" . *Bioprocess Eng.* 17, 3 (1997).
- M. V. ARBIGE; P. R. FREUND; S. C. SILVER y J. T. ZELKO - "Novel Lipase for Cheddar Cheese Flavor Development". *Food Technol.* 40, 91 (1986).
- R. G. Arnold; K. M. Shahani y B. K. Dwivedi - "Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products". *J. Dairy Sci.* 58, 1127 (1975).
- ASAHI DENKA CO.- Japanese Patent N° 57.111.398 (1982).
- ASAHI DENKA CO.- Japanese Patent N° 57.198.798 (1982).
- B. ATKINSON - "Reactores Bioquímicos". Ed. Reverté S.A., p233 (1986).
- K. AUNSTRUP - *Appli. Biochem. Bioeng.* 2, 27 (1975).
- K. BAGI; L. M. SIMON y B. SZAJANI - "Immobilization and Characterization of Porcine Lipase". *Enzyme and Microbial Technol.* 20, 7 (1997).
- J. E. BAILEY y D. F. OLLIS - "Biochemical Engineering Fundamentals" - 2nd Ed. Mc Graw-Hill, p63, (1986).
- J. E. BAILEY y D. F. OLLIS - "Design and Analysis of Biological Reactors" en *Biochemical Engineering Fundamentals.* Mc Graw-Hill Chemical Engineering Series, p544 (1986).
- T. E. BARMAN - "Enzyme Handbook". Vol. II. Springer-Verlag (1969).

-
- G. BELL; J. R. TODD; J. A. BLAIN; J. D. E. PATTERSON y C. E. SHAW - "Hydrolysis of Triglycerides by Solid Phase Lipolytic Enzymes of *Rhizopus Arrhizus* in Continuous Reactor Systems". *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1703 (1981).
- J. S. BINDO y G. D. SMITH - *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 68A (1981).
- R. B. BIRD; W. E. STEWART y E. N. LIGHTFOOT - "Fenómenos de transporte". Ed. Reverté S.A., Barcelona p17 (1976).
- A. BODALÓ SANTOYO; E. GÓMEZ; J. L. GÓMEZ CARRASCO; J. BASTIDA RODRÍGUEZ y A. LÓPEZ CABANES. *Afinidad XLIII*, (404), 355 (1986).
- BODALÓ; J. L. GÓMEZ; E. GÓMEZ; J. BASTIDA; J. L. IBORRA y A. MANJÓN. "Analysis of Diffusion Effects on Immobilized Enzymes on Porous Supports with Reversible Michaelis-Menten Kinetics". *Enzyme Microb. Technol.* 8, 433 (1986).
- C. BOELHOUWER. In *Future Sources of Organic Raw Materials*, World Conference on Future Sources of Organic Raw Materials, L. E. Pierre y G. R. Brown Ed.- Pergamon Press, NY p637 (1980).
- J. L. BOHNERT y T. A. HORBETT - "Changes in Adsorbed Fibrinogen and Albumin Interactions with Polymers Indicated by Decreases in Detergent Elutability". *J. Coll. Interf. Sci.* 111, 363 (1988).
- C. O. L. BOYCE - *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1750 (1984).
- C. BRADY. L. METCALFE; D. SLABOSZEWSKI y D. FRANK - "Hydrolysis of Fats". U.S. Patent N° 4.629.742 (1986).
- C. BRADY; L. METCALFE; D. SLABOSZEWSKI y D. FRANK - "Hydrolysis of Fats". U.S. Patent N° 4.678.580 (1987).
- C. BRADY; L. METCALFE; D. SLABOSZEWSKI y D. FRANK - "Lipase Immobilized on a Hydrophobic Microporous Support for the Hydrolysis of Fats". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 917 (1988).

-
- H. BRANDENBERGER - Rev. Ferment. Ind. Aliment. 11, 237 (1956).
- P. L. T. BRIAN; H. B. HALES y T. K. SHERWOOD - "Transport of Heat and Mass between Liquids and Spherical Particles in an Agitated Tank". J. Am. Inst. Chem. Eng. 15, 727-33 (1969).
- H. L. BROCKMAN; J. H. LAW y F. J. KEZDY - "Catalysis by Adsorbed Enzymes. Hydrolysis of Tripropionin by Pancreatic Lipase Adsorbed to Siliconized Glass Beads". J. Biol. Chem. 248, 4965 (1973).
- P. S. BUNTING y K. J. LAIDLER - "Kinetic Studies on Solid Supported β -galactosidase". Biochem, 11, 4477 (1972).
- I. BURKHARDT - "Phosphatides of Sunflowerseeds Involved in Color Formation Occurring in Extracted and Heated Crude Oils" - AOCS Spring Meeting (1969).
- C. CAMUSSO and B. MAROTO.- "Hydrophobic Interactions in the Purification of Soybean Lecithin". J. Am. Oil Chess. Soc., 72, 163 (1995).
- J. J. CARBERRY - "Ingeniería de las Reacciones Químicas y Catalíticas". Ed. Geminis, Bs. As., p80 (1980).
- M. H. COLEMAN y A. R. MACRAE - U.S. Patent N° 4.275.081 (1981).
- A. CORNISH-BOWDEN - "Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed Uncompetitive and Noncompetitive Inhibitors" - Biochem. J. 137, 143 (1974).
- A. CORNISH-BOWDEN - "Fundamentals of Enzyme Kinetics". Butterworth and Co. Pub. Ltd. (1979).
- T. E. CREIGHTON - "Protein-Structures and Molecular Properties". W. H. Freeman and Co., NY p419 (1984).
- S. E. CHARM y B. L. WONG - "Enzyme Inactivation with Shearing". Biotech. Bioeng. 12, 1103 (1970).

-
- D. CHAPMAN - "Lipidos". Ed. Alhambra (1972).
- I. CHIBATA and T. TOSA - en "Immobilized Enzyme Principles", edited by L. B. Wingard, E. Katchalski-Katzir y L. Goldstein, Academic Press, NY, p329 (1976).
- I. CHIBATA; T. TOSA; T. SATO y T. MORI - "Production of L-Amino Acids by Aminoacylase Adsorbed on DEAE-Sephadex" in Methods in Enzymology. Vol XLIV, Immobilized Enzymes - K. Mosbach Ed. Ac. Press, p746 (1976).
- E. A. DAY; en "Flavor Chemistry", edited by R. F. Gould. American Chemical Society, Washington D.C., p94 (1966).
- G. H. DE HASS; W. NIEUWENHUYZEN; L. L. VAN DEENEN - "Purification and Properties of Phospholipase A from Porcine Pancreas". Biochim. Biophys. Acta 159, 103 (1968).
- R. A. DEMEL; L. L. M. VAN DEENEN y B. A. PETICA - Biochim. Biophys. Acta 135, 11 (1967).
- R. A. DEMEL - J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 305 (1968).
- DESARROLLO AGROINDUSTRIAL DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA: 6-1, 6-2. Consejo Federal de Inversiones. Fundación Banco de la Provincia de Córdoba. Relevamiento de la Producción Agroindustrial (1984).
- P. DESNUELLE; J. MOLINES y D. DERVICHIAN - Bull. Soc. Chim. Fr. 3-4, 197 (1951).
- D. S. DICKEY y J. C. FENIC - "Dimensional Analysis for Fluid Agitation Systems". Chem. Eng. 5; 139 (1976).
- D. S. DICKEY y R. W. HICKS - "Fundamentals of Agitation". Chem. Eng. 2; 93 (1976).
- J. C. DITTMER y M. A. WELLS - "Methods in Enzymology". V14; Ed. J. M. Lowenstein, Ac. Press, Inc. NY (1969) p.483.

-
- M. DIXON - "Determination of enzyme-inhibitor constants". *Biochem. J.* 55, 170 (1953).
- V. DOLE y H. MEITNERTZ - "Microdetermination of Long-chain Fatty Acids in Plasma and Tissues". *J. Biol. Chem.* 235, 2595 (1960).
- B. K. DWIVEDI - *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 3, 457 (1973).
- R. EISENTHAL and A. CORNISH-BOWDEN - "Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods" - *Biochem. J.* 139, 721 (1974).
- R. EISENTHAL and A. CORNISH-BOWDEN - "The Linear Plot"- *Biochem. J.* 139, 715 (1974).
- S. EKMAN y B. LUNDBERG - *Acta Chem. Scand B32*, 197 (1978).
- J. M. ENGASSER y C. HORWATH - *J. Theor. Biol.* 42, 137 (1973).
- J. M. ENGASSER - "A fast evaluation of Diffusion effects on Bound Enzyme Activity" - *Biochim. Biophys. Acta* 526, 301 (1978).
- M. G. FARNHAM y DAIRYLAND - Food Laboratories Inc., U.S. Patent N° 1.966.460 (1950).
- M. G. FARNHAM y DAIRYLAND - Food Laboratories Inc., U.S. Patent N° 2.169.278 (1957).
- D. J. FINK; T. NA y J. S. SCHULTZ - *Biotechnol. Bioeng.* 15, 879 (1973).
- V. FLORES LUQUE; F. C. LÓPEZ ROMASANTA; C. GÓMEZ HERRERA y J. PEREDA MARÍN - "La Agitación en la Extracción con Disolventes de Orujos Procedentes de Sistemas ALFIN. 1 - Generalidades de la Cinética del Proceso". *Grasas y Aceites* 19, 247 (1968).
- G. F. FROMENT y K. B. BISCHOFF - "Chemical Reactor Analysis and Design". Jhon Wiley & Sons (1979).

-
- P. F. FOX - "Enzymes other than Rennets in Dairy Technology". J. Soc. Dairy Technol. 33, 118 (1980).
- M. FROBISHER - "Fundamentals of Microbiology". 8th Ed. p.61 W.B. Saunders Co. Philadelphia, (1968).
- FUJI OIL CO.; Japanese Patent N° 56.025.643 (1981).
- J. FUKUMOTO; M. IWUAI and TSUJISAKA - "Crystallization and properties of Lipase of *Aspergillum niger*" - J. Gen. Appl. Microbiol., 9, 353 (1963).
- J. FUKUMOTO; Japanese Patent N° 20.026 (1971).
- CH. M. GARRISON - "How to Design an Escalator Mixing Pilot-plants". Chem. Eng. 7, 63 (1983).
- L. E. GATES; T. L. HENLEY y J. G. FENIC - "How to Select the Optimum Turbine Agitator". Chem. Eng. 8, 110 (1975).
- L. GIORNO y E. DRIOLI - "Catalytic Behavior of Lipase Free and Immobilized in Biphasic Membrane Reactor with different low Water-soluble Substrates" J. Chem. Technol. and Biotechnol. 69, 1 (1997).
- L. GOLDSTEIN et al. - "A Water Insoluble Polyanionic Derivative of Tripsin II. Effects of The Polyelectrolyte Carrier on the Kinetic Behavior of Bound Tripsin". Biochem 3, 1913 (1964).
- L. GOLDSTEIN - "Immobilized Enzymes. Synthesis of new type of Polyanionic and Polycationic Resins and Utilization for the Preparation of Water Insoluble Enzymes Derivatives". Biochim. Biophys. Acta 315, 1 (1973).
- L. GOLDSTEIN - "Kinetic Behavior of Immobilized Enzyme Systems". Methods in Enzymology. 44, Immobilized Enzymes. Ed. K. Mosbach, Ac. Press (1976).
- L. A. GOODMAN y J. W. BERRY - "Phospholipids of Three Xerophytic Cucurbit Seed Oils" – J. Am. Oil Chem. Soc. 63, (1986).

-
- J. M. GUISAN; F. V. MELO y A. Q. BALLESTEROS - *Appli. Biochem. Biotechnol.* 6, 37 (1981).
- N. B. HAVEWALA y W. H. PITCHER - "Immobilized Glucose Isomerase for the Production of High Fructose Syrups" in E. K. Pye and L. B. Wingand. *Enzymes Engineering II*, Plenum Press (1974).
- H. S. HENDRICKSON y E. A. DENIS.- "Kinetic Analysis of the Dual Phospholipid Model for Phospholipase A₂ Action" - *J. Biol. Chem.* 259, 5734 (1984).
- S. HERTZBERG; L. KVITTINGEN; T. ANTHONSEN y G. SKJAK-BRAEK - "Alginate as Immobilization Matrix and Stabilizing Agent in a Two-Phase Liquid System: Application in Lipase-Catalysed Reactions". *Enzyme Microb. Technol.* 14, 42-47 (1992).
- R. W. HICKS; J. R. MORTON y J. G. FENIC - "How to Design Agitator for Desired Process Response". *Chem. Eng.* 26, 102 (1976).
- M. M. HOQ; T. YAMANE; S. SHIMIZU; T. FUNADA and S. ISHIDA - "Continuous Synthesis of Glycerides by Lipase in a Microporous Membrane Bioreactor" *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 776 (1984).
- M. M. HOQ; H. TAGAMI; T. YAMANE and S. SHIMIZU - "Bioreactor for Enzymatic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives. Part II. Some Characteristics of Continuous Glycerides Synthesis by Lipase in a Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor". *Agric. Biol. Chem.* 49, 335 (1985).
- M. M. HOQ; T. YAMANE; S. SHIMIZU; T. FUNADA and S. ISHIDA - "Bioreactor for Enzymatic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives III. Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Lipase in a Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 1016 (1985)
- W. HORWITZ - "Methods of Analysis of the Assessment of Chemistry". 12th Ed. 129 (1975).

-
- S. ISHIDA - "Hydrolysis of Fats and Oils for Lipase". *Yushi* 37, 47 (1984).
- M. IWAI; S. OKUMURA y Y. TSUJISAKA - "Synthesis of Various Kinds of Esters by four Microbial Lipases". *Biochem. Biophys. Acta* 575, 156 (1979).
- B. H. JENSEN; D. R. GALLUZZO y R. G. JENSEN - *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 927 (1988).
- O. B. JORGENSEN - *Acta Chem. Scand.* 17, 2471 (1963).
- S. T. KANG and J. S. RHEE - "Effect of Water on Hydrolysis of Olive Oil by Immobilized Lipase in Reverse Phase System". *Biotechnol. Lett.* 10, 341 (1988).
- S. T. KANG and J. S. RHEE - "Characteristics of Immobilized Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil of High Concentration in Reverse Phase System". *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1469 (1989).
- S. T. KANG and J. S. RHEE - "Effect of Solvents on Hydrolysis of Olive Oil by Immobilized Lipase in Reverse Phase System". *Biotechnol. Lett.* 11, 37 (1989).
- Y. KARUBE; Y. YUGETA and S. SUZUKI - "Electric field Control of Lipase Membrane Activity". *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1493 (1977).
- E. KATCHALSKI; I. SILMAN y R. GOLDMAN - "Effects of the Microenvironment on the Mode of Action of Immobilized Enzymes". *Adv. Enzymol.* 34, 445 (1971).
- K. KAWASHIMA y K. UMEDA - "Studies on Immobilized Enzymes by Radiopolymerization-Part III. A Method for Preparing Bead-Shaped Immobilized Enzymes". *Agr. Biol. Chem.* 40, 1143 (1976).
- J. F. KENNEDY; C. A. WHITE - "Principles of immobilization of Enzymes" in *Handbook of Enzyme Biotechnology*, A. Wiseman Ed., Wiley & Sons (1985).

-
- A. KILARA y K. M. SHAHANI - "Lactase Activity of Cultured and Acidified Dairy Products". J. Dairy Sci. 59, 2031 (1976).
- A. KILARA; K. M. SHAHANI and F. W. WAGNER - "Preparation and characterization of Immobilized Lactase". Lebensm. Wiss. Technol. 10, 84(1976).
- A. KILARA - "Immobilized Proteases and Lipases". Proc. Biochem. 16, 25 (1981).
- A. KILARA - "Enzyme-modified Lipid Food Ingredients". Process Biochem. 20, 35 (1985).
- Y. KIMURA; A. TANAKA; K. SONOMOTO; T. NIHIRA and S. FUKUI - "Application of Immobilized Lipase to Hydrolysis of Triacylglyceride". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 107 (1983).
- H. KLIMMEK - Chem. Ind. 33, 136 (1981).
- T. KOBAYASHI y K. LAIDLER - "Kinetics Analysis for Solid-Supported Enzymes". Biochim. Biophys. Acta 302, 1 (1973).
- T. KOBAYASHI y M. MOO-YOUNG - "Kinetics and Mass Transfer Behavior of Immobilized Invertase on Ion-exchange Resin on Beads". Biotechnol. Bioeng. 15, 47 (1973).
- T. KOBAYASHI; I. KATO; K. OMIYA and S. SHIMIZU - "Recovery of Foam Stability of Yolk-Contaminated Egg White by Immobilized Lipase". Agric. Biol. chem. 44, 413 (1980).
- Y. KOSUGI y H. SUZUKI - J. Ferment. Technol. 51, 895 (1973).
- Y. KOSUGI y H. SUZUKI - "Affinity chromatographic Studies on the adsorption of Lipase on Aliphaticamine-Sepharose 4B". J. Ferment. Technol. 52, 577 (1984).
- KRAFTCO CORP.; British Patent N° 1.240.3445 (1971).

-
- K. KREBS; D. HEUSER y H. WIMMER - "Spray Reagents-Chromatography". E. Stahl (1969).
- B. KRISTAPPA; G. AZEEMODDING y S. D. THIRUMALA RAO - "Power Phosphatides from Indian Soybean Oil". Paintindia 26, 21 (1976).
- R. A. KWON; K. H. KIM y J. S. RHEE - "Hydrolysis of Triglyceride in Two-Phase System Using Immobilized Lipase". Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 15, 122 (1987).
- K. J. LAIDLER - "The Chemical Kinetics of Enzyme Action" - p.64, Oxford University Press. London (1958).
- J. LAJARA - "Degumming of Vegetable Oils. Lecithin manufacture". Grasas y Aceites (Sevilla) 20, 242 (1969).
- J. LAJARA - "Degumming of Vegetable Oils. Lecithin production". Grasas y Aceites (Sevilla) 8, 17 (1970).
- N. A. LANGE - "Handbook of Chemistry". 10th Ed. Mc Graw Hill (1969).
- K. LARSSON - S. C. J. Monograph N° 32, 8 (1968).
- J. LAVAYRE; J. BARATTI - "Preparation and Properties of Immobilized Lipases". Biotechnol. Bioeng. 24, 1007 (1982).
- H. LECUYER y D. G. DERVICHIAN - J. Mol. Biol. 45, 39 (1969).
- O. LEVENSPIEL - "Chemical Reaction Engineering". 2nd Ed. Wiley & Sons, NY (1972).
- P. E. LILEY y W. R. GAMBILL - In "Chemical Engineer's Handbook". R. H. Perry y C. H. Chilton, Eds. Mc Graw-Hill (1982).
- D. M. LILLY; W. E. HORNBY y E. M. CROOK - "The Kinetic of Carboxymethylcellulose-Ficin in Packed Beds". Biochem. J. 100, 718 (1966).

-
- M. D. LILLY y P. DUNILL - Immobilized Enzyme Reactors in Methods in Enzymology, Vol XLIV. Immobilized Enzymes. K. Mosbach Ed. Ac. Press (1976).
- H. C. LIM. - "On Kinetic Behavior at High Enzyme Concentration"- Am. Inst. Chem. Eng. J. 19, 659 (1973).
- H. LINERWEAVER y D. J. BURK - "Determination of Enzyme Dissociation Constants". J. Am. Chem. Soc. 56, 658 (1934).
- W. M. LINFIELD; D. J. O'BRIEN; S. SEROTA y R. A. BARAUSKAS - "Lipid-Lipase Interactions. I: Fat Splitting with Lipase from *Candida rugosa*". J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 1067 (1984).
- G. LIPPEL SAINT'ANNA - "Difusão e Cinética em Enzimas Imobilizadas". Reactores com Enzimas Imobilizadas, Brasil (1989).
- D. LOMBARDO y E. A. DENNIS - "Immobilized Phospholipase A₂ from Cobra Venon". J. Biol. Chem. 260, (30) 16114-21 (1965).
- LUCAS MEYER - AME 22 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).
- LUCAS MEYER - AME 24 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).
- LUCAS MEYER - AME 28 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).
- LUCAS MEYER - AME 36 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).
- LUCAS MEYER - AME 39 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).
- LUCAS MEYER - AME 40 - Quality Assessment of Lecithin - Hamburg, Alemania (1973).

-
- R. LUMRY; E. L. SMITH y R. R. GLANTZ - "Kinetics of Carboxypeptidase Action I. Effects of Varius Extrinsic Factors on Kinetics Parametes". J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 4330 (1951).
- A. R. MACRAE - "Lipase-Catalized Interesterification of Oil and Fats". J. Am. Oil Chem. Soc. 60, 291 (1983).
- A. R. MACRAE - "Biotechnology for the Oils and Fats industry", edited by C. Ratledge, P. Dawson y J. Rattray, American Oil Chemistry's Society, Champaing Il, p189 (1984).
- A. R. MACRAE - "Biocatalysis in Organic Synthesis". J. Tramper, H. C. van der Plaas y P. Linko, Ed, Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam, p185 (1985).
- R. MADOERY; A. ABRIL; R. CABROL; C. CAMUSSO y B. MAROTO - "Purificación de Lecitina de Soja". III Congreso Latinoamericano de Cs. Farmacéuticas, Montevideo (1986).
- R. MADOERY; A. ABRIL; R. CABROL; C. CAMUSSO y B. MAROTO - "Purificación de Lecitina de Soja. I: Obtención de Lecitina Pura en polvo. II: Obtención de Fosfatidilcolina Pura". La Alimentación Latinoamericana, 163, 60 (1987).
- F. X. MALCATA; H. R. REYES; H. S. GARCÍA; C. G. HILL y C. H. AMUNDSON - "Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils - A Review". J. Am. Oil Chem. Soc. 67, 890 (1990).
- X. MALCATA; H. S. GARCÍA; C. G. HILL y C. H. AMUNDSON - "Hydrolysis of Butteroil by Immobilized Lipase Using a Hollw-Fiber Reactor. Part I- Adsorption Studies". Biotech. and Bioeng. 39, 647 (1992).
- F. X. MALCATA; C. G. HILL y C. H. AMUNDSON - "Hydrolysis of Butter Oil by Immobilized Lipase Using a Hollow_Fiber Reactor: IV Effects of Temperature". Biotech. and Bioeng. 39, 1097 (1992).
- S. MARCELJA - Biochim. Biophys. Acta 455, 1 (1976)

-
- C. MARLOT; G. LANDGRAND; C. TRIANTAPHYLIDES y J. BARATTI - "Ester Synthesis in Organic Solvent Catalized by Lipases Immobilized on Hydrophilic Supports". *Biotechnol. Lett.* 7, 647 (1985).
- B. MAROTO; C. CAMUSSO y R. MADOERY - "Optimización del proceso de purificación de Lecitina de Soja. I: Diseño del equipo agitador. II: Cinética de la Extracción". *La Alimentación Latinoamericana* N° 183, 63 (1990).
- B. MAROTO; C. CAMUSSO y R. MADOERY - "Purificación de Lecitina de Soja. I: Selección de Equipamiento y Determinación de Condiciones Operativas. II: Obtención del Diagrama de Equilibrio". *Grasas y Aceites (España)* 43, 6 (1991).
- T. MATSUO; N. Sawamura; y. Hashimoto y W. Hashida - U.S. Patent N° 4.420.560 (1983).
- T. MATSUO; N. Sawamura; y. Hashimoto y W. Hashida - U.S. Patent N° 4.268.3527 (1991).
- R. MEAD; R. N. CORNON y A. M. HASTED - "Statistical Methods in Agriculture and Experimental Biology". Chapman y Hall, Londres (1993).
- MEITO SANGYO CO KK, Japanese Patent N° 7.116.509 (1971).
- MEITO SANGYO CO KK; Japanese Patent N° 7.928.305 (1979).
- MEITO SANGYO CO KK; Japanese Patent N° 7.995.607 (1979).
- R. A. MESSING - "Molecular Inclusion-Adsorption of Macromolecules on Porous Glass Membranes". *J. Am. Chem. Soc.* 91, 2370 (1969).
- R. A. MESSING - *Enzymology* 38, 370 (1970).
- R. A. MESSING - "Adsorption and Inorganic Bridge Formations" in *Methods of Enzymology*. XLIV. Immobilized Enzymes - K. Mosbach. Ac. Press, p148 (1970).

-
- R. A. MESSING - "Introduction and General History of Immobilized Enzymes" in
R. A. Messing - Immobilized Enzymes for Industrial Reactors - Ac. Press
NY p1 (1975).
- L. MICHAELIS y M. L. MENTEN - "Kinetics of Invertase Action". Biochem. Z.
49, 333 (1913).
- C. MILLER; H. AUSTIN; L. POSORSKE y J. GONZALEZ - "Characteristics of
an Immobilized Lipase for the Commercial Synthesis of Esters". J. Am. Oil
Chem. Soc. 65, 927 (1988).
- M. MOO-YOUNG y T. KOBAYASHI - "Effectiveness Factors for Immobilized
Enzyme Reactions". Can. J. Chem. Eng. 50, 162 (1972).
- W. W. NAWAR in "FOOD CHEMISTRY" - O. R. Fennema Ed. Marcel Decker,
Inc. NY p139 (1985).
- S. L. NIEDELMAN y J. GEIGERT - J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 290 (1984).
- J. H. NELSON - "Enzymatically Produced flavors for Fatty Systems". J. Am. Oil
Chem. Soc. 49, 559 (1972).
- T. NIELSEN - Fette Seifen Anstrichm. 83, 507 (1981).
- T. NIELSEN - Fette Seifen Anstrichm. 87, 15 (1984).
- NISSHIN OIL MILLS LTD - Japanese Patent N° 7.041.304 (1970).
- NISSHIN OIL MILLS LTD - Japanese Patent N° 7.116.508 (1971).
- NISSHIN OIL MILLS LTD - Japanese Patent N° 7.680.305 (1976).
- W. NORDE; F. MAC RITCCHIE; G. NOWICKA y J. LYKLEMA - "Protein
Adsorption at Solid-Liquid Interfases: Reversibility and Conformation
Aspects". J. Coll. Interf. Sci. 112, 447 (1986).
- NOVO NORDISK - Lecitase - Hoja Técnica (1989).

OCÓN TOJO - "Problemas de Ingeniería Química. Operaciones Básicas".
Tomo 2. Ed. Aguilar (1970).

I. C. OMAR; H. SAEKI; N. NISHIO y S. NAGAI - "Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Thermostable Lipase Trans Humicola Lanuginosa". Agric. Biol. Chem. 52, 99 (1988).

S. ONO; K. HIROMI y M. JIMBO - "Kinetics Studies of Glucoamylase". J. Biochem. (Tokyo) 55, 315 (1964).

H. E. OTTING y M&R DIETETIC LABS INC.- U.S.Patent N° 1.966.460 (1934).

H. E. OTTING y M&R DIETETIC LABS INC.- U.S.Patent N° 2.169.278 (1934).

J. H. PARK y Y. C. LEE - "Studies on the Immobilization of Lipase by Adsorption Method". Korean J. Food Sci. Technol. 17, 75 (1985).

J. PARSON y S. PATTON - "Two dimensional Thin-Layer Chromatography of Polar Lipids from Milk and Mammary Tissue". Journal of Lipids Research V8, (1967).

J. D. E. PATTERSON; J. A. BLAIN; C. E. L. SHAW; R. TODD y G. BELL - "Synthesis of Glycerides and Esters by Fungal Cell-Bound Enzymes in Continuous Reactor Systems". Biotechnol Lett. 1, 211 (1979).

L. H. POSORSKE - J. Am. Oil Chem. Soc. 61, 1758 (1984).

E. H. PRIDE - J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 719A (1979).

W. PRONK; P. A. M. KERKHOF; C. VAN HELDEN and K. VAN'T RIET - "The Hydrolysis of Triglycerides by Immobilized Lipase in a Hydrophilic Membrane Reactor". Biotechnol. Bioeng. 32, 512 (1988).

L. QUELLET; K. J. LAIDLER; M. F. MORALES - "Molecular Kinetics of Muscle Adenosine Triphosphate". Arch. Biochem. Biophys. 39, 37 (1952).

-
- M. M. RAKHIMOV; N. R. DZHANBAEVA and I. V. BEREZIN - "Change in the Activity of Lipolytic Enzymes During the Storage and Treatment of Cotton Seeds". Doklady Biochem. 229, 389 (1977).
- P. A. RAMACHANDRAN - Biotechnol. Bioeng. 17, p211 (1975).
- C. N. Rao - "Espectroscopía Ultravioleta y Visible". Ed. Alhambra S.A. p280 (1970).
- R. R. RAUTZEN; D. S. DICKEY y R. R. CORPSTEYN - "How to Use Escal-up Methods for Turbine Agitator". Chem. Eng. 25, 119 (1976).
- G. REED - "General Characteristics of Enzymes". Enzymes in Food Processing, 2nd Ed. Dunnill, Food Science and Technology Monographs, Ac. Press (1975).
- D. L. REGAN; M. D. LILLY y P. DUNILL - "Influence of Intraparticle Diffusional Limitation on the Observed Kinetics of Immobilized Enzymes and on Catalized Design". Biotechnol. Bioeng. 16, 1081 (1974).
- E. N. REIMERDES - "Development of an Enzyme Reactor for food chemistry" in Enzymes as Catalysis in Organic Synthesis, M. P. Schneider Ed., Reidel Pub. Co. (1989).
- M. J. ROBERTS y KRAFTCO CORP - Canadian Patent N° 911.248 (1971).
- M. J. ROBERTS y KRAFTCO CORP.- Canadian Patent N° 911.250 (1971).
- M. J. ROBERTS y KRAFTCO CORP.- U.S.Patent N° 3.650.768 (1971).
- L. SARDA y P. DESNUELLE - "Action de la lipase pancréatique sur les Esters en Emulsion". Biochim. Biophys. Acta 30, 513 (1958).
- M. SARDAR; R. AGARWAL; A. KUMAR y M. N. GUPTA - "Noncovalent immobilization of enteric polymer Eudragit S-100". Enzyme and Microbial Technol. 20, 5 (1997).

-
- B. J. SCHNYDER y R. M. LOGAN - "Commercial Application of immobilized Glucose Isomerase". 77th AIChE National Meeting, Pittsburg (1974).
- R. SCHUCH y K. M. MUKHERJEE - "Interesterification of Lipids Using an Immobilized sn-1,3-Specific Triacylglycerol Lipase". J. Agric. Food Chem. 35, 1005 (1987).
- I. H. SEGEL - "Enzymes Kinetics-Behavior and Analysis of Rapid equilibrium and Steady-State Enzymes Systems". J. Wiley & Sons, NY p5 (1993).
- K. M. SHAHANI; R. G. ARNOLD; A. KILARA y B. K. DWIVEDI - "Role of Microbial Enzymes in Flavor Development in Foods". Biotechnol. Bioeng. 18, 891 (1976).
- I. W. SIZER - "Temperature Activation and Inactivation of the Crystalline Catalase-Hydrogen Peroxide System". J. Biol. Chem. 154, 461 (1944).
- V. SKIPSKI; R. PETERSON; M. BARCLAY - "Quantitative Analysis of Phospholipids by Thin-Layer Chromatography". Biochem. J. 90, 374 (1964).
- H. V. SMITH - "Oleochemicals in the Plastic Industry". J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 351 (1985).
- N. O. V. SONNTAG - J. Am. Oil chem. Soc. 56, 861A (1979).
- W. STEIN - "Fatty chemical and Petrochemical raw Materials - Contrast or Complement". Fette Seifen Anstrichm. 84, 45 (1982).
- A. C. STORER y A. CORNISH-BOWDEN - "Kinetic evidence of a 'mnemonical' Mechanism for Rat Liver Glucokinase". Biochem. J. 165, 61 (1977).
- R. SURESH y M. CHIDAMBARAM - "Periodic Operation of Well mixed Enzyme Reactors with Steady State Multiplicities Using Relay Feedback". Bioprocess Eng. 16, 4 (1997).

TABELLE PER IL LABORATORIO - Carlos Erba.

-
- T. TANAKA; E. ONO y K. TAKINAMI. U.S. Patent N° 4.275.011 (1981).
- L. TARHAN y A. TELEFONCU - "Effect of Enzyme Ratio on the Properties of Glucose Oxidase and Catalase Immobilized on Modified Perlite". *Process Biochemistry* 27, 11 (1992).
- D. THOMAS; G. BROUN y E. SÉLÉGNY - "Non Enzymatic Model Membranes: Diffusion-Reaction Kinetics and Phenomena". *Biochimie* 54, 229 (1972).
- M. TIRRELL y S. MIDDLEMAN - "Shear Modifications of Enzyme Kinetics". *Biotech. Bioeng.* 17, 299 (1974).
- T. TOSA et al. - "Continuous Production of L-Aspartic acid by Immobilized Aspartase". *Biotech Bioeng.* 15, 68 (1973).
- R. TREYBAL - *Mass Transfer Operations*. Mc Graw-Hill, NY (1968).
- A. G. TSUK and G. OSTER - "Determination of Enzyme Activity by a Linear Measurement". *Nature (London)* 190, 721 (1961).
- L. L. M. VAN DEENEN; U. M. T. HOUTS MULLER; G. H. DE HAAS y E. J. - *Pharm. and Pharmacol.* 14, 197 (1962).
- A. VAN DER PADT; M. J. EDEMA; J. J. W. SEWALT and K. VAN'T RIET - *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 347 (1990).
- W. VAN NIEUWENHUYZEN - "Lecithin Production and Properties". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53, 425 (1976).
- K. VENKATASUBRAMANIAN y H. S. HARROW - "Design and Operation of a Commercial Immobilized Glucose Isomerase Reactor System". *Annals NY Acad. Sci* 326, 141 (1979).
- C. WALSH - "Enzymatic Reaction Mechanisms". W. H. Freeman and Co. NY, p24 (1984).

-
- L. R. WEATHERLEY; D. W. ROONEY y M. V. NIEKERK - "Clean Synthesis of Fatty Acids in an Intensive Lipase-catalysed Bioreactor". *J.Chem. Technol. and Biotech.* 68, 4 (1997).
- J. F. WEHNER y R. H. WILHEM - *Chem. Eng. Sci.* 6, p89 (1956).
- B. W. WERDELMANN - "Fat and Oil Chemistry. A Vital Obligation". *Fette Seifen Anstrichm.* 76, 1 (1974).
- B. W. WERDELMANN y R. D. SCHMID - *Fette Seifen Anstrichm.* 84, 436 (1982).
- J. E. WILLIAMSON; K. E. PAZAIRE y C. J. GEANKOPLIS - "Liquid-Phase Mass Transfer at Low Reynolds Number". *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 2, 126 (1963).
- R. A. WISDOM; P. DUNILL; M. D. LILLY y A. MACRAE - "Enzymatic Interesterification of Fats: Factors Influencing the Choice of Support for Immobilized Lipase". *Enzyme Microb. Technol.* 6, 43 (1984).
- R. A. WISDOM; P. DUNILL y M. D. LILLY - *Enzyme Microb. Technol.* 7, 567 (1985).
- R. A. WISDOM; P. DUNILL y M. D. LILLY - "Enzymatic Interesterification of Fats: The Effect of non Lipase Material on Immobilized Enzyme Activity". *Biotechnol. Bioeng.* 29, 1381 (1986).
- H. Y. YAMAMOTO; M. P. STEINBERG y A. I. NELSON - *J. Food Sci.* 27, 113 (1962).
- T. YAMANE - "Bioreactors for Fats and Oils. Part IX - A Comparison of Assays on Hydrolytic Activity of Lipase with and without Surfactant". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 12 (1987).
- M. K. YAHOUN - "Fatty Acid and Position Specificities of *Rhizopus delemar* Intracellular Lipases". *Grasas y Aceites (Sevilla)* 37, 191 (1986).

Nomenclatura

NOMENCLATURA

Ap	área superficial de la partícula (cm^2)
Ca	concentración del componente A (moles.l^{-1})
Ca0	concentración del componente A a tiempo inicial (moles.l^{-1})
dp	diámetro de la partícula (cm)
D/uL	módulo de dispersión
Des	Difusividad efectiva de sustrato ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
Dso	Difusividad del sustrato ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
e_{inmov}	carga de enzima (UI. g^{-1})
e	concentración de enzima (UI.l^{-1})
Ea	energía de activación (J.mol^{-1})
ES	complejo enzima - sustrato (mol. l^{-1})
F	caudal volumétrico de alimentación (l.min^{-1})
g	aceleración de la gravedad (m.s^{-2})
IA	porcentaje de insolubles en acetona (%)
k	constante de velocidad de reacción (min^{-1})
ks	coeficiente de transferencia de masa externo (cm.s^{-1})
K	constante de equilibrio de la reacción Enzima-Sustrato
Km	constante de Michaelis-Menten (mol.l^{-1})
Kp/Kr	parámetro de difusión restringida
M	peso molecular del agua
Ns	flujo de materia ($\text{mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)
P	concentración de producto de reacción (mol.l^{-1})
q_{E inmov}	actividad específica de la enzima inmovilizada (UI)
Q	cantidad total de trazador (mol.s. l^{-1})
r	radio de la partícula soporte (cm)
R	constante absoluta de los gases ($\text{J.mol}^{-1}.\text{°K}^{-1}$)

s	concentración de sustrato en la interfase solución-partícula = concentración de sustrato que interviene en la reacción cuando no hay resistencia difusional (mol.l^{-1})
s_o	concentración inicial de sustrato en el reactor (mol.l^{-1})
S_o	concentración de sustrato en la solución (mol.l^{-1})
t	tiempo (min)
T	temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K}$)
U	velocidad relativa entre la partícula y el fluido
v	velocidad de reacción ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
v_s	velocidad de reacción cuando la concentración es s ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
v_{s_o}	velocidad de reacción cuando la concentración de sustrato es S _o ($\text{moles.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
v_o	velocidad volumétrica promedio de utilización de sustrato ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
v_p	volumen medio del poro (cm^3)
V	velocidad máxima de reacción ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
V_b	volumen molar del soluto al punto de ebullición normal ($\text{cm}^3.\text{g}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)
V_f	volumen del fluido contenido en el reactor (cm^3)
V_{ol}	volumen del reactor (cm^3)
V_p	volumen de la partícula (cm^3)
V_{s_o}	velocidad de reacción libre de efectos difusionales ($\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
X	número de asociación para el agua

LETRAS GRIEGAS

$\Delta\rho$	diferencia de densidad entre la partícula y el fluido (g. cm^{-3})
ε_p	porosidad de la partícula
τ	factor de tortuosidad
μ	viscosidad del fluido ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
δ	velocidad de dilución (min^{-1})
η	factor de efectividad
η_e	factor de efectividad externo
η_i	factor de efectividad interno