

Producción Sostenible de Aromatizantes Basada en un Proceso Biocatalítico Optimizado

Sustainable Production of Flavorings Based on an Optimized Biocatalytic Process

Presentación: 08/10/2024

Doctorando:

Germán CARRILLO

Centro de Investigación y Tecnología Química, Facultad Regional Córdoba, Universidad Tecnológica Nacional, Córdoba - Argentina.
gcarrillo@frc.utn.edu.ar

Directora:

Griselda Alejandra EIMER

Codirectores:

Eliana Gabriela VASCHETTO

Gabriel Orlando FERRERO

Resumen

Desde las últimas dos décadas las sílicas mesoporosas han sido estudiadas debido a su potencial como soportes de varias moléculas y biomoléculas, para aplicaciones en catálisis heterogénea y nanotecnología. En la síntesis de estos materiales se utilizan agentes plantilla que permiten obtener un tamaño de poro variable según los requerimientos y/o aplicaciones necesarias. Uno de los focos de la Ingeniería de los Materiales es explorar metodologías más sostenibles para la obtención de estos sólidos. En este estudio se empleó un moldeante derivado de recursos renovables en la etapa de síntesis de los soportes mesoporosos para luego anclar la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en estos. De esta manera, el biocatalizador obtenido fue aplicado en reacciones de Química Fina. Específicamente, mediante la transesterificación de alcohol isoamílico con acetato de vinilo se evaluó la producción de acetato de isoamilo, un éster con olor característico a banana empleado como aromatizante y saborizante. Luego de optimizar el tiempo de inmovilización de la enzima y la temperatura de reacción, se logró un rendimiento del 62,5% a las 24h.

Palabras clave: proceso sostenible, biocatalizadores, materiales mesoporosos, producción de aromatizantes/saborizantes

Abstract

Since the last two decades, mesoporous silicas have been studied due to their potential as supports for various molecules and biomolecules, for applications in heterogeneous catalysis and nanotechnology. In the synthesis of these materials, template agents are used to obtain a variable pore size according to the requirements and/or applications required. One of the focuses of Materials Engineering is to explore more sustainable methodologies for obtaining these solids. In this study, moldants derived from renewable resources were used in the synthesis stage of mesoporous supports to then anchor the lipase of *Pseudomonas fluorescens* in them. In this way, the biocatalyst obtained was applied in Fine Chemistry reactions. Specifically, by transesterifying isoamyl alcohol with vinyl acetate, the production of isoamyl acetate, an ester with a characteristic banana odor used as a flavoring and flavoring, was evaluated. After optimizing the immobilization time of the enzyme and the reaction temperature, a yield of 62.5% was achieved at 24h.

Keywords: sustainable process, biocatalysts, mesoporous materials, flavoring production

Introducción

Con el paso del tiempo el uso de las sílicas mesoporosas en la catálisis heterogénea ha cobrado relevancia en aplicaciones industriales y de Química Fina. Su gran superficie y tamaño de poro ajustable las vuelven adecuadas para ser soporte de un gran número de moléculas, metales y especies biológicas. Además, las sílicas son materiales estructuralmente resistentes y químicamente estables en un amplio rango de pH y de temperatura. Generalmente se sintetizan utilizando un agente plantilla orgánico que posteriormente se elimina por extracción con solventes o calcinación. Una nueva perspectiva más sustentable plantea la posibilidad de reemplazar los surfactantes comúnmente empleados por fuentes alternativas derivadas de la biomasa, conservando principalmente las propiedades texturales de los soportes y sus altas áreas específicas (Vaschetto et al., 2023). En este sentido se contempla usar agentes moldeantes de disponibilidad comercial, particularmente el Monoestearato de Glicerilo (MEG).

Por otra parte, con respecto a las enzimas, dentro de la gran variedad que existen, las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* permiten adaptarse a aplicaciones biotecnológicas con gran potencial en la síntesis orgánica de sustancias químicas de interés. En este sentido, los sistemas enzimáticos ofrecen ventajas frente al uso de catalizadores sintéticos convencionales, que suelen exigir condiciones severas y procesos que conllevan altos consumos energéticos y una excesiva generación de residuos (Vilas Bôas & de Castro, 2022).

En este trabajo se estudió la síntesis del biocatalizador y el proceso biocatalítico para la obtención de acetato de isoamilo por medio de la transesterificación de acetato de vinilo y alcohol isoamílico empleando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada en una sílice mesoporosa renovable. El uso más destacado del acetato de isoamilo es como aromatizante y saborizante, confiriéndole un particular olor y sabor a banana a alimentos y bebidas (Nyari et al., 2018,);(George A. Burdock, 2010).

Desarrollo

Se sintetizó una sílice mesoporosa por medio del método sol-gel siguiendo el procedimiento descrito en Vaschetto et al., 2023. El porógeno MEG (Merck) fue disuelto en etanol (Biopack, 99,5% V/V) a una temperatura de 60 °C bajo agitación magnética. Luego se adicionó lentamente la solución conteniendo el precursor de silicio (tetraetoxisilano, TEOS, Sigma Aldrich, 98%) disuelto en una solución de HCl 2 M (Cicarelli, 36,5-38% p/p), paso seguido se agregó fluoruro de sodio (NaF, Sigma Aldrich, P.A.) como iniciador de la condensación de la sílice (Peña et al., 2007, 2008). El sistema se llevó a agitación. Finalmente, se sometió a tratamiento hidrotérmico a 85 °C por tres días, formándose un gel. El material fue filtrado, secado y calcinado en flujo de aire a 550 °C. A este sólido se lo denominó M-MEG.

Posteriormente se procedió a preparar una solución enzimática y suspender en ella una cantidad de matriz siguiendo la metodología descrita en Carrillo et al., 2023. El biocatalizador obtenido se dejó secando a temperatura ambiente durante un día. Para una carga nominal de 400 mglipasa/gsoporte se evaluaron distintos tiempos de contacto: 24, 48, 96 y 120h. Los materiales fueron designados como M-MEG/PF-“X”h, siendo X la cantidad en h que se dejó inmovilizando la solución de enzima con el soporte.

La matriz fue caracterizada por isotermas de adsorción/desorción de N₂ en un equipo ASAP 2420 Micromeritics con desgasado previo de las muestras a 130 °C por 6h bajo vacío, donde se analizó la mesoporosidad, tamaño y volumen de poros, distribución de tamaños de poro. La inmovilización enzimática en el soporte mesoporoso fue verificada por medio de Espectroscopía por Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) empleando un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 equipado con un módulo Smart ARK.

Para la evaluación catalítica de los materiales, se preparó una mezcla de acetato de vinilo y alcohol isoamílico en una proporción 1: 1,5. Luego se separó en viales y se añadió el biocatalizador correspondiente. Para llevar a cabo la reacción, se sellaron los viales y se llevaron a un agitador orbital termostizado a 200 rpm. Las reacciones fueron realizadas a diferentes temperaturas: 30, 40 y 50 °C. Además, se realizaron reacciones de control con el soporte mesoporoso M-MEG. Las reacciones fueron monitoreadas tomando muestras a 0, 2 y

24h, las cuales se centrifugaron y se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer - Clarus 500 con detector de ionización de llama (FID) provisto de una columna ZB-1.

Resultados

La isoterma de adsorción/desorción de nitrógeno para la matriz M-MEG pudo ser clasificada como tipo IV, según IUPAC, característica de una estructura mesoporosa (figura no mostrada). Con su análisis pudo calcularse el área específica ($386,71 \text{ m}^2/\text{g}$), tamaño medio de poro ($8,4 \text{ nm}$, típico de estos materiales) y volumen de poros (alrededor de $1,04 \text{ cm}^3/\text{g}$), y distribución de tamaños de poros estrecha (Carrillo et al., 2023).

La técnica IR-TF es utilizada para estudiar los enlaces de péptidos y proteínas evidenciando la presencia de éstas en los soportes. Tanto en la enzima libre como en los biocatalizadores fueron observadas las señales a 1645 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} , características de los enlaces Amida I y Amida II, respectivamente (Figura 1). (Wong et al., 1991). (Van Dorp et al., 1990)

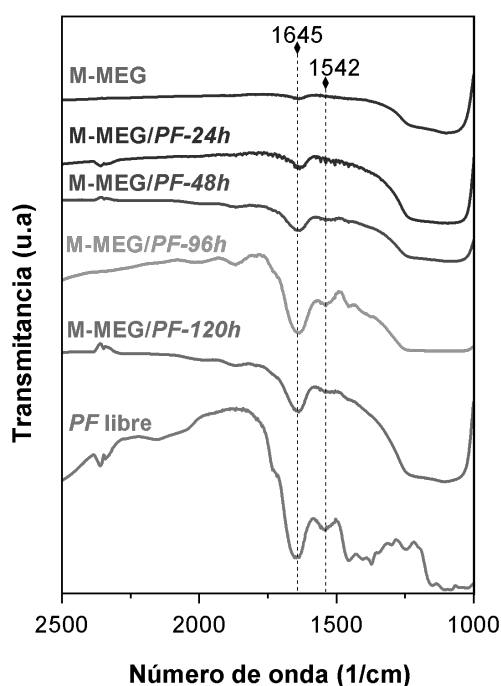


Figura 1. IR-TF de la enzima libre y los biocatalizadores sintetizados a los tiempos de inmovilización mencionados.

Pudo observarse una tendencia creciente de la intensidad de la banda a 1645 cm^{-1} a medida que aumenta el tiempo de inmovilización hasta las 96h, indicando que el material M-MEG/PF-96h presentaría el mayor porcentaje de enzima inmovilizada.

Los resultados de evaluación catalítica de todos los materiales se muestran en la Figura 2. El soporte no presentó actividad a las 2h ni a las 24h, mientras que los biocatalizadores fueron activos en los tiempos de reacción mencionados. Como se observa en la Figura 2A y 2B, donde se compara la evaluación catalítica para todos los biocatalizadores sintetizados, tanto a 2h como a 24h de reacción el mejor resultado se obtuvo con un tiempo de inmovilización de 96h, logrando un rendimiento a acetato de isoamilo del orden del 19,7% y del 62,5%, respectivamente. Superado este tiempo, el rendimiento disminuye levemente. Mientras que a tiempos de inmovilización menores se lograría anclar menor cantidad de enzima en la matriz pura, traducándose en un menor rendimiento. Es por lo antes mencionado que se seleccionó un tiempo óptimo de contacto entre la enzima y soporte de 96h.

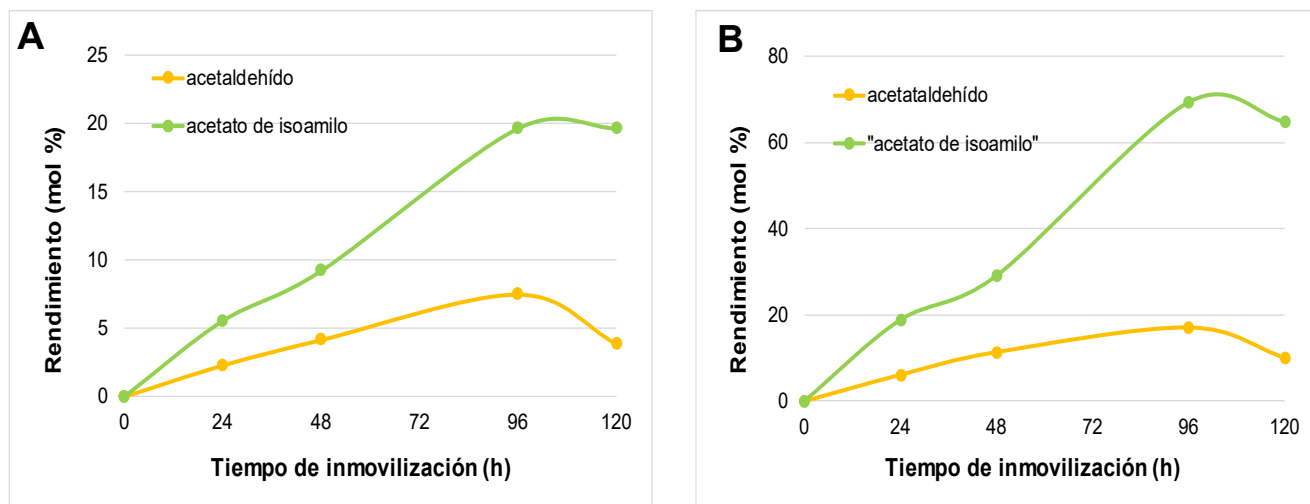


Figura 2. Rendimiento a acetato de isoamilo y a acetaldehído de los biocatalizadores a distintos tiempos de inmovilización: A) 2h y B) 24h de reacción. Material: M-MEG/PF-96h. Condiciones de reacción: Relación molar alcohol isoamílico/acetato de vinilo = 1.5/1 y rpm=200.

Por otra parte, como se reporta en bibliografía (Kumari et al., 2008), la temperatura es una variable clave para estudiar la influencia que tiene sobre la producción de una amplia gama de ésteres, ya que puede impactar en el rendimiento de la reacción. El aumento de la temperatura de un sistema puede tener un efecto positivo sobre aspectos cinéticos, sin embargo, este incremento puede provocar la desnaturalización de la proteína y la consecuente inactivación enzimática (Kumari et al., 2008). Para evaluar el efecto de la variación de la temperatura en la reacción, se llevó a cabo la transesterificación empleando como biocatalizador el material M-MEG-PF-96h a tres temperaturas diferentes: 30, 40 y 50 °C.

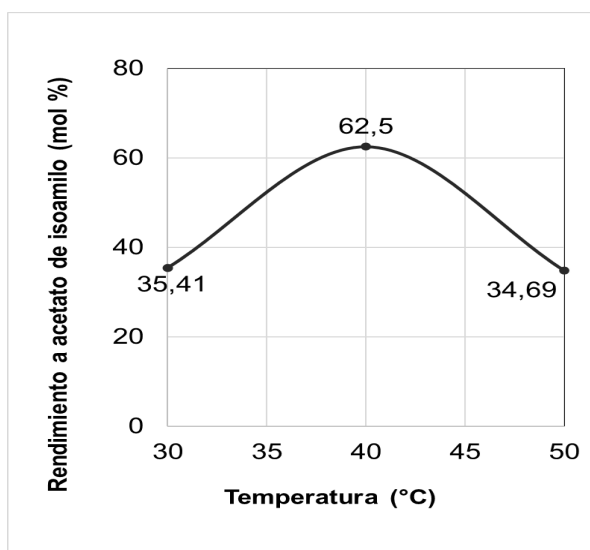


Figura 3. Efecto de la temperatura de reacción en la actividad catalítica. Condiciones de reacción: Material: M-MEG/PF-96h. Condiciones de reacción: Relación molar alcohol isoamílico/acetato de vinilo = 1.5/1 y rpm=200. Tiempo de reacción: 24h.

Como se muestra la Figura 3, luego de 24h de reacción los biocatalizadores presentaron actividad a todas las temperaturas ensayadas, logrando la máxima actividad a los 40 °C, con el ya mencionado rendimiento a producto del 62,5%. Por lo tanto, una temperatura de 40 °C fue elegida como la más adecuada para llevar a cabo la reacción de transesterificación.

Para estudiar la influencia del tiempo de reacción sobre la actividad catalítica se evaluó el material M-MEG/PF-96h tomando muestras de reacción cada 2h durante 24h (Figura 4). Como se observa en dicha figura, el equilibrio fue alcanzado aproximadamente a las 20h de reacción, con una conversión del orden del 86%, lo que representa un rendimiento a acetato de isoamilo del 66 %.

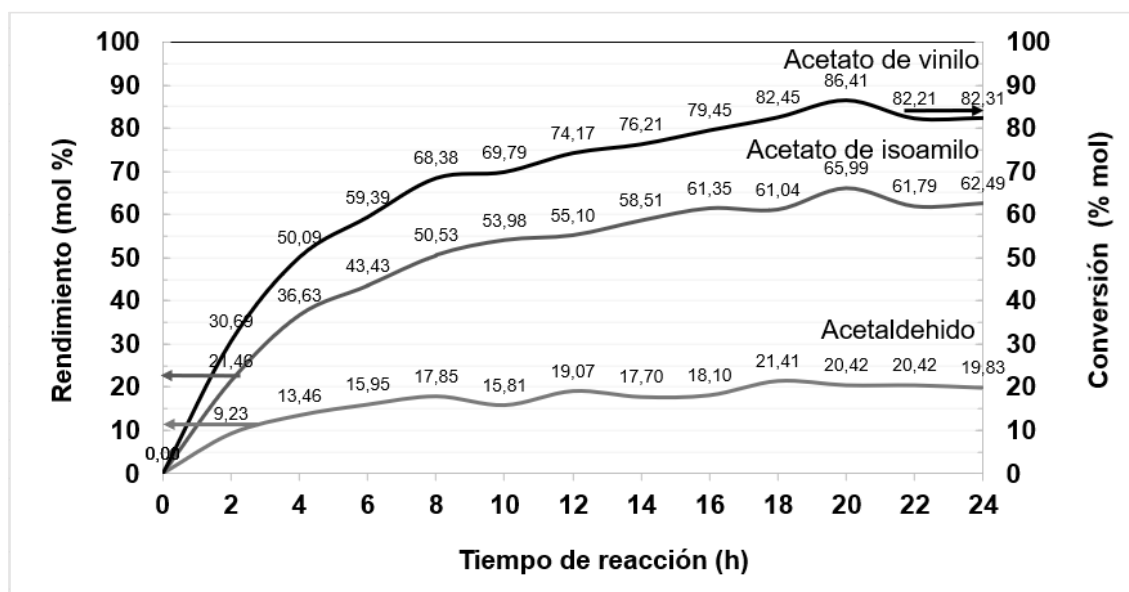


Figura 4. Tiempo de actividad óptimo en la transesterificación de acetato de vinilo con alcohol isoamílico

Para evaluar la estabilidad del biocatalizador en función del tiempo de almacenamiento, se determinó la actividad del biocatalizador M-MEG/PF-96h transcurridos 2, 4 y 6 meses desde su preparación. Luego de 2 meses, 4 meses y 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente los rendimientos a las 24h de reacción fueron del 63%, 62,5% y 58% respectivamente, demostrando que la enzima continúa inmovilizada en el soporte y puede mantener su actividad catalítica prácticamente intacta con el transcurso del tiempo, representando esto que la actividad a los seis meses de almacenamiento se mantiene en el orden del 93%.

Finalmente, esta serie de experimentos ha permitido optimizar un conjunto de catalizadores heterogéneos enzimáticos sintetizados a partir de un soporte silíceo preparado por una ruta más amigable ambientalmente. A su vez, el empleo de sistemas enzimáticos permitió operar en condiciones más suaves (vías alternativas más eco-amigables y controlables), alcanzando un buen rendimiento a acetato de isoamilo, éster muy utilizado como aromatizante y/o saborizante.

Conclusiones

A partir de la síntesis de un material silíceo mesoporoso que emplea un agente plantilla más sostenible derivado de biomasa, se lograron desarrollar biocatalizadores heterogéneos por inmovilización enzimática de la lipasa *Pseudomonas fluorescens*.

Se determinó que el tiempo óptimo de inmovilización fue de 96h, mientras que la temperatura de reacción óptima fue de 40°C, logrando un rendimiento del 62,5% a las 24h y se alcanzó una actividad óptima del orden del 66 % de rendimiento al producto deseado a 20h de reacción.

La estabilidad del biocatalizador fue evaluada logrando mantener su actividad en un 93% luego de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

En base a la serie de experimentos realizados se han logrado desarrollar biocatalizadores a partir de un soporte silíceo preparado por una ruta alternativa más eco-amigables y controlable, alcanzándose un buen

rendimiento a acetato de isoamilo, éster muy utilizado como aromatizante y/o saborizante en aplicaciones industriales.

Referencias

- Carrillo, G., Ferrero, G. O., Vaschetto, E. y Eimer G. A. (2023). Preparación de un sólido mesoporoso renovable para su aplicación como biocatalizador en la transesterificación de acetato de vinilo con alcohol isoamílico. *Revista SAM - Asociación Argentina de Materiales*, 1, 60–66. Disponible en <<http://materiales-sam.org.ar/sam/wp-content/uploads/2024/01/V1-Rev-SAM-2023.pdf>>
- George A. Burdock. (2010). *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients Sixth Edition: Vol. 6th Edition*. CRC Press.
- Kumari, A., Mahapatra, P., Kumar, G. V. y Banerjee, R. (2008). Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31, 291–298. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0160-x>
- Nyari, N., Paulazzi, A. y Zamadei, R. (2018). Synthesis of isoamyl acetate by ultrasonic system using *Candida antarctica* lipase B immobilized in polyurethane. *Journal of Food Process Engineering*, 41, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12812>
- Peña, J., Cardona, E. y Rios, L. (2008). Synthesis of silicon oxide with high superficial area and porosity through sol-gel technique using glycerol and glyceryl monostearate as templates. *DYNA- Revista de la Facultad Nacional de Minas (Colombia)*, 75, 207–216. Disponible en <<http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v75n156/a20v75n156.pdf>>
- Peña, J., Rios, L., Restrepo, G. y Marín, J. (2007). Sílices mesoporosas a partir de porógenos derivados de aceites vegetales. *Scientia Et Technica*, 36, 543–548. Disponible en <<https://www.redalyc.org/pdf/849/84903696.pdf>>
- Van Dorp, D. A., Vickery, L., Nozawa, T., Sauer, K., Sokolovsky, M., Riordan, J. F. y Vallee, B. L. (1990). Determination of the Secondary Structure Content of Proteins in Aqueous Solutions from Their Amide I and Amide II Infrared Bands. Comparison between Classical and Partial Least-Squares Methods, *Biochemistry*, 29, 8771–8779. <https://doi.org/10.1021/bi00489a038>
- Vaschetto, E. G., Ochoa Rodríguez, P. A., Pérez Pariente, J. y Eimer, G. A. (2023). Engineering more sustainable catalysts based in ecological and economic synthesis routes from renewable raw material: Novel mesoporous silicas for remediation technologies. *Microporous and Mesoporous Materials*, 360, 112719. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2023.112719>
- Vilas Bôas, R. N. y de Castro, H. F. (2022). A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases. *Biotechnology and Bioengineering*, 119, 725–742. <https://doi.org/10.1002/bit.28024>
- Wong, P. T. T., Wong, R. K., Caputo, T. A., Godwin, T. A. y Rigas, B. (1991). Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis (cervical cancer/dysplasia/high pressure spectroscopy). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 10988–10992. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.10988>