

Para este sistema:

a) Costes de fabricación (M):

- 1) **Materias primas (M1):** los reactivos necesarios y su precio de mercado se recogen en la tabla 4.3.1.

Compuesto	Precio unitario (ptas)	Cantidad(Kg/año)	Precio (ptas /año)
K_2HPO_4	71 145/50Kg	275	392000
KH_2PO_4	53528/50 Kg	750	803000
$MgSO_4$	8708/25 Kg	50	17000
$(NH_4)_2SO_4$	39353/50 Kg	200	157000
NH_3 30 %	27459/601	250 (l/año)	114000
Acido oleico	9380/4 l	400	4216000

Tabla 4.3.1.: Evaluación del coste de las materias primas para la producción de lipasa UAB.

Despreciando el precio del resto de reactivos (agua destilada, vitaminas, $FeCl_3$ y antiespumante) se obtiene un total de 5.7 MM/año.

- 2) **Mano de obra directa (M2):** considerando el elevado nivel de instrumentación de los equipos presentes, se puede estimar en 5 el número de personas necesarias para desarrollar el proceso. Considerando un valor medio de 4 MM/persona y año se tiene un valor de 20 MM.
- 3) **Patentes (M3):** entre 1 y 5 % de las ventas, en este caso, un valor medio del 3% originaría $M3 = 0.03V = 8.5$ MM.
- 4) **Mano de obra indirecta (M4):** entre 15 y 45 % del valor de la mano de obra directa, en este caso se toma el valor mínimo por el tipo de empresa: $M4 = 0.15M2 = 3$ MM.
- 5) **Servicios generales (M5):** esta partida será muy baja en nuestro caso, y sólo habría que tener en cuenta el vapor necesario en la esterilización. Se despreció en relación con el resto de términos.

- 6) **Suministros (M6)**: entre 0.2 y 1.5 % de I, en nuestro caso se tomó el valor intermedio, $M6 = 0.0085I = 1.5 \text{ MM}$.
- 7) **Mantenimiento (M7)**: entre 0.02 y 0.10 de I, se consideró un valor intermedio de 0.06, $M7 = 0.06I = 10.9 \text{ MM}$.
- 8) **Laboratorio (M8)**: entre 10 y 30 % de la mano de obra (M2), cogiendo el valor más frecuente del 20 %, con lo que $M8 = 0.2M2 = 4 \text{ MM}$.
- 9) **Envasado (M9)**: consideramos bajos estos precios para este tipo de productos, 5 % del valor de las ventas: $M9 = 0.10V = 14.1 \text{ MM}$.
- 10) **Expedición (M10)**: consideramos también 5 % del valor de las ventas: $M9 = 0.10V = 14.1 \text{ MM}$.
- 11) **Directivos y técnicos (M11)**: 0.10 a 0.40 de la mano de obra directa, como valor medio se toma: $M11 = 0.25M2 = 5 \text{ MM}$.
- 12) **Amortización (M12)**: se tendrá en cuenta posteriormente.
- 13) **Alquileres (M13)**: se tendrá en cuenta posteriormente.
- 14) **Impuestos (M14)**: entre 0.5 y 1 % de I; $M14 = 0.0075I = 1.4 \text{ MM}$.
- 15) **Seguros (M15)**: 1 % de I, $M15 = 0.01I = 1.8 \text{ MM}$.

Con lo que los **costes de fabricación** ascenderían a $M = 90.0 \text{ MM ptas/año}$.

b) Gastos generales (G):

- 1) **Gastos comerciales (G1)**: entre el 5 y 20 % de M, como valor medio $G1 = 0.13M = 11.7 \text{ MM}$.
- 2) **Gerencia (G2)**: entre el 3 y el 6 % de M, como valor medio $G2 = 0.045M = 4.1 \text{ MM}$.
- 3) **Gastos financieros (G3)**: no estimados.
- 4) **Investigación y servicios técnicos (G4)**: 1.5 % de M, $G4 = 0.9 \text{ MM}$.

Con lo que los **gatos generales** ascienden a $G = 16.7 \text{ MM ptas/año}$.

Y los **costes totales**: $C = M + G = 106.7 \text{ MM ptas/año}$.

4.3.1.4. Amortización

El criterio seguido para calcular la amortización de la planta fue el criterio de suma de dígitos descrito por Vián (1991). Se trata de un criterio de amortización decreciente para el que necesitamos calcular:

$$I = 181.8 \text{ MM}$$

valor residual de los equipos que cifraremos en un 10 % de su valor inicial:

$$R = 0.10I = 18.2 \text{ MM}$$

el tiempo de vida de la planta:

$$t = 10 \text{ años}$$

y donde la cantidad a amortizar en cada año viene dada por la ecuación (1):

$$A_i = \frac{(I - R)}{Z} (t - i + 1) \quad (1)$$

con $Z = t(t+1)/2$, en nuestro caso, $Z = 55$, y los valores de amortización para cada año se dan en la tabla 4.3.2.

t	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A_i	29.7	26.8	23.8	20.8	17.8	14.9	11.9	8.9	5.9	3.0

Tabla 4.3.2.: Importe de la inmovilización para cada año de operación de la planta.

4.3.1.5. Capital circulante

En esta partida se incluye el capital necesario para iniciar el ciclo de producción que evidentemente se recupera al final del proceso. Una estimación de este valor se puede calcular como un porcentaje del capital inmovilizado que oscila entre el 10 y el 30 % según Vián (1991), para este caso, y tomando un valor intermedio del 20 %:

$$\text{Capital circulante} = 0.20I = 36.4 \text{ MM.}$$

4.3.2. Cálculo de la rentabilidad

A continuación, se pasó a determinar el RDCF (rent discounted cash flow) o el valor del interés del dinero que hace que la ganancia generada por la empresa sea cero. La comparación de este valor con el interés actual del dinero da una idea de la rentabilidad del proceso.

Para conocer este valor es necesario construir una tabla en la que se incluyen las partidas calculadas en el punto 4.3.1 y que se presentan en la tabla 4.3.3.

Años	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C. Inmovilizado	-181.8											18.2
C. Circulante		-36.4										36.4
Ventas		281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	281.3	
Costes totales		106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	106.7	
Ventas-Costes		174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	174.6	
Amortización		-29.7	-26.8	-23.8	-20.8	-17.8	-14.9	-11.9	-8.9	-5.9	-3	
Base imponible		144.9	147.8	150.8	153.8	156.8	159.7	162.7	165.7	168.7	171.6	
Impuestos (40 %)			58.0	59.1	60.3	61.5	62.7	63.9	65.1	66.3	67.5	68.6
Beneficios netos		144.9	89.8	91.7	93.5	95.3	97.0	98.8	100.6	102.4	104.1	-68.6
NCF	-181.8	108.5	89.8	91.7	93.5	95.3	97.0	98.8	100.6	102.4	104.1	-14.0

Tabla 4.3.3.: Cálculo del NCF (Net Cash Flow) para los distintos años de operación de la planta.

Con el NCF para cada año de operación de la planta se puede obtener el valor del interés que hace que el VAN (suma de NCF actualizados con el tiempo) se igual a 0, es decir, lo que expresa la ecuación (2):

$$VAN = \sum_{j=0}^t \frac{NCF_j}{(1+i)^j} = 0 \quad (2)$$

donde $i = \text{RDCF}$.

Para nuestro caso y resolviendo la ecuación (2), $\text{RDCF} = 0.534$ (53.4 %).

Dado que el valor del RDCF es el que corresponde al valor del interés del dinero que se podría pagar para esta inversión, es evidente que el proceso parece altamente rentable, si el valor del dinero se sitúa entre el 5 o el 10 %.

4.3.3. Conclusiones

Como conclusiones del capítulo se puede extraer:

- Se trata de un proceso que es altamente rentable.
- Incluso teniendo en cuenta todas las simplificaciones que se han hecho, el valor y la calidad del producto hacen factible la posibilidad de su comercialización.
- Sin embargo, al haber varias empresas distribuyendo este tipo de producto un estudio de las necesidades de lipasa en el mercado mundial es necesario.
- Las propiedades catalíticas específicas que pueda tener esta lipasa también serían un factor muy importante a tener en cuenta en la viabilidad del proceso.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA LIPASA UAB Y COMPARACIÓN CON LIPASAS COMERCIALES DE SIGMA 1754-TIPO VII

4.4.1. Determinación de las proteínas presentes en la lipasa UAB

Se han conseguido aislar hasta 7 genes que codifican lipasas de *Candida rugosa*. De 5 de estos genes se puede deducir la secuencia teórica de aminoácidos, comprobándose que tienen una gran homología por encima del 80 % y mínimas diferencias en su peso molecular, punto isoeléctrico, etc. (Tabla 4.4.1).

Proteína	PM (Da)	pI	Puntos de glicosilación
LIP1	57223	4.5	3
LIP2	57744	4.9	1
LIP3	57291	5.1	3
LIP4	57051	5.7	1
LIP5	56957	5.5	3

Tabla 4.4.1.: Diferencias entre las lipasas codificadas por genes de *Candida rugosa* calculadas a partir de la secuencia teórica (Lotti y Alberghina, 1996).

En la figura 4.4.1 se presenta la secuencia N-terminal de estos cinco genes denominados Lip1-5 (Lotti *et al*, 1993), mostrándose los puntos de discrepancia de aminoácidos entre ellos.

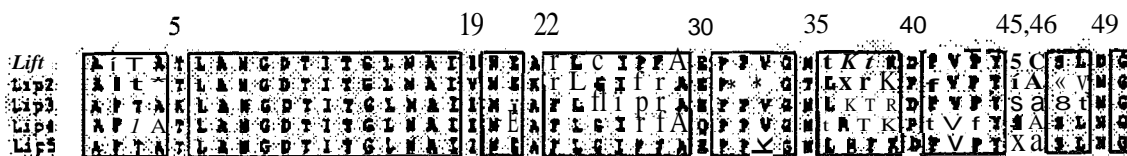


Fig. 4.4.1.: Secuencia de aminoácidos para los distintos genes presentes en *Candida rugosa* descritos por Lotti y Alberghina (1996).

En lipasa comercial se han conseguido identificar diversas isoenzimas, algunas de las cuales presentan diversas isoformas. En concreto, la lipasa de *Candida rugosa* suministrada por Sigma es una enzima de la cual se han caracterizado diversas isoenzimas mayoritarias denominadas lipasa A y B (Rúa *et al.*, 1993). Estudios posteriores determinaron que las isoenzimas mayoritarias A y B eran similares en peso molecular, punto isoeléctrico y contenido en aminoácidos, siendo su principal diferencia en el tanto por ciento de glicosilación. Estos datos se presentan en Tabla 4.4.2 (datos de Rúa *et al.*, 1993).

	Lipasa A	Lipasa B
Peso molecular (KDa)	60	60
Punto isoeléctrico	5.5	4.80-5.04
Secuencia N-terminal	APTAKLANGD	APTATLANGD
% de glicosilación	8	3.6

Tabla 4.4.2.: Características de las dos isoformas predominantes en la lipasa de *Candida rugosa*.

La presencia de ambas isoformas en la lipasa UAB había sido ya constatada en trabajos previos (Gordillo *et al.*, 1995), así como la influencia de las condiciones de fermentación sobre la proporción de ambas isoenzimas (Sánchez, 1996).

El liofilizado obtenido tras el proceso de downstream descrito en el apartado 4.2 fue caracterizado y comparado con una de las lipasas comerciales de *Candida rugosa* más ampliamente usadas: lipasa Sigma 1754-tipo VIL

En primer lugar se realizó una caracterización de los componentes que constituyen el liofilizado, así como las actividades lipolíticas y esterásicas específicas del preparado obtenido. Los resultados se muestran en la tabla 4.4.3.

Lipasa	Proteína (%)	Act. Lip. Esp. (U/mg prep.)	Act. Est. Esp. (U/mg prep.)	Act. Lip. Esp. (U/mg prot.)	Act. Est. Esp. (U/mg prot.)	Polisacárido (%)
UAB	8.17	242	0.138	2965	1.68	25.2
Sigma	4.58	1.83	0.060	39.9	1.31	2.90
UAB/Sigma	1.78	132	2.30	74.3	1.28	8.69

Tabla 4.4.3.: Resultados resumen del liofilizado de lipasa UAB y comparación con lipasa de Sigma.

En la tabla 4,4.3 se pueden observar diferencias apreciables entre ambos preparados. En primer lugar, el contenido en proteína es mayor en la lipasa UAB que en la de Sigma, del orden del doble, pero la actividad lipolítica específica con respecto a proteína es casi 75 veces superior en el caso de la lipasa UAB. Sin embargo, estos resultados no se trasladan al analizar la actividad esterásica, siendo la lipasa UAB sólo ligeramente superior a la de Sigma. Cuando estas actividades específicas se **refieren** a peso de **liofilizado** total este valor lógicamente aumenta, debido al mayor contenido en proteína de la lipasa UAB, siendo 132 veces superior la lipasa UAB en el caso de la actividad lipolítica y de algo más del doble en la actividad esterásica. Resumiendo, la lipasa UAB presenta una actividad lipolítica muy superior a la lipasa de Sigma y, en cambio, similar en términos de actividad esterásica.

Mención aparte merece el contenido en polisacáridos presentes en la lipasa UAB. Este elevado contenido que supera el 25 % del liofilizado en peso era muy superior con respecto al que presenta la lipasa comercial y llegó a valores aun mayores en el caso de fermentaciones en las que el microorganismo estaba creciendo limitado por el sustrato. Sin embargo, como se observa en la figura 4.1.2 es evidente que se trata de un producto asociado al propio crecimiento del microorganismo y que alcanza valores muy altos en la parte final del fed-batch. El resto de la composición en peso del liofilizado de la lipasa UAB son fundamentalmente sales correspondientes al tampón fosfato, proveniente del medio de fermentación y el que se usa en la **diafiltración** descrita en el apartado 4.2.

Cuando se compararon los preparados UAB y Sigma por electroforesis en **SDS-PAGE** con tinción de plata para proteínas y reactivo de **Schiff** para azúcar, se observaron diferencias importantes en la composición proteica y contenido en polisacáridos de ambos preparados. Los geles se muestran en la figura 4.4.2.

Como se observa en la Fig. 4.4.2, la lipasa UAB está formada por 4 bandas de proteína claramente diferenciadas estando libre de proteínas de bajo peso molecular, mientras que en la lipasa Sigma aparece una fuerte señal de proteína para pesos moleculares inferiores a 20 **kDa**. En la lipasa de Sigma también se observan 4 bandas, pero las proporciones relativas son muy distintas que las de la lipasa UAB.

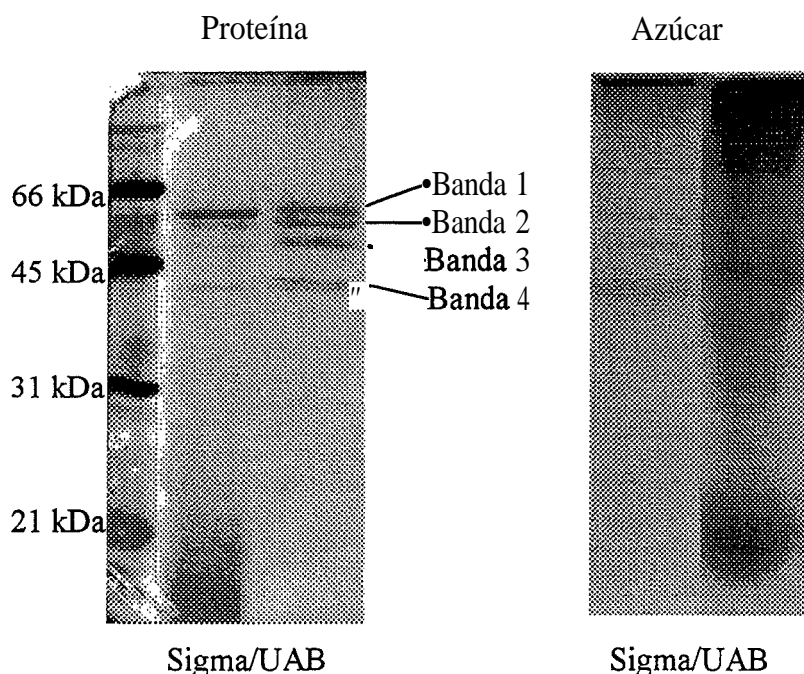


Fig. 4.4.2.: Tinción de proteína y azúcar para los preparados UAB y Sigma.

De cara a identificar las 4 bandas presentes en la lipasa UAB, se realizó la secuenciación del N-terminal de las 4 bandas, así como la determinación del porcentaje de glicosilación (% G) en gel por desglicosilación enzimática usando N-glicosidasa F y comparación de pesos moleculares. También se realizó un gel nativo con tinción de actividad esterásica para determinar si las bandas presentaban este tipo de actividad catalítica. Los resultados se presentan en la Tabla 4.4.4.

Banda	kDa	Secuencia N-terminal	Identificación	% G	Act. Gel
1	62.0	APTAKL	Lip 3	5.3	+
2	57.7	APTATLANGDTITGLNAIVNEK	Lip 2	3.5	+
3	50.4	ADLDVVDNDS	Desconocido	13.3	+
4	43.1	VPTTQTISYGS/G	Acil-CoA tioesterasa/carboxilesterasa	0.0	+

Tabla 4.4.4.: Identificación, determinación del porcentaje de glicosilación y actividad esterásica en gel de las bandas presentes en la lipasa UAB.

Con los datos obtenidos de la Tabla 4.4.4, por tanto, se tenían identificadas 3 de las 4 bandas presentes en la lipasa UAB, las dos bandas 1 y 2 de peso molecular mayor corresponden a dos de las isoformas descritas por Lotti *et al.* (1993), en concreto Lip3 y Lip2, mientras que la banda 4 de peso molecular inferior correspondía a una **Acil-CoA tioesterasa/carboxilesterasa** recientemente descrita por Diczfalusy *et al.* (1996) en lipasa de Sigma. Por otro lado, la banda 3, cuyo porcentaje de glicosilación es muy elevado y que presenta actividad esterásica, no tenía una cadena de aminoácidos que correspondiera a ninguna proteína buscando en los servidores web Swiss-Prot y Prosite (Apartado 7.2).

En lipasas de Sigma de *Candida rugosa* está ampliamente descrita la presencia de la **isoenzima Lip 1** como mayoritaria (Grochulski *et al.*, 1993) mientras que se han encontrado en menor proporción Lip 3 (Rúa *et al.*, 1993) y Lip 2 (Diczfalusy *et al.*, 1996). Así pues, en el caso de la lipasa UAB la isoenzima correspondiente a Lip 1, mayoritaria en el caso de la lipasa comercial, no estaba presente. Como diferencias cualitativamente importantes entre las lipasas Sigma y UAB se pueden citar:

- Las isoformas mayoritarias para la lipasa UAB son Lip 3 y Lip 2 (bandas 1 y 2) mientras que para lipasas de Sigma es Lip 1.
- La presencia en la lipasa UAB de una banda desconocida (banda 3) no identificada en la lipasa de Sigma.
- La importante presencia de bandas de peso molecular inferior en la lipasa de Sigma que no aparecen en la lipasa UAB.
- La presencia en mucha mayor proporción de Acil-coA esterasas/carboxilesterasas en la lipasa UAB (banda 4) con respecto a la lipasa de Sigma.

En el caso de la tinción de azúcares que aparece en la figura 4.4.2, como era de prever, aparece una fuerte señal de polisacárido en el gel correspondiente a la lipasa UAB, y en una proporción mucho menor para el caso de la lipasa de Sigma.

4.4.2. Separación de las distintas proteínas presentes

Una vez identificadas las distintas proteínas que forman parte del liofilizado obtenido mediante la secuencia de separación descrita en el capítulo 4.2, se pasó a la determinación de una secuencia de purificación que permitiera aislar las distintas bandas. Para conseguir la purificación de las bandas, se probaron distintas técnicas de cromatografía de entre las que hay descritas en la bibliografía (capítulo 1.4).

4.4.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

Trabajando con gradientes de sal con una columna de intercambio amónico (Millipore DEAE Memsep 1000) en FPLC es posible separar ambas isoformas de la lipasa de *Candida rugosa* comercial (Sigma 1754-tipo VII), eluyéndose ambas isoenzimas en función de su punto isoeléctrico (Rúa *et al.*, 1993). La aplicación de estos métodos para la lipasa UAB, sin embargo, no originó los resultados previstos, ya que las isoenzimas que se separaron no eran puras. Concretamente, en la figura 4.4.3 se muestra un cromatograma obtenido con concentrados de lipasa UAB sobre el cual se aplicó un gradiente de NaCl como se indica en la misma figura.

En la figura 4.4.3. aparecen unas primeras bandas sin actividad hasta que aparecen dos picos donde se concentra la actividad lipolítica (figura 4.4.4) que corresponden respectivamente a una concentración de NaCl de 0.45 M y 1 M.

En el cromatograma se advierte una excelente separación de los picos correspondientes a la lipasa A y B según el patrón seguido por las lipasas comerciales, sin embargo, posteriores estudios de electroforesis demostraron que no se trataba de picos puros sino que de las dos bandas mayoritarias del crudo de lipasas aparecían mezcladas en ambos picos. En concreto, en la Figura 4.4.5 se observa como los dos picos de actividad de la figura 4.4.2 contienen diversos porcentajes de ambas bandas iniciales que corresponden al crudo.

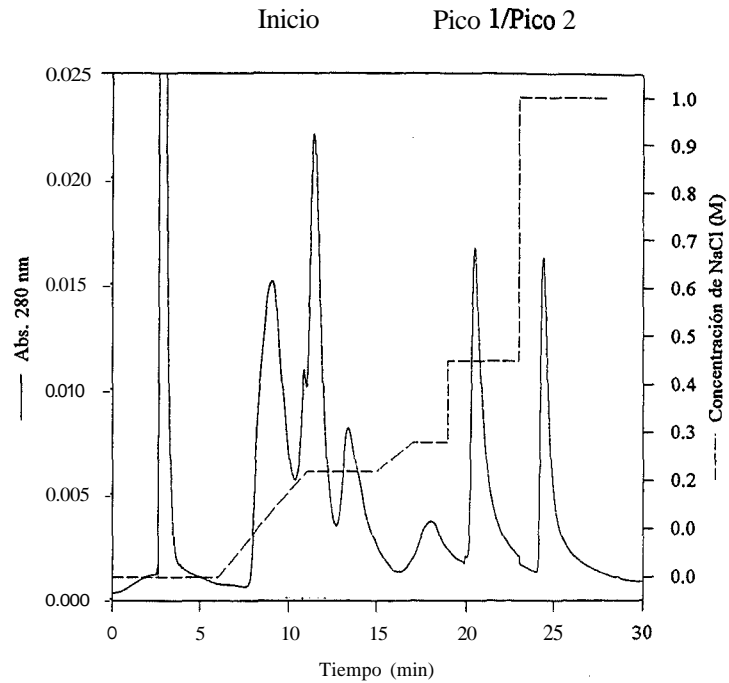


Fig. 4.4.3.: Cromatograma típico obtenido con lipasas UAB sometidas a un gradiente de NaCl que también se muestra en la figura. Columna Memsep DEAE 1000.

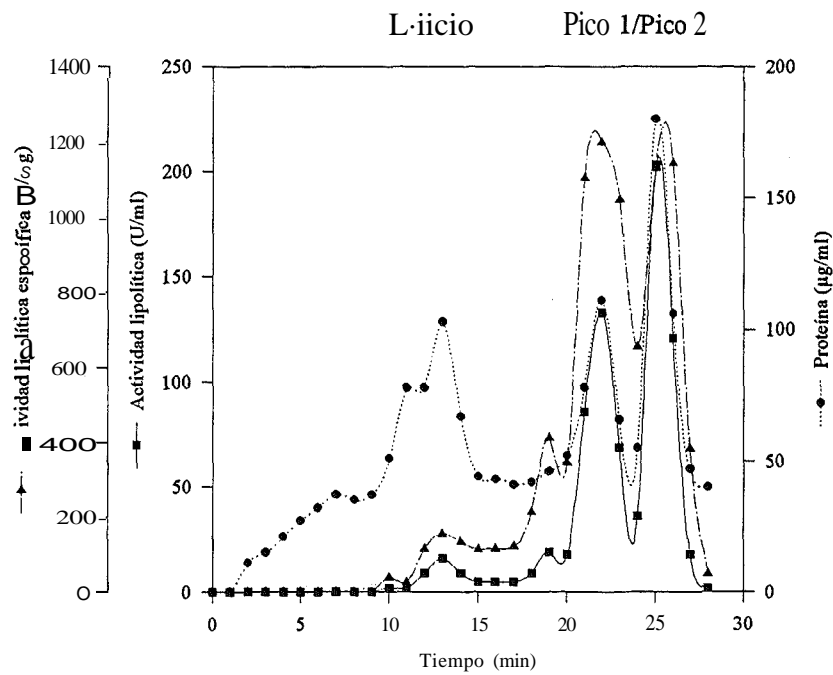


Fig. 4.4.4.: Distribución de la actividad lipolítica, proteína total y actividad específica en el cromatograma de la Figura 4.4.3.

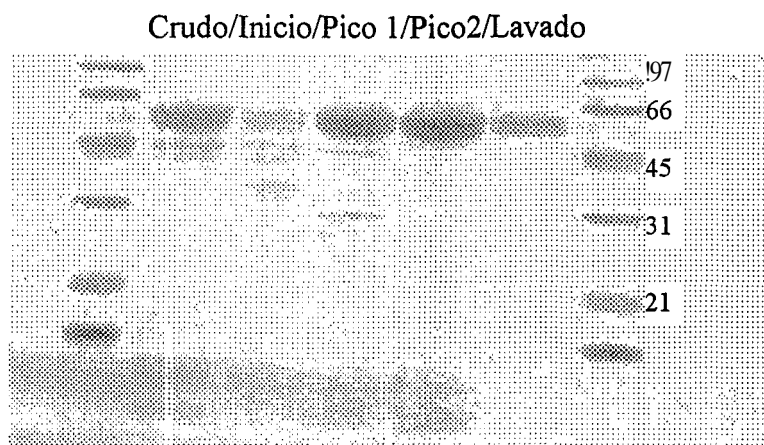


Fig. 4.4.5: Electroforesis de las lipasas obtenidas en la cromatografía por FPLC usando una columna Millipore DEAE Memsep 1000 de intercambio aniónico.

La causa probable del distinto comportamiento ante una cromatografía de intercambio iónico que presenta la lipasa UAB con respecto a la de Sigma es el elevado contenido en polisacáridos que presenta la primera. En el caso de los picos 1 y 2 obtenidos mediante esta cromatografía, había una importante presencia de estos azúcares de elevado peso molecular que podían justificar los bajos rendimientos alcanzados (16 % de la actividad lipolítica para el pico 1 y 14 % para el pico 2) y la diferente separación de isoenzimas con respecto a la lipasa comercial.

El uso de otro tipo de rellenos con mayor resolución por tener una mayor capacidad de intercambio iónico como Source® 15Q de Pharmacia Biotech, unido al empleo de gradientes de sal más suaves, no originó mejores resultados, ya que no se consiguió una buena separación de los picos presentes en la muestra.

En la figura 4.4.6. se muestran los mejores resultados obtenidos para este relleno a nivel de separación de picos. Sin embargo, en el cromatograma ya se observa el solapamiento parcial de los picos, aspecto que se vio confirmado por electroforesis, donde no se obtuvieron bandas puras.

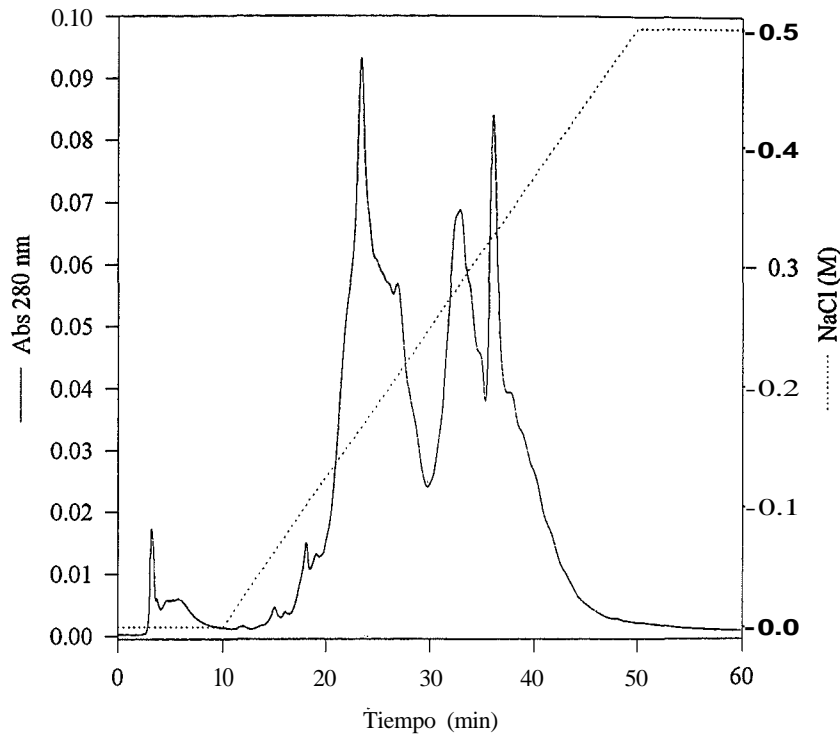


Fig. 4.4.6.: Cromatograma obtenido con lipasas UAB sometidas a un gradiente de NaCl que también se muestra en la figura. Columna Source® 15Q.

4.4.3.2. Cromatografía de gel filtración. Relación lipasa-polisacárido

Otra posibilidad de separar las 4 bandas era el uso de cromatografía en gel filtración, aunque el hecho de que la diferencia de pesos moleculares entre las distintas bandas fuera bajo no lo hacía parecer una solución recomendable. Para ello, se emplearon columnas de distintos rangos de separación, Pharmacia Superdex 75 (3-70 kDa) y 200 (10-600 kDa), un cromatograma de ejemplo se muestra en la figura 4.4.7 para una columna Superdex 200.

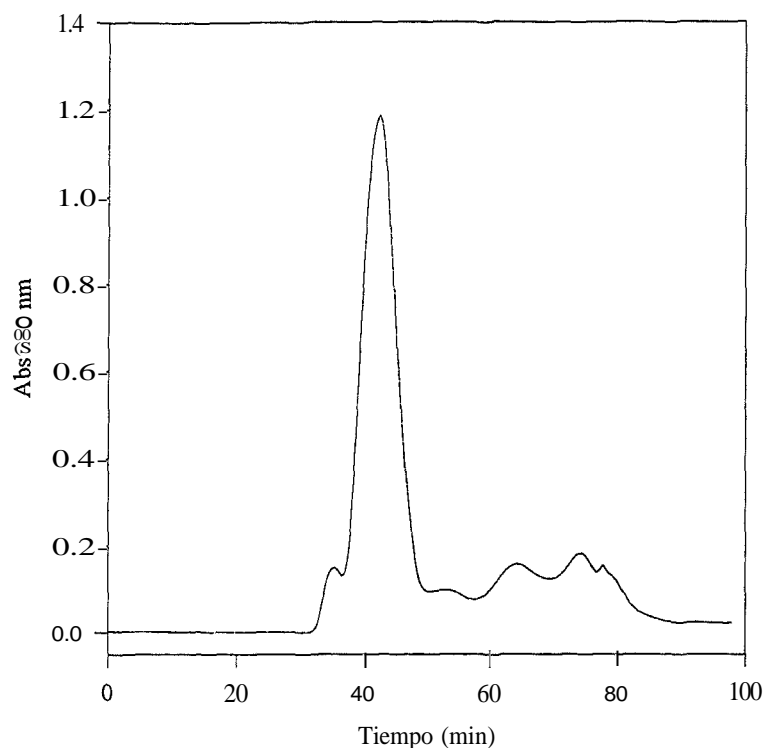


Fig. 4.4.7.: Cromatograma de FPLC utilizando una columna Pharmacia Superdex 200.

En la figura 4.4.7 se observa como aparecía un cromatograma plano con un pico único donde se concentraba la actividad lipolítica con rendimientos superiores al 95 % y sin separación de polisacárido como demostraron geles posteriores. En el caso de usar una columna con relleno Pharmacia Superdex 75 (3-70 kDa) se producía el mismo fenómeno aunque el pico aparecía en el tiempo correspondiente al volumen muerto de la columna, indicando la ausencia de interacción con este relleno.

Para comprobar la posible interacción lipasa-polisacárido se filtró a través de 100 kDa una muestra conteniendo lipasa UAB. En principio, era de esperar que la actividad lipolítica (es decir, la lipasa) apareciese en el filtrado (su peso molecular está alrededor de 60 kDa), sin embargo, los resultados demostraron que se encontraba en el retenido, sin atravesar el filtro, lo cual indicaba que estaba agregada a sí misma o a alguna sustancia de peso molecular

elevado. Puesto que las únicas sustancias detectadas que se encuentran presentes en el preparado en concentraciones importantes son los polisacáridos, se generó la hipótesis de que probablemente existía algún tipo de asociación lipasa-polisacárido (Serrano, 1998).

La actuación sobre este complejo con detergentes de tipo no desnaturizante como Chaps tampoco originó resultados muy **esperanzadores**, y tan sólo con detergentes desnaturizantes propios de la realización de las electroforesis se obtuvo una separación perfecta.

La actuación sobre el proceso de fermentación para evitar la producción del polisacárido está actualmente en curso, si bien se ha observado que la producción de este tipo de subproductos en levaduras suele ir asociada a estados finales de fermentación con limitación de algún nutriente (Cirigliano y Carman, 1984) lo que se confirma en este caso. No obstante, a pesar de que una pequeña **producción** siempre se observa en las etapas iniciales del **fed-batch**, la producción de polisacárido se ha limitado parando la adición del sustrato, ácido oleico, antes de que sea limitante y provoque una elevada producción de polisacárido. De todas formas, la posterior concentración del medio hace que al final se tengan concentraciones de polisacárido todavía importantes.

4.4.3.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica: separación de bandas 3 y 4

A priori la técnica **cromatográfica** que tenía que originar mejores resultados era la cromatografía de interacción hidrofóbica, ya que basa su principio de separación en la interacción de los grupos hidrofóbicos del relleno con los grupos hidrofóbicos presentes en las proteínas y que no poseen los polisacáridos. Así pues, se trataba de una técnica que tendría que conseguir, por un lado, separar el polisacárido y, por otro lado, separar las 4 bandas de proteína en función de su distinta hidrofobicidad debido a diferencias en la composición de aminoácidos y también en parte al diferente grado de glicosilación de las 4 bandas.

El empleo de una columna Pharmacia Phenyl Superóse HR 5/5 basada en este tipo de interacción originó los resultados que se presentan en la figura 4.4.8. El funcionamiento de este tipo de columnas es el contrario de las de intercambio iónico, aquí se parte de una

concentración elevada de sal que favorece la interacción de los grupos hidrofóbicos de las proteínas con el relleno que presenta grupos de la misma naturaleza. La evolución de un gradiente de fuerza iónica decreciente provoca que al disminuir la fuerza iónica del medio las proteínas pasen a la fase móvil. Además, posibles sustancias de carácter **hidrofilico** como los polisacáridos tendrían que eluirse en las primeras fases del cromatograma, coincidiendo con la fuerza iónica más elevada.

En nuestro caso, la sal utilizada fue sulfato amónico 1.7 M (aproximadamente el 35 % de saturación) debido a la elevada solubilidad y fuerza iónica de esta sal. El protocolo es el recomendado por Pharmacia Biotech para el uso de la columna (apartado 3.1.3.3). En este punto, hay que comentar que el empleo de concentraciones más elevadas de sal originaba, como se vio en el apartado 4.2, la precipitación de la proteína. En todos los casos, las muestras fueron disueltas en la concentración inicial de sulfato amónico 1.7 M, y se dejaron agitando durante 30 minutos para favorecer la posible separación del polisacárido.

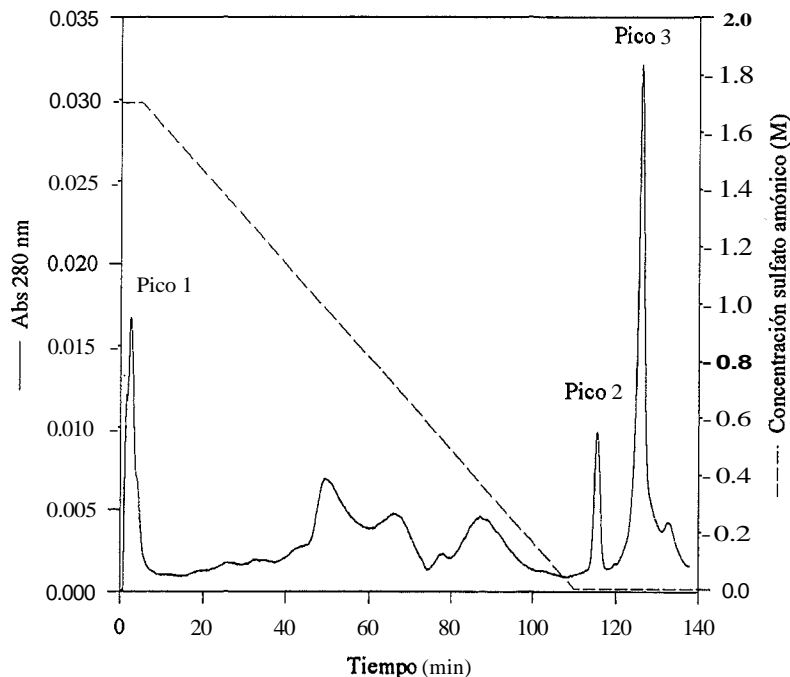


Fig. 4.4.8: Cromatograma de la lipasa UAB en una columna Pharmacia Phenyl Superóse HR 5/5 de interacción hidrofóbico.

En la figura 4.4.8. se observa como hay una separación de tres picos, un primer pico de proteínas no retenidas en la columna, un segundo pico a baja fuerza iónica y un último pico que aparece en la zona de fuerza iónica cero.

La realización de **electroforesis en SDS-PAGE** sobre los tres picos obtenidos mediante esta cromatografía originó los geles mostrados en la 4.4.9, correspondientes a tinción con Blue Comassie para los tres picos y tinción con plata para el pico 3 que era el que presentaba mayores impurezas.

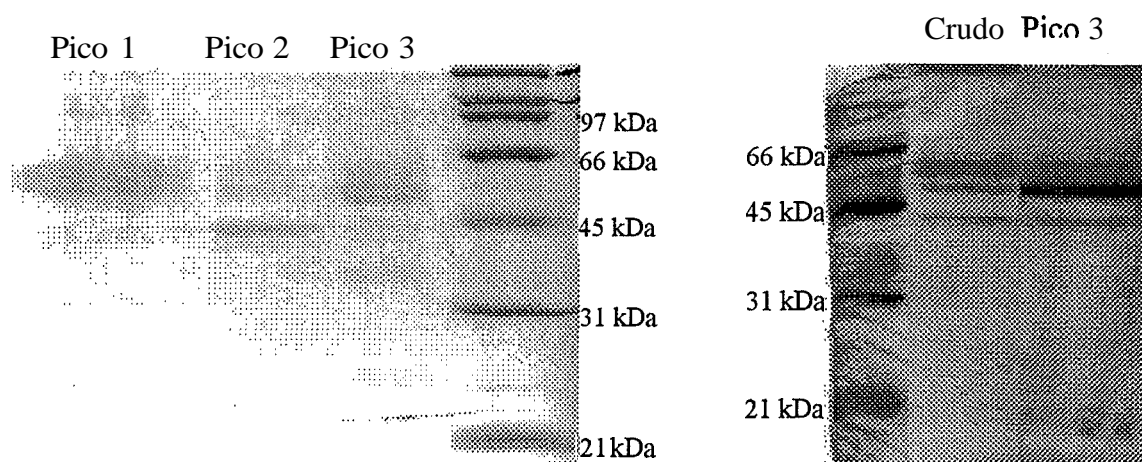


Fig. 4.4.9.: SDS-PAGE con tinción de proteína para los picos obtenidos en la figura 4.4.8.

Como se observa en la figura 4.4.9, los picos obtenidos mediante la cromatografía de interacción hidrofóbica representada en la figura 4.4.8 corresponden a las bandas inicialmente encontradas en la figura 4.4.2 para el extracto crudo.

En concreto, el pico 1 corresponde a las bandas 1 y 2, es decir, las dos isoformas de lipasa, el pico 2 a la banda 4 y el pico 3 a la banda 3. Este sistema sería, por tanto, una alternativa para separar las bandas 3 y 4. Además, se trata de bandas prácticamente libres de polisacárido, como se observa en la figura 4.4.10 que correspondería a realizar una tinción de azúcar sobre los picos obtenidos en la figura 4.4.8.

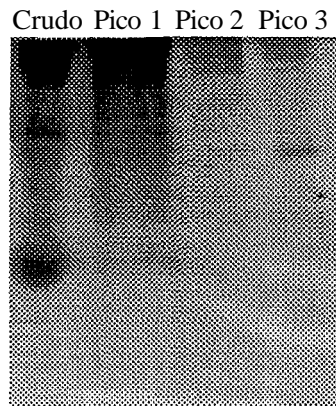


Fig. 4.4.10.: SDS-PAGE con tinción de Schiff para los picos obtenidos en al figura 4.4.8.

Un aspecto importante a tener en cuenta es el hecho de que el pico 1 que incluye las bandas 1 y 2 es minoritario en el cromatograma, mientras que las bandas 3 y 4 son las más abundantes (Fig. 4.4.2). Este hecho se explica ya que buena parte de la actividad lipolítica se queda adsorbida a la columna, pudiéndose eluir después del cromatograma mediante detergentes como Tritón X100.

Con este sistema se tiene un método para separar las bandas 3 y 4 libres de polisacárido pero con ciertas impurezas de las otras bandas como se observa en la figura 4.4.9. Por ello, para conseguir la obtención de las proteínas puras se pasaron estos picos por una columna de intercambio iónico, en concreto una columna Source® 15Q de cara a obtener una purificación superior de estas bandas.

Los resultados para los picos 2 y 3 se muestran en las figuras 4.4.11 y 4.4.12 respectivamente. En estas figuras se observa la presencia de un pico **mayoritario** que corresponde a cada una de las bandas. Además, estos dos picos demostraron corresponder a bandas prácticamente puras en una **electroforesis** en SDS-PAGE como queda patente en la figura 4.4.13.

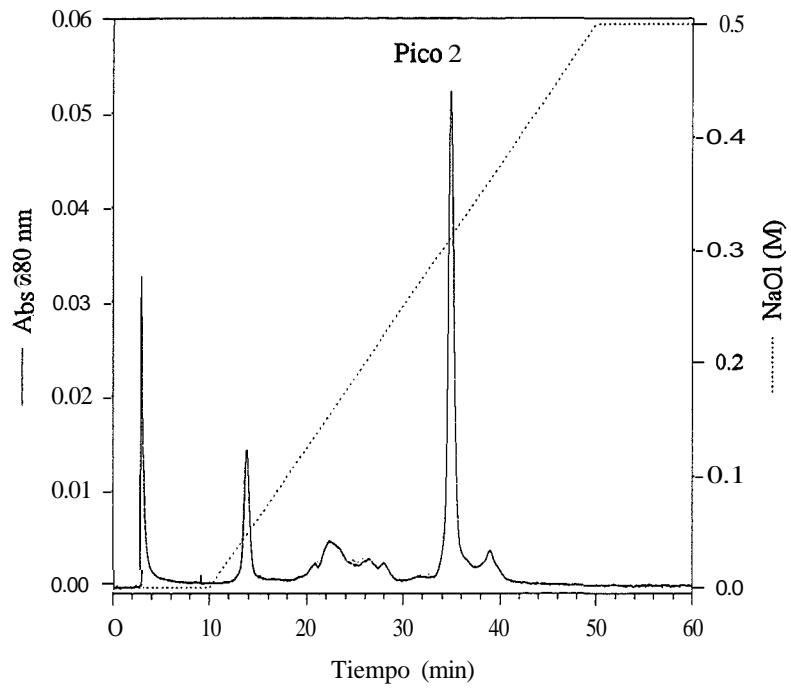
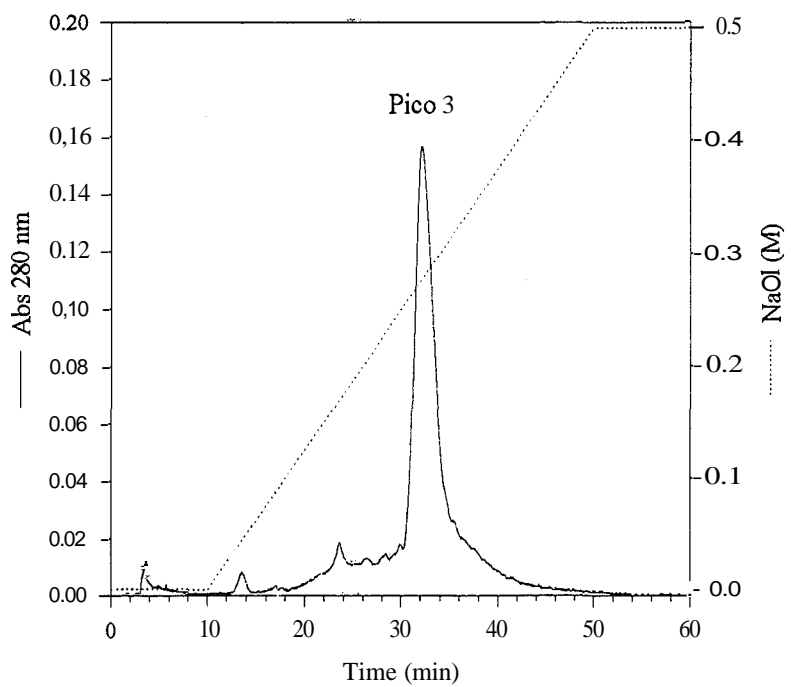


Fig. 4.4.11.: Pico 2 sometido a cromatografía de intercambio iónico. Columna Source® 15Q.



Fig» 4.4.12.: Pico 3 sometido a cromatografía de intercambio iónico. Columna Source® 15Q.

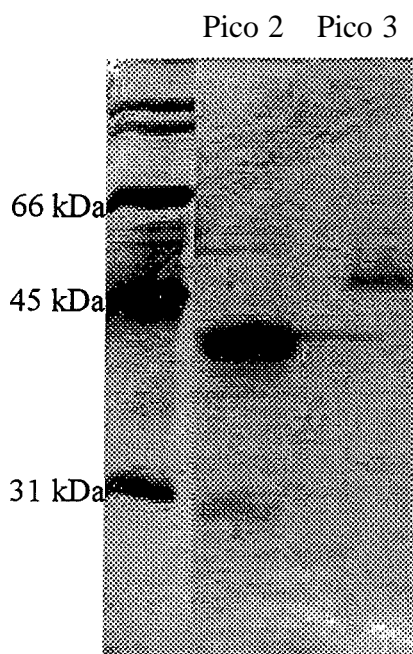


Fig. 4.4.13.: SDS-PAGE para los picos 2 y 3 sometidos a cromatografía de intercambio iónico. Columna Source® 15Q.

Es de destacar el hecho de que los picos 2 y 3 observados en las figuras 4.4.11 y 4.4.12 corresponden exactamente en tiempo de retención a dos de los picos observados en la figura 4.4.6, cuyo cromatograma está realizado en las mismas condiciones, pero donde los picos estaban solapados y no era posible una correcta separación. Por tanto, el paso por una cromatografía hidrofóbica es necesario para poder separar estos dos picos que mediante una cromatografía de intercambio iónico directa no podían separarse.

Resumiendo, se ha desarrollado un protocolo de purificación de las bandas 3 y 4 que son las que no corresponden a **isoenzimas** de lipasas. No obstante, en el ámbito del Proyecto **CICYT-QUI97-0506-C03** que se enmarca dentro del Programa Español en Tecnología de los Procesos Químicos, el grupo de investigación encabezado por la Dra. Rúa de la Universidad de Vigo está trabajando actualmente en el empleo de detergentes tipo Tritón X100 de cara a conseguir la eliminación del polisacárido y la posterior separación de las isoenzimas de lipasa por medio de columnas de gel filtración e intercambio iónico.

4.4.3. Conclusiones

A modo de resumen, se pueden extraer una serie de conclusiones:

- El preparado de lipasa **UAB** es distinto en composición y proporción de proteínas del preparado de Sigma.
- Las diferencias en el caso de las **isoformas** de lipasa son debidas a la no presencia de Lip 1 en el preparado **UAB**.
- El preparado **UAB** presenta un contenido en polisacárido muy superior al de Sigma.
- La cromatografía de intercambio iónico no generó buenos resultados en términos de separación de proteína, posiblemente debido a la presencia del polisacárido.
- La cromatografía de gel filtración no era una buena opción para separar proteína y polisacárido, dada la fuerte interacción entre ambas **macromoléculas**.
- La cromatografía de interacción hidrofóbica produjo los mejores resultados, consiguiéndose la separación de las bandas 3 y 4 del preparado de lipasa **UAB**.
- Cuando los picos 2 y 3 correspondientes a las bandas 4 y 3 eran sometidos a una cromatografía de intercambio iónico, se obtenían dos proteínas puras.
- Se ha identificado y separado una proteína (banda 3, pico 3) hasta ahora no descrita en lipasa de *Candida rugosa*.
- Se ha identificado y separado una **Acil-Coa/Carboxilesterasa** presente en el preparado **UAB** en una proporción muy superior al de Sigma.
- Por lo que se refiere a la separación de las isoformas de lipasa Lip 2 y Lip 3, el equipo de la Dra. Rúa de la Universidad de Vigo está trabajando en su separación, mediante al utilización de detergentes y de distintas etapas de cromatografía.

4.5. UTILIZACIÓN DE LA LIPASA UAB LIBRE EN REACCIONES DE SÍNTESIS NO QUIRALES

4.5.1. Esterificación del ácido propiónico con alcoholes lineales

Las lipasas han cobrado gran interés en la última década a raíz del descubrimiento de su potencial en el campo de las reacciones de síntesis en medios orgánicos fuertemente apolares, en especial cuando la reacción implica la resolución de un compuesto quiral (Klibanov, 1986). Previo a los estudios de reacciones de síntesis en medio orgánico con productos quirales se realizaron una serie de reacciones de cara a comparar la actividad sintética en reacciones no quirales de la lipasa UAB con respecto a las lipasas comerciales de Sigma 1754 tipo VII y Amano AY 30, ambas lipasas de *Candida rugosa*.

El empleo de la lipasa UAB en reacciones de hidrólisis en medio acuoso originó unos resultados comparables con las lipasas comerciales en cuanto a velocidad inicial de reacción y conversión final siempre y cuando se incluyera calcio en el medio de reacción (Sánchez, 1996). En la figura 4.5.1 se observa el comportamiento de la lipasa UAB frente a la lipasa de Amano en presencia o no de calcio para la reacción de hidrólisis del propionato de *n*-butilo en medio acuoso partiendo de una actividad lipolítica de 11 U/ml para todos los casos. Como se puede observar en la Fig. 4.5.1, se constata la importancia del calcio tanto en la conversión final como en la velocidad de reacción, siendo el comportamiento de la lipasa UAB con calcio es similar al de la lipasa Amano.

La primera reacción de síntesis no quiral que se estudió fue la **esterificación** del ácido propiónico con alcoholes primarios de cadena variable (C₄-C₆). La elección de este producto no fue arbitraria ya que el objetivo último de este trabajo era la síntesis de productos enantioméricamente puros derivados del ácido 2-fenilpropiónico.

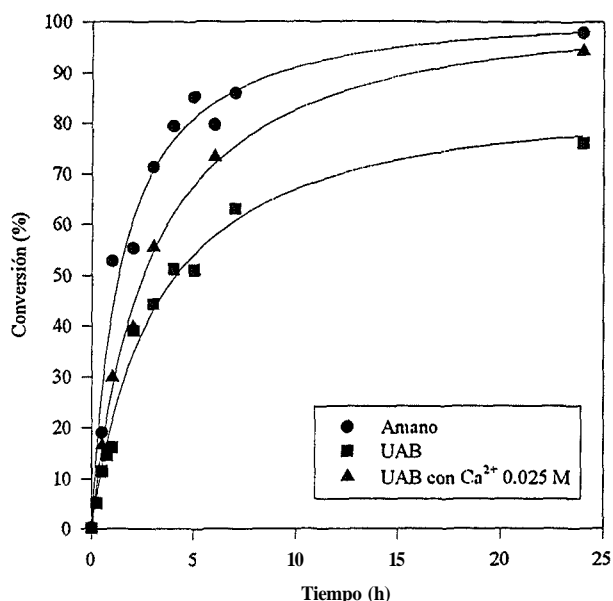


Fig. 4.5.1.: Hidrólisis de propionato de n-butilo con diferentes lipasas.

Una de las características del medio de reacción es que se trata de un medio fuertemente apolar. De entre los disolventes posibles los más utilizados son ciclohexano, hexano e isooctano, todos ellos ampliamente referenciados en la bibliografía (Tsai y Wei, 1994; Chen *et al.*, 1993; Yang y Russell, 1995).

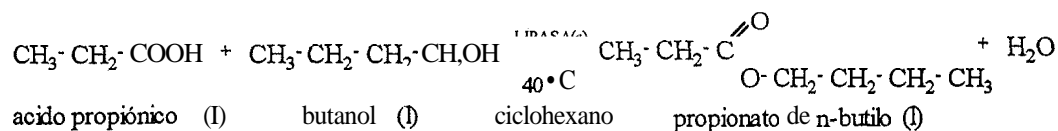
Para estos experimentos preliminares se utilizó ciclohexano como disolvente. La reacción se llevó a cabo termostataada a 40°C , con agitación magnética de 500 r.p.m. y en un volumen de 10 ml de disolvente con una concentración de 100 mM para cada uno de los reactivos.

La cantidad introducida de enzima fue el equivalente a 90 U/ml medidas frente a trioleína para todos los casos. Dado que la actividad lipolítica específica de cada preparado sólido era distinta se pesó la cantidad apropiada para tener en el medio las citadas 90 U/ml. Un resumen de las actividades lipolíticas de cada sólido se presenta en la tabla 4.5.1.

Lipasa	Act. lip. específica (U/mg sólido)	Peso (mg) en 10 ml (90 U/ml)
UAB	46	20
Sigma	5.0	180
Amano	11	82

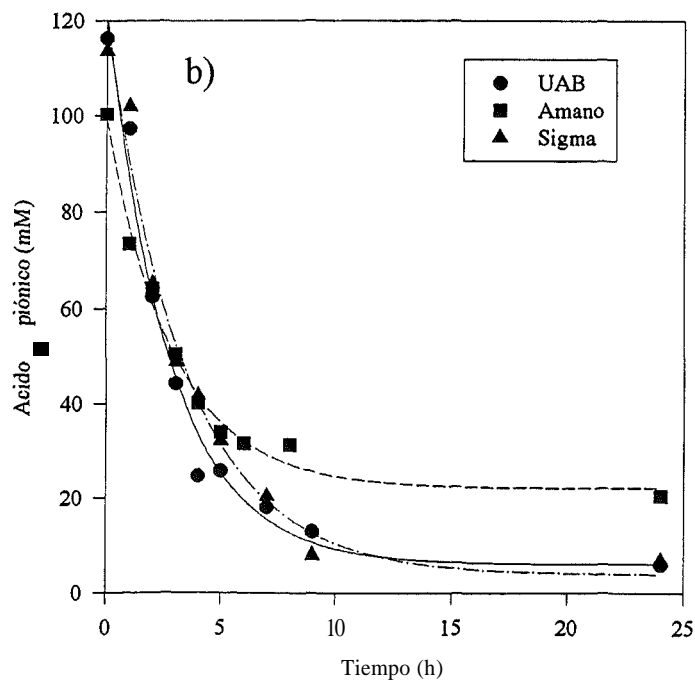
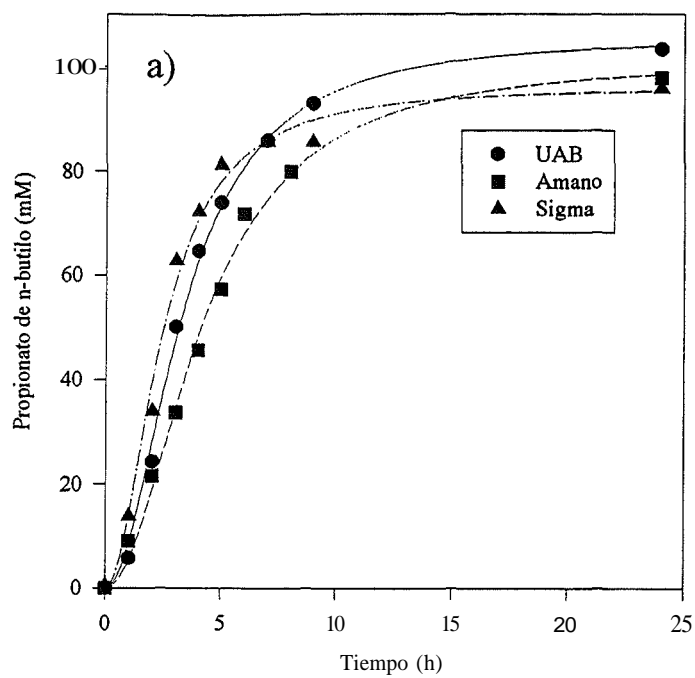
Tabla 4.5.1.: Actividades específicas de los 3 preparados enzimáticos empleados en la reacción de síntesis y su equivalente en peso para asegurar 90 U/ml.

Tomando como ejemplo el uso de ciclohexano como disolvente y el butanol como alcohol la reacción seleccionada sería la siguiente:



En este caso, los resultados para las tres lipasas probadas se presentan en la figura 4.5.2.a. En ella se observa como los resultados son muy semejantes para cada una de las lipasas empleadas, es decir, parece no haber diferencias apreciables entre los tres preparados, los tres valores de conversión final fueron muy cercanos así como los datos de velocidad inicial que se presentan en la tabla 4.5.2.

Debido a ello se realizaron respectivas pruebas cambiando la longitud del alcohol, en concreto realizando la misma reacción de síntesis con pentanol y hexanol. Los perfiles de reacción se muestran respectivamente en las figuras 4.5.2.b y 4.5.2.c mientras que en la tabla 4.5.2 se recogen a modo de resumen los datos comparativos de velocidad inicial de reacción y conversión a las 24 horas de reacción para las tres enzimas y los tres alcoholes probados.



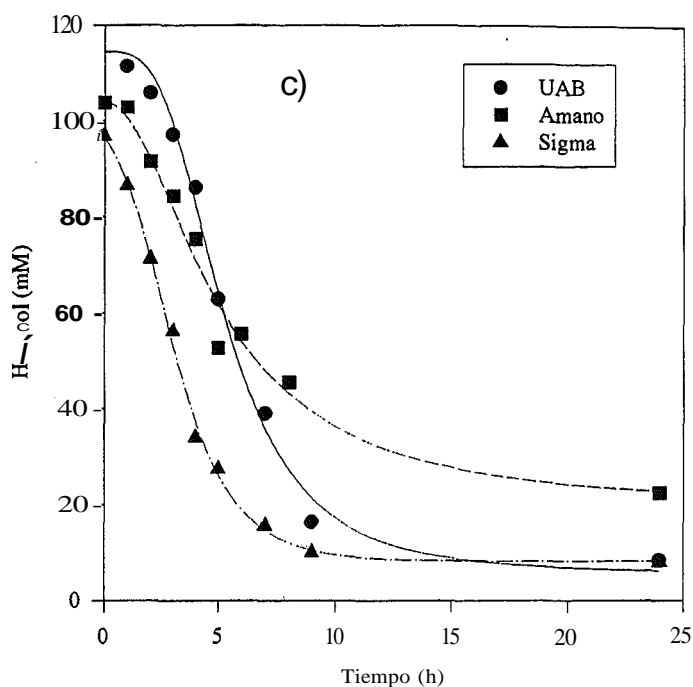


Fig. 4.5.2.a/b/c: Representación de los perfiles de reacción para las síntesis de propionato de n-butilo (a) n-pentilo (b) y n-hexilo (c) para las tres lipasas estudiadas.

ALCOHOL \Rightarrow	Butanol		Pentanol		Hexanol	
ENZIMA U	$r_0 \left(\frac{\mu\text{moles}}{h \cdot U} \right)$	X (%)	$r_0 \left(\frac{\mu\text{moles}}{h \cdot U} \right)$	X (%)	$r_0 \left(\frac{\mu\text{moles}}{h \cdot U} \right)$	X (%)
UAB	0.174	100	0.214	94.9	0.118	96.9
Amano	0.132	97.8	0.145	79.7	0.112	78.4
Sigma	0.197	95.8	0.191	94.0	0.164	91.8

Tabla 4.5.2.: Comparación de velocidad inicial y conversión final para distintos alcoholes con las tres lipasas utilizadas. La velocidad inicial de reacción se expresa como μmoles de éster sintetizados por hora de reacción y por unidad de actividad **enzimática**.

En la tabla 4.5.2 se puede ver como los valores de conversión y velocidad inicial para las distintas lipasas varían de forma significativa. En la mayoría de los casos la conversión alcanza valores superiores al 90% excepto para los alcoholes de cadena más larga (pentanol y hexanol) con lipasa Amano. Además, estos valores son prácticamente estacionarios, como se observa en las figuras 4.5.2.b/c, con lo que hacen pensar en una posible desactivación de la

enzima. Además, para la lipasa de Amano, los valores de velocidad inicial siempre son más bajos.

Por otro lado, y por lo que se refiere a las lipasas **UAB** y Sigma, las diferencias de comportamiento son bastante escasas, de hecho, por lo que se refiere a conversión final, los resultados son ligeramente favorables a la lipasa UAB, mientras que en la velocidad inicial los valores tienden a alternarse con pequeñas diferencias, excepto en el caso de la síntesis del propionato de **n-hexilo**, donde la lipasa de Sigma posee una mayor velocidad inicial.

Las diferencias observadas en el comportamiento de las enzimas **frente** a estas reacciones sencillas pueden ser explicadas por múltiples factores, entre los cuales el más importante sería sin duda la presencia de agua de la reacción y la capacidad de absorberla que tenga el sólido con el que se trabaja, esto dependerá fuertemente de la naturaleza del sólido empleado y su contenido en sales, presencia de otras proteínas, etc.

4.5.2. Conclusiones

Como conclusiones a este capítulo se pueden señalar:

- Las lipasas UAB se han mostrado desde el punto de vista de velocidad inicial y de conversión final comparables y en algún caso superiores a dos lipasas comerciales ampliamente utilizadas en reacciones de química fina.
- Su buen funcionamiento en medio orgánico las convierte en una opción de cara a sus posibilidades en reacciones de síntesis donde intervengan centros quirales.
- Se requeriría un sistema de inmovilización para las lipasas UAB para obtener un biocatalizador fácilmente recuperable.

4.6. INMOVILIZACIÓN DE LA LIPASA UAB

4.6.1. Necesidad de inmovilizar la lipasa UAB

Debido a que uno de los puntos de interés de este trabajo era comprobar si la lipasa UAB era capaz de trabajar en reacciones de síntesis quirales y a ser posible desarrollar un sistema de reacción escalable a producción piloto o industrial, el proceso pasa por la reutilización de la enzima para compensar su alto precio. La estrategia más comúnmente utilizada para una posible reutilización supone el uso de técnicas de inmovilización. La inmovilización puede aportar además, su estabilización frente a condiciones ambientales adversas como será el trabajar en síntesis en medio orgánico.

Las dos técnicas de inmovilización más comúnmente utilizadas son: inmovilización por adsorción e inmovilización por enlace covalente. El primer sistema asegura buenas recuperaciones de actividad pero impide el uso de la enzima en reacciones en medio acuoso donde se produciría el fenómeno de desadsorción, mientras que en el caso del enlace covalente puede ocasionar modificaciones importantes en la enzima lo que generalmente repercute en una disminución importante de su actividad catalítica (Balcao *et al.*, 1996b).

4.6.2. Inmovilización por adsorción

Este es, sin duda, el método más empleado con lipasas (Gandhi *et al.*, 1995, Montero *et al.*, 1993). Hay una multitud de soportes con diferentes grupos funcionales utilizados para llevar a cabo la inmovilización, y multitud de protocolos para favorecer la interacción soporte-enzima. En este trabajo se estudiará la inmovilización de lipasas UAB y Sigma de *Candida rugosa* sobre cuatro soportes ampliamente utilizados: celita, poliamida, Duolite® (resina de intercambio aniónico macroporosa) y EP100 (polipropileno microporoso).

4.6.2.1. Inmovilización sobre celita y poliamida

En estos dos soportes se estudió el fenómeno de adsorción y se analizó como se comportaba la enzima una vez inmovilizada en la reacción de síntesis en medio orgánico estudiada anteriormente (síntesis de propionato de *n*-butilo), donde la lipasa UAB libre funcionaba de forma satisfactoria.

Para ello, 15000 U de actividad fueron añadidas a 1 g de celita y poliamida respectivamente, se homogeneizó la mezcla sólido-líquido y se liofilizó hasta peso constante. Este fenómeno es más una deposición que una adsorción ya que no se tiene control sobre el fenómeno de adsorción en sí. Con los preparados secos, se llevaron a cabo experimentos en los que se comparaban los dos preparados inmovilizados con lipasa libre utilizando como parámetro comparativo la velocidad inicial de reacción. Todos los experimentos se realizaron en las mismas condiciones que en el apartado 4.4.1 excepto la actividad lipolítica inicial que fue de 25 U/ml para tener medidas lineales al inicio de la reacción. En la figura 4.6.1 se representan los perfiles de conversión para sendos experimentos usando lipasas UAB inmovilizadas sobre celita y poliamida y el correspondiente a lipasa UAB libre.

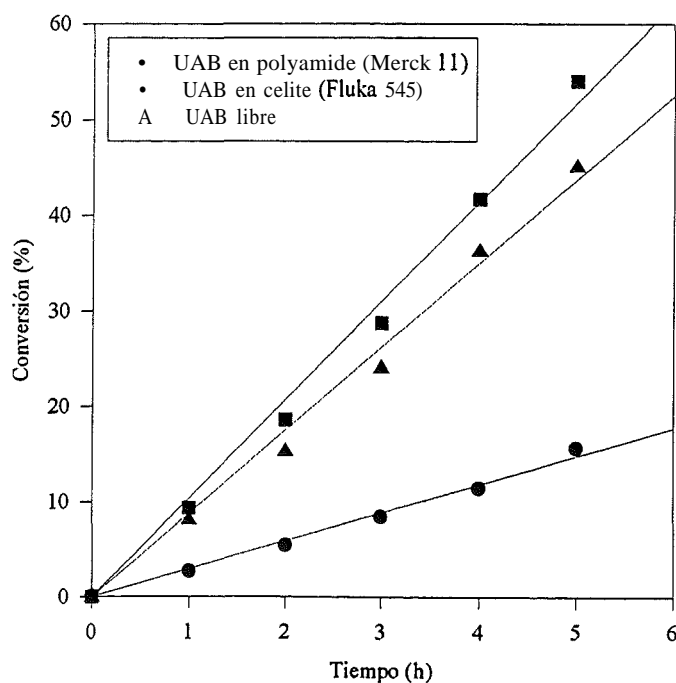


Fig. 4.6.1.: Perfiles de reacción para la síntesis de propionato de *n*-butilo con distintas lipasas.

En la tabla 4.6.1 se presentan los valores resumen de la velocidad inicial determinada para las lipasas libres y las dos inmovilizadas. En la tabla 4.6.1 se observa lo que se constató anteriormente respecto a las lipasas libres en el sentido de que UAB y Sigma son similares y, en cambio, la lipasa de Amano es sensiblemente inferior, y lo que es más importante, el hecho de que la lipasa UAB inmovilizada sobre celita conserva completamente su actividad sintética siendo incluso ligeramente superior a las libres, lo que permitiría usar este método como protocolo de inmovilización.

Lipasa	$r_0 \left(\frac{\mu\text{mols}}{U \cdot h} \right)$
UAB	0.350
Sigma 1754-VII	0.334
Amano	0.069
UAB celita	0.415
UAB poliamida	0.118

Tabla 4.6.1.: Determinación de la velocidad inicial de síntesis para las distintas lipasas libres e inmovilizadas estudiadas.

Comparando la inmovilización sobre celita con la inmovilización sobre poliamida la velocidad de reacción en este último soporte es del orden de 3 veces inferior comparado con el primero. Una posible causa de esta disminución de la velocidad inicial de reacción se deba a que este soporte acepta mayor cantidad de agua que la celita (Capellas *et al.*, 1996).

Así pues, la lipasa inmovilizada sobre celita originó los mejores resultados para la lipasa UAB, superiores a los mejores con lipasas libres (UAB y Sigma) y muy superiores a la UAB sobre poliamida.

En este punto, se decidió comparar la lipasa UAB inmovilizada sobre celita con lipasas comerciales también inmovilizadas. Sin embargo, no se dispone de lipasas comerciales de *Candida rugosa* inmovilizadas, por lo que se decidió a comparar con lipasas provenientes de otros microorganismos, en concreto, con una de las lipasas más ampliamente usadas, denominada comercialmente Lipozyme® IM 20 y suministrada por Novo Industri A/S

Bagsvaerd, Dinamarca. Esta lipasa es producida por *Mucor miehei* y se encuentra adsorbida sobre un soporte comercial denominado Duolite® A 568 suministrado por Duolite International SA. París. El empleo de esta lipasa se encuentra ampliamente referenciado en procesos sintéticos (Ergan *et al.*, 1991, Kwon *et al.*, 1994) así como sus características y posibilidades de recuperación (Vázquez-Lima *et al.*, 1995) y constituye una excelente alternativa en muchos procesos de síntesis orgánica. Debido a que esta lipasa se encuentra inmovilizada por adsorción es difícil a priori tener un test de hidrólisis comparativo a modo del que se tiene para las lipasas libres, por lo que se pasó directamente a comparar actividades sintéticas.

Por ello, se comparó la reacción de síntesis del propionato de *n*-butilo con la lipasa UAB sobre celita (correspondiente 90 U/ml) con el mismo peso de Lipozyme (30 mg). Los resultados se muestran en la figura 4.6.2, en esta figura se observa como las velocidades iniciales son notablemente favorables al Lipozyme y como la lipasa UAB presenta una primera fase de activación de la enzima para después llegar a superar a la enzima comercial. Esto podía ser consecuencia directa del agua necesaria que necesita la enzima para iniciar la reacción.

Duolite®, el soporte sobre el que está inmovilizado la lipasa en Lipozyme®, contiene en condiciones normales entre un 5.5 y un 10.5% de agua, mientras que la lipasa UAB es un preparado liofilizado con lo que su contenido en agua será prácticamente nulo. Para evitar esta fase de activación se trabajó con el disolvente (ciclohexano) saturado en agua. En la figura 4.6.2 se observa como al trabajar con el disolvente saturado en agua se produce una casi total desaparición del periodo inicial de activación.

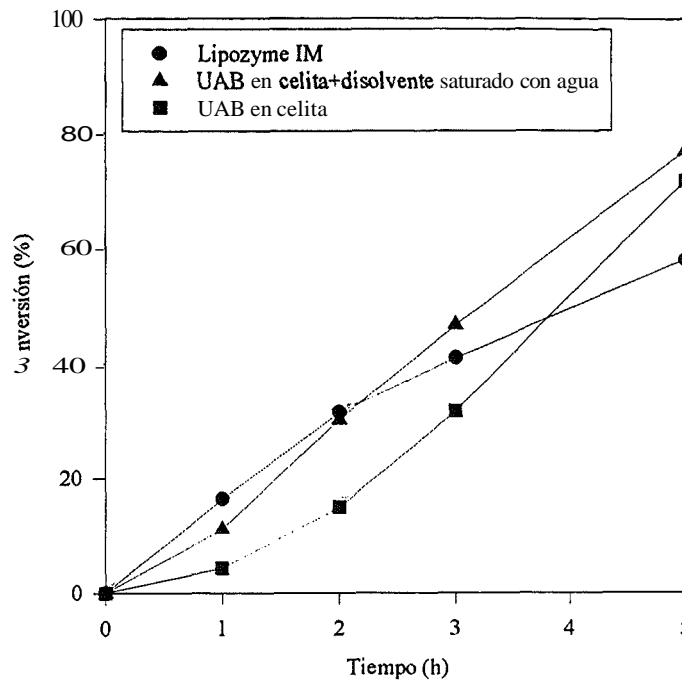


Fig. 4.6.2.: Perfiles de reacción para la lipasa UAB con y sin saturación del disolvente en agua y comparación con Lipozyme para la reacción de síntesis del propionato de *n*-butilo.

Por tanto, una buena estrategia de operación para la lipasa UAB sería la inmovilización con celita trabajando después con disolventes saturados en agua para asegurar la presencia mínima de agua para iniciar la reacción. Sin embargo, el hecho de que esta cantidad de agua dependerá del disolvente utilizado, ya que cada uno presenta un valor distinto de saturación que puede ser muy variable, implicará que no se podrá generalizar para cualquier tipo de reacciones y medios orgánicos, dependiendo incluso del contenido en agua de los diferentes reactivos que intervengan en la síntesis.

4.6.2.2. Inmovilización sobre Duolite

No obstante estos problemas podrían evitarse trabajando con el propio Duolite como soporte, que ha demostrado su gran funcionalidad con lipasas de *Mucor miehei*. Así pues, y siguiendo el protocolo de inmovilización para Duolite descrito por Valivety *et al.* (1992), se procedió a intentar inmovilizar distintas cargas de lipasa UAB sobre este soporte siguiéndose

el fenómeno de adsorción a partir de la medida de disminución de la actividad lipolítica en la fase líquida.

Como se muestra en la figura 4.6.3 los porcentajes adsorbidos sobre el soporte fueron muy bajos en comparación con resultados descritos (Valivety *et al.*, 1992) en los que se asegura un porcentaje de adsorción cercano al 100%.

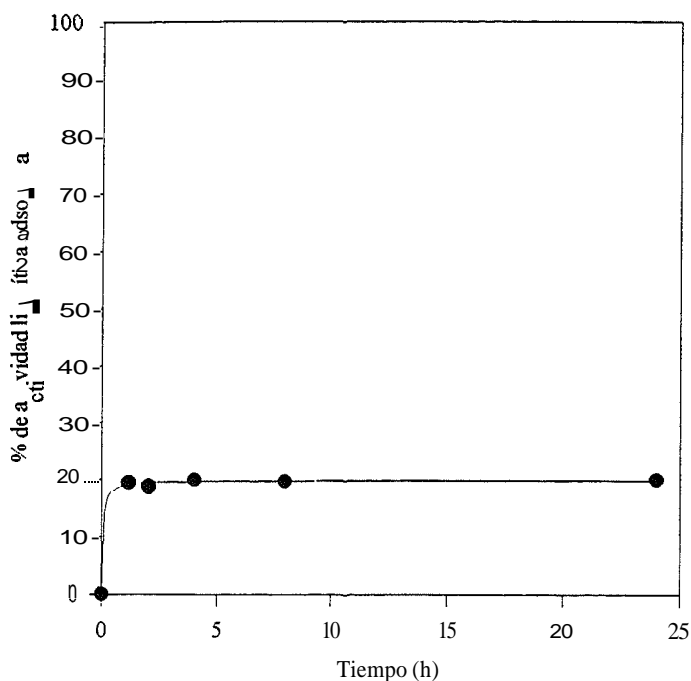


Fig. 4.6.3.: Adsorción de la lipasa UAB sobre Duolite para una actividad lipolítica inicial de 326 U de actividad lipolítica inicial por gramo de soporte.

Con lipasa UAB la inmovilización tan sólo alcanzó un 20% de la actividad lipolítica y este porcentaje ya se conseguía en la primera hora de inmovilización, sin embargo, la actividad lipolítica adsorbida era muy baja con respecto a las conseguidas con celita o incluso con poliamida. Trabajando a distintas cargas **enzimáticas** no se observaron mejoras como se constata en la tabla 4.6.2., es decir, el hecho de aumentar la carga **enzimática** inicial no suponía un aumento considerable en la proporción de lipasa adsorbida. En todos los casos se llega aproximadamente a la misma actividad total inmovilizada en el soporte.

Actividad inicial (U/ml)	% actividad inmovilizada	Actividad esperada en el soporte (U/g)
1056	8	739
345	17	587
169	40	676
96	67	643
58	98	568
30	100	300

Tabla 4.6.2.: Comportamiento de la adsorción de lipasa UAB sobre Duolite A568 para distintas cargas enzimáticas iniciales.

La actividad conseguida sobre Duolite es muy baja con respecto a la que se alcanzaba con celita, cercana a las 15000 U/g de soporte. En una reacción de síntesis de propionato de *n*-butilo con esta lipasa adsorbida la velocidad de síntesis era del orden de 10 veces inferior con respecto a los datos obtenidos con UAB en celita o Lipozyme comercial. Este factor era crítico al tener que desarrollar sistemas de reacción de tipo piloto o industrial cuyo diseño se basa habitualmente en consideraciones cinéticas o de tiempo de residencia, así que los resultados señalaron como mejor sistema de inmovilización de la lipasa UAB por adsorción la celita.

Como último test, y debido a las diferencias en composición descritas en el apartado 4.4 que tenía la lipasa UAB con respecto a las lipasas comerciales de *Candida rugosa* se quiso comprobar si el mal comportamiento frente a la inmovilización sobre Duolite también se producía en las lipasas comerciales y si los problemas eran debido a la enzima en sí o, por el contrario, a algún compuesto que la acompañe como los polisacáridos anteriormente descritos. En concreto, se probó la lipasa Sigma que originó resultados muy parecidos como se muestra en la tabla 4.6.3.

Por consiguiente, parece demostrado que el bajo rendimiento en la adsorción de la lipasa de *Candida rugosa* sobre Duolite es un problema inherente a las características de la lipasa producida por este microorganismo, y no a posibles contaminantes que se produzcan en la fermentación o estabilizantes que pueda contener la lipasa de *Candida rugosa* comercial. De hecho, ambas lipasas (UAB de *Candida rugosa* y Lipozyme de *Mucor miehei*) son

distintas desde el punto de vista estructural y sus pesos moleculares difieren en aproximadamente 30 kDa.

Actividad inicial (U/ml)	% actividad inmovilizada	Actividad esperada en el soporte (U/g)
45	100	450
87	74	644
153	43	658
450	15	675

Tabla 4.6.3.: Comportamiento de la adsorción de lipasa Sigma 1754 tipo VII sobre Duolite® A568 para distintas cargas enzimáticas iniciales.

4.6.2.3. Inmovilización sobre EP100

En la etapa final de la realización de este trabajo, se tuvo disposición de un soporte recientemente referenciado como una buena alternativa para inmovilizar lipasas de *Candida rugosa* (Gitlesen *et al.*, 1997). Este soporte, denominado EP100, es un polvo microporoso de polipropileno, de naturaleza muy hidrofóbica y con elevada área específica ha sido caracterizado por Capellas *et al.* (1996). A modo de resumen, en la tabla 4.6.4. se incluyen algunas de las características de este soporte y su comparación con los soportes utilizados para la inmovilización de la lipasa UAB.

Soporte	Proveedor	Tamaño de partícula (µm)	Diámetro medio de poro (nm)	Área específica (m ² /g)	Agua (%)
EP100	Akzo	200-1000	1860	47	0.26
Ceuta 545	Fluka	26	17000	2.2	0.27
Poliamida 11	Merck	100-200	50	27	1.24
Duolite A568	Rohm & Haas	150-600	40	-	8.0

Tabla 4.6.4.: Características de EP100 con respecto a otros soportes.

A la vista de los resultados proporcionados por la tabla 4.6.4., resulta evidente que el mejor soporte en términos de hidrofobicidad y de área específica es el EP100. Experimentos de inmovilización corroboraron este extremo, debido a que se consiguió inmovilizar del orden de 100000 U de actividad/g de soporte, resultados muy superiores a las inmovilizaciones llevadas a cabo con el resto de soportes probados. Además, en el caso del EP100, la inmovilización se realiza por adsorción como en el caso de Duolite, y no por deposición como en el caso de la celita y la poliamida, de manera que la actividad lipolítica adsorbida no se desadsorbía en sucesivos lavados del soporte que contenía la enzima inmovilizada.

Cuando se comparó la lipasa UAB inmovilizada sobre EP100 en la reacción de síntesis de propionato de n-butilo utilizada como test anteriormente, se obtuvieron resultados excelentes comparados con las otras inmovilizaciones y también mejores que utilizando Lipozyme. Estos resultados se presentan en la figura 4.6.4.

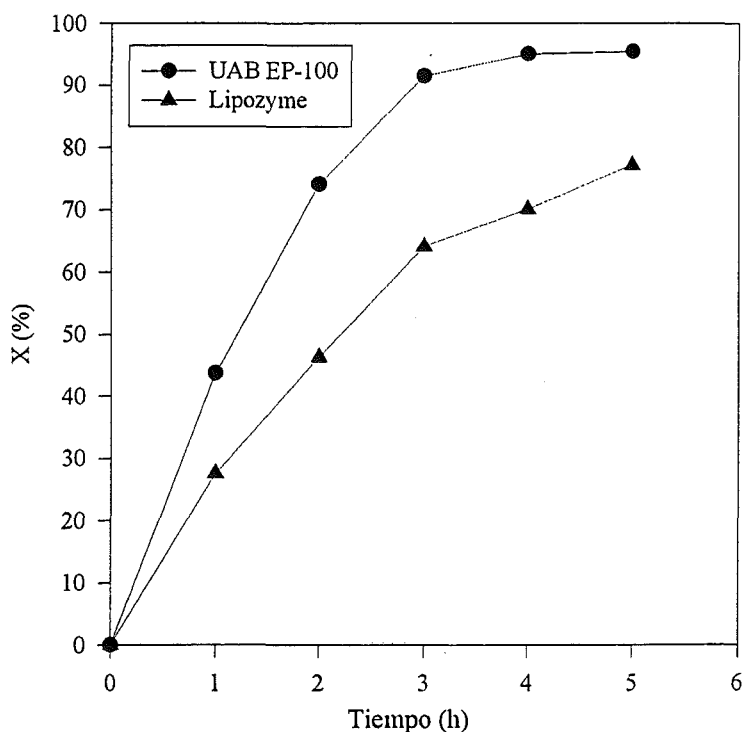


Fig. 4.6.4.: Perfiles de reacción en la síntesis de propionato de n-butilo con lipasa UAB sobre EP100 y Lipozyme IM20.

En consecuencia, este soporte era el que presentaba un mejor comportamiento con la lipasa UAB debido a la elevada carga enzimática que admitía, originando resultados mucho mejores que los obtenidos con lipasa UAB sobre otros soportes de inmovilización y otros protocolos, y superiores a los obtenidos con Lipozyme IM20.

4.6.3. Inmovilización por unión covalente

Esta fue una de las opciones menos estudiada debido a los problemas asociados que suele tener en la actividad enzimática y que para las lipasas está poco referenciado en reacciones de síntesis aunque puede tener cierto interés en reacciones de hidrólisis para facilitar la recuperación de la enzima (Bagi *et al.*, 1997).

En el caso de la lipasa UAB, un problema importante fue que la inmovilización normalmente se ha de llevar a cabo en medios alcalinos, por ejemplo, en el caso de inmovilización sobre soportes de agarosa el pH de trabajo es de 10. Un experimento previo demostró que la pérdida de actividad a este pH para la lipasa UAB era muy importante, como se observa en la figura 4.6.5. Concretamente, el 50 % de la actividad se pierde en los primeros minutos del experimento, mientras que a tiempos largos las pérdidas se estabilizan en un 80 %. La sensibilidad general que mostraba la lipasa UAB con el pH desaconseja llevar a cabo inmovilizaciones en las que hubiera que cambiar este parámetro de forma significativa (Gordillo, 1993).

Una última tentativa fue el uso de una resina con un grupo reactivo tipo aldehído denominada Toyopearl® AF-Formyl-650M que se caracterizaba por realizar la inmovilización a un pH cercano a la neutralidad. Aunque con este soporte los porcentajes de inmovilización superaron en todos los casos el 90% de actividad inmovilizada, el problema era que tras la inmovilización, el soporte que contenía la enzima no presentaba actividad hidrolítica frente a substratos propios de las lipasas como troleína y tampoco en reacciones de síntesis. Estos resultados parecen indicar claramente que la modificación que sufre la enzima al realizar la unión covalente con el soporte afecta a su centro activo de manera que o bien éste no está accesible a los substratos o bien el enlace covalente provoca la desactivación

completa de la enzima. Este hecho se vio **confirmado** cuando se varió la carga enzimática inicial de la que se partía. En todos los casos la actividad sintética e hidrolítica fue prácticamente nula, lo que descartó el uso de este soporte.

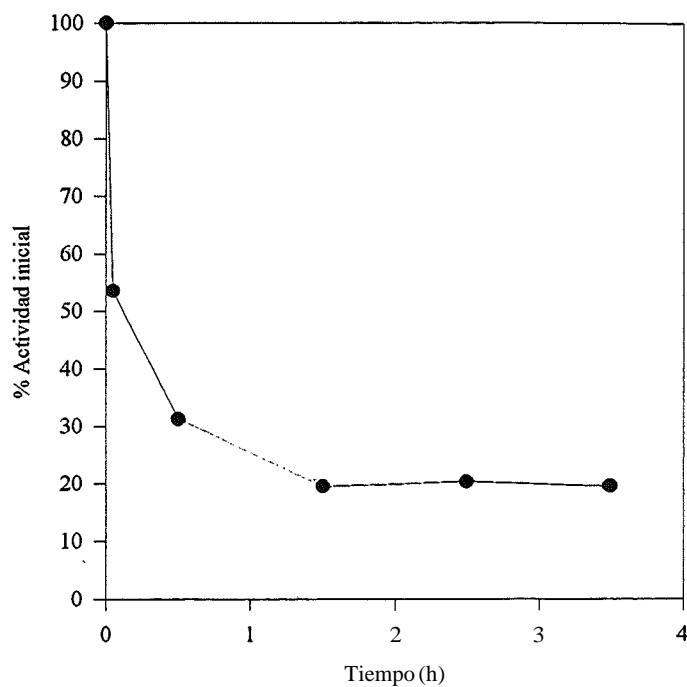


Fig. 4.6.5.: Estabilidad de la lipasa UAB en medio acuoso frente a pH alcalino (10).

4.6.4. Conclusiones

En este apartado, se pueden destacar los siguientes resultados obtenidos utilizando la reacción modelo de síntesis de propionato de *n*-butilo

- Se ha demostrado la capacidad de las lipasas **UAB** de inmovilizarse sobre una gran variedad de soportes.
- El comportamiento de la lipasa **UAB** inmovilizada sobre soportes hidrofóbicos como EP100 o celita 545 ha sido mucho mejor que el uso de soportes menos hidrofóbicos como poliamida o **hidrofilicos** como Duolite.
- En los mejores casos de inmovilización, la lipasa **UAB** se comportaba mejor que la lipasa **UAB** libre y que las lipasas comerciales de *Candida rugosa*.
- Cuando el proceso de inmovilización se llevó a cabo con celita se observaba una primera fase de activación de la enzima que podía ser corregida mediante la saturación del disolvente en agua.
- Con celita se consigue una lipasa inmovilizada similar a Lipozyme **IM20**.
- Mediante el uso de EP100, se ha conseguido una lipasa inmovilizada superior a Lipozyme **IM20**.
- La técnica de inmovilización por enlace covalente no supuso una alternativa válida para los soportes considerados.
- Se eligió el EP100 como mejor soporte para la inmovilización de la lipasa **UAB**, consiguiéndose actividades específicas del orden de 100 U de actividad **lipolítica/mg** soporte. Este soporte parece el óptimo para su utilización en reacciones de síntesis quirales.

4.7. UTILIZACIÓN DE LA LIPASA UAB INMOVILIZADA EN REACCIONES DE SÍNTESIS QUIRALES

4.7.1. Elección de las reacciones

Llegados a este punto, se quería estudiar la funcionalidad de las lipasas UAB frente a sustratos de naturaleza quiral. Dada la enorme variedad de sustratos que se pueden probar, se eligieron unas reacciones modelo en las que estaba demostrada la utilización de distintas lipasas. En concreto, se estudió la resolución de ácidos 2-aril-propiónicos vía esterificación con alcoholes primarios y la esterificación de *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol con ácidos primarios. La elección de estos productos viene también supeditada a los objetivos de los proyectos BIO-4-96-0005 (European Program on Biotechnology), QFN94-4627-C02-1 (Programa de Química Fina, Plan Nacional de R+D. CIRIT, Generalitat de Catalunya) y CICYT-QUI97-0506-C03 (Programa Español en Tecnologías de Procesos Químicos) en los que se enmarca este trabajo.

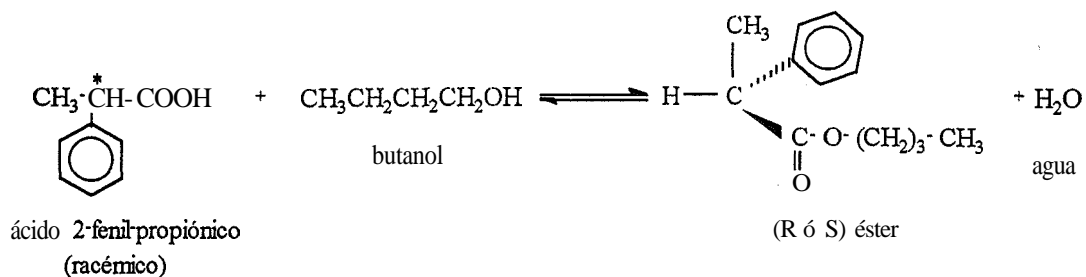
Los ácidos 2-aril-propiónicos son interesantes desde el punto de vista terapéutico como antiinflamatorios no esteroideos (Shen, 1972) mientras que el *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol está considerado un producto quiral auxiliar en una gran variedad de reacciones asimétricas (Basavaiah y Rao, 1994).

Dentro del grupo de ácidos 2-aril-propiónicos se eligieron como modelos el ácido 2-fenil-propiónico, donde no se habían obtenido muy buenos resultados con lipasas de *Candida rugosa* (García *et al.*, 1993) y el ibuprofeno o ácido 2-(4-isobutilfenil) propiónico, por su especial importancia farmacológica (Stratman *et al.*, 1997).

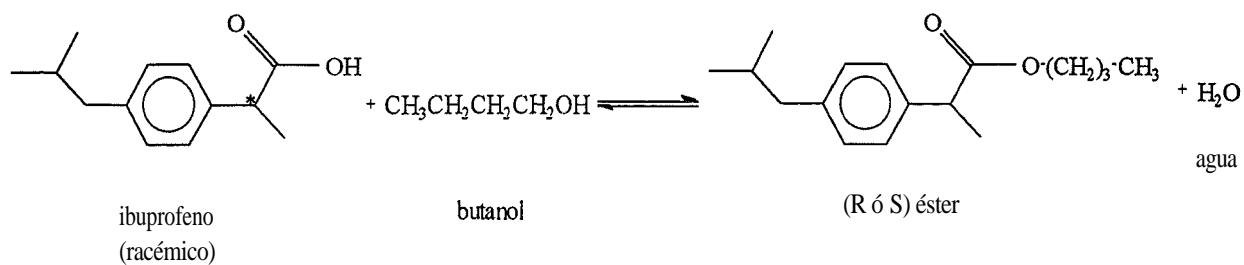
Como agentes esterificantes se eligió como alcohol el butanol tanto para el ácido 2-fenil-propiónico como para el ibuprofeno, y como ácido el ácido propiónico para el caso del *fr-aw5*-2-fenil-1-ciclohexanol. Ambos compuestos habían generado buenos resultados en las reacciones de síntesis estudiadas en los capítulos 4.5 y 4.6.

Así pues, las reacciones que se estudiaron se pueden esquematizar de la manera siguiente:

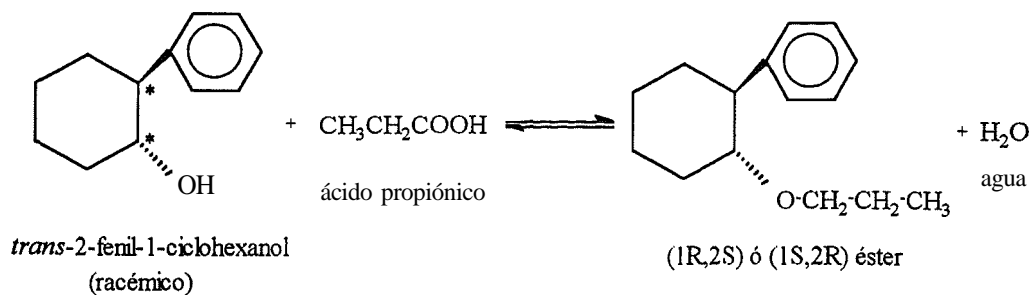
1) Esterificación del ácido 2-fenil-propiónico con butanol:



2) Esterificación del ibuprofeno con butanol:



3) Esterificación del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol con ácido propiónico:



4.7.2. Condiciones de reacción. Elección de la enzima

Como condiciones de reacción se eligieron las siguientes:

- Temperatura: 40°C
- Agitación: 250 rpm en orbital
- Concentración de todos los reactivos: 25 mM
- Volumen de reacción: 10 ml
- Carga **enzimática**: 10 mg soporte con la enzima inmovilizada/ml
- Disolvente: isooctano

La elección de estos valores fue arbitraria, debido a que no se tenía conocimiento previo de las condiciones óptimas de funcionamiento del sistema. Posteriormente, cuando se requirió un estudio detallado de las condiciones óptimas de reacción, éstas se determinaron mediante un diseño de experimentos (apartados 4.8 y 4.9).

Como enzimas a realizar las **esterificaciones** se eligieron, por un lado, la lipasa **UAB** producida por fermentación e inmovilizada sobre EP100 que originó los mejores resultados según se describe en el apartado 4.6 mientras que entre las lipasas comerciales se eligió la lipasa Lipozyme® IM20 de *Mucor Miehei*.

Aunque desde el punto de vista **catalítico**, comparar lipasas producidas por diferentes microorganismos puede parecer incorrecto, si es lógico desde el punto de vista ingenieril y de comparación de la lipasa UAB con una de las mejores lipasas existentes en el mercado. Al encontrarse las lipasas comerciales de *Candida rugosa* muy lejos en actividad de la lipasa UAB, el poder disponer de una enzima comercial de *Candida rugosa* inmovilizada con una actividad parecida a la UAB hubiera requerido importantes operaciones de purificación.

4.7.3. Comparación entre lipasa UAB v Lipozyme® IM20

En consecuencia, se realizaron las tres reacciones descritas en el punto 4.7.1 bajo las condiciones del punto 4.7.2 usando las dos lipasas mencionadas anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 4.7.1, 4.7.2 y 4.7.3.

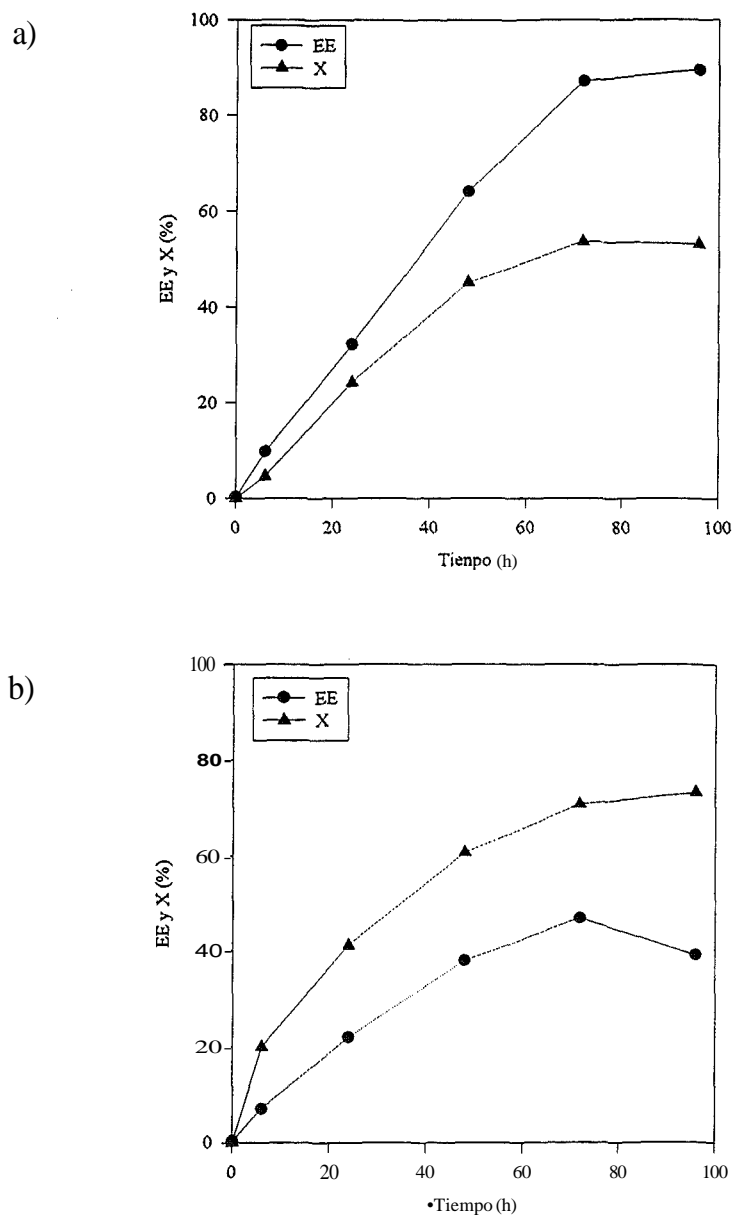


Fig. 4.7.1.a/b: Esterificación enantioselectiva del ácido 2-fenil-propiónico con butanol en isoocetano: a) Lipasa UAB sobre EP100. b) Lipozyme® IM20.

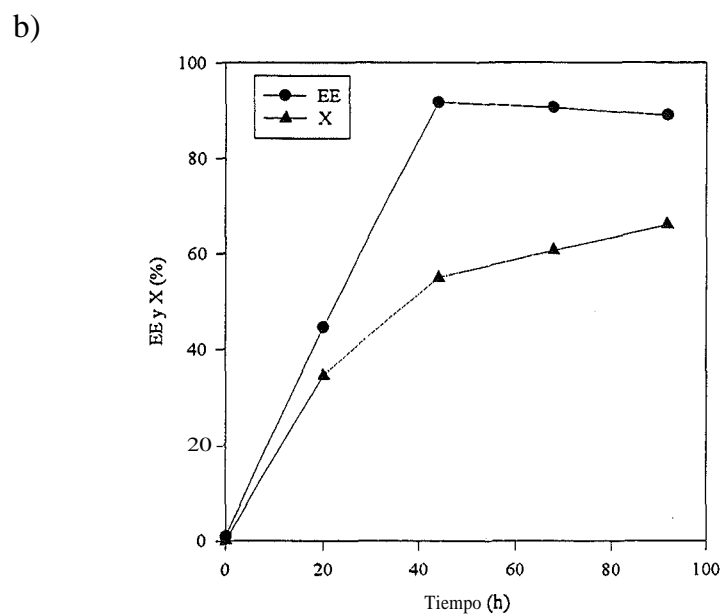
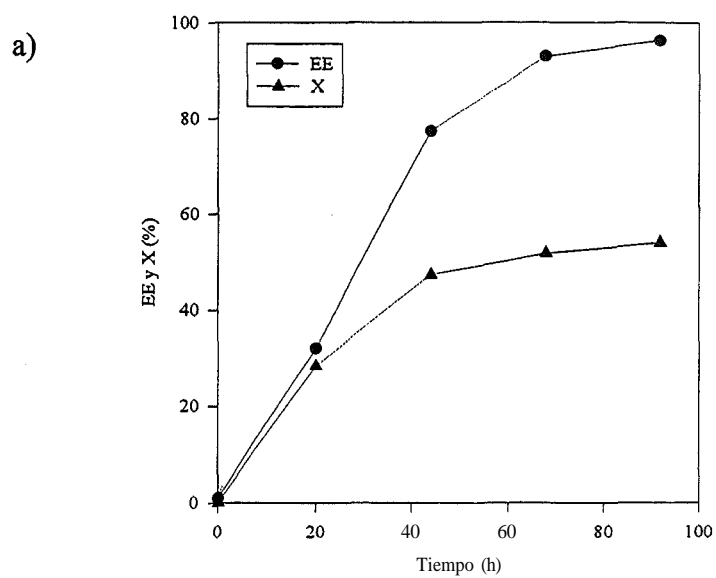


Fig. 4.7.2.a/b: Esterificación enantioselectiva de ibuprofeno con butanol en isooctano:
a) Lipasa UAB sobre EPIOO. b) Lipozyme® IM20.

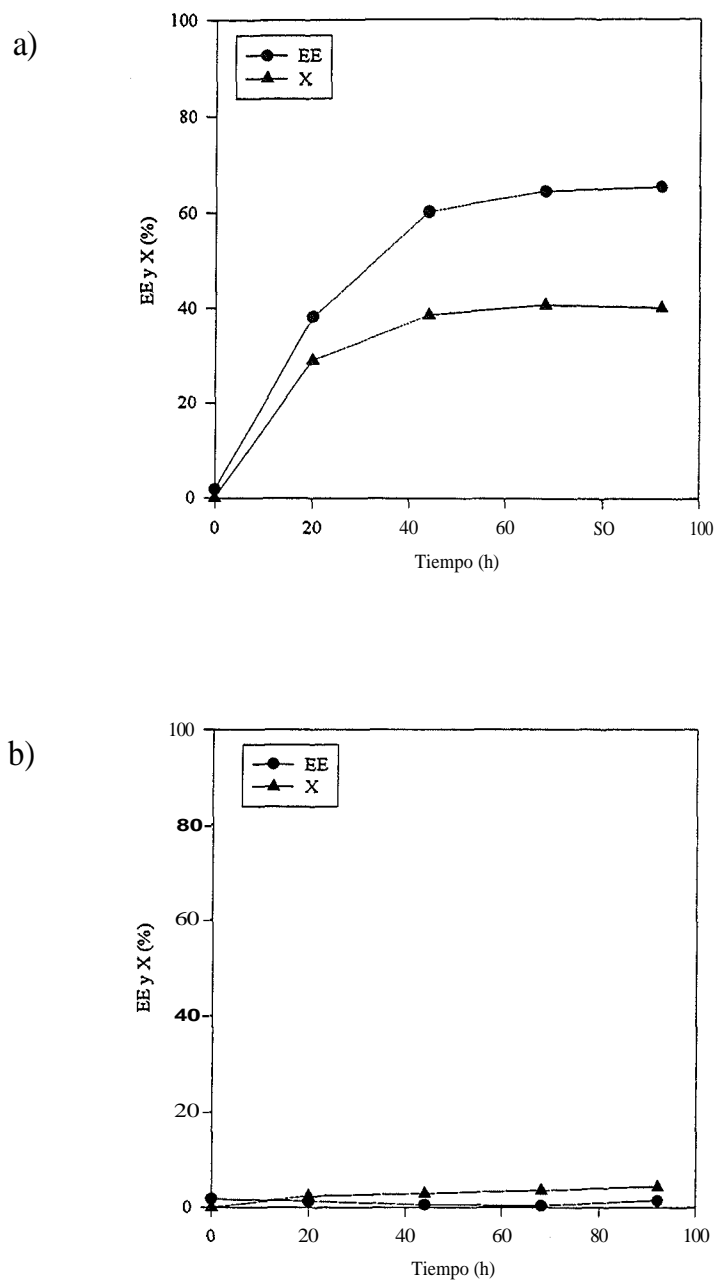


Fig. 4.7.3.a/b: Esterificación enantioselectiva de ibuprofeno con butanol en isooctano:
a) Lipasa UAB sobre EP 100. b) Lipozyme® IM20.

En la tabla 4.7.1 se recoge un resumen de los resultados finales (96 h) de conversión total (X), exceso enantiomérico (EE) y cociente enantiomérico (E) calculados de acuerdo con Chen *et al.* (1982).

Esterificación	X (%)		EE (%)		E	
	UAB	Lipozyme	UAB	Lipozyme	UAB	Lipozyme
Acido 2-fenil-propiónico	53.3	73.4	89.5	39.2	25	2
Ibuprofeno	54.0	65.9	96.2	89.0	39	8
trans-2-fenil-1-ciclohexanol	39.8	4.3	65.0	1.3	232	2

Tabla 4.7.1: Resumen de los resultados obtenidos a las 96 h en las seis reacciones de esterificación.

El primer aspecto a señalar es el hecho de que ambas enzimas muestran la misma enantioselectividad hacia el enantiómero S(+) del ácido 2-fenil-propiónico e ibuprofeno y por el 1R,2S(-)-*trans*-2-fenil-1-ciclohexanol.

En el caso del ácido 2-fenil-propiónico y del ibuprofeno, el cociente enantiomérico usando Lipozyme fue 2 y 8 respectivamente, similar a los obtenidos por López-Belmonte *et al.* (1997) bajo distintas condiciones. La lipasa UAB mostró un mejor comportamiento en términos de enantioselectividad alcanzando valores de E para el ácido 2-fenil-propiónico de 25 y 39 para el ibuprofeno. Estas diferencias son atribuibles básicamente al hecho de que en la esterificación del ibuprofeno usando lipasa UAB, la relación entre las velocidades de reacción entre los enantiómeros S y R es más elevada que la observada con Lipozyme (Tabla 4.7.2). En la tabla 4.7.2 se recogen los valores de las relaciones entre las velocidades iniciales de reacción para cada enantiómero, confirmándose los valores de la tabla 4.7.1.

Bajo estas condiciones, sin embargo, el enantiómero S del ibuprofeno no desapareció totalmente del medio de reacción antes de que empezara la esterificación del enantiómero R, al contrario de lo señalado por Mustranta (1992).

En el caso del ácido 2-fenil-propiónico, el valor del cociente enantiomérico obtenido es superior a los previamente obtenidos con lipasa de *Candida rugosa* (García *et al.*, 1993), y

muy superior al obtenido con Lipozyme, debido a que con esta enzima ambos enantiómeros son consumidos simultáneamente con velocidades similares en orden de magnitud (Tabla 4.7.2).

Lipasa	VS/VR ácido 2-fenil propiónico	VS/VR ibuprofeno
UAB sobre EP100	6.2	22.3
Lipozyme® IM20	1.6	7.5

Tabla 4.7.2.: Relación de velocidades iniciales de **esterificación** para los enantiómeros R y S del ibuprofeno y ácido 2-fenil propiónico para lipasa UAB y Lipozyme IM20.

En el caso del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol, sólo la lipasa UAB fue la enzima capaz de producir una buena resolución. Prácticamente se obtuvo una separación enantioméricamente perfecta, alcanzando un cociente enantiomérico superior a 230. En cambio, Lipozyme no presentó actividad catalítica para este sustrato, con una conversión inferior al 5 %. En este caso, la lipasa UAB constituía una excelente opción para llevar a cabo esta resolución, a pesar de alcanzar valores de conversión sólo del 40 %.

4.7.4. Conclusiones

Como conclusiones al capítulo se pueden señalar:

- La lipasa UAB inmovilizada sobre EP100 demostró un buen comportamiento en reacciones de síntesis quirales.
- En las tres reacciones estudiadas mostró un comportamiento mejor en términos de cociente enantiomérico respecto a Lipozyme IM20, aunque peor en términos de velocidad de reacción y conversión.
- La lipasa UAB sobre EP100 constituye una buena alternativa en la resolución por esterificación del ácido 2-fenil-propiónico y del ibuprofeno y una excelente alternativa en el caso del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol.

Finalmente, después de los resultados obtenidos y como objeto de estudio para ver sus posibilidades de aplicación en un reactor en continuo se eligieron los siguientes sistemas de reacción:

- 1) Esterificación del ibuprofeno con butanol mediante Lipozyme® IM20.
- 2) Esterificación del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol con ácido propiónico mediante lipasa UAB inmovilizada sobre EP100.

El diseño de un reactor en continuo para estas dos reacciones es objeto de estudio en los capítulos 4.8 y 4.9.

4.8. ESTUDIO DE LA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE IBUPROFENO MEDIANTE LIPOZYME® IM20

4.8.1. Metodología general

A la hora de estudiar las condiciones óptimas para el funcionamiento de la reacción dos son las vías posibles de trabajo: la realización de experimentos discretos o la elaboración de un diseño de experimentos. En la realidad, los dos sistemas no son excluyentes, y lo más común y aconsejable es aprovechar los conocimientos previos, ya sean experimentales o bibliográficos, para a partir de experimentos discretos, descartar ciertos factores y **realizar** un diseño de experimentos en el que se incluyan aquellos factores de los que se desconoce su influencia en el sistema o está probada su interacción con el mismo.

Para el diseño de una sistema en continuo para la **esterificación** altamente **enantioselectiva** de ibuprofeno se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Determinación de los factores que influyen en la reacción. Fijar aquellos factores que puedan ser conocidos mediante experimentos discretos y aquellos que habrán de ser determinados.
- 2) Determinación de las condiciones óptimas en discontinuo mediante un diseño de experimentos factorial.
- 3) Determinación de la cinética de reacción en las condiciones del óptimo.
- 4) Elección del tipo de reactor en continuo con los datos cinéticos: **RCFP** o **RCTA**.
- 5) Construcción del reactor y comprobación hidrodinámica de la idealidad del reactor: **DTR**
- 6) Funcionamiento del reactor: posibilidades de reutilización de la enzima y estabilidad ante factores como la formación de agua o inactivación **enzimática**.

Estos pasos se estudiaron **secuencialmente** y tenían como objetivo final llegar a determinar si el diseño del sistema en continuo era viable o no para esta reacción **enzimática**.

4.8.2. Determinación de los factores que influyen en la reacción

En concreto, para esta reacción definida como la **esterificación** del ibuprofeno con **butanol** para generar un éster de una elevada pureza enantiomérica deben considerarse los siguientes factores:

1. Disolvente
2. Temperatura
3. Concentración de ibuprofeno
4. Relación **alcohol/ácido**
5. Contenido en agua
6. Carga **enzimática**
7. Volumen

De todos estos factores algunos se fijaron previamente:

1. Volumen = 10 ml
2. Carga enzimática = 10 mg/ml, en principio, la constante de velocidad ha de ser directamente proporcional a la carga enzimática.

El disolvente a utilizar también se decidió mediante experimentos discretos. En la bibliografía se recogen diferentes disolventes potenciales de uso: ciclohexano (Chang y Tsai, 1997) y n-hexano (Fadnavis y Koteswar, 1997), e isooctano (Vázquez-Lima *et al.*, 1995). Así pues, como la lista de disolventes podría ser interminable, se eligieron estos tres disolventes orgánicos debido a que los tres aseguraban contenidos muy bajos en agua incluso al nivel de saturación (ver valores de **logP** en Tabla 1.16).

Para determinar cual era el mejor se eligió la reacción de síntesis utilizando una concentración de ibuprofeno 25 mM y butanol en proporción estequiométrica y se siguió la evolución de los dos parámetros críticos a lo largo del tiempo: el exceso enantiomérico de los reactivos y la conversión en éster. En la figura 4.8.1 se muestran los resultados obtenidos.

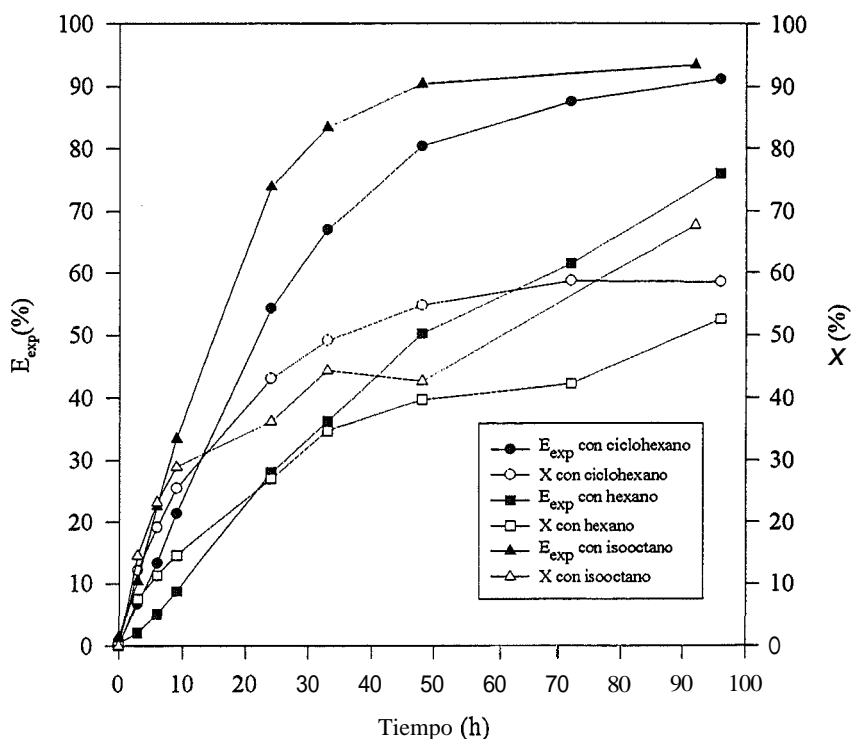


Fig. 4.8.1.: Evolución del exceso enantiomérico y de la conversión para la síntesis del éster del ibuprofeno con butanol con Lipozyme IM20 usando n-hexano, ciclohexano e isooctano.

En la figura se aprecia como los mejores valores de exceso enantiomérico se obtienen con isooctano, seguidos de ciclohexano a poca distancia y obteniéndose los peores resultados con n-hexano. Estos resultados se correlacionan con los valores de $\log P$, siendo el mejor disolvente el de mayor $\log P$. Por lo que se refiere a la conversión, las diferencias no son muy importantes y, en todo caso, el factor crucial para la elección del disolvente adecuado es el comportamiento del exceso enantiomérico a lo largo del tiempo, por lo que se decidió trabajar con isooctano teniendo en cuenta que el ciclohexano no sería una mala alternativa.

También cabe señalar que otro factor importante a favor del **isooctano** es su elevado punto de ebullición (**99.1°C**) en comparación con el ciclohexano (**80.7°C**) y n-hexano (**69.0°C**) hecho que implica una importante disminución de las pérdidas de disolvente por evaporación, que pueden ser significativas a tiempos elevados de reacción.

4.8.3. Diseño de experimentos

Con los factores de los que no se tenía conocimiento previo de su comportamiento se decidió hacer un diseño de experimentos en los que los factores fueron:

1. **Concentración de ibuprofeno:** 10, 25 y 50 mM debido a que por encima de este valor ya se producía inhibición y los tiempos de reacción se hacían excesivos para pensar en desarrollar la reacción en continuo.
2. **Relación butanol:ibuprofeno:** se probaron 1:1, 2:1, 4:1.
3. **Temperatura:** 35, 40 y 45°C.
4. **Contenido en agua:** disolvente anhidro o saturado con agua.

Así pues se tienen tres factores con tres niveles cada uno y un factor con dos niveles, lo que implica la realización de $3 \times 3 \times 3 \times 2 = 54$ experimentos. El código empleado para nombrar dichos experimentos fue el siguiente:

Temperatura / Concentración de ibuprofeno / Relación de butanol / Saturación o no con agua

Así, por ejemplo, el código 40/50/2/si significa un experimento realizado a 40°C con una concentración 50 mM de ibuprofeno, una relación 2:1 de butanol (100 mM en butanol) y con el disolvente saturado de agua.

Los experimentos se realizaron en discontinuo, de ellos se obtuvieron los datos de exceso enantiomérico y conversión eligiendo para cada caso como óptimo el punto de mayor exceso enantiomérico. En principio, podría parecer que el momento óptimo es aquel punto en el que se ha alcanzado un estado estacionario que correspondería al equilibrio químico, pero esto no fue así debido a que para concentraciones de ibuprofeno bajas el exceso enantiomérico presentaba un máximo, lo que significaba que con suficiente tiempo la enzima

era capaz de esterificar el enantiómero para el cual la velocidad de síntesis era menor produciendo una rápida bajada en el valor del exceso enantiomérico. Para concentraciones elevadas de ibuprofeno, en cambio, se llegaba a un estado estacionario en el que los valores de la conversión y el exceso enantiomérico se mantenían estables.

Estos resultados se ilustran en las figuras 4.8.2.a/b donde se observan los perfiles de reacción para dos concentraciones de ibuprofeno. Claramente se observa el fenómeno anteriormente descrito, para la concentración de ibuprofeno de 10 mM el exceso enantiomérico presenta un máximo mientras que la conversión acaba cerca del 100 % lo que implica que la enzima llega a sintetizar los dos enantiómeros (fig. 4.8.2.a). En cambio, para el caso de una concentración de ibuprofeno de 50 mM se llega a un estado estacionario estable con una conversión cercana al 50 % y un exceso enantiomérico del 95 % (fig. 4.8.2.b).

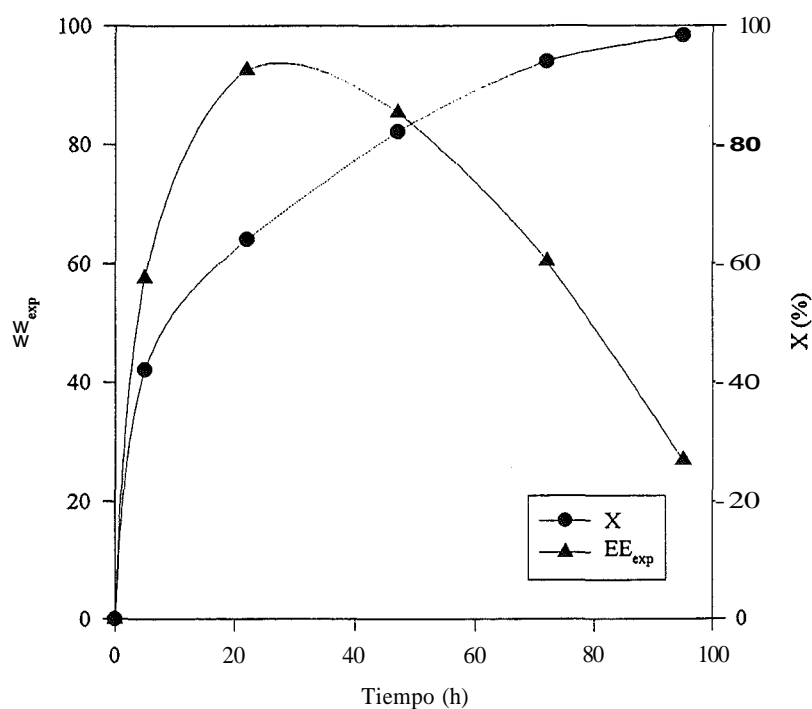


Fig. 4.8.2.a.: Evolución de la reacción de síntesis para una concentración inicial de ibuprofeno de 10 mM.

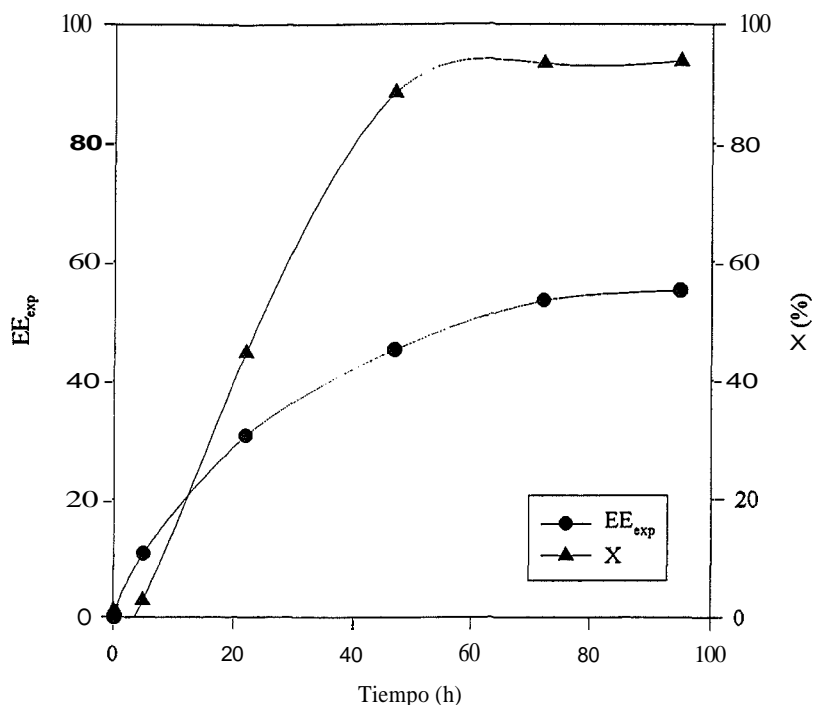


Fig. 4.8.2.b.: Evolución de la reacción de síntesis para una concentración inicial de ibuprofeno de 50 mM.

Debido a esto, se eligió el punto óptimo de cada experimento como aquél que generó un exceso enantiomérico mayor. Además, para cada uno de los experimentos había que decidir cual era el parámetro a optimizar, de cara a la calidad del producto lo fundamental era un elevado exceso enantiomérico (siempre lo más cerca posible del 100 %), de cara a la separación del producto era importante tener una elevada conversión (cercana al 50 %) y para el diseño de un reactor en continuo o para la productividad también era importante tener bajos tiempos de reacción. Se optó por una función objetivo particular para este sistema y para las necesidades del proceso, decidiéndose dar tres pesos diferentes a cada parámetro, en una relación 3:1:0.3 de gradación de importancia de la variable.

Función objetivo = 3 (exceso enantiomérico) + 1 (conversión) - 0.3 (tiempo)

En la tabla 4.8.1 se recogen el óptimo para cada reacción y los datos de la evaluación de esta función objetivo para los distintos experimentos realizados.

Experimento	Tiempo opt. (h)	EE _{exp} Opt. (%)	X opt. (%)	Fobjetivo
35/10/1/no	31	100	69	3.604
35/10/2/no	23	100	73	3.601
35/10/4/no	26	100	64	3.662
35/25/1/no	45	93	60	3.877
35/25/2/no	48	99	63	4.044
35/25/4/no	50	98	57	3.953
35/50/1/no	51	94	56	4.514
35/50/2/no	116	94	40	4.045
35/50/4/no	116	85	33	3.607
35/10/1/si	42	88	70	3.240
35/10/2/si	38	90	76	3.967
35/10/4/si	38	96	68	3.671
35/25/1/si	82	94	68	3.951
35/25/2/si	78	98	58	3.937
35/25/4/si	80	96	56	3.858
35/50/1/si	70	90	49	4.217
35/50/2/si	116	94	47	4.186
35/50/4/si	116	92	56	4.225
40/10/1/no	21	100	54	3.297
40/10/2/no	27	94	70	3.348
40/10/4/no	28	99	68	3.452
40/25/1/no	32	96	57	3.741
40/25/2/no	30	96	52	3.928
40/25/4/no	52	96	74	4.108
40/50/1/no	57	92	50	4.239
40/50/2/no	58	94	50	4.353
40/50/4/no	95	90	46	3.998
40/10/1/si	72	81	68	2.857
40/10/2/si	32	84	72	3.141
40/10/4/si	22	88	64	3.198
40/25/1/si	32	90	54	3.773
40/25/2/si	54	96	62	3.925
40/25/4/si	95	96	66	3.940
40/50/1/si	56	90	45	4.135
40/50/2/si	95	94	50	4.317
40/50/4/si	95	90	46	4.003
45/10/1/no	26	82	68	3.053

45/10/2/no	26	88	74	3.305
45/10/4/no	30	94	74	3.497
45/25/1/no	32	92	58	3.841
45/25/2/no	30	96	60	4.01
45/25/4/no	40	96	61	4.055
45/50/1/no	40	90	46	4.276
45/50/2/no	54	94	56	4.582
45/50/4/no	112	96	44	4.264
45/10/1/si	88	91	56	3.057
45/10/2/si	26	75	70	2.893
45/10/4/si	28	94	78	3.452
45/25/1/si	32	90	60	3.764
45/25/2/si	32	94	59	3.935
45/25/4/si	40	95	61	4.039
45/50/1/si	44	90	44	4.211
45/50/2/si	48	94	44	4.299
45/50/4/si	112	95	48	4.204

Tabla 4.8.1.: Distribución de los datos correspondientes a los puntos óptimos para cada uno de los experimentos y cálculo de la función objetivo para este punto óptimo.

De la tabla 4.8.1 se puede observar que el punto donde la función objetivo es mayor es el que corresponde al experimento 45/50/2/no. Siguiendo los pasos del diseño de experimentos se pasó a ajustar los valores de la función objetivo con los diferentes factores que se consideraron y teniendo en cuenta los distintos niveles. La nomenclatura utilizada así como los valores de cada factor se detallan en la tabla 4.8.2.

Para realizar este ajuste y siguiendo con la metodología propia del diseño de experimentos se ajusta la función objetivo de manera estadística a una función polinómica que incluye distintos términos que reflejan la influencia de los factores en el valor de la función objetivo. Esta función se puede hacer tan compleja como se quiera incluyendo términos de distintos grados así como distintas interacciones entre los factores pero evidentemente tiene que llegar un punto en el cual la bondad del ajuste no se vea afectada por la inclusión de nuevos términos en la expresión de la función a optimizar.

Variable	Valor	Nivel
Temperatura (X_1)	35	-1
	40	0
	45	1
Concentración ibuprofeno (X_2)	10	-1
	25	-0.25
	50	1
Relación butanol:ibuprofeno (X_3)	1	-1
	2	-0.333
	4	1
Saturación o no del disolvente con agua (X_4)	No	-1
	Si	1

Tabla 4.8.2.: Asignación de variables y de niveles para los distintos factores considerados en la determinación de la función a optimizar.

Con los valores normalizados de los distintos niveles de los factores considerados se pasó a ajustar los valores de la función objetivo probando diferentes expresiones polinomiales de la función a optimizar. La optimización de la función se llevó a cabo mediante un programa descrito en la sección de Apéndices 8.14.

Esta metodología se puede resumir de la siguiente manera:

- 1) Definición de la matriz de experimentos: X
- 2) Cálculo de la traspuesta de la matriz de experiencias: X^T
- 3) Determinación de la matriz de varianza-covarianza: $(X^T \cdot X)^{-1}$
- 4) Determinación de los coeficientes de cada término del polinomio que ajusta la función objetivo: $B = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y$
- 5) Determinación del coeficiente de regresión R^2 mediante el cálculo de los siguientes parámetros estadísticos:

$$R^2 = SS_{\text{fact}} / SS_{\text{cor}}$$

donde:

$$SS_{fact} = \sum_{i=1}^n (y_i^* - y_m)^2 \quad \text{suma cuadrática de los efectos de los factores}$$

$$SS_{cor} = \sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2 \quad \text{suma cuadrática de las respuestas corregidas}$$

con:

$n=54$, número total de experimentos

$m=1$, número de experimentos realizados en el mismo punto

y_m = media de los experimentos realizados

$$y_m = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

y_i = valor de la función obtenida experimentalmente

y_i^* = valor de la función estimada por el modelo

Se partió de una función lineal:

$$F_0 = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4$$

para posteriormente ir añadiendo términos cuadráticos (al estilo X_i^2) y de interacción (de la forma $X_iX_jX_k$) observando la evolución del coeficiente de regresión hasta conseguir un valor donde las diferencias en la bondad del ajuste fueran mínimas. Los resultados de este proceso se muestran en la tabla 4.8.3, en ella se recogen los valores obtenidos de los coeficientes del polinomio para cada función probada además del cálculo del coeficiente de regresión. Con funciones más complejas el coeficiente de regresión no varió en sus dos primeras cifras **significativas**, por lo que se eligió F_6 como mejor ajuste.

Función	R ²	b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄	b ₅	b ₆	b ₇	b ₈	b ₉	b ₁₀
F ₀	0.67	3.86	-0.040	0.41	0.033	-0.034	-	-	-	-	-	-
F ₁ =F ₀ +X ₁ ²	0.68	3.80	-0.040	0.41	0.033	-0.034	0.094	-	-	-	-	-
F ₂ =F ₁ +X ₂ ²	0.77	3.99	-0.040	0.43	0.033	-0.034	0.094	-0.27	-	-	-	-
F ₃ =F ₂ +X ₃ ²	0.78	4.07	-0.040	0.43	0.043	-0.034	0.094	-0.27	-0.10	-	-	-
F ₄ =F ₃ +X ₁ X ₂	0.83	4.07	-0.028	0.43	0.043	-0.034	0.094	-0.27	-0.10	0.14	-	-
F ₅ =F ₄ +X ₁ X ₃	0.84	4.07	-0.198	0.43	0.043	-0.034	0.094	-0.27	-0.10	0.14	0.074	-
F ₆ =F ₅ +X ₂ X ₃	0.89	4.07	-0.198	0.41	0.032	-0.034	0.094	-0.27	-0.10	0.14	0.074	-0.13

Tabla 4.8.3.: Ajuste para distintos modelos de función con los valores experimentales normalizados de la tabla 4.8.2.

En un diseño de experimentos, sin embargo, el valor del coeficiente de regresión necesita de la confirmación de distintos parámetros estadísticos que den validez al modelo propuesto, ya que pese a que el valor de R² sea bueno para este tipo de diseños, se requiere la realización de repeticiones de experimentos para ver el peso que tiene el error experimental en las variaciones de la función objetivo con respecto a los cambios en los niveles de los factores considerados.

Los experimentos se realizaron a 40°C llevándose a cabo tres réplicas de los experimentos 10/2/no, 25/2/no y 50/2/no respectivamente. Los resultados obtenidos para estas tres triadas de experimentos se muestran en la tabla 4.8.4. Para la determinación de la influencia del error experimental sobre la función modelo se necesitaban determinar una serie de valores estadísticos y correlacionarlos con valores estadísticos tabulados. La función modelo ahora determinada incluirá la totalidad de experimentos (replicados o no) y los coeficientes y coeficiente de regresión se verán ligeramente afectados por la introducción de estos nuevos experimentos.

A continuación, se presenta la serie de cálculos para obtener la nueva función modelo a partir de los valores de la tabla 4.8.1 y 4.8.4.

Experimento	Réplica	Función objetivo
10/2/no	a	3.417
	b	3.325
	c	3.385
25/2/no	a	3.299
	b	3.263
	c	3.266
50/2/no	a	3.055
	b	3.002
	c	2.991

Tabla 4.8.4.: Distribución de los datos correspondientes a los puntos óptimos para cada uno de los experimentos y cálculo de la función objetivo para este punto óptimo referentes a las tres réplicas realizadas para tres niveles diferentes.

Cálculo de la función modelo y validación del modelo:

- 1) Determinación mediante el programa factor.for (Apéndices 8.14) de los coeficientes del polinomio que ajusta mejor la totalidad de datos experimentales.

$$F = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_5 X_1^2 + b_6 X_2^2 + b_7 X_3^2 + b_8 X_1 X_2 + b_9 X_1 X_3 + b_{10} X_2 X_3$$

b ₀	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄	b ₅	b ₆	b ₇	b ₈	b ₉	b ₁₀
4.04	-0.020	0.41	0.032	-0.031	0.10	-0.26	-0.093	0.14	0.074	-0.13

- 2) Cálculo de los valores estadísticos necesarios:

$n = 63$ (54+9), número total de experimentos

$m = 3$, número de experimentos **realizados** en el mismo punto

$f = 54$, número de combinaciones realizadas

$p = 11$, número de parámetros del modelo

y_j , valor de la función obtenida experimentalmente

y_i^* , valor de la función estimada del modelo

y_{mri} , valor medio de la función para los experimentos replicados

Media:

$$y_m = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} = 3.825$$

Suma cuadrática de las medias:

$$SS_m = \sum_{i=1}^m (y_m)^2 = 921.6$$

Suma cuadrática de las respuestas corregidas:

$$SS_{cor} = \sum_{i=1}^n (y_i - y_m)^2 = 10.31$$

Suma cuadrática total de las respuestas:

$$SS_T = \sum_{i=1}^n (y_i)^2 = 931.8$$

Suma cuadrática de los residuos:

$$SS_r = \sum_{i=1}^n (y_i - y_i^*)^2 = 1.071$$

Suma cuadrática de los efectos de los factores:

$$SS_{fact} = \sum_{i=1}^n (y_i^* - y_m)^2 = 9.234$$

Suma cuadrática de la carencia de ajuste:

$$SS_{lof} = \sum_{i=1}^n (y_{mri} - y_i^*)^2 = 0.985$$

Suma cuadrática del error experimental:

$$SS_{pe} = \sum_{i=1}^n (O - y_{mri})^2 = 0.0857$$

3) Determinación del coeficiente de regresión:

$$R^2 = \frac{SS_{fact}}{SS_{cor}} = 0.896$$

4) Determinación de los valores estadísticos F:

$$F_{1\text{exp}} = F_{(p-1; n-p)} = \frac{SS_{fact}/(p-1)}{SS_r/(n-p)} = 44.83$$

$$F_{2\text{exp}} = F_{(f-p; n-f)} = \frac{SS_{lof}/(f-p)}{SS_{pe}/(n-f)} = 2.406$$

$F_{1\text{exp}} \gg \gg F_{2\text{exp}}$ primer test correcto (es mucho más importante la contribución de los factores que la del error experimental en el ajuste del modelo estadístico).

5) Comparación con los valores tabulados de F:

$$F_{1\text{tab}} = F(10, 52) \quad \text{para } \alpha = 0.95 \quad F_{1\text{tab}} = 2.05$$

$$\text{para } \alpha = 0.99 \quad F_{1\text{tab}} = 2.70$$

en todo caso $F_{1\text{exp}} \gg \gg F_{1\text{tab}}$, segundo test correcto: el modelo explica mucha más variación debida a los factores que a la puramente aleatoria.

$$F_{2\text{tab}} = F(43, 9) \quad \text{para } \alpha = 0.95 \quad F_{2\text{tab}} = 2.83$$

$$\text{para } \alpha = 0.99 \quad F_{2\text{tab}} = 4.57$$

en todo caso $F_{2\text{exp}} > F_{2\text{tab}}$, tercer test correcto: el error del modelo está dentro de lo esperado estadísticamente para esta población.

Obtenido ya un modelo con una función que era capaz de reproducir satisfactoriamente el efecto de los factores sobre la función objetivo, se pasó a determinar cual era el óptimo de dicha función para obtener definitivamente las condiciones ideales de la reacción. Para ello se utilizó un método **quasi-Newton** con evaluación del gradiente por diferencias finitas tomando como restricciones las correspondientes al dominio experimental de las variables independientes, obteniéndose como valores que maximizaban la función objetivo:

$X_1 = 1$, Temperatura = 45°C

$X_2 = 1$, Concentración de ibuprofeno = 50 mM

$X_3 = -0.1385$, Relación butanol:ibuprofeno = 2.2

$X_4 = -1$, Utilización de disolvente saturado en agua = no

Valor de la función objetivo en este punto = 4.44

4.8.4. Determinación de la cinética de reacción

El último paso que restaba para poder caracterizar completamente las condiciones óptimas de la reacción era la determinación de la cinética de la misma bajo estas condiciones. En consecuencia, se realizó un experimento con los resultados obtenidos del óptimo determinado mediante el diseño de experimentos, es decir: 45/50/2.2/no.

En estas condiciones se obtuvieron los **perfiles** representados en la figura 4.8.3, en los que se siguió durante la reacción el exceso enantiomérico y la conversión total de reacción. En este caso, y como era de esperar, se obtuvo una curva muy parecida a la de la figura 4.8.2.b que correspondía a las condiciones 45/50/2/no.

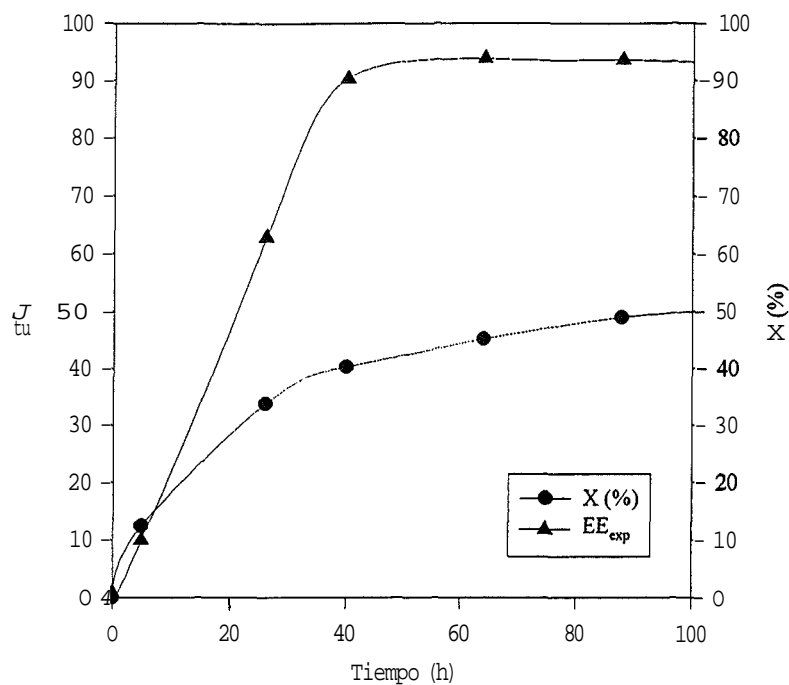


Fig. 4.8.3.: Evolución del exceso enantiomérico y de la conversión total para las condiciones óptimas de reacción: 45/50/2.2/no.

A la vista de lo representado en la figura 4.8.3 una primera hipótesis fue considerar una cinética en la cual la reacción avanzara sólo sintetizando el enantiómero S, mientras que el R no reaccionara bajo estas condiciones y considerando este tiempo de reacción. Bajo esta hipótesis la reacción quedaría simplificada de la siguiente manera:



considerando el enantiómero R del ibuprofeno como un inerte.

La determinación de la cinética bajo estas condiciones pasaba por considerar distintas aproximaciones y ver cual se ajustaba mejor a los datos experimentales. Las condiciones iniciales y la expresión de la concentración de S-ibuprofeno viene dada por:

$$\text{CAO} = 25 \text{ mM (A = S-ibuprofeno)}$$

$$\text{CBO} = 110 \text{ mM (B = butanol)}$$

A = reactivo limitante: $C_A = C_{A0}(1-X_A)$

$X_A = 2X$

Con ello, se probaron diferentes cinéticas de reacción. De entre las posibilidades descritas en la bibliografía de cinéticas para lipasas (apartado 1.7.2) se eligió utilizar pseudocinéticas de tipo homogéneo dado que el objetivo final es el diseño del reactor y no conocer el mecanismo de reacción.

1) Orden 1 respecto a A y orden 0 respecto a B:

$r = kC_A$, o integrando: $C_A = C_{A0}\exp(-kt)$

con una regresión lineal de $\ln(C_{A0}/C_A)$ vs a t se ha de obtener una recta de pendiente k:

ordenada en el origen = $6.808 \cdot 10^{-3}$

pendiente = $k = 0.0422 \text{ h}^{-1}$

$r = 0.997$

los resultados del ajuste se presentan en la figura 4.8.4.:

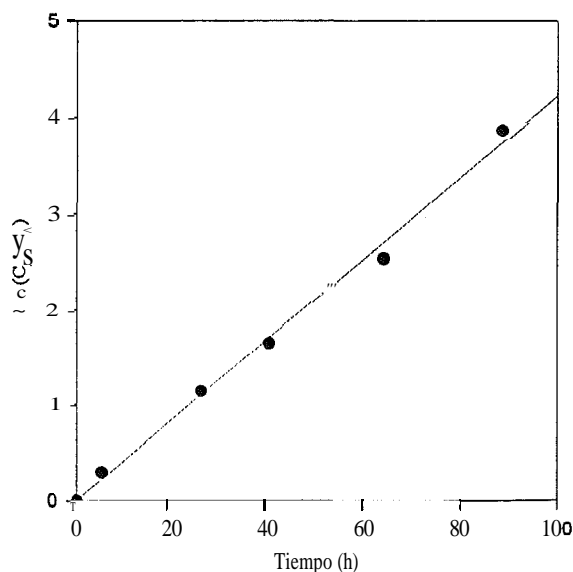


Fig. 4.8.4.: Resultados para un ajuste de primer orden con respecto al S-ibuprofeno.

2) Orden 2 respecto a A y orden 0 respecto a B:

$$r = kC_A^2, \text{ o integrando: } C_A = 1/(kt + 1/C_{A0})$$

mediante una regresión lineal de $1/C_A - 1/C_{A0}$ respecto a t se tendría que obtener una recta de pendiente k , sin embargo, de la figura 4.8.5 ya se observa que los datos no se ajustan a una recta, por tanto una cinética de orden 2 no corresponde con la reacción estudiada.

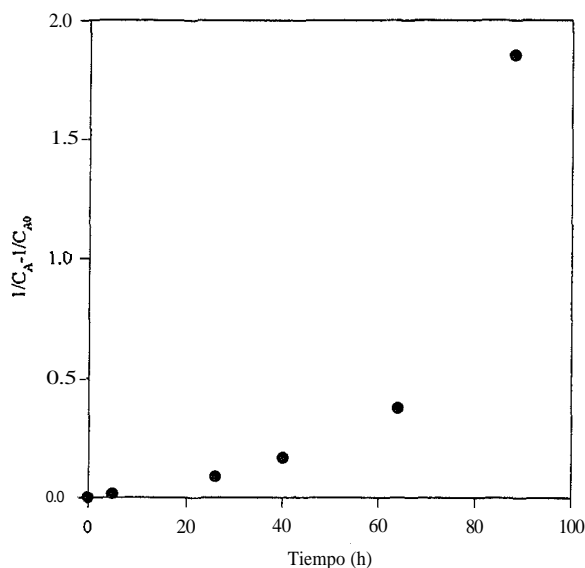


Fig. 4.8.5.: Resultados para un ajuste de segundo orden con respecto al S-ibuprofeno.

3) Orden 1 respecto a A y orden 1 respecto a B:

$$r = kC_A C_B, \text{ con } C_A = C_{A0}(1 - X_A) \text{ y } C_B = C_{B0} - X_A C_{A0}$$

integrando r respecto X_A se obtiene:

$$kt = \frac{1}{85} \left[\ln\left(\frac{110 - 25X_A}{1 - X_A}\right) \right]_0^{X_A}$$

mediante una regresión lineal de $1/85 \cdot (\ln((110-25X_A)/(1-X_A)) - 4.70)$ respecto a t se ha de obtener una recta de pendiente k :

ordenada en el origen = $-5.183 \cdot 10^{-4}$

pendiente = $k = 4.648 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$

$r = 0.996$

los resultados del ajuste se presentan en la figura 4.8.6., el ajuste es similar al primer caso, lo que indica que esta cinética se comporta de manera similar al primer caso, orden 1 respecto al S-ibuprofeno mientras que el butanol se comporta bien con los dos órdenes propuestos debido a que su concentración se puede considerar prácticamente constante a lo largo de la reacción.

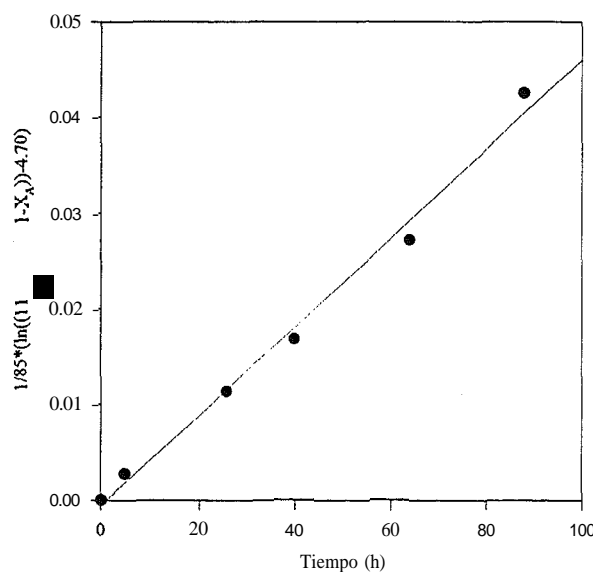


Fig. 4.8.6.: Resultados para un ajuste de segundo orden con respecto al S-ibuprofeno.

En consecuencia, y debido a que la inclusión del butanol en la expresión de la cinética no aportaba mejoras sensibles en la bondad del ajuste, se decidió tomar como pseudocinética

la de primer orden con respecto al S-ibuprofeno con todas las aproximaciones anteriormente comentadas, que vendrá dada por:

$$r = 0.0422C_A \text{ (mM/h)}$$

determinada bajo las siguientes condiciones:

CAO = 25 mM de S-ibuprofeno (50 mM de la mezcla racémica)

C_{B0} = 110 mM

T = 45°C

Disolvente: isooctano no saturado con agua

Carga enzimática: 10 mg Lipozyme IM 20/ml

Volumen de reacción: 10 ml

4.8.5. Selección de tipo de reactor en continuo: RCFP o RCTA

La posibilidad de diseñar un sistema en continuo capaz de conseguir como mínimo los mismos resultados que un sistema en discontinuo fue estudiada **inicialmente** desde un punto de vista teórico. En primer lugar, dado que por simples balances de materia se tienen las ecuaciones de diseño de los dos reactores ideales en continuo, el Reactor Continuo de Flujo en Pistón (RCFP) y el Reactor Continuo de Tanque Agitado (RCTA), y que en el apartado 4.8.4 se llegó a determinar la cinética de la reacción, en principio se podría hacer una previsión acerca de que sistema funcionaría mejor.

Para un RCTA isotérmico el balance de materia en estado estacionario viene expresado como:

$$\text{Entrada} + \text{Generación} = \text{Salida} \quad (1)$$

desarrollando los términos para el reactivo A:

$$Q_L C_{A0} + r_A V = Q_L C_A \quad (2)$$

Puesto que:

$$r_A = -kC_A \quad (4)$$

y que:

$$C_A = C_{A0}(1-X_A) \quad (5)$$

Llegamos a la expresión:

$$\tau = \frac{V}{Q_L} = \frac{X_A}{k(1-X_A)} \quad (6)$$

Donde t es conocido como el tiempo de residencia del reactor y parámetro clave de diseño. Para un caso particular donde quisiéramos asegurar un 95 % de exceso enantiomérico obtenido en discontinuo para las condiciones del óptimo, y si sólo se produce síntesis con el

enantiómero S-ibuprofeno, ello significaría una conversión $X_A = 95 \%$, lo que implicaría un tiempo de residencia de 450 h para la carga enzimática usada en el discontinuo.

En el caso de trabajar con un RCFP isotérmico el tiempo de residencia obtenido a partir del balance de materia viene dado por la siguiente expresión:

$$\tau = \frac{V}{Q_L} = \int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{r} \quad (7)$$

que en nuestro caso se reduce a:

$$\tau = \frac{V}{Q_L} = -\frac{1}{k} [\ln(1 - X_A)]_0^{X_A} \quad (8)$$

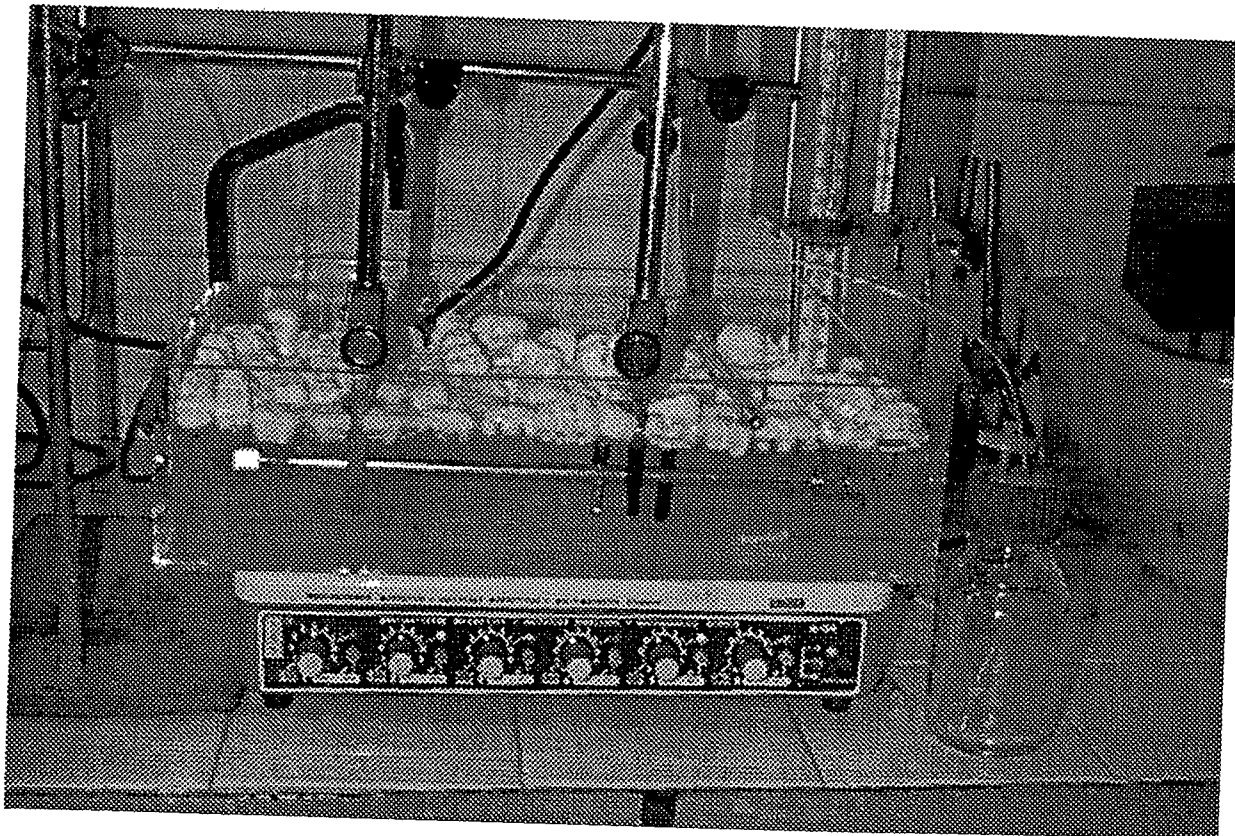
de nuevo para una conversión del 95 % nos aparece un tiempo de residencia de 71 h. Como se puede observar, la diferencia del tiempo de residencia es muy importante a favor del RCFP, del orden de unas 6 veces menor, lo que implicaría un volumen de reactor 6 veces menor. Además, el hecho de que el RCFP se preste a trabajar con mayores cargas enzimáticas con sistemas tipo lecho fijo hace aconsejable esta opción por no citar los problemas que la agitación mecánica en los reactores RCTA provoca sobre los soportes en los que se inmovilizan las enzimas.

No obstante, interesaría trabajar con tiempos de residencia del orden de 1 hora ya que con estos tiempos el sistema podría ser operativo desde el punto de vista industrial. Para conseguir este objetivo la constante cinética tendría que aumentar 71 veces o lo que es equivalente, aumentar 71 veces la carga enzimática, suponiendo que la velocidad de reacción sea directamente proporcional a dicha carga enzimática. Esto implicaría conseguir cargas enzimáticas de 710 mg/ml, o del orden de 0.5-1.0 g/ml, lo cual sólo sería posible en un reactor de tipo RCFP de lecho fijo. Para conseguir este objetivo se pasó a utilizar como reactor una columna de HPLC (Aminex® HPX-87H Biorad) vacía de dimensiones 30cm x 7.8mm. Este reactor tiene un volumen real de 14.3 ml, en el cual es posible introducir 5.8 g de Lipozyme (densidad 1.12 g/ml), lo que implica que el volumen útil del reactor es de 9.1 ml. Bajo estas condiciones la carga enzimática del reactor será de 0.64 g/ml bastante cercana al valor obtenido a partir de los datos de la operación en discontinuo.

4.8.6. Estudios en un RCFP

Con estas consideraciones, se pasó a probar el funcionamiento real que tendría un RCFP con las características mencionadas en el apartado 4.8.5. Para ello se construyó un «fe» de reacción basado en dicho RCFP completamente relleno con Lipozyme con el caudal de entrada de reactivos y disolvente impulsado con una microbureta comandada por un ordenador (Apéndices 8.15) y sumergido en un baño termostatzado a 45°C que actúa como camisa externa calefactora. Los detalles del montaje experimental se presentan en las figuras 4.8.7.a/b.

a)



b)

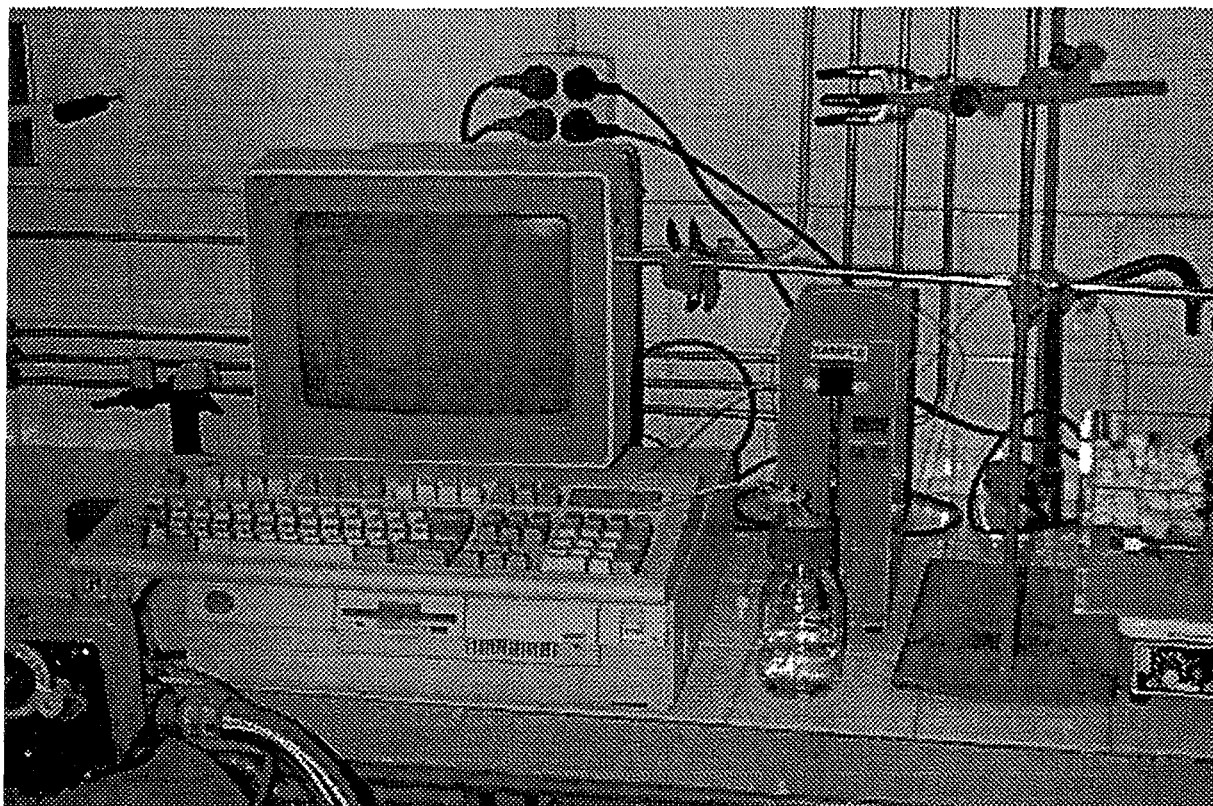


Fig. 4.8.7.a/b: Detalles del montaje experimental. En la primera fotografía se observa con detalle el RCFP y en la segunda el ordenador que actúa sobre la microbureta que impulsa el caudal de entrada al reactor.

Mediante este sistema se pasó a trabajar con distintos tiempos de residencia de cara a ver cual era el funcionamiento óptimo del reactor. Dado que el volumen útil del reactor está fijado (9.1 ml), la variable libre que quedaba en el sistema para actuar con el objetivo de poder conseguir diferentes tiempos de residencia era el caudal QL. Para tener tiempos de residencia de 1 h con el volumen fijado, los caudales tendrían que estar entre 0.1- 0.2 ml/min, aunque se probaron más valores como se recoge en la figura 4.8.8. Otro parámetro interesante que se representa en la figura 4.8.8 es la pureza enantiomérica, definida como tanto por ciento del enantiómero de interés respecto al total de producto, este valor puede ser de interés aquí además del exceso enantiomérico ya que da una idea de la pureza del compuesto obtenido. En estos experimentos se fue cambiando el caudal de líquido y se consideraba que se había alcanzado un nuevo estado estacionario cuando había circulado el equivalente en volumen a tres tiempos de residencia (27 ml) o bien cuando 3 muestras sucesivas originaban los mismos resultados (esto sucedía a los 2 tiempos de residencia).

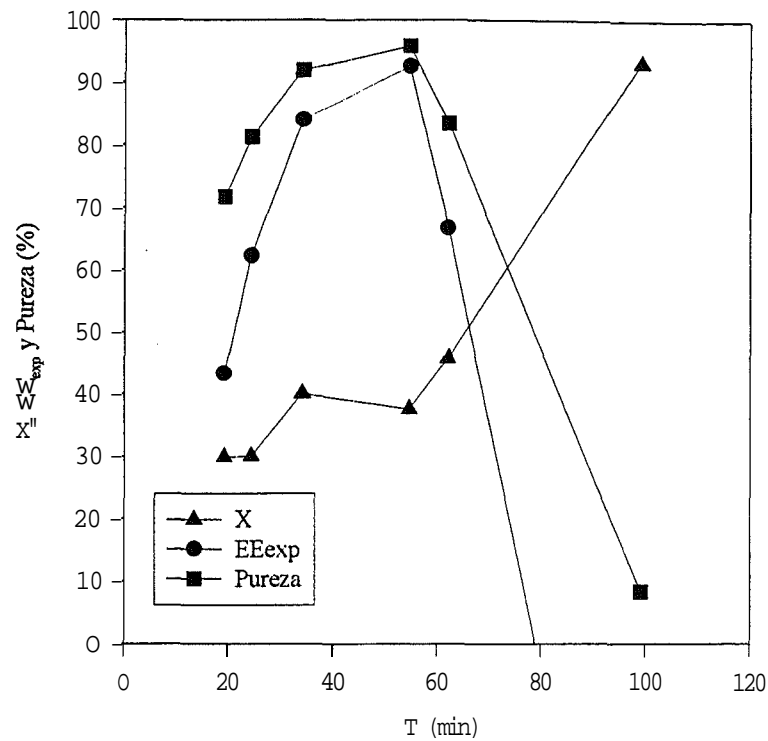


Fig. 4.8.8.: Evolución de los parámetros claves del RCFP para distintos estados estacionarios a diferentes tiempos de residencia.

De la figura 4.8.8 se obtienen las siguientes conclusiones. En primer lugar, constatar que el tiempo de residencia óptimo se sitúa en torno a 55 minutos, lo que corresponde a un caudal de 0.17 ml/min. Si se recuerdan los valores previstos por el estudio de la cinética determinada en discontinuo se observa que el error no ha sido muy elevado considerando las hipótesis y simplificaciones que se han tenido que realizar. Por otro lado, es importante destacar que para este valor óptimo se obtienen los siguientes resultados:

$$\tau = 54.6 \text{ min}$$

$$X = 37.6 \%$$

$$EE_{\text{exp}} = 92.5 \%$$

$$\text{Pureza} = 95.8 \%$$

estos resultados se encuentran de acuerdo con la bibliografía (Trani *et al.*, 1995) y significan unos buenos resultados en particular por lo que se refiere al exceso enantiomérico. Por otro lado, es importante señalar el hecho de que el margen de trabajo con respecto al caudal óptimo es bastante estrecho, y que con una disminución mayor del caudal lo que se provoca es

que se sintetice el otro enantiómero, de manera que el exceso **enantiomérico** en la salida del reactor disminuye de forma considerable. Este hecho sería análogo a lo que ocurría en la figura 4.6.2.a, en la cual para concentraciones bajas de ibuprofeno y a tiempos largos se sintetizaba una mezcla de los dos **enantiómeros**, lo que en este caso equivaldría a tiempos de residencia grandes o a caudales de trabajo pequeños.

Una vez comprobado este óptimo el siguiente estudio fue comprobar cuanto tiempo se mantenían las condiciones óptimas del estado estacionario y si no se producía desactivación de la enzima. Esto se representa en la figura 4.8.9.

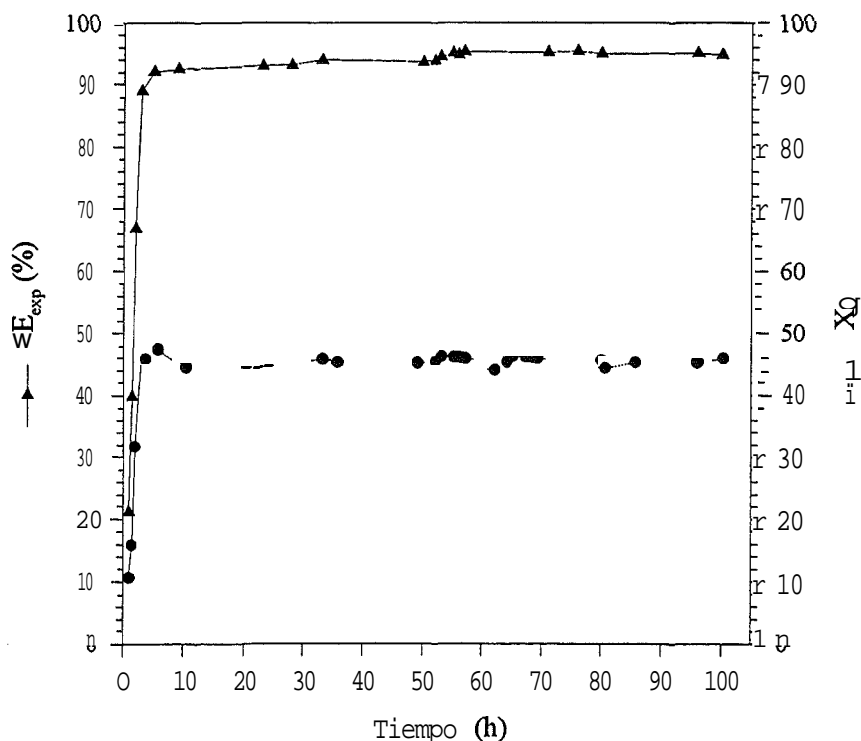


Fig. 4.8.9.: Evolución de los parámetros claves del RCFP para las condiciones óptimas ($\tau=54.6$ min) en el estado estacionario, incluyendo la puesta en marcha desde el tiempo 0.

De la figura 4.8.9 se puede concluir que el sistema es muy estable a lo largo del tiempo, de hecho, las desviaciones de la conversión y del exceso enantiomérico son muy pequeñas como se muestra en la tabla 4.8.5, donde se presentan los valores de desviación correspondientes a la figura 4.8.9.

t (h)	X (%)	EE _{exp} (%)
1.0	10.6	21.3
1.5	15.9	39.8
2.0	31.8	66.9
3.0	45.8	89.1
5.0	47.3	92.1
9.0	44.5	92.5
23.0	45.3	93.1
28.0	45.2	93.2
33.0	45.8	94.0
50.0	44.1	93.7
52.0	45.3	93.9
53.0	46.1	94.5
55.0	46.0	95.1
56.0	46.0	94.8
57.0	45.8	95.3
71.0	44.3	95.2
76.0	45.2	95.4
80.0	45.6	95.0
96.0	45.3	95.1
100.0	45.9	94.8

Tabla 4.8.5.: Datos correspondientes a la figura 4.8.9.

Tomando como estado estacionario a partir de los 2 tiempos de residencia tenemos los siguientes datos promedios:

$$EE_{exp} = 93.9 \pm 1.6 \%$$

$$X = 45.5 \pm 0.8 \%$$

Como se puede ver, las desviaciones son muy bajas, con lo que se puede llegar a concluir que el estado estacionario es estable al menos para estos tiempos de residencia.

4.8.7. Comportamiento del agua en el sistema

Uno de los parámetros claves en el diseño de este tipo de reactores de cara a su escalado y estabilidad tanto de la enzima como de la reacción es conocer que ocurre con el agua que se forma en la reacción. El agua tendrá una importancia vital en el equilibrio de la reacción pero más allá del propio desplazamiento termodinámico la influencia más importante que tiene es su repercusión en la estabilidad y buen funcionamiento de la enzima, lo cual está ampliamente referenciado (Selmi *et al.*, 1997).

En el caso del RCFP la producción de agua es baja pero no despreciable, tomando datos de la conversión en estado estacionario se puede calcular fácilmente la producción de agua de la reacción:

$$\begin{aligned} \text{Producción de agua} &= 50 \text{ mmoles ibuprofeno/l} \cdot 0.416 \text{ de conversión} \cdot 0.167 \cdot 10^{-3} \text{ l/min} = \\ &= 3.85 \cdot 10^{-3} \text{ mmoles agua/min} = 69.3 \text{ } \mu\text{g/min} \end{aligned}$$

Esto correspondería a una concentración de agua en la salida de:

$$\begin{aligned} \text{Concentración de agua en la salida} &= 50 \text{ mmoles ibuprofeno/l} \cdot 0.416 \text{ de conversión} = \\ &= 23.05 \text{ mmoles agua/l} = 0.415 \text{ g agua/l isooctano} = \\ &= 0.060 \% \text{ agua en isooctano} \end{aligned}$$

Sin embargo, los datos experimentales de saturación del isooctano a 45°C muestran que el nivel de saturación es del orden del 0.044 % (Sorensen y Arlt, 1979), así pues parece que el disolvente no sería capaz de arrastrar toda el agua generada en la reacción, incluso teniendo en cuenta que el disolvente entrara completamente anhidro en el reactor.

Por otro lado, el soporte en el cual se halla inmovilizado Lipozyme, la Duolite A568 es capaz de adsorber cantidades importantes de agua, en concreto, un máximo del 64 % según describe el proveedor. Para nuestro caso, en el que se introducen 5.8 g del producto con un contenido inicial del 10.5 % según el proveedor, supondría poder llegar a adsorber 9.22 g de agua. En la reacción se producen 69.3 μg de agua/min, lo que supondría poder llegar a trabajar 92 días de reacción (más de 2000 tiempos de residencia) hasta saturar el soporte de agua suponiendo que no hay salida de agua. Por estos motivos, en la figura 4.8.9. no se

observan desestabilizaciones del estado estacionario debidas al agua. Sin embargo, es posible que antes de llegar a estos valores de saturación se generaran otros problemas como difusión de reactivos, etc. En todo caso, sería un factor a tener en cuenta en el escalado de la reacción, y posiblemente se necesitaría tener un sistema de regeneración de la enzima consistente en un lavado con disolvente fresco y posterior secado (o incluso **liofilización**) para eliminar el agua que se vaya acumulando en el soporte.

En relación con este punto, se realizaron medidas a lo largo de la reacción para ver la capacidad de eliminación de agua que tenía el disolvente, si bien se había constatado que no era posible una total eliminación debido al fenómeno de saturación y el hecho de que este tipo de disolventes sean muy **hidrofóbicos**, si se quería determinar cuanta agua era capaz de eliminar. Para ello se realizaron medidas en un estado estacionario del porcentaje de agua en la salida del reactor mediante un sistema Karl-Fisher para las condiciones óptimas, es decir, tiempo de residencia de 54.6 minutos. Los resultados se presentan en la figura 4.8.10.

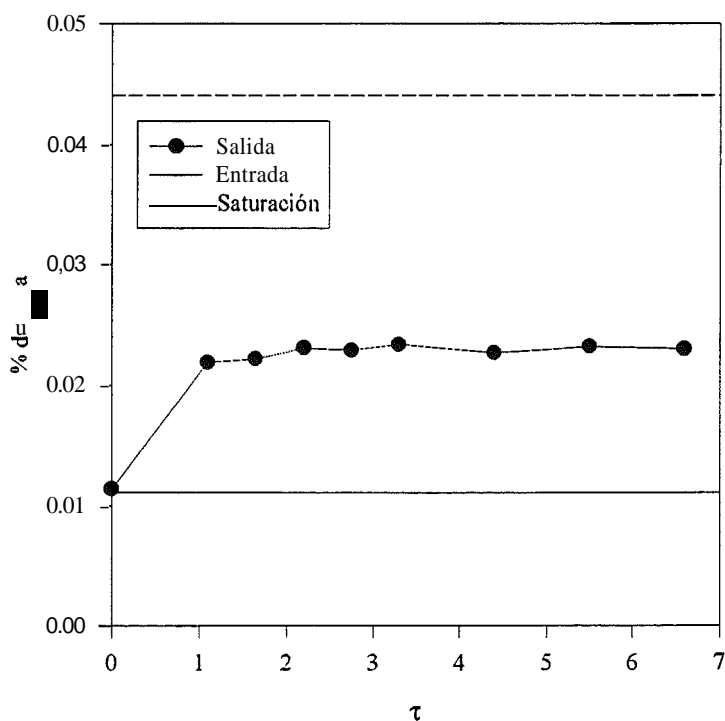


Fig. 4.8.10.: Evolución de % de agua en la salida del reactor para el estado estacionario. Las líneas horizontales representan el contenido de agua en la entrada y el valor de saturación del isooctano a 45°C.

Como se observa en la figura 4.8.10 sí se produce una pequeña eliminación de agua en la salida, ya que el % de agua aumenta desde el 0.0111 % de la entrada hasta un valor medio de 0.0228 ± 0.0005 %. Aunque el valor de la salida está muy lejos del óptimo que sería una total eliminación (0.060 %) o incluso del valor de saturación del **isooctano** (0.044 %), esta pequeña eliminación también tendría que ser tenida en cuenta de cara a realizar un escalado de la reacción.

Por consiguiente, parece evidente que la mayoría de agua producida en la reacción acaba acumulándose en el soporte, con lo que alguna operación de regeneración de la enzima consistente en, por ejemplo, vaciado del reactor, secado del soporte y posterior relleno, parecen ser imprescindibles para que el proceso llegue a ser rentable. Para validar esto, se realizaron una serie de experimentos en los cuales se reutilizó la enzima distintas veces y se observó a que estado estacionario se llegaba en cada caso, para **cuantificar** posibles pérdidas de actividad que se produjeran en las operaciones de limpieza, vaciado, secado y relleno de la enzima. Los resultados por lo que se refiere a conversión y exceso enantiomérico se presentan en la tabla 4.8.6.

Utilización	EE _{exp} (%)	X (%)
1 ^a	91.9	39.2
2 ^a	91.7	40.5
3 ^a	92.6	40.0
4 ^a	92.1	41.1

Tabla 4.8.6.: Resultados para el estado estacionario con el RCFP con distintas reutilizaciones de la misma enzima.

De la tabla 4.8.6 se deduce claramente que la reutilización de la enzima con una operación de secado intermedia no provoca una disminución visible de los resultados una vez alcanzado el estado estacionario. Por otro lado, la puesta en marcha y la llegada al estado estacionario fueron iguales en las cuatro utilizaciones.

A modo de conclusión, se puede afirmar que el RCFP funciona de manera estable hasta los cinco días de funcionamiento, y que aunque su eficacia parece mantenerse bien a lo largo del tiempo, la acumulación del agua generada por la reacción en el soporte de inmovilización provocaría que se tuviera que vaciar y secar la enzima cada cierto tiempo, **cuando** se observara una disminución en el exceso enantiomérico de salida. Sin embargo, la enzima y el soporte presentan una buena recuperación **frente** a este tipo de operaciones, sin haberse observado disminuciones significativas de la actividad hasta la cuarta reutilización de la enzima.

4.8.8. Estudio hidrodinámico del RCFP: DTR

Una de las formas clásicas de caracterizar el reactor es la de realizar una distribución de tiempo de residencia, más conocida como DTR. Mediante este estudio se consigue determinar las desviaciones de la idealidad que pueda presentar el reactor en el funcionamiento en continuo.

Las técnicas normalmente utilizadas pasan por la introducción de una perturbación en forma de trazador inerte en la entrada del sistema y ver la evolución en la salida. Normalmente las dos posibilidades más comúnmente empleadas son la introducción de un trazador en forma de escalón o pulso de concentración.

En el caso del RCFP y trabajando con una microbureta como impulsora del líquido es mucho más cómodo realizar un escalón, es decir, a partir de un momento pasar de introducir el disolvente puro a introducir el disolvente con una concentración conocida de una sustancia inerte. Obviamente, si el reactor es un flujo en pistón perfecto la salida tiene que ser también un escalón perfecto que aparezca para un tiempo igual al tiempo de residencia, como se presenta en la figura 4.8.11.

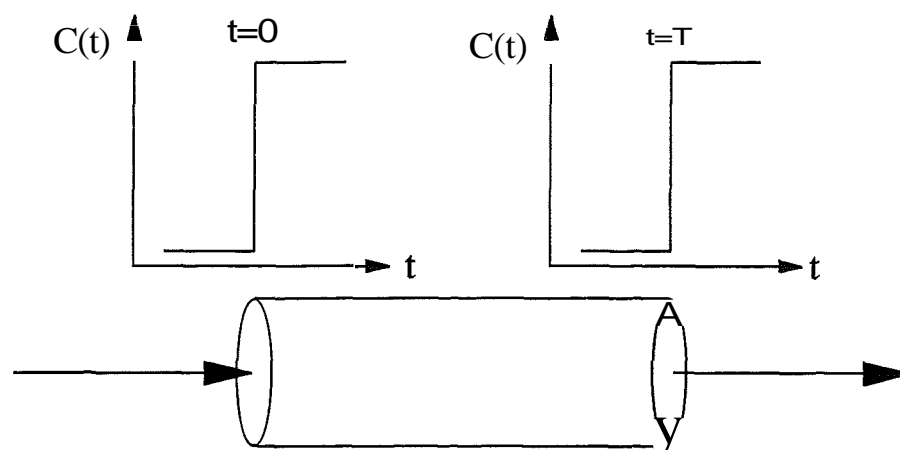


Fig. 4.8.11.: Comportamiento esperado para un RCFP ideal cuando se le somete a un escalón de trazador inerte en la entrada,

En los casos reales, la curva que se obtiene se desvía más o menos de la ideal en función de la dispersión que hay en el reactor. De hecho, un lecho empacado difícilmente será ideal, debido a que la presencia del catalizador dentro del reactor provocará la presencia de dispersión axial, caminos preferenciales, etc.

Para confirmar estas desviaciones se realizó el experimento de introducir un escalón de un trazador que en este caso fue propionato de *n*-butilo y seguir la concentración del producto en la salida del reactor. La elección del trazador fue realizada en base a cumplir los siguientes requisitos: un producto perfectamente soluble, inerte debido a que se trata de un éster, y fácilmente analizable por **cromatografía** de gases (ver Materiales y Métodos, capítulo 3.2.2.2). La introducción del escalón fue realizada simplemente por cambio de la botella de alimento una vez el sistema estaba a régimen circulando isooctano puro.

Un factor que se tuvo en cuenta al realizar la DTR fue el hecho de que aunque para el cálculo del tiempo de residencia de la reacción química se consideró el volumen cilíndrico de la columna, era evidente que como tiempo de residencia hidráulico se tenía que considerar todo el volumen muerto que suponen las conexiones de entrada y salida del reactor. Así pues, el volumen total del cilindro era de 9.12 ml, pero se estimó el volumen muerto de las conexiones en 0.88 ml, teniendo en cuenta longitudes y diámetros internos de los tubos utilizados, con lo que el volumen total pasó a ser de 10 ml, y éste sería con el que se calcularía

el tiempo de residencia hidráulico para analizar la DTR. Este tiempo de residencia viene dado por:

$$\tau_h = \frac{10 \text{ ml}}{0.17 \text{ ml/min}} = 58.8 \text{ min}$$

Con todo esto se analizaron los datos correspondientes a la respuesta al escalón de propionato de *n*-butilo (125.7 mM) introducido en el reactor, que se recogieron en la figura 4.8.12., tomando como escala de abscisas el valor del tiempo de residencia hidráulico determinado anteriormente teniendo en cuenta la totalidad del volumen del sistema, y como eje de ordenadas el % de concentración en la salida con respecto a la de la entrada.

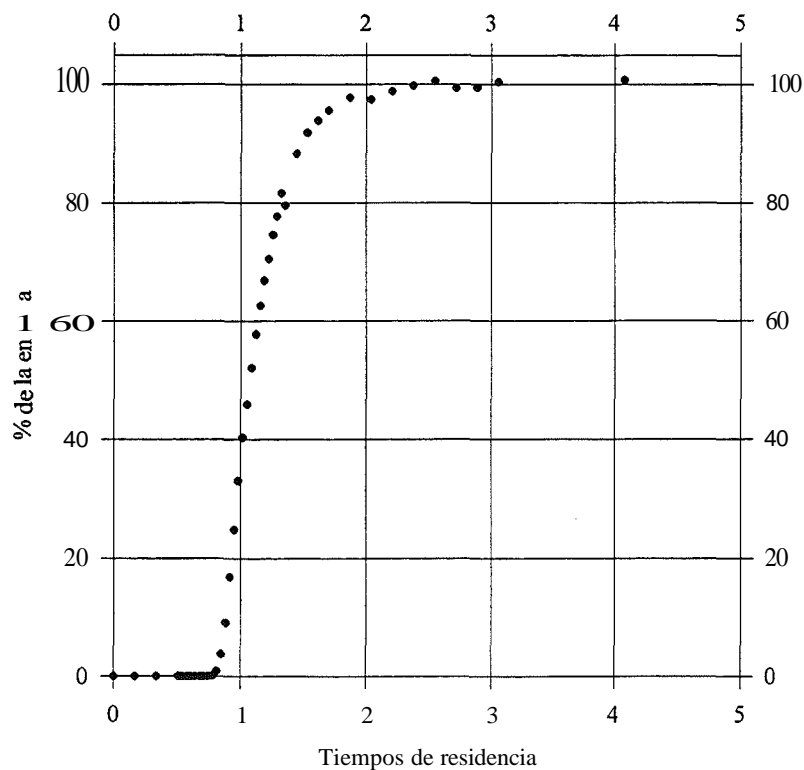


Fig. 4.8.12.: Representación de la DTR obtenida con la introducción de un escalón de propionato de *n*-butilo (125.7 mM) en el RCFP.

Como se observa en la figura 4.8.12 hay una cierta desviación de la idealidad pero en líneas generales, el comportamiento es el esperado según la figura 4.8.11. Una de las cosas que se debe hacer en este punto es un test de consistencia para corroborar el balance de materia del trazador, este balance vendría dado por la ecuación (9):

$$C_{\max} \cdot \tau_r = m \cdot V / Q_L^2 \quad (9)$$

Donde:

$$C_{\max} = 125.7 \text{ mM} = 0.0163 \text{ g trazador/ml (concentración másica de trazador)}$$

$$m = 0.0163 \text{ g trazador/ml} \cdot 0.17 \text{ ml/min} = 2.797 \cdot 10^{-3} \text{ g trazador /min (caudal másico de trazador)}$$

$$V = 10 \text{ ml (volumen de reactor)}$$

$$Q_L = 0.17 \text{ ml/min (caudal volumétrico total)}$$

τ_r es el tiempo de residencia real del reactor calculado como:

$$\tau_r = \frac{\int_0^{fC_{\max}} t dC}{\int_0^{fC_{\max}} dC} \quad (10)$$

para nuestro caso y resolviendo la integral numéricamente por el método de los trapecios:

$$\tau_r = 64.3 \text{ min}$$

con estos datos, ambos lados de la igualdad de la ecuación (9) resultan:

$$C_{\max} \cdot \tau_r = 1.05 \text{ g} \cdot \text{min/ml}$$

$$m \cdot V / Q_L^2 = 1.00 \text{ g} \cdot \text{min/ml}$$

con lo que el test de consistencia quedaba cerrado con un 5 % de error, en este tipo de sistemas y dado el error de análisis así como el error numérico en la determinación de la integral se puede dar por bueno y el tiempo de residencia real no está muy alejado del valor

teórico calculado para el tiempo de residencia hidráulico, en concreto, se trata de un 8 % de error.

Si se quisiera ver la respuesta del sistema a la introducción de un pulso se podría visualizar de dos formas diferentes, por un lado, realizar el experimento en sí, o teniendo en cuenta que la relación de respuestas entre escalón y pulso es una relación tipo **derivada↔integral**, mediante esta relación se puede construir la respuesta que tendría el sistema a un pulso calculando las derivadas numéricas para cada punto. Para que esto sea válido se necesita trabajar con las formas adimensionales del tiempo y de la concentración:

$$O = \frac{t}{T_r} \quad (11) \text{ tiempo adimensional}$$

$$Fe = \frac{Q_L}{m} \cdot C \quad (12) \text{ concentración adimensional}$$

Generando los datos de Fe y θ a partir de los datos experimentales se obtiene la figura 4.8.13.

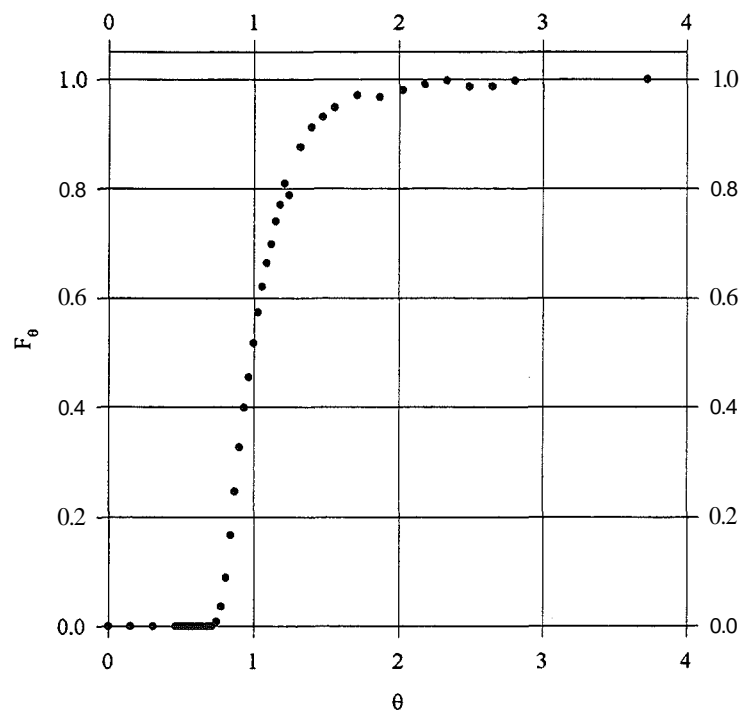


Fig. 4.8.13.: Representación adimensional y normalizada de la DTR, a partir de los datos de la figura 4.8.12 y mediante las ecuaciones (11) y (12).

Con esta nomenclatura si que se cumple que la derivada de F (concentración adimensional para la entrada en escalón) es E (concentración adimensional para la entrada en pulso), siendo E el equivalente de la concentración adimensional para una introducción de trazador en pulso. Para el cálculo de la derivada en un punto se utilizó la fórmula de 5 puntos ya que es la que originaba mejores resultados.

La expresión de la derivada con 5 puntos viene dada por la ecuación (13) (Yakowitz y Szidarovszky, 1989):

$$f'(x) = \frac{-2f(x+h) + 16f(x) - 18f(x-h) + 2f(x-2h)}{24h} \quad (13)$$

Los resultados se presentan en la figura 4.8.14.

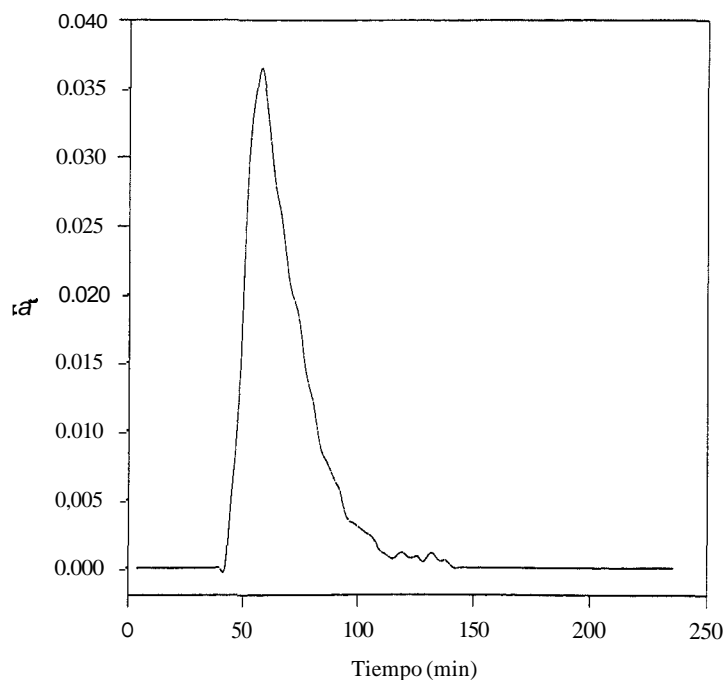


Fig. 4.8.14.: Obtención de la curva E a partir de la derivada de F de la figura 4.8.13.

De la figura 4.8.14 se puede ver como el RCFP presenta una dispersión axial no simétrica alrededor del tiempo de residencia. Uno de los modelos más ampliamente utilizados para describir este tipo de sistemas es el modelo de dispersión axial (Levenspiel, 1979). En este modelo se considera una dispersión axial del trazador por encima del flujo convectivo, las desviaciones con respecto a la idealidad se **cuantifican** mediante el modulo adimensional denominado número de Peclet:

$$Pe = \frac{uL}{D_z} \quad (14)$$

donde: u = velocidad del fluido en el reactor

L = longitud de reactor

DZ = coeficiente de dispersión axial

Como se puede ver, el número de Peclet refleja el cociente entre el valor del flujo convectivo y el de la dispersión axial, con lo cual es un buen valor para **cuantificar** la relación mezcla/dispersión, en el caso de un RCFP este valor tendría que ser infinito mientras que valores pequeños indicarían presencia de mezcla. En el caso presente, y al ser un sistema no simétrico, el cálculo del número de Peclet viene dado por la siguiente expresión (15):

$$\sigma^2 = 2\left(\frac{D_z}{uL}\right) - 2\left(\frac{D_z}{uL}\right)\left(1 - \exp\left(\frac{-uL}{D_z}\right)\right) \quad (15)$$

con:

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\tau^2}{\tau^2} \quad (16)$$

y:

$$\sigma^2 \approx \frac{\sum t_i^2 C_i}{\sum C_i} - \tau^2 \quad (17)$$

mediante los datos experimentales, se pueden calcular todos los valores:

$$\sigma^2 * 202$$

$$\sigma_{\theta}^2 = 0.046$$

$$\frac{D_z}{uL} = 0.0234 = \frac{1}{Pe}; \quad Pe = 43$$

Este valor es calificado por Levenspiel como dispersión "intermedia", que es el caso en el cual el flujo en pistón presenta una dispersión axial no simétrica pero de una magnitud no demasiado elevada.

Otro modelo usado habitualmente es el de tanques agitados en serie. Como su nombre indica se trata de describir el sistema real mediante una serie de tanques perfectamente agitados del mismo volumen, lógicamente, conforme avanza el número de tanques necesarios para describir el sistema, el comportamiento real más se asemeja al comportamiento de un RCFP. A partir de la ecuación del balance de materia para un RCTA se puede deducir la expresión de la concentración adimensional $E(\theta)$:

$$E(\theta) = \frac{N(N\theta)^{N-1}}{(N-1)!} \exp(-N\theta) \quad (18)$$

Probando para distintos valores de N se puede generar la figura 4.8.15.

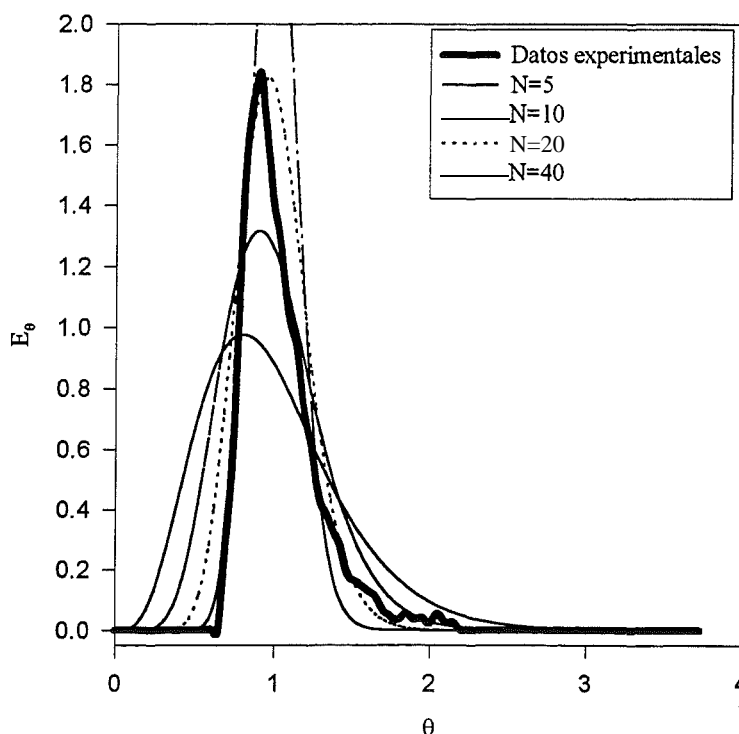


Fig. 4.8.15.: Modelización de los datos experimentales con el modelo de tanques agitados en serie para varios valores del número de tanques.

Como se observa en la figura 4.8.15 el modelo de tanques en serie también supone una buena aproximación a los valores experimentales para un número de tanques aproximadamente de veinte, el ajuste es de hecho bastante bueno y el elevado número de tanques necesarios para describir con ciertas garantías el sistema ya indica de nuevo que las desviaciones de la idealidad del RCFP no son excesivas.

En resumen, se puede decir que el sistema experimental desarrollado se comporta de forma satisfactoria en cuanto a la obtención de un producto con un exceso enantiomérico aceptable (comparando con los datos presentes en la bibliografía), la estabilidad del reactor es muy buena hasta donde se ha llegado a determinar y el único problema podría llegar a ser la acumulación de agua en el soporte enzimático. Además, la presunción de que el sistema se comportaba como un RCFP es correcta, habiéndose caracterizado el comportamiento del reactor mediante una DTR y propuesto distintos modelos de flujo no ideal para describirlo.

4.8.9. Conclusiones

Las conclusiones más destacables que se pueden extraer de este capítulo son las siguientes:

- Se ha diseñado un sistema en continuo para realizar la síntesis enantioselectiva de ibuprofeno mediante Lipozyme IM20.
- El sistema más efectivo para trabajar en continuo resultó ser el reactor continuo de flujo pistón, obteniéndose excesos enantioméricos del orden del 94 % y conversiones del 45 %, para el tiempo de residencia óptimo que se situó en torno a 55 min.
- El sistema probó ser estable hasta aproximadamente 100 tiempos de residencia.
- El agua formada en la reacción se encuentra mayoritariamente en el soporte de inmovilización aunque una parte se elimina en la salida acompañando al disolvente.
- La reutilización de la enzima ha sido probada hasta 4 veces sin observarse una disminución en la conversión y el exceso enantiomérico del producto.
- El estudio hidrodinámico del reactor mediante DTR demostró que el sistema se comportó como tal con cierta desviación axial no simétrica con un número de Peclet de 43 y un equivalente de tanques agitados en serie de 20.

- La metodología propuesta en el punto 4.8.1 ha demostrado ser una buena opción en el estudio de este tipo de reacciones para ver su posible aplicación en procesos en continuo.
- La realización de un diseño de experimentos fue un buen sistema de optimización de las condiciones de la reacción.
- La suposición de una cinética de primer orden originó unos resultados aceptables.

4.9. ESTUDIO DE LA ESTERIFICACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE *trans*-2-FENIL-1-CICLOHEXANOL CON LIPASAS UAB

4.9.1. Optimización de las condiciones de reacción

En este capítulo se llevó a cabo el estudio del funcionamiento de la reacción en continuo de esterificación del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol mediante lipasas UAB inmovilizadas sobre EP100. Este estudio se hizo siguiendo las líneas del capítulo 4.8 y utilizando la misma metodología.

En primer lugar, se pasó a determinar las condiciones óptimas de funcionamiento en discontinuo mediante un diseño de experimentos. En concreto, y aprovechando información ya conocida de nuestro sistema se fijaron los siguientes factores:

1. Disolvente: **isooctano**.
2. Temperatura: 42°C, óptima para la lipasa UAB (Gordillo, 1993).
3. Agitación: 250 rpm en orbital.
4. Contenido en agua: disolvente no saturado.
5. Carga **enzimática**: 10 mg/ml.
6. Volumen de reacción: 10 ml.
7. Agente **esterificante**: ácido propiónico, dado su buen comportamiento anterior con la lipasa UAB.

Con estos factores fijados, sólo quedaban por optimizar las concentraciones de ambos reactivos:

1. Concentración de *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol: de 10 a 50 mM (X_1).
2. Relación ácido/alcohol: de 0.5 a 2 (X_2).

En este caso, por tanto, si se eligen tres niveles para cada uno de los dos factores, se tienen que realizar $3^2 = 9$ experimentos. Para la elección de los niveles de los factores se eligió un diseño de experimentos de Box-Hunter rotatable (Box *et al.*, 1988). Según este modelo, los puntos se sitúan en los extremos y los puntos intermedios se determinan mediante una circunferencia de radio 1.41 (con valores normalizados). Este sistema asegura que la cantidad de información obtenida sea la misma al ser puntos equidistantes. El cálculo de los puntos experimentales se presenta en la figura 4.9.1.

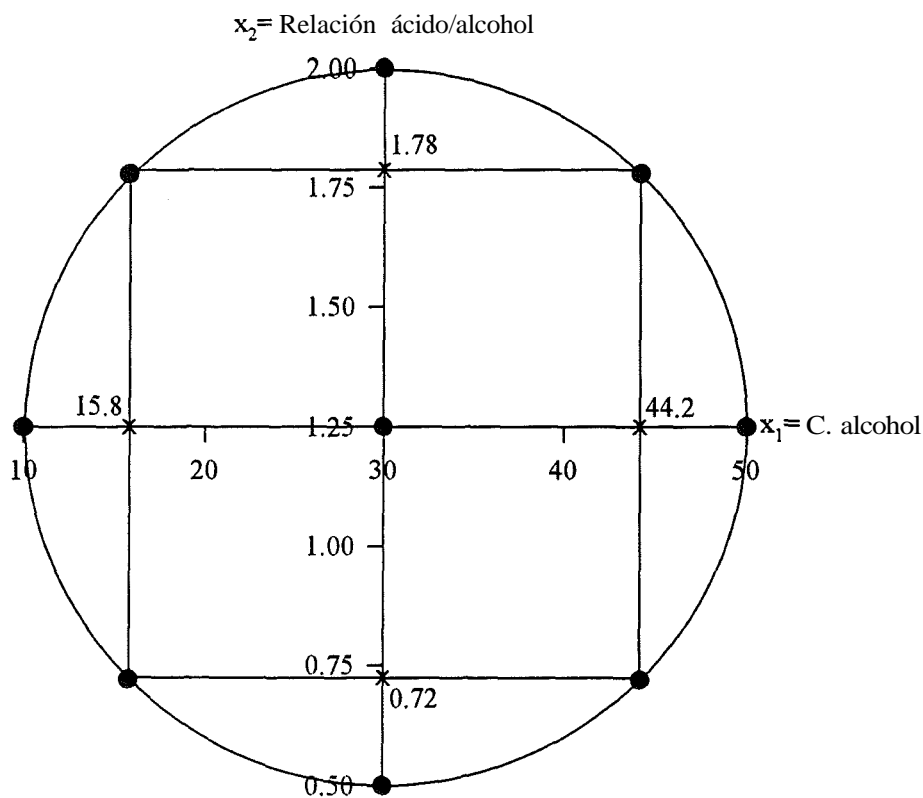


Fig. 4.9.1.: Distribución de los puntos experimentales según Box-Hunter.

De la fig. 4.9.1 se pueden calcular aquellos puntos en los cuales realizar los experimentos. En el punto central se eligió hacer 4 réplicas para comprobar la bondad del ajuste. Esto se recoge en la tabla 4.9.1. En este caso, la elevada enantioselectividad del proceso en todos los casos y condiciones hizo considerar como factores a optimizar la

conversión y el tiempo de reacción, o lo que es lo mismo, la velocidad inicial de reacción. Además, el enantiómero que no reaccionaba se consideró un inerte de la reacción.

Así pues, en este caso:

$$F_{obj} = r_0 = \frac{dC}{dt}(t=0) = C_0 \frac{dX}{dt}(t=0) \quad (mM/h) \quad (1)$$

siendo C la concentración del racémico.

Así pues, se descartó el valor del exceso enantiomérico puesto que en todos los casos y para todas las concentraciones probadas de reactivos la enantioselectividad podía considerarse total. Realizando los experimentos representados en la Figura 4.9.1 se obtiene la tabla 4.9.1.

X ₁ (mM)	X ₂	X ₁ (norm.)	X ₂ (norm.)	Réplica	a	b	r ₀ = F _{obj} (mM/h)
30	1.25	0	0	1	29.6	5.9	1.505
30	1.25	0	0	2	23.3	4.8	1.456
30	1.25	0	0	3	24.7	4.9	1.512
30	1.25	0	0	4	22.0	4.5	1.467
10	1.25	-1	0	1	46.1	5.1	0.904
50	1.25	1	0	1	19.7	4.6	2.141
30	2	0	1	1	21.6	4.8	1.350
30	0.5	0	-1	1	27.9	5.2	1.610
44.2	1.78	0.71	0.71	1	22.0	4.5	2.161
44.2	0.72	0.71	-0.71	1	20.6	4.6	1.979
15.8	1.78	-0.71	0.71	1	22.4	2.7	1.311
15.8	0.72	-0.71	-0.71	1	27.7	3.5	1.250

Tabla 4.9.1.: Resultados de la función objetivo para cada uno de los experimentos propuestos según Box-Hunter.

En la tabla 4.9.1 la velocidad inicial de reacción fue determinada de la siguiente forma: dado que era imposible experimentalmente tener datos en los puntos iniciales para todos los experimentos pues implicaría introducir en el sistema varias perturbaciones en poco tiempo, se tomaron muestras cada dos horas hasta un tiempo final de 8 horas. En este tiempo, la conversión ya alcanzaba valores donde no era posible aplicar el método de las velocidades

iniciales y la evolución de la conversión no era lineal con el tiempo. Sin embargo, la conversión se ajustaba perfectamente a una curva del tipo descrito por la ecuación (2):

$$X = \frac{at}{b+t} \quad (2)$$

derivando:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{ab}{(b+t)^2} \quad (3)$$

que para $t = 0$, resulta la ecuación (4):

$$r_0 = C_0 \frac{dX}{dt}(t=0) = C_0 \frac{a}{b} \quad (4)$$

Para tener una idea de la bondad del ajuste se representa en la figura 4.9.2. el ajuste correspondiente a las condiciones ($X_1=30$ mM, $X_2=1.25$, Réplica 1).

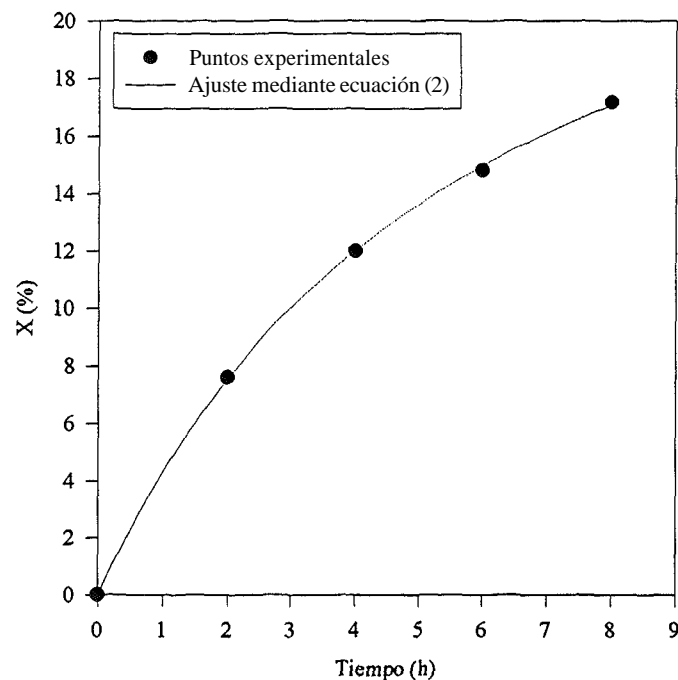


Fig. 4.9.2.: Ajuste de los puntos experimentales mediante la ecuación (2) para el experimento ($X_1=30$ mM, $X_2=1.25$, Réplica 1).

Por tanto, determinando para cada experimento el valor de a y b se obtenía una buena estimación de la velocidad inicial. Los valores de a y b se recogen también en la tabla 4.9.1.

Conocidos los valores de la función objetivo, se pasó a realizar el ajuste polinomial siguiendo los pasos del capítulo 4.8. La función objetivo que generó mejores resultados fue la expresada mediante la ecuación (5):

$$F_{\text{obj}} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1^2 + b_4X_2^2 + b_5X_1X_2 \quad (5)$$

Realizando el ajuste polinomial del diseño de experimentos se obtienen los siguientes resultados:

$$b_0 = 1.484$$

$$b_1 = 0.587$$

$$b_2 = 0.022$$

$$b_3 = 0.125$$

$$b_4 = -0.083$$

$$b_5 = 0.060$$

De los valores de b_i se observa que el parámetro más influyente en la velocidad de reacción es X_1 (concentración de fr$\text{m}\text{\\$}'\text{-2-fenil-1-ciclohexanol}$), ya que b_1 es el valor más elevado. Al ser $b_1 > 0$, la velocidad de reacción aumentará al aumentar X_1 , aunque no de forma lineal, ya que el término b_3 (correspondiente al término cuadrático de X_1) también tiene un valor significativo (y de nuevo es positivo). La dependencia de la función objetivo con X_2 es, por otro lado, mucho menor, siendo los parámetros b_2 (factor de X_2) y b_4 (factor de X_2^2) sensiblemente inferiores a los correspondientes a X_1 (b_1 y b_3). Además, al ser b_2 y b_4 de signo contrario, no se puede prever cualitativamente la influencia que tendrá X_2 sobre F_{obj} . El término cruzado $X_1 \cdot X_2$, representado por b_5 , también parece tener poco peso en el valor final de F_{obj} .

Aplicando el mismo tratamiento estadístico desarrollado en el apartado 4.8 se obtienen los siguientes parámetros estadísticos:

$$R^2 = 0.93$$

$$F_{1\text{exp}} = 15.1$$

$$F_{2\text{exp}} = 1.3$$

siendo para este caso y tomando $\alpha = 0.95$:

$$F_{1\text{tab}} = F_1(5,6) = 4.4$$

$$F_{2\text{tab}} = F_2(3,3) = 9.3$$

con lo que de nuevo $F_{1\text{exp}} > F_{1\text{tab}}$ y $F_{2\text{tab}} > F_{2\text{exp}}$, lo que junto con el buen valor de R^2 da validez a la función propuesta.

La optimización de la ecuación (5) con los valores de los coeficientes b_i obtenidos mediante el diseño de experimentos mediante un método *quasi-Newton* originó los siguientes resultados:

$$X_{1,\text{opt}} = 1.000$$

$$X_{2,\text{opt}} = 0.232$$

$$F_{\text{obj,opt}} = 2.201$$

Lo que significa que el valor de la concentración óptima de *trans-2-fenil-1-ciclohexanol* es de 50 mM y que la relación de ácido propiónico es de 1.42 moles de ácido propiónico/mol de *trans-2-fenil-1-ciclohexanol*, o una concentración de ácido propiónico de 71.2 mM.

Los valores de la función descrita en la ecuación (5) se pueden ver en la figura 4.9.3a para un ajuste tridimensional y en la figura 4.9.3b para un ajuste en forma de curvas de nivel.

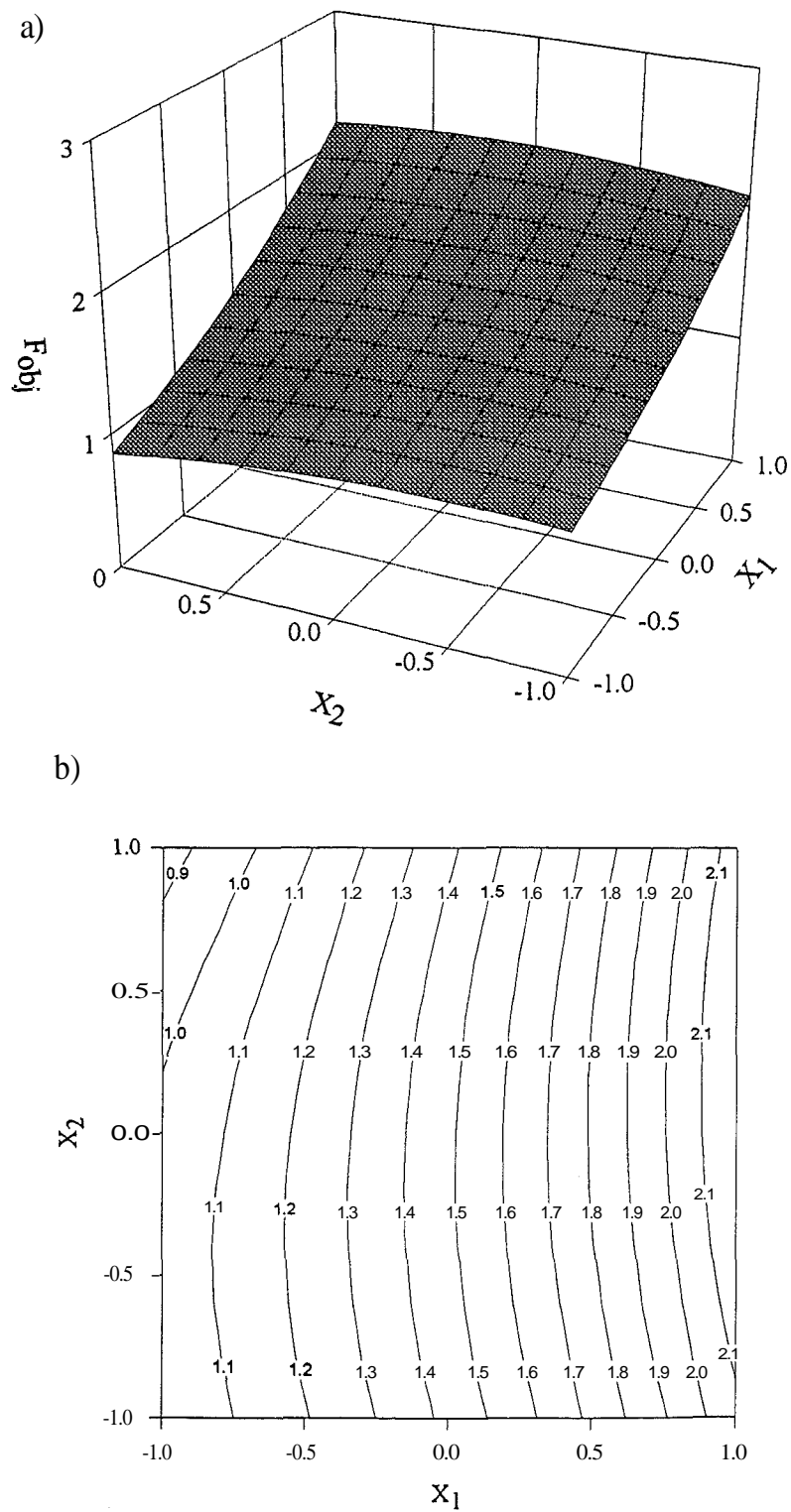


Fig. 4.9.3a/b: Representación gráfica de la ecuación (5): a) tridimensional, b) curvas de nivel.

En la figura 4.9.3. se confirma lo deducido anteriormente a partir de los valores de b_j , es decir, el factor determinante en la velocidad inicial de reacción es X_1 , la concentración inicial de *trans*-2-fenil-ciclohexanol, mientras que la concentración de ácido propiónico (X_2) tiene un efecto muy suave en el valor de la velocidad inicial.

4.9.2. Determinación de la cinética en el óptimo

Una vez conocidas las condiciones de reacción óptimas, y siguiendo la metodología propuesta en el apartado 4.8, se pasó a realizar la determinación de una cinética que ajustara correctamente los valores experimentales correspondientes al óptimo. Con esta cinética se pasaría a desarrollar el sistema de reacción en continuo más conveniente.

En esta cinética se tomaron como hipótesis iniciales que, dada la elevada enantioselectividad de la reacción, sólo se esterificaba el enantiómero 1R,2S-(-)-*trans*-2-fenil-1-ciclohexanol, la concentración C_A se refería a la concentración de este enantiómero y la conversión X_A también se refería a la del enantiómero y no a la del racémico (X). Para esta hipótesis se verificaba que $X_A = 2X$.

En este caso, cinéticas de orden sencillo no originaron buenos ajustes. En concreto ajustando los datos experimentales para las condiciones óptimas a valores de orden de reacción 1 y 2 no producían unos ajustes satisfactorios como puede observarse en la tabla 4.9.2.

Orden respecto a <i>trans</i> -2-fenil-ciclohexanol	Orden respecto a ácido propiónico	Cinética	Ajuste (r)
1	0	kC_A	0.938
1	1	$KC_A C_B$	0.945
2	0	kC_A^2	0.957
2	1	$KC_A^2 C_B$	0.926
2	2	$KC_A^2 C_B^2$	0.972

Tabla 4.9.2.: Calidad del ajuste para las distintas cinéticas simples consideradas.

Ante la posibilidad de probar cinéticas más complejas y dado que se tenía un buen ajuste de la conversión con respecto al tiempo mediante la ecuación (2) se decidió trabajar con una tabla de valores donde la velocidad de reacción se podía calcular a partir del tiempo y relacionar mediante la ecuación de diseño del reactor con la conversión. Los resultados obtenidos para las condiciones óptimas de reacción se muestran en la figura 4.9.4.

En la figura 4.9.4 se observa como se tiene un ajuste muy bueno de la conversión con respecto al tiempo y, en consecuencia, un buen ajuste de la velocidad de reacción con respecto a la conversión, que es lo necesario para el diseño del reactor en continuo.

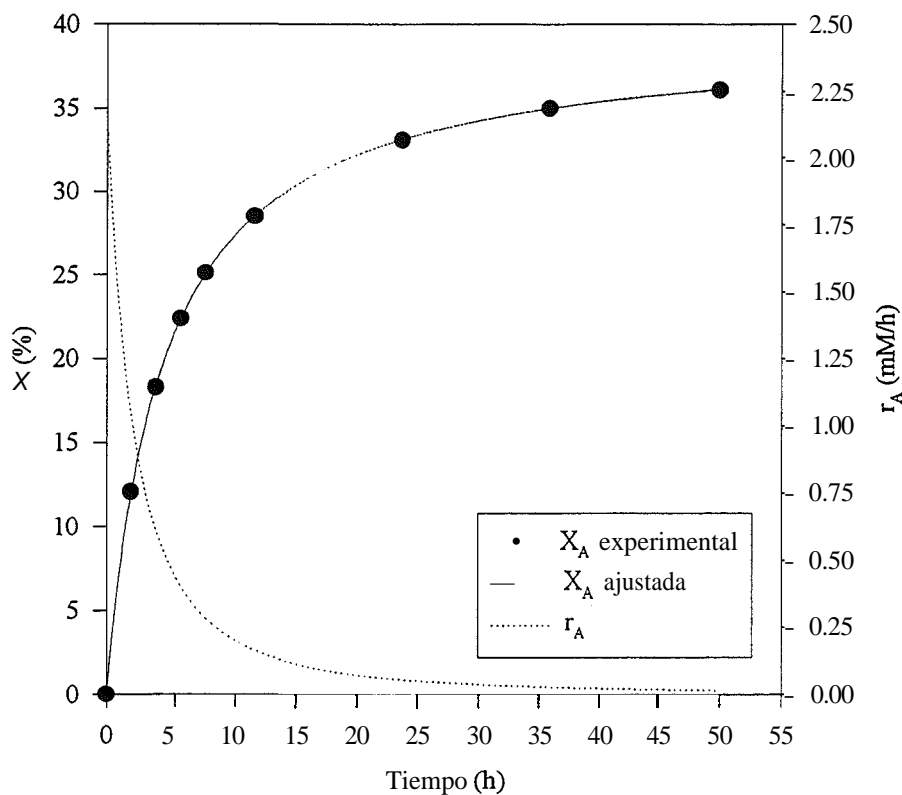


Fig. 4.9.4.: Determinación experimental de la velocidad de reacción mediante el ajuste proporcionado por la ecuación (2) para las condiciones óptimas de reacción.

Otro factor a destacar es el hecho que para estas condiciones y según se observa en la figura 4.9.4, el valor máximo de la conversión se sitúa en torno al 40 %. Este valor límite

podría ser debido a alcanzar el equilibrio químico o por la aparición de inhibición por producto, en todo caso, este aspecto tendrá que verse confirmado en el reactor en continuo.

4.9.3. Elección del tipo de reactor

Conocida la cinética experimental, mediante la figura 4.9.3 se pasó a determinar que configuración sería la más apropiada en términos de conversión para llevar a cabo la reacción en continuo.

Las ecuaciones que permitían calcular el tiempo de residencia para las dos configuraciones de reactor en continuo, RCTA y RCFP fueron presentadas en el capítulo 4.8.5.

Para un RCTA:

$$\tau = \frac{V}{Q_L} = C_{A0} \frac{X_A}{r} \quad (6)$$

Para un RCFP:

$$\tau = \frac{V}{Q_L} = C_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dx}{r} \quad (7)$$

La resolución de la ecuación (7) fijando una conversión pasará por la resolución de una integral numérica con los valores de la figura 4.9.4. En la tabla 4.9.3 se presentan los valores del tiempo de residencia teórico necesario para obtener unas conversiones fijadas.

X _A	r(X _A)	τ _{RCTA} (h)	Integral (7)	τ _{RCFP} (h)
0.10	1.198	2.08	0.064	1.60
0.20	0.523	9.56	0.188	4.70
0.30	0.123	60.8	0.584	14.6
0.35	0.027	324	1.448	36.2

Tabla 4.9.3.: Valores teóricos del tiempo de residencia para un RCFP y un RCTA para distintas conversiones.

Como se observa en la tabla 4.9.3 el tiempo de residencia para el RCFP es menor que en el caso del RCTA, aumentando la diferencia entre ambos a conversiones más elevadas.

4.9.4. Funcionamiento del RCFP

El RCFP era la mejor alternativa para realizar la reacción en continuo. Por ello, se preparó de nuevo el RCFP utilizado en el capítulo 4.8 para utilizarlo en esta **esterificación**.

Para este sistema:

Volumen de reactor = 14.3 ml

Peso catalizador = 1.95 g

Volumen catalizador = 6.1 ml (densidad EP100: 0.32 g/l)

Volumen libre = 14.3 ml - 6.1 ml = 8.2 ml

Carga **enzimática** en el reactor = 1.95 g/8.2 ml = 240 mg catalizador/mi reactor

En los experimentos en discontinuo la carga enzimática era de 10 mg/ml, con lo cual la velocidad de reacción tendría que ser del orden de 24 veces mayor en el caso del RCFP, con lo que el tiempo de residencia previsto en el caso de la tabla 4.3.9 también sería 24 veces menor. Estos resultados previstos se recogen en la tabla 4.9.4.

XA	$\tau_{\text{RCFP}}^{\text{previsto}}$ (h)	$\tau_{\text{RCFP}}^{\text{real}}$ (min)	QL(ml/min)
0.10	1.60	4	2.05
0.20	4.70	12	0.68
0.30	14.6	37	0.22
0.35	36.2	91	0.09

Tabla 4.9.4.: Tiempos de residencia previstos para el RCFP considerando la carga enzimática presente en el reactor.

Con estos valores se montó el reactor y trabajando para los **caudales** de la tabla 4.9.4 y para caudales más bajos se determinó la conversión en los diferentes estados estacionarios. Los resultados se presentan en la figura 4.9.5.

Como hechos importantes que se observan en la figura 4.9.5 se pueden destacar que para tiempos de residencia elevados se superaron las conversiones previstas (> 40 %) por los experimentos en discontinuo, lo cual descartaba que se tratara de un problema de equilibrio químico.

Por otro lado, hay que señalar que la enantioselectividad se mantuvo para todas las condiciones en valores superiores a 200, lo que implicaba que en ningún momento se esterificaba el enantiómero que 1S,2R-(-)-*trans*-2-fenil-1-ciclohexanol, al contrario de lo que ocurría en el caso del ibuprofeno con Lipozyme IM20.

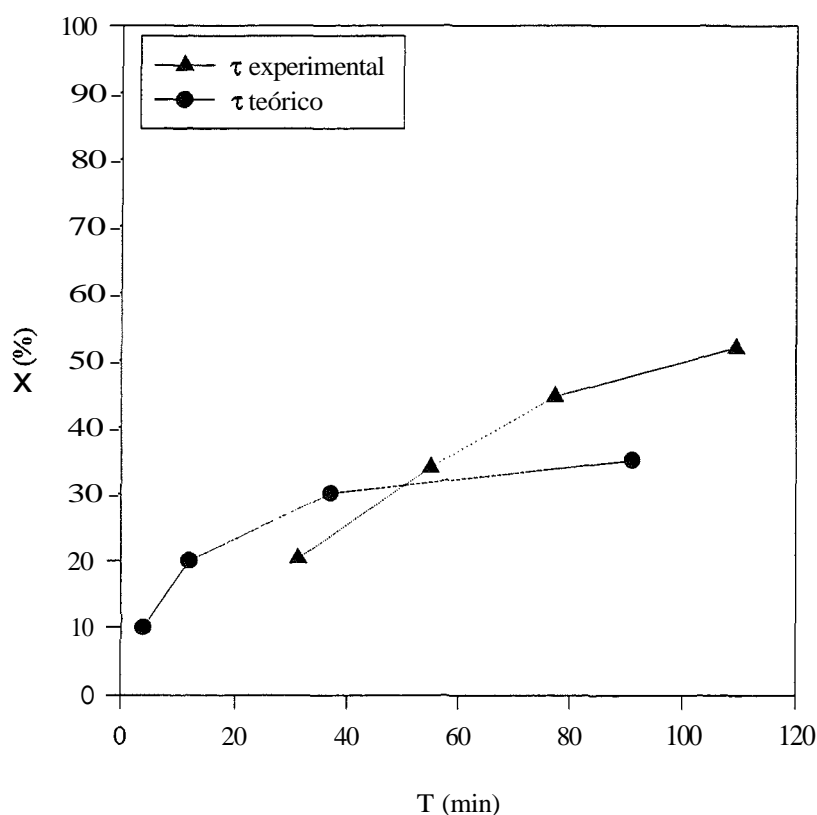


Fig. 4.9.5.: Comparación entre las conversiones obtenidas experimentalmente y las previstas teóricamente para el RCFP.

4.9.5. Conclusiones

Como conclusiones a este capítulo podemos destacar:

- La lipasa **UAB** inmovilizada sobre **EP100** demostraron ser un catalizador que producía unos excelentes resultados en la **esterificación** enantioselectiva del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol.
- El sistema en continuo demostró ser mejor que el sistema en discontinuo dado que los problemas de inhibición por producto quedan minimizados.
- De nuevo, la metodología propuesta para el diseño en continuo del reactor **enzimático** demostró ser una buena alternativa.
- El diseño de experimentos mediante el método de Box-Hunter supone una buena alternativa al diseño factorial empleado en el capítulo 4.8.
- No es necesario conocer una expresión explícita de la velocidad de reacción para proponer un diseño aproximado del RCFP.
- En las dos reacciones estudiadas con profundidad el RCFP demostró ser una mejor alternativa que el RCTA.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De la presente memoria, además de las conclusiones parciales de cada uno de apartados del capítulo 4, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha conseguido un sistema integrado de fermentación y purificación donde se tienen caracterizadas las condiciones necesarias para obtener una enzima que se puede aplicar a reacciones de interés.
2. En el campo de la fermentación, se desarrolló una ley de adsorción basada en la ley de **Langmuir** que describía el proceso de adsorción de las lipasas sobre el ácido oleico.
3. Se ha desarrollado una secuencia de separación para la obtención de la enzima en estado sólido a partir del medio de fermentación con una recuperación superior al 90 % en la actividad lipolítica.
4. Se ha demostrado la viabilidad económica del proceso de producción de lipasas de *Candida rugosa* por vía fermentativa usando ácido oleico como sustrato.
5. Se han identificado las distintas proteínas que componen la lipasa **UAB**, encontrándose dos isoenzimas de lipasas correspondientes a los genes Lip2 y Lip3 y dos proteínas de naturaleza esterásica para las que se ha desarrollado un protocolo de **purificación**.
6. Se ha utilizado la lipasa UAB en la síntesis de ésteres no quirales del ácido propiónico en medio orgánico, obteniéndose resultados comparables e incluso superiores a los obtenidos con lipasas comerciales de *Candida rugosa* de Sigma y Amano.
7. Se han probado diferentes protocolos de inmovilización de la lipasa UAB sobre distintos soportes, resultando como mejor opción el EP100. La lipasa UAB sobre este soporte produjo resultados comparables a la lipasa comercial de *Rhizomucor miehei* Lipozyme® **IM20** de Novo Nordisk.

8. Se han puesto a punto las técnicas numéricas de optimización de las condiciones de reacción en discontinuo mediante diseño de experimentos para después aplicarlas al reactor en continuo.
9. Se han puesto a punto los métodos analíticos necesarios para el seguimiento de reacciones en medio orgánico, tanto para productos quirales como no quirales.
10. Se ha utilizado la lipasa **UAB** inmovilizada sobre EP100 en la resolución de compuestos quirales, originando excelentes resultados de enantioselectividad en la **esterificación** de ibuprofeno, ácido 2-fenil propiónico y *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol.
11. Se ha diseñado un reactor **enzimático** que permite la esterificación enantioselectiva de compuestos de interés en medio orgánico. Este reactor de lecho fijo generó excelentes resultados en la resolución del *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol con lipasa UAB de *Candida rugosa* inmovilizada sobre **EP100** y en la resolución de ibuprofeno con Lipozyme® **IM20**.
12. Se ha estudiado el modelo de flujo de reactor de lecho fijo, correspondiendo a un flujo pistón con cierta dispersión axial no simétrica, determinándose el número de Peclet. El modelo de tanques agitados en serie también produce una buena descripción del sistema.

En resumen, se ha conseguido, mediante técnicas de Ingeniería Bioquímica, un biocatalizador de eficacia superior a los comerciales en la resolución de compuestos quirales.

6. NOMENCLATURA

6. NOMENCLATURA

% G	porcentaje de glicosilación
0	tiempo adimensional
T	tiempo de residencia (min)
τ_h	tiempo de residencia hidráulico (min)
A	área interfacial (m^2)
C	concentración de trazador a la salida del reactor (mM)
C	importe de la partida de costes
C _e	concentración adimensional
C _A	concentración de substrato quiral (mM)
C _B	concentración de agente esterificante no quiral (mM)
C _{max}	concentración máxima de trazador a la salida del reactor (mM)
DTR	distribución de tiempo de residencia
D _z	coeficiente de dispersión axial (min/cm^2)
E	enantioselectividad ("enantiomeric ratio")
E _(θ)	concentración de trazador adimensional para entrada de trazador en impulso
EE _(exp)	exceso enantiomérico referido a substrato
F _(θ)	concentración de trazador adimensional para entrada de trazador en escalón
G	importe de la partida de gastos generales
I	importe de la partida de inmovilizado
K	constante de proporcionalidad en la ley lineal (m^{-2})
k	constante de velocidad (h^{-1} o min^{-1})
K'	constante de proporcionalidad en la ecuación del área interfacial (m^2)
K ₁	constante de saturación máxima en la ley de Langmuir
K ₃	constante de equilibrio en la ley de Langmuir (ml/U)
K ₄	constante de equilibrio en la ley de BET (ml/U)
K' _d	constante de saturación (g/l)
K _d	constante de saturación máxima en la ley lineal
L	actividad lipolítica (U/ml)

L	longitud del reactor (cm)
Lip _{aq}	actividad lipolítica acuosa (U/ml)
Lip _{org}	actividad lipolítica adsorbida en la fase orgánica (U/ml)
Lip _{tot}	actividad lipolítica extracelular total (U/ml)
m	caudal de trazador para entrada de trazador en escalón (g/min)
M	importe de la partida de costes de fabricación
M	masa total de trazador para entrada de trazador en impulso (g)
N	número de tanques agitados en el modelo de tanques en serie
P	pureza enantiomérica
Pe	número de Peclet
q	caudal de adición constante de ácido oleico en operación fed-batch (g/(l·h))
QL, v	caudal de líquido (ml/min)
R	importe de la partida de valor residual
r	velocidad de reacción (mmol éster/(lh))
r ₀	velocidad inicial de síntesis (μmol éster/(hU))
S	concentración de ácido oleico (g/l)
S ₁	% de sulfato amónico (respecto a saturación) inicial en la precipitación
S ₂	% de sulfato amónico (respecto a saturación) final en la precipitación
T	temperatura (°C)
t	tiempo (min)
\bar{t} , τ_r	tiempo de residencia real calculado mediante DTR (min)
u	velocidad del fluido dentro del reactor (cm/min)
V	importe de la partida de ventas
V	volumen del reactor (ml)
X	concentración de biomasa en peso seco (g/l)
X	conversión total
X	importe de la partida de maquinaria y aparatos
X _A	conversión referida al enantiómero esterificado preferentemente
Y	capital físico
Z	capital directo

7. BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

7.1. Referencias

- Adams, S.S., Bresloff, P. and Mason, G.C. 1976. Pharmacological difference between the optical isomers of ibuprofen: Evidence for metabolic inversion of the (-) isomer. *J. Pharm. Pharmacol.* 28, 156-157.
- Adhirai, M. and Selvam, R. 1998. Renal calcium oxalate binding protein: studies on its properties. *Kidney International.* 53, 1, 125-129.
- Alfonzo, J.D., Sahota, A. and Taylor, M.W. 1997. Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1341, 2, 173-182.
- Allenmark, S. and Ohlsson, A. 1992. Studies of the heterogeneity of a *Candida cylindracea* (*rugosa*) lipase: Monitoring of esterolytic activity and enantioselectivity by chiral liquid chromatography. *Biocatalysis.* 6, 211-221.
- Andersson, M., Ramberg, M. and Johansson, B.L. 1998. The influence of the degree of cross-linking, type of ligand and support on the chemical stability of chromatography media intended for protein purification. *Proc. Biochem.* 33, 1, 47-55.
- Arica, M.Y., Alaeddinoglu, N.G. and Hasirci, V. 1998. Immobilization of glucoamylase onto activated Phema/egdma microspheres: properties and application to a packed-bed reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 3, 152-157.
- Arien, E.J. 1986. Stereochemistry. A source of problems in medical chemistry. *Med. Res. Rev.* 6, 451-466.
- Arroyo, M. and Sinisterra, J.V. 1994. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from *Candida antárctica*: A mechanistic approach. *J. Org. Chem.* 59, 4410-4417.
- Arroyo, R., Sánchez-Muñiz, F.J., Cuesta, C., Burguillo, F.J. and Sánchez-Montero, J.M. 1996. Hydrolysis of used frying palm olein and sunflower oil catalyzed by porcine pancreatic lipase. *Lipids.* 31, 11, 1133-1139.
- Ayers, T.A., Schnettler, R.A., Marciniak, G., Stewart, K.T., Mishra, R.K., Krysan, D.J., Bernas, B.R., Bhardwaj, P. and Fevig, T.L. 1997. Enzymatic resolution for an improved enantioselectivity synthesis of benzofuranyl derivatives: precursors to a class of vitamin E related antioxidants. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 1, 45-55.
- Bagi, K., Simon, L.M. and Szajani, B. 1997. Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 7, 531-535.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. 1st Edition. McGraw-Hill, New York.

- Balcao, V.M., Viera, M.C. and Malcata, F.X. 1996a. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. *Biotechnol. Prog.* **12**, 164-172.
- Balcao, V.M., Paiva, A.L. and Malcata, F.X. 1996b. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 392-416.
- Bando, T., Namba, Y. and Shishido, K. 1997. Lipase-mediated asymmetric construction of 2-arylpropionic acids: enantiocontrolled syntheses of S-naproxen and S-ibuprofen. *Tetrahedron: Asymmetry.* **8**, 13, 2159-2165.
- Basavaiah, D. and Rao, P.D. 1994. Enzymatic resolution of *trans*-2-arylcylohexan-1-ols using crude chicken liver esterase (CCLE) as biocatalyst. *Tetrahedron: Asymmetry.* **5**, 223-234.
- Basri, M., Yunus, W.M.Z.W., Yoong, W.S., Ampón, K., Razak, C.N.A. and Salleh, A.B. 1996. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **66**, 169-173.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J. and Guisan, J.M. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 5, 486-493.
- Battistel, E., Bianchi, D., Cesti, P. and Pina, C. 1991. Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 659-664.
- Belter, P.A., Cussler, E.L. and Hu, W.S. 1988. *Bioseparations, Downstream Processing for Biotechnology.* 1st Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bianchi, D., Golini, P., Bortolo, R., Battistel, E., Tassinari, R. and Cesti, P. 1997. Immobilization of glutaryl-7-ACA acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 5, 368-372.
- Borgström, B. and Brockman, H.L.A. 1984. *Lipases.* 1st Edition. Elsevier, New York.
- Botta, M., Cernia, E., Corelli, F., Manetti, F. and Soro, S. 1997. Probing the substrate specificity for lipases. II: Kinetic and modelling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1337**, 2, 302-310.
- Bourg-Garros, S., Razafindramboa, N. and Pavia, A.A. 1998. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent-free medium. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 4, 240-245.
- Bouvrette, P., Male, K.B., Luong, J.H.T. and Gibbs, B.F. 1997. Amperometric biosensor for diamine using diamine oxidase purified from porcine kidney. *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 1, 32-38.
- Bouwer, S.T., Cuperus, F.P. and Derksen, J.T.P. 1997. The performance of enzyme-membrane reactors with immobilized lipase. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 4, 291-296.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. 1988. *Estadística para investigadores.* 1^a Edición. Reverte, Barcelona.

- Brahimi-Horn, M.C., Guglielmino, M.L., Elling, L. and Sparrow, L.G. 1990. The esterase profile of a lipase from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1042**, 51-54.
- Breccia, J.D., Sineriz, F., Baigori, M.D., Castro, G.R. and Hatti-Kaul, R. 1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 1, 42-49.
- Brunauer, S., Emmet, P.H. and Teller, E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 390.
- Brink, L.E.S., Tramper, J., Luyben, K. and Van't Riet, K. 1988. Biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 736-743.
- Brocca, S., Schmidt-Dannert, C., Lotti, M., Alberghina, L. and Schmid, R.D. 1998. Design, total synthesis and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science. Inpress.*
- Brzozowski, A.M., Derewenda, U., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bjorkling, F., Høge-Jensen, B., Patkar, S.A., and Thim, L. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature.* **351**, 491-494.
- Cai, C., Xue, K., Zhou, Y. and Hui, Y. 1997. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode. *Talanta.* **44**, 3, 339-347.
- Cai, Y.J., Buswell, J.A. and Chang, S.T. 1998. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvarellavolvacea*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 2, 122-129.
- Cambou, B. and Klivanov, A.M. 1984. Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2687-2697.
- Capellas, M., Benaiges, M.D., Caminal, G., González, G., López-Santín, J., Clapés, P. 1996. Influence of water activity and support material on the enzymatic synthesis of a CCK-8 tripeptide fragment. *Biocatal. Biotransfor.* **13**, 165-178.
- Carpenter, B.E., Hunt, I.R. and Keay, B.A. 1996. A short efficient preparation of (+) and (-)-*trans*-2-phenylcyclohexanol. *Tetrahedron: Asymmetry.* **7**, 11, 3107-3198.
- Carrea, G., Ottolina, G. and Riva, S. 1995. Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotech.* **13**, 63-70.
- Chamorro, S., Sánchez-Montero, J.M., Alcántara, A.R. and Sinisterra, J.V. 1998. Treatment of *Candida rugosa* lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities. *Biotechnol. Lett.* **20**, 5, 499-505.
- Chang, R.C., Chou, S.J. and Shaw, J.F. 1994. Multiple forms and functions of *Candida rugosa* lipase. *Appl. Biotechnol Biochem.* **19**, 93-97.
- Chang, C. and Tsai, S. 1997. A facile enzymatic process for the preparation of (S)-Naproxen ester prodrug in organic solvents. *Enzyme Microb, Technol.* **20**, 8, 635-639.

- Charton, E. and Macrae, A.R. 1993. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC 335426 lipases A y B in hydrolysis and ester synthesis in organic solvents. *Enzyme Microb Technol.* 15, 489-493.
- Chellapandian, M. 1998. Preparation and characterization of alkaline protease immobilized on vermiculite. *Proc. Biochem.* 33, 2, 169-173.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. and Sih, C.J. 1982. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 7294-7299.
- Chen, P., Wu, S. and Wang, K. 1993. Double enantioselective esterification of racemic acids and alcohols by lipase from *Candida cylindracea*. *Biotechnol. Lett.* 15, 2, 181-184.
- Chen, J., Shimura, S., Kirimura, K. and Usami, S. 1994. Purification of extracellular Upases from *Trichosporum fermentan*. WU-C12. *J. Ferment. Bioeng.* 77, 5, 548-550.
- Chen, H., Hsu, M. and Jiang, S. 1997a. Purification and characterization of an exo-N,N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 3, 191-197.
- Chen, J. and Wang, J. 1997b. Wax ester synthesis by lipase-catalyzed esterification with fungal cells immobilized on cellulose biomass support particles. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 8, 615-622.
- Chiou, A.J., Wu, S.H. and Wang, K.T. 1992. Enantioselective hydrolysis of hydrophobic amino acid derivatives by Upases. *Biotechnol. Lett.* 14, 6, 461-464.
- Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P. and Willemot, R.M. 1990. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in hexane. *FEBS Lett.* 276, 181-184.
- Cirigliano, M. C. and Carman G.M. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
- Cirigliano, M. C. and Carman G.M. 1985. Purification and characterization of a Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 846-850.
- Coligan, J.E., Dunn, B.M., Ploegh, H.L., Speicher, D.W. and Wingfield, P.T. 1995. Current Protocols in Protein Science, 2 Volume Set. 1st Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Compagnone, D. and Guilbault, G.G. 1997. Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP. *Anal. Chim. Acta.* 340, 1, 109-113.
- Dalmau, E., Sánchez, A, Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente, F.J. and Casas, C. 1998. Study of the drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. *J. Biotechnol.* 59, 3, 183-192.
- Danieli, B., Lesma, G., Luisetti, M. and Riva, S. 1997. *Candida antártica* Lipase B catalyzes the regioselective esterification of ecdysteroids at the C-2 OH. *Tetrahedron.* 53, 16, 5855-5862.
- Davies, E.F. and Avery, G.S. 1971. Ibuprofen: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in rheumatic disorders. *Drugs.* 2, 416-446.

- De Castro, M.S. and Gago, J.V.S. 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral amides. A systematic study of the variables that control the synthesis. *Tetrahedron*. 54, 12, 2877-2892.
- De la Casa, R.M., Sánchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. 1996. Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preoperative esterification. *Biotechnol. Lett.* 18, 1, 13-18.
- Deane, E.E., Whipps, J.M., Lynch, J.M. and Peberdy, J.F. 1998. The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1383, 1, 101-110.
- Del Río, J.L., Serra, P., Valero, F., Poch, M. and Solà, C. 1990. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. *Biotechnol. Lett.* 12, 11, 835-838.
- Del Río, J.L. 1991. Estudios sobre el proceso de producción de lipasas por *Candida rugosa*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Deutscher, M. P. 1988. Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology, Vol. 182. 1st Edition. Academic Press Inc., San Diego.
- Diczfalusy, M.A. and Alexson, S.E.H. 1996. Isolation and characterization of novel long-chain acyl-CoA thioesterase/carboxylesterase isoenzymes from *Candida rugosa*. *Archiv. Biochem. Biophys.* 334, 104-112.
- Diczfalusy, M.A., Hellman, U. and Alexson, S.E.H. 1997. Isolation of carboxylester lipase (CEL) isoenzymes from *Candida rugosa* and identification of the corresponding genes. *Archiv. Biochem. Biophys.* 348, 1-8.
- Dinella, C., Stagni, A. and Lanzarini, G. 1997. Pectolytic enzymes co-immobilization on γ -alumina spheres via organophosphate compounds. *Proc. Biochem.* 32, 8, 715-722.
- Dordick, J.S. 1991. Non-aqueous enzymology. *Curr. Op. Biotechnol.* 2, 3, 401-407.
- Ducharme, J. and Farinotti, R. 1997. Rapid and simple method to determine chloroquine its desethylated metabolites in human microsomes by high-performance liquid chromatography fluorescence detection. *J. Chrom.* 698, 1, 243-250.
- Ducret, A, Trani, M. and Lortie, R. 1998. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled activity. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 4, 212-216.
- Dudal, Y. and Lortie, R. 1995. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucormiehei* lipase. *Biotechnol Bioeng.* 45, 129-134.
- Ergan, F. and Trani, M. 1991. Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. *Biotechnol. Lett.* 13, 1, 19-24.
- Fadel, A. and Arzel, P. 1997. Asymmetric construction of benzylic quaternary carbons by lipase-mediated enantioselective transesterification of prochiral α,α -disubstituted 1,3-propanediols. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 2, 283-291.

- Fadnavis, N.W. and Koteshwar, K. 1997. Remote control of stereoselectivity: lipase catalyzed enantioselective **esterification** of racemic α -lipoic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*. 8, 2, 337-339.
- Ferdersel, H.J. 1993. Drug **chirality-scale-up**, manufacturing, and control. *CHEMTECH*. 24-33.
- Ferreira-Dias, S. and Da Fonseca, M.M.R. 1995. Glycerolysis of olive oil: batch operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in hydrophilic polyurethane foams. *Bioproc. Eng.* 13, 311-315.
- Fishman, A. and Zviely, M. 1998. Chemo-enzymatic synthesis of (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl alcohol. *Tetrahedron: Asymmetry*. 9, 1, 107-118.
- Forro, E., Lundell, K., Fulop, F. and Kanerva, L.T. 1997. Preparation of the stereoisomers of 2-cyanocycloalkanols by lipase-catalysed acylation. *Tetrahedron: Asymmetry*. 8, 18, 3095-3099.
- Fung, Y.S. and Lau, K.M. 1998a. Development and validation of analytical methodology using capillary electrophoresis for separation and determination of anions in rainwater. *Talanta*. 45, 4, 641-656.
- Fung, Y.S., Lau, K.M. and Tung, H.S. 1998b. Analysis of leachable and total trace metals in air particulate matters by capillary electrophoresis. *Talanta*. 45, 4, 619-629.
- Fureby, A.M., Tian, L., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. 1997. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 3, 198-206.
- Furutani, T., Ooshima, H. and Kato, J. 1997. Preparation of N,O-diacyl thanolamine from N-acyl ethanolamine using lipase preparations. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 214-220.
- Fusetti, F., Brocea, S., Porro, D. and Lotti, M. 1996. Effect of the leader sequence on the expression of recombinant *C. rugosa* lipase by *S. cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* 18, 281-286.
- Gandhi, N., Sawant, S.B. and Joshi, J.B. 1995. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 1-12.
- Garcia, M., Del Campo, C., Llama, E.F., Sánchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. 1993. Chemoenzymatic synthesis of pure enantiomeric 2-aryl propionic acids. *Tetrahedron*. 49, 8433-8440.
- Gargouri, Y., Chahinian, H., Moreau, H., Ransac, S. and Verger, R. 1991. Inactivation of pancreatic and gastric lipases by THL and C12:0-TNB: a kinetic study with emulsified tributyrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1085, 3, 322-328.
- Gargouri, M. and Legoy, M.D. 1997. Bioenzymatic reaction for hydroperoxide production in a multiphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 79-84.
- Gatfield, I.L. 1984. The enzymatic synthesis of esters in non-aqueous systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 434, 569-572.

- Geluk, M.A., Norde, W., Van Kalsbeek, H.K.A.I. and Van't Riet, K. 1992. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 748-754.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. 1st edition. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Gil, N., Bosch, M.P. and Guerrero, A. 1997. Chemoenzymatic synthesis of (*R*)-(+)- α -(4-fluorophenyl)-4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinebutanol and (*R*)-(+)- α -(4-fluorophenyl)-4-methyl-1-piperazinebutanol as potential antipsychotic agents. *Tetrahedron.* 53, 44, 15115-15122.
- Gillies, B., Yanazaki, H. and Armstrong, D.W. 1987. Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotechnol. Lett.* 9, 10, 709-714.
- Gitlesen, T., Bauer, M. and Adlercreutz, P. 1997. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim. Biophys. Acta.* 1345, 2, 188-196.
- Goderis, H.L., Ampe, G., Feyten, M.P., Fouwé, B.L., Guffens, W.M., Van Cauwenbergh, S.M. and Tobback, P.P. 1987. Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.* XXX, 258-266.
- Godfrey, T. and West, S. 1996. Industrial Enzymology. 2nd Edition. Stockton Press, New York.
- Godtfredsen, S.E., Ingvorsen, K., Yde, B. and Andersen, O. 1985. The scope of biocatalysis in organic chemical processing. In: *Biocatalysis in organic syntheses*. J. Tramper, H.C., Van der Plas and P. Linko (eds.). 1st Edition. Elsevier, Amsterdam.
- Goj, O., Burchardt, A. and Haufe, G. 1997. A versatile approach to optically active primary 2-fluoro-2-phenylalkanols through lipase-catalyzed transformations. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 3, 399-408.
- Gordillo, M.A. 1993. Estudi de l'estabilitat de la Lipasa de *Candida rugosa* en el brou de cultiu i efecte de la concentració de substrat a la producció. Master universitari. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Gordillo, M.A., Obradors, N., Montesinos, J.L., Valero, F., Lamente, J. and Solà, C. 1995. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 38-41.
- Gordillo, M.A. 1996. Estratègies d'operació en "fed-batch": Aplicació a la producció de lipases per *Candida rugosa*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Gordillo, M.A., Sanz, A., Sánchez, A., Valero, F., Montesinos, J.L., Lamente, J., and Solà, C. 1998. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operational strategies. *Biotechnol. Bioeng.* In press.
- Gorman, L.A.S. and Dordick, J.S. 1992. Organic solvents strip water of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 392-397.
- Goto, M., Noda, S., Kamiya, N. and Nakashio, F. 1996. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant-coated lipases in organic media. *Biotechnol. Lett.* 18, 839-844.

- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D., Douthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cygler, M. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268, 12843-12847.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J.D. and Cygler, M. 1994. Two conformational states of *Candida rugosa* Lipase. *Protein Science.* 3, 82-91.
- Guerrieri, A., De Benedetto, G.E., Palmisano, F. and Zambonin, P.G. 1998. Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes: a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer. *Biosensors & Bioelectronics.* 13, 1, 103-112.
- Hamman, M.A., Thompson, G.A. and Hall, S.D. 1997. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human Cytochrome P450 2C. *Biochem. Pharmacol.* 54, 1, 33-41.
- Han, J.J. and Rhee, J.S. 1998. Effect of salt hydrate pairs for water activity control on lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a solvent-free system. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 3, 158-164.
- Happel, J. and Jordan, D.G. 1981. Economía de los procesos químicos. 1ª Edición. Ed. Reverte, Barcelona.
- Harris E.L.V. and Angal, S. 1989. Protein purification methods. A practical approach. Practical Approach series, Vol. 1. 1st Edition. Oxford University Press, New York.
- Hedström, G., Backhand, M. and Slotte, J.P. 1993. Enantioselective synthesis of ibuprofen esters in AOT/isooctane microemulsions by *Candida cylindracea* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 618-624.
- Hernáiz, M.J., Sánchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. 1995. Hydrolysis of (R,S)-2-aryl propionic esters by pure lipase B from *Candida cylindracea*. *J. Mol. Catal.* 96, 317-327.
- Hernáiz, M.J., Sánchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. 1997. New differences between isoenzymes A and B from *Candida rugosa* lipase. *Biotechnol. Lett.* 19, 4, 303-306.
- Hoq, M.M., Yamané, T. and Shimizu, S. 1984. Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane reactor. *JAOCs.* 61, 4, 776-781.
- Hoq, M.M., Koike, M., Yamané, T. and Shimizu, S. 1985. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophilic hollow fiber bioreactor. *Agric. Biol. Chem.* 49, 11, 3171-3178.
- Hutt, A.J. and Caldwell, J. 1984. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacokin.* 9, 371-373.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M. and Misset, O. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 29-63.

- Jay, G.D., Culp, D.J. and Jahnke, M.R. 1990. Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium sulfate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Anal. Biochem.* 185, 324-330.
- Jernejc, K. and Legisa, M. 1996. Purification and properties of carnitine acetyltransferase from citric acid producing *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60, 2, 151-158.
- Jin, W., Weng, Q. and Wu, J. 1997. Determination of bovine serum albumin by capillary zone electrophoresis with end-column amperometric detection at the carbon fiber microdisk array electrode. *Anal. Chim. Acta.* 342, 67-74.
- Kaimal, T. and Saroja, M. 1988. Selective removal of linolenic acid from soybean oil by lipase-catalyzed interesterification at low temperature. *Biotechnol. Lett.* 10, 5, 337-340.
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J. and Iwasaki, S. 1989. The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature.* 341, 164-166.
- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T. and Cuccia, L.A. 1991. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* 56, 2656-2665.
- Kiba, N., Itagaki, A. and Furusawa, M. 1997. Determination of L-phenylalanine in serum by flow-injection analysis using immobilized phenylalanine dehydrogenase and fluorimetric detection. *Talanta.* 44, 1, 131-134.
- Kierkels, J.G., Vleugels, L.F.W., Geladé, E.T.F., Vermeulen, D.O., Kamphuis, J., Wandrey, C. and Van den Tweel, W.J. 1994. *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorption and the kinetics of hydrolysis in a dynamic emulsion system. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 513-521.
- Kim, K.H., Kwon, D.Y. and Rhee, J.S. 1984. Effects of organic solvents on lipase fat splitting. *Lipids.* 19, 975.
- Kim, T. and Chung, K. 1989. Some characteristics of palm kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* in reversed micelle of AOT in isoctane, and additive effects. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 528.
- Kim, M.G. and Lee, S.B. 1996. Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by lipase-catalyzed esterification reaction: effects of water content and solid supports. *J. Ferment. Bioeng.* 81, 3, 269-271.
- Kim, H.K., Lin, C.C., Parker, D., Veals, J., Lim, J., Likhari, P., Statkevich, P., Marco, A. and Nomeir, A.A. 1997. High-performance liquid chromatographic determination and stability of 5-(3-methyltriazen-1-yl)-imidazo-4-carboximide, the biologically active product of the antitumor agent temozolomide, in human plasma. *J. Chrom.* 703, 1, 225-233.
- Kinderman, S.S. and Feringa, B.L. 1998. Asymmetric synthesis of acetomycin. *Tetrahedron: Asymmetry.* 9, 1215-1222.

- Kittelberger, R., Diack, D.S., Vizcaino, N., Zygmunt, M.S. and Cloeckaert, A. 1998. Characterization of an **immuno-dominant** antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microb.* **59**, 2, 213-227.
- Klass, M.R. and Warwel, S. 1997. Lipase-catalyzed preparation of **peroxy** acids and their use for epoxidation. *J. Mol. Catal.* 117, 311-319.
- Klibanov, A.M. 1986. Enzymes that work in organic solvents. *CHEMTECH* **16**, 354-357.
- Klibanov, A.M. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.* 23, 266-280.
- Knepper, P.A., Mayanil, C.S., Goossens, W., McLone, D.C. and Hayes, E. 1998. The presence of transcription factors in fetal bovine **sera**. *In Vitro Cellular Developmental Biology.* 34, 2, 170-173.
- Knezevic, Z., Mojovic, L. and Adnadjevic, B. 1998. Palm oil hydrolysis by **lipase** from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 4, 275-280.
- Kvittingen, L. 1994. Some aspects of Biocatalysis in organic solvents. *Tetrahedron.* 50, 8253-8274.
- Kwon, S.J., Song, K.M., Hong, W.H. and Rhee, J.S. 1995. Removal of water produced from lipase-catalyzed **esterification** in organic solvent by **pervaporation**. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 1-12.
- Laane, C., Boeren, S., Hilhorst, R. and Veeger, C. 1987. Optimization of biocatalysis in organic media. In: Laane, C., Tramper, J. and Lilli, M.D. (eds.). Biocatalysis in organic media. Proceedings of an International Symposium held at Wageningen. The Netherlands. Elsevier, Amsterdam.
- Lalonde, J.J., Govardhan, C., Khalaf, N., Martínez, A.G., Visuri, K. and Margolin, A.L. 1995. Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase: highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 26, 6845-6852.
- Lavayre, J. and Baratti, J. 1982. Preparation and properties of immobilized **lipases**. *Biotechnol. Bioeng.* XXIV, 1007-1013.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of **Bacteriophage T4**. *Nature.* 227, 680.
- Lee, Y.K. and Choo, C.L. 1989. The kinetics and mechanism of shear **inactivation** of lipase from *Candida cylindracea*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 183-190.
- Lee, S.J. and Park, K. 1996. **Interfacial Phenomena and Bioproducts**. 1st Edition. P.W. Marcel Dekker Inc. New York.
- Lee, F.J.S., Lin, L.W. and Smith, J.A. 1997. A **N^α-acetyltransferase** selectively transfers an acetyl group to **NH₂-terminal methionine** residues: purification and partial characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1338, 2, 244-252.

- Lee, P. and Swaisgood, H.E. 1998. Cloning and expression of a streptavidin-lipase fusion gene in *Escherichia coli* and characterization of the immobilized fusion protein. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 4, 246-254.
- Legros, J.Y., Toffano, M., Drayton, S.K., Rivard, M. and Fiaud, J.C. 1997. Kinetic resolution of secondary alcohols mediated by rabbit gastric lipase. *Tetrahedron Lett.* **38**, 11, 1915-1918.
- Lehninger, A.L. 1982. Principles of Biochemistry. 2nd Edition. Ed. Worth Publishers Inc., New York.
- Levenspiel, O. 1979. Chemical Reactor Omnibook. 1st Edition. OSU Book Stores, Inc., Corvallis.
- Lieberman, R.B. and Ollis, D.F. 1975. Hydrolysis of particulate tributyrin in a fluidized lipase reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **17**, 10, 1401-1419.
- Linko, Y. and Wu, X.Y. 1996. Biocatalytic production of useful esters by two forms of lipase from *Candida rugosa*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **65**, 163-170.
- Ljubovic, E. and Sunjic, V. 1997. Correlation between distance of the perturbing groups and enantioselective of the lipase catalyzed acetylation of acyclic *sec* alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry.* **8**, 1, 1-4.
- López-Belmonte, M.T., Alcántara, A.R. and Sinisterra, J.V. 1997. Enantioselective esterification of 2-aryl propionic acids catalyzed by immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *J. Org. Chem.* **62**, 1831-1840.
- López-Ulibarri, R. and Hall, G.M. 1997. Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 6, 398-404.
- Lotti, M., Grandori, R., Fusetti, F., Longhi, S., Brocea, S., Tramontano, A. and Alberghina, L. 1993. Cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene.* **124**, 45-55.
- Lotti, M., Brocea, S., Fusetti, F. and Alberghina, L. 1994. Expression of recombinant *Candida rugosa* lipase. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **59**, 4b, 2313-2319.
- Lotti, M. and Alberghina, L. 1996. *Candida rugosa* lipase isoenzymes. In: Engineering of/with lipases. (Malcata, F.X., ed.). 1st Edition. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J.L., Brocea, S., Valero, F. and Lafuente, J. 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chem. Phys. Lipids. In press.*
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.K. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lundell, K., Raijola, T. and Kanerva, L.T. 1998. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* and *Candida rugosa* lipases for the resolution of secondary alcohols: The effect of *Candida rugosa* isoenzymes. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 86-93.

- Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed **interesterification** of oils and fats. *JAOCS*. 60, 2, 291-294.
- Macrae, A.R. and Hammond, R.C. 1985. Present and future applications of **lipases**. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 3, 193-217.
- Magnuson, T.S. and Crawford, D.L. 1997. Purification and characterization of an alkaline xylanase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 3, 160-164.
- Malcata, F.X., García, H.S., Hill, J.C.G. and Amundson, C.H. 1992. Hydrolysis of **butteroil** by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part I. Lipase Adsorption Studies. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 647-657.
- Marangoni, A.G. 1994. Enzyme kinetics of lipolysis revisited: the role of lipase interfacial binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200, 3, 1321-1328.
- Margolin, A.L. 1993. Enzymes in the synthesis of **chiral** drugs. *Enzymes Microb. Technol.* 15, 266-280.
- Margot, A, Flaschel, E. and Renken, A. 1998. Development of a continuously operated reactor for the limited hydrolysis of whey protein by trypsin. *Proc. Biochem.* 33, 2, 125-131.
- Marlot, C., Langrand, G, Triantaphylides, C. and Baratti, J. 1985. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by **lipases** immobilized on **hydrophilic** supports. *Biotechnol. Lett.* 7, 9, 647-650.
- Martinelle, M., Holmquist, M. and Hult, K. 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1258, 272-276.
- Matos, J.R., West, J.B. and Wong, C.H. 1987. Lipase catalysed synthesis of peptides: preparation of a penicilin G precursor and other peptides. *Biotechnol. Lett.* 9, 4, 233-236.
- Matsumae, H., Furui, M. and Shibatani, T. 1994. Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow fiber membrane reactor. *J. Ferment. Bioeng.* 78, 59-63.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. and Monsan, P. 1997. Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by **amidification** reaction. *Tetrahedron.* 53, 14, 5185-5194.
- Mileto, D., Brocea, S., Lotti, M., Takagi, M., Alquati, C. and Alberghina, L. 1998. Characterization of the *Candida rugosa* lipase system and overexpression of the **Lip1** isoenzyme in a non-conventional yeast. *Chem. Phys. Lipids. Inpress.*
- Minagawa, S., Ishida, M., Shimakura, K., Nagashima, Y. and Shiomi, K. 1997. Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura affxanthogrammica*. *Compar. Biochem. Physiol.* 118, 2, 381-386.
- Monsan, P. and Durand, G. 1971. Preparation d'**invertase** insolubilisée per fixation sur bentonite. *FEBS Lett.* 16, 39.

- Montero, M., Blanco, A., Virto, M.D., Landeta, L.C., Agud, I., Solozábal, R., Lascaray, J.M., Renobales, M., Llama, M.J. and Serra, J.L. 1993. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 239-247.
- Montesinos, J.L., Campmajó, C., Iza, I., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C. 1993a. Software development to fermentation gas analysis using mass spectrometry. *Biotechnol. Tech.* 7, 429-434.
- Montesinos, J.L. 1993b. Definición de estrategias de operación en procesos biotecnológicos mediante el uso de técnicas de monitorización y modelización: Aplicación a la producción de lipasas por *Candida rugosa*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Montesinos, J.L., Campmajó, C., Iza, I., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C. 1994. Use of an intelligent system to monitor and control fermentation processes: Application to lipase production by *Candida rugosa*. *Proc. Cont. Qual.* 5, 237-244.
- Montesinos, J.L., Lafuente, J., Gordillo, M.A., Valero, F., Solà, C. and Charbonnier, S. 1995. Structured modeling and state estimation in a fermentation process: lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 573-584.
- Moreno, J.M., Samoza, A., Del Campo, C., Llama, E.F. and Sinisterra, J.V. 1995. Organic reactions catalyzed by immobilized lipases. Part I. Hydrolysis of 2-aryl propionic and 2-aryl butyric esters with immobilized *Candida cylindracea* lipase. *J. Mol. Catal.* 95, 179-192.
- Moreno, J.M., Arroyo, M., Hernáiz, M.J. and Sinisterra, J.V. 1997. Covalent immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 8, 552-558.
- Mosbach, K. 1987. Immobilized Enzymes and Cells, Part B. Methods in Enzymology, Vol. 135. 1st Edition. Academic Press, London.
- Murray, M., Rooney, D., Van Neikerk, M., Montenegro, A. and Weatherley, L.R. 1997. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Proc. Biochem.* 32, 6, 479-486.
- Mustranta, A. 1992. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 61-66.
- Nakao, K., Kiefner, A., Furumoto, K. and Harada, T. 1997. Production of gluconic acid with immobilized glucose oxidase in airlift reactors. *Chem. Eng. Sci.* 52, 21, 4127-4133.
- Navia, M. and St Clair, N. 1997. Crosslinked enzyme crystals. *Biosensors & Bioelectronics.* 12, 9-10.
- Nishio, T., Takahashi, K., Yoshimoto, Y., Kodera, Y., Saito, Y. and Inada, Y. 1987. Terpene alcohol ester synthesis by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biotechnol. Lett.* 9, 3, 187-190.

- Nishizawa, K., Ohgami, Y., Matsuo, N., Kisida, H., Nishida, S. and Hirohara, H. 1997. Lipase-catalyzed hydrolysis of (4-phenoxyphenoxy)propyl acetates for preparation of enantiomerically pure juvenile hormone analogues. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 5, 333-339.
- Norin, M., Boutelje, J., Holmberg, E. and Hult, K. 1988. Lipase immobilized by adsorption. Effect of support hydrophobicity on the reaction rate of ester synthesis in cyclohexane. *Appl. Microb. Biotechnol.* 28, 527-530.
- Novak, M. and Zemis, J.N. 1985. *trans*-2-phenylcyclohexanol. A powerful and readily available chiral auxiliary. *J. Org. Chem.* 50, 4664-4665.
- Obradors, N., Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente, J. and Solà, C. 1993. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotechnol. Lett.* 15, 4, 357-360.
- Olczak, M., Watorek, W. and Morawiecka, B. 1997. Purification and characterization of acid phosphatase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta.* 1341, 1, 14-25.
- Palmeros, B., Güereca, L., Alagón, A., Soberón-Chávez, G. 1993. Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. *Proc. Biochem.* 29, 207-212.
- Park, Y., Cho, S. and Linhardt, R.J. 1997. Exploration of the action pattern of *Streptomyces* hyaluronate lyase using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1337, 217-226.
- Parve, O., Vallikivi, I., Metsala, A., Lille, U., Tougu, V., Sikk, P., Kaambre, T., Vija, H. and Pehk, T. 1997. Lipase-catalysed enantioselective hydrolysis: interpretation of the kinetic results in terms of frontier orbital localisation. *Tetrahedron.* 53, 13, 4889-4900.
- Pencreac'h, G. and Baratti, J.C. 1997. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. *App. Microbiol. Biotechnol.* 47, 6, 630-635.
- Peters, M. and Timmerhaus, K. 1980. Plant Design and Economics for Chemical Engineers. 1st Edition. McGraw-Hill, New York.
- Piazza, G.J. 1991. Generation of polyunsaturated fatty acids from vegetable oils using the lipase from ground oat (*Avena Sativa* L.) seeds as a catalyst. *Biotechnol. Lett.* 13, 3, 173-178.
- Pierce Chemical Company. 1989. "Coomassie Protein Assay Reagent Kit".
- Plou, F.J., Sogo, P. and Calvo, M.V. 1997. Kinetic and enantioselective behaviour of isoenzyme A and isoenzyme B from *Candida rugosa* lipase in the hydrolysis of lipids and esters. *Biocatal. Biotransform.* 15, 75-89.
- Prazeres, D.M.F., Garcia, F.A.P. and Cabral, J.M.S. 1993. An ultrafiltration membrane bioreactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media. *Biotechnol Bioeng.* 41, 761-770.
- Prazeres, D.M.F. and Cabral, J.M.S. 1994. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme Microb. Technol.* 16, 738-750.

- Pronk, W., Kerkhof, P.J.A.M., Van Helden, C. and Van't Riet, K. 1988. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 512-518.
- Rapp, P. and Backhaus, S. 1992. Formation of extracellular lipase by filamentous fungi, yeasts and bacteria *Enzyme Microb. Technol.* 4, 938-943.
- Redondo, O., Herrero, A., Bello, J.F., Roig, M.G., Calvo, M.V., Plou, F.J. and Burguillo, F.J. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid *p*-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243, 1, 15-24.
- Reslow, M., Adlercreutz, P. and Mattiason, B. 1992. Modification of the microenvironment of enzymes in organic solvents. Substitution of water by organic solvents. *Biocatalysis.* 6, 307-318.
- Richart, E. 1977. Evaluación de inversiones industriales. 1ª Edición. Ed. Alhambra, Madrid.
- Riguetti, P.G. 1990. Immobilized pH gradients: Theory and Methodology. 1st Edition. Elsevier, Amsterdam.
- Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1989. The yeast, 3. 1st Edition. Academic Press, New York.
- Rosell, C.M., Vaidya, A.M. and Hailing, P.J. 1996. Continuous in situ water activity control for organic phase biocatalysis in a packed bed hollow fiber reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 284-289.
- Rúa, M.L., Díaz Mauriño, T., Fernández, V.M., Otero, C. and Ballesteros, A. 1993. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1078, 181-189.
- Rúa, M.L. and Ballesteros, A. 1994. Rapid purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Tech.* 8, 21-26.
- Sánchez, A. 1996. Purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*: aplicación a reacciones de hidrólisis y síntesis de ésteres del ácido propiónico. Master universitario. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Sánchez, E.M., Bello, J.F., Roig, M.G., Burguillo, F.J., Moreno, J.M. and Sinisterra, J.V. 1996. Kinetic and enantioselective behavior of the lipase from *Candida cylindracea*: A comparative study between the soluble enzyme and the enzyme immobilized on agarose and silica gels. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 468-476.
- Santaniello, E., Ferraboschi, P. and Grisenti, P. 1993. Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 367-382.
- Sanz, A. 1998. Aplicación de técnicas de control avanzadas al proceso de producción de lipasas por *Candida rugosa*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Scandella, C. and Pettersson, T. 1991. Industrial purification of human superoxide dismutase. *Bioseparatión.* 1, 367.

- Schaefer, A., Stein, M.A., Schneider, K.H. and Giffhorn, F. 1997. Mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* Si4: subcloning, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 1, 47-52.
- Schoemaker, M., Feldbrugge, R., Grundig, B. and Spener, F. 1997. The lipoxygenase sensor, a new approach in essential fatty acid determination in foods. *Biosensors & Bioelectronics.* 12, 11, 1089-1099.
- Schoffers, E., Golebiowski, A. and Johnson, C.R. 1996. Enantioselective synthesis through enzymatic asymmetrization. *Tetrahedron.* 52, 3769-3826.
- Scott, P.G., Nakano, T. and Dodd, C.M. 1997. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim. Biophys. Acta.* 1336, 2, 254-262.
- Secundo, F., Ottolina, G., Riva, S. and Carrea, G. 1997. The enantioselectivity of lipase PS in chlorinated solvents increases as a function of substrate conversion. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 13, 2167-2173.
- Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T. and Inamasu, S. 1984. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid. Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *JAACS.* 61, 11, 1761-1765.
- Selmi, B., Gontier, E., Ergon, F., Barbotin, J.N. and Thomas, D. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of tricaprilyn in a medium solely composed of substrates. Water production and elimination. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 5, 322-325.
- Serrano, A. 1998. Estudio y modificación de la glicosilación de las lipasas producidas por la levadura *Candida rugosa*. Master universitario. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Shaw, J.F. and Chang, C.H. 1989. Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial *Candida* lipase preparation. *Biotechnol. Lett.* 11, 11, 779-784.
- Shen, T.Y. 1972. Perspectives in nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 11, 460-472.
- Shimada, Y., Koga, C., Sugihara, A., Nagao, T., Takada, N., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. 1993. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 5, 349-352.
- Sidebottom, C.M., Charton, E., Dunn, P.P.J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J.L., Macrae, A.R. and Slabas, A.R. 1991. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* 202, 485-491.
- Skupin, R., Cooper, T.G., Frohlich, R., Prigge, J. and Haufe, G. 1997. Lipase-catalyzed resolution of both enantiomers of Ornidazole and some analogues. *Tetrahedron: Asymmetry.* 8, 14, 2453-2464.
- Sorensen, J.H. and Arlt, W. 1979. Liquid-liquid Equilibrium Data Collection. Binary Systems. 1st Edition. Dechema Chemistry Data Series. Vol. V. Part I.

- Spagna, G., Andreani, F., Salatelli, E., Romagnoli, D. and Pifferi, P.G. 1998. Immobilization of α -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan. *Proc. Biochem.* 33, 1, 57-62.
- Stinson, S.C. 1994. Chiral drugs. *Chem. Eng. News.* 38-72.
- Straathof, A.J.J., Rakels, J.L.L. and Heijnen, J.J. 1995. Mass balancing in kinetic resolution: calculating yield and enantiomeric excess using chiral balance. *Biotechnol. Bioeng.* 45, 536-538.
- Straathof, A.J.J. and Jongejan, J.A. 1997. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 559-571.
- Stratman, N.C., Carter, D.B. and Sethy, V.H. 1997. Ibuprofen: effect on inducible nitric oxide synthase. *Mol. Brain Res.* 50, 107-112.
- Sutherland, A. and Willis, C.L. 1997. Enantioselective syntheses of α -Amino- β -Hydroxy Acids, [^{15}N]-L-allothreonine and [^{15}N]-L-threonine. *Tetrahedron Lett.*, 38, 10, 1837-1840.
- Svensson, I., Wehje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. 1994. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 549-556.
- Taylor, F., Panzer, C.C., Craig, J.C. and O'Brien, D.J. 1986. Continuous hydrolysis of tallow with immobilized lipase in a microporous membrane. *Biotechnol. Bioeng.* XXVIII, 1318-1322.
- Taylor, S.C.S., McCague, R. and Jones, D.T.E. 1997. A process of preparing chiral cycloalkanols and their enantiomers by biotransformation. *Proc. Biochem.* 32, 8, 723.
- Theil, F. and Bjorkling, R. 1993. Specificity of *Candida antarctica* Lipase B (SP-435) in the presence of Lipase A in a double enantioselective transesterification. *Biotechnol. Lett.* 15, 605-608.
- Trani, M., Ducret, A., Pepin, P. and Lortie, R. 1995. Scale-up of the enantioselective reaction for the enzymatic resolution of (R,S)-ibuprofen. *Biotechnol. Lett.* 17, 10, 1095-1098.
- Tsai, S. and Wei, H. 1994. Effect of solvent on enantioselective esterification of naproxen by lipase with trimethylsilyl methanol. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 64-68.
- Tsai, S.W., Lu, C.C. and Chang, C.S. 1996a. Surfactant enhancement of (S)-naproxen ester productivity from racemic naproxen by lipase in isooctane. *Biotechnol. Bioeng.* 51, 2, 148-156.
- Tsai, S. and Dordick, J.S. 1996b. Extraordinary enantioselectivity of lipase catalysis in organic media induced by purification and catalyst engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 296-300.
- Tsai, S.W., Lin, J.J., Chang, C.S. and Chen, J.P. 1997. Enzymatic synthesis of (S)-ibuprofen ester prodrug from racemic ibuprofen by lipase in organic solvents. *Biotechnol. Prog.* 13, 82-88.

- Ushio, K., Hakagawa, K., Nakagawa, K. and Watanabe, K. 1992. An easy access to optically pure (**R**)-malic acid via **enantioselective** hydrolysis of diethyl malate by *Rhizopus* lipase. *Biotechnol. Lett.* 14, 9, 795-800.
- Valero, F. 1990. Estudio de la producción de lipasas por *Candida rugosa*. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.
- Valero, F., Del Rio, J.L., Poch, M. and Solà, C. 1991. Fermentation behaviour of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. *J. Ferment. Bioeng.* 72, 5, 399-401.
- Valivety, R.H., Hailing, P.H., Peilow, A.D. and Macrae, A.R. 1992. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1122, 143-146.
- Van den Heuvel, M., Cuiper, A.D., Van der Deen, H., Kellogg, R.M. and Feringa, B.L. 1997. Optically active 6-acetyloxy-2H-pyran-3(6H)-one obtained by lipase catalyzed transesterification and esterification. *Tetrahedron Lett.* 38, 9, 1655-1658.
- Van der Padt, A., Sewalt, J.J.W. and Van't Riet, K. 1993. Online water removal during enzymatic triacylglycerol synthesis by means of pervaporation. *J. Membr. Sci.* 80, 199-208.
- Vazquez-Lima, F., Pyle, D.L. and Asenjo, J.A. 1995. Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst: enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 69-79.
- Veeraragavan, K. and Gibbs, B. 1989. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnol. Lett.* 5, 345-348.
- Verger, R., Riviere, C., Moreau, H., Gargouri, Y., Rogalska, E., Nury, S., Moulin, A., Ferrato, F., Ransac, S., Carrière, F., Cudrey, N. and Trétout, T. 1990. Enzyme Kinetics of Lipolysis. in 'Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering'. Gbf Monographs, 16, 105-116.
- Vián, A. 1991. El pronóstico económico en Química Industrial. 1ª Edición. Eudema S.A, Madrid.
- Ward, O.P., Fang, J. and Li, Z. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 52-56.
- Wehtje, E., Kaur, J., Adelercreutz, P., Chand, S. and Mattiason, B. 1997. Water activity control in enzymatic esterification processes. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 502-510.
- Wisdom, R.A., Dunnill, P. and Lilly, M.D. 1987. **Enzymic interesterification** of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* **XXIX**, 1081-1085.
- Wu, D.R., Cramer, S.M. and Belfort, G. 1993. Kinetic resolution of racemic glycidyl butyrate using a multiphase membrane enzyme reactor: experiments and model verification. *Biotechnol Bioeng.* **41**, 979-990.

- Xu, D.K., Lin, H. and Chen, H.Y. 1997. Amperometric detection of **enzymes** in capillary zone electrophoresis based on dynamic modification with surfactans. *Anal. Chim. Acta.* 349, 215-219.
- Yakowitz, S. and Szidarovszky, F. 1989. An Introduction to Numerical Computations. 2nd Edition. Macmillan Publishing Company, New York.
- Yamamura, I., Fujiwara, Y., Yamato, T., Irie, O. and Shishido, K. 1997. Enantiocontrolled total synthesis of the **diterpenoids**, Triptoquinone D, C and **Triptocallol**. *Tetrahedron Lett.* 38, 23, 4121-4124.
- Yamané, T., Funada, T. and Ishida, S. 1982. Repeated use of lipase immobilized on **amphiphilic** gel for hydrolysis of a small amount of glycerides included in liquid crude fatty acid. *J. Ferment. Technol.* 60, 6, 517-523.
- Yamané, T., Hoq, M.M., Itoh, S. and Shimizu, S. 1986. Continuous glycerolysis of fat by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 632-636.
- Yang, D. and Rhee, J.S. 1991. Stability of the lipase immobilized on DEAE-Sephadex for continuous **lipid** hydrolysis in organic solvents. *Biotechnol. Lett.* 13, 8, 553-558.
- Yang, F. and Russell, A.J. 1995. A comparison of lipase-catalyzed ester hydrolysis in reverse micelles, organic solvents, and biphasic systems. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 60-70.
- Yang, H.W., Zhao, C. and Romo, D. 1997. Studies of the tandem Mukaiyama **Aldol-Lactonization (TMAL)** Reaction: A concise and highly diastereoselective route to γ -lactones applied to the total synthesis of the potent pancreatic lipase inhibitor, (-)-**Panclacin D**. *Tetrahedron.* 53, 48, 16471-16488.
- Yoshida, H., Kohno, Y., Endo, H., Yamaguchi, J., Fukushima, K., Suwa, T. and Hayashi, M. 1997. Mechanistic studies on metabolic chiral inversion of 4-(4-methylphenyl)-2-methylthiomethyl-4-oxobutanoic acid (ke-748), an active metabolite of the new anti-rheumatic agent 2-acetylthiomethyl-4-(4-methylphenyl)-4-oxobutanoic acid (ke-298), in rats. *Biochem. Pharmacol.* 53, 2, 179-187.
- Zaborsky, O. 1973. Immobilized Enzymes. 1st Edition. CRC Press, Cleveland.

7.2. Bibliografía electrónica

Webs de consulta general:

1. Base de datos Medline:

<http://www.dimdi.de/>

2. Biblioteca virtual de la Universitat Autònoma de Barcelona:

<http://decomat.uab.es/>

Webs específicos:

1. Buscador de compuestos químicos CS Chemfinder:

<http://chemfinder.camsoft.com/>

2. Búsqueda de secuencias de proteínas:

ExpASy Molecular Biology Server:

<http://expasy.hcuge.ch/>

contiene accesos a las bases de datos Swiss-Prot y Prosite.

8. APENDICES

8.1. Calibrado de la actividad lipolítica

El calibrado de la pendiente obtenida mediante el test **turbidimétrico** descrito en el capítulo 3.2.1.2 con la actividad lipolítica determinada por valoración se muestra en la fig. 8.1.

$$\text{Pendiente test turb.} \cdot ((-1) \cdot 10^4) = 0.590 + 2.241 \cdot \text{Act. lipolítica (U/ml)} \quad (r=0.998)$$

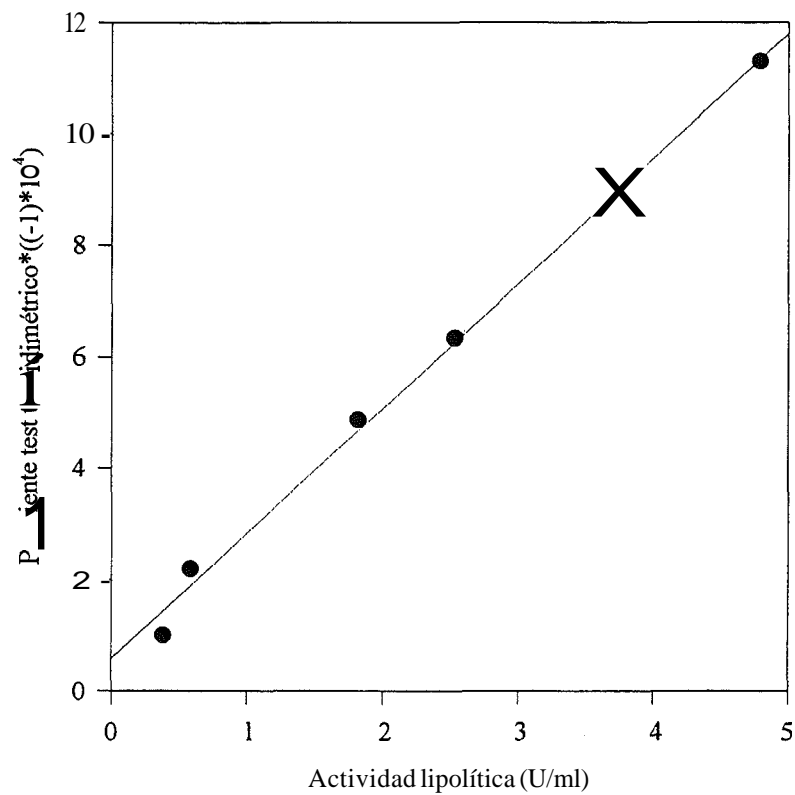


Fig. 8.1.: Calibrado de la actividad lipolítica.

8.2. Calibrado de la actividad esterásica

El calibrado para la determinación de la actividad esterásica por hidrólisis del *p*-nitrofenilpropionato descrito en el capítulo 3.2.1.3 se muestra en la fig. 8.2.

$$\text{Pendiente test} = 8.204 \cdot 10^{-3} + 1.536 \cdot \text{Act. esterásica (U/ml)} \quad (r=0.9994)$$

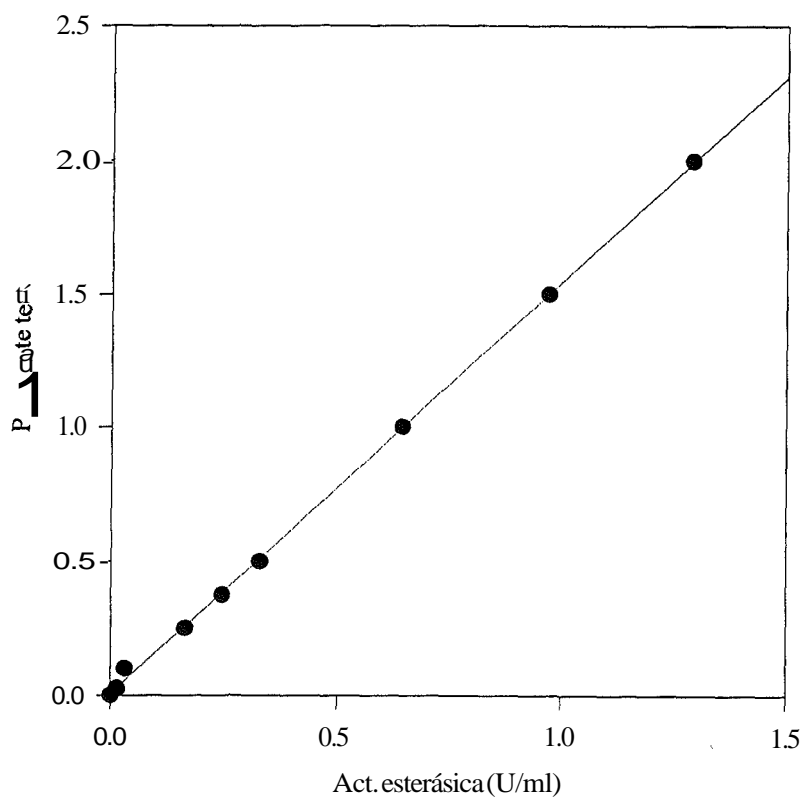


Fig. 8.2.: Calibrado de la actividad esterásica.

83. Calibrado de proteína total por el método de Lowry

El calibrado para la determinación de la proteína total por el método descrito en el capítulo 3.2.1.4 se muestra en la fig. 8.3.

$$\text{Absorbancia a 750 nm} = 8.403 \cdot 10^{-3} + 2.404 \cdot 10^{-3} \cdot \text{Proteína } (\mu\text{g/ml}) \quad (r=0.9990)$$

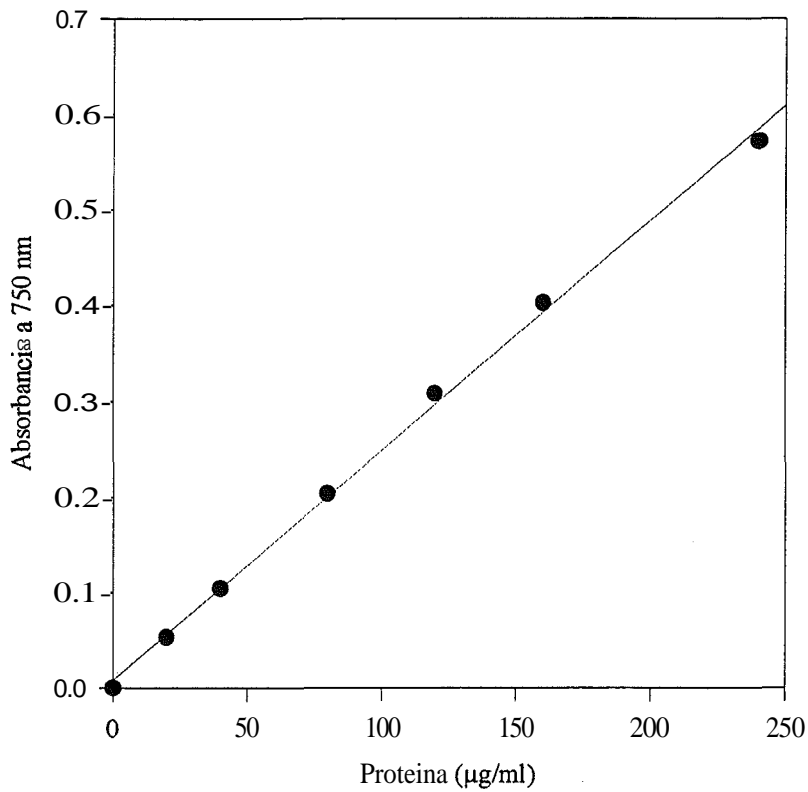


Fig. 8.3.: Calibrado de la concentración de proteína total por el método de Lowry.

8.4. Calibrado de proteína total por el método de Bradford

El calibrado para la determinación de la proteína total por el método descrito en el capítulo 3.2.1.5 se muestra en la fig. 8.4.

$$\text{Absorbancia a 595 nm} = 7.701 \cdot 10^{-3} + 0.0285 \cdot \text{Proteína } (\mu\text{g/ml}) \quad (r=0.9992)$$

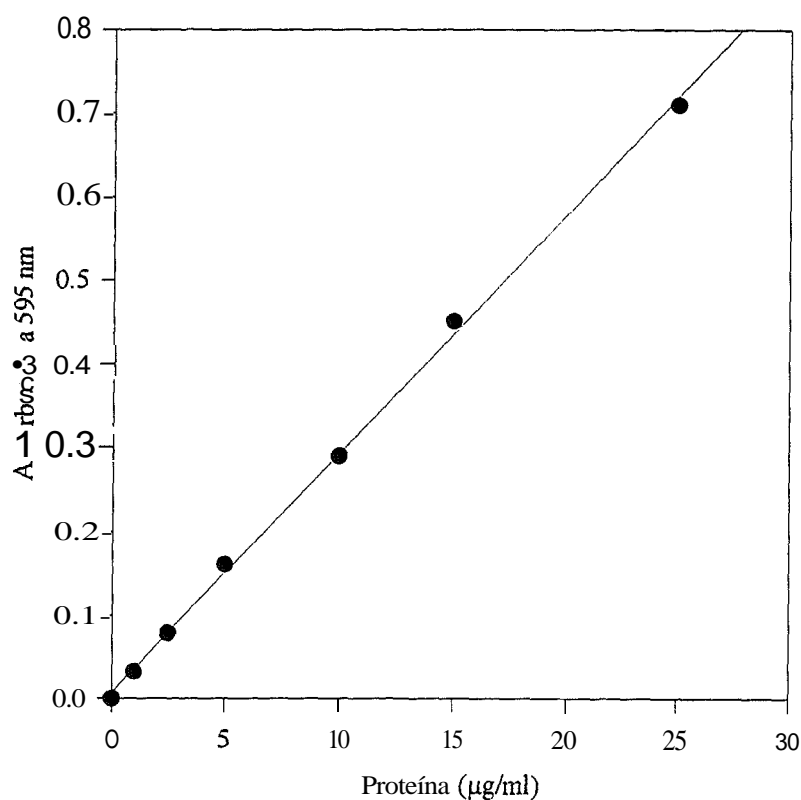


Fig. 8.4.: Calibrado de la concentración de proteína total por el método de Bradford.

8.5. Calibrado de polisacáridos por el método de Antrona

El calibrado para la determinación de los polisacáridos totales por el método descrito en el capítulo 3.2.1.6 se muestra en la fig. 8.5.

$$\text{Absorbancia a 625 nm} = 1.748 \cdot 10^{-5} + 9.461 \cdot 10^{-5} \cdot \text{Polisacárido } (\mu\text{g/ml}) \quad (r=0.998)$$

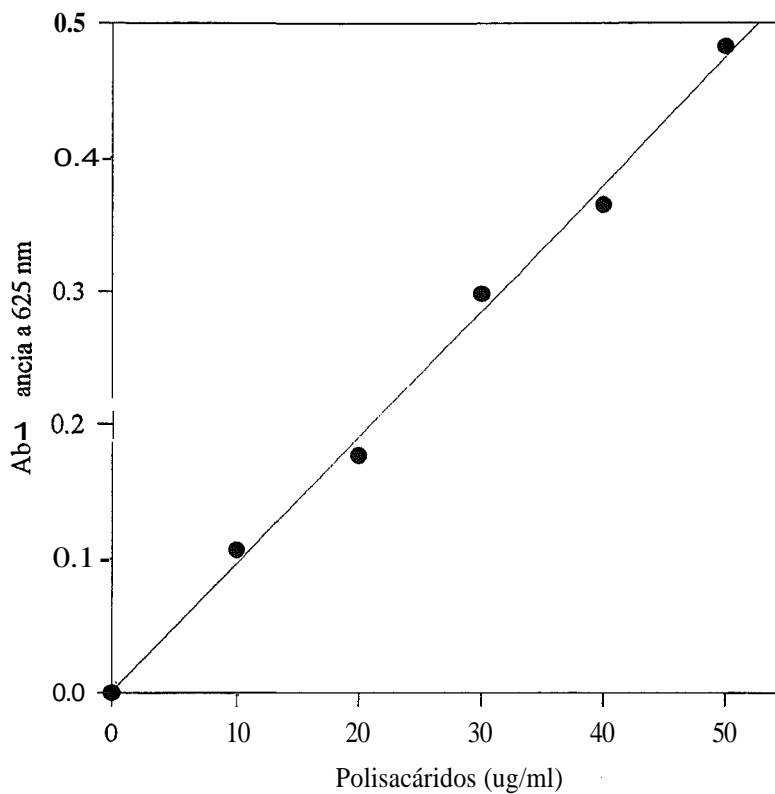


Fig. 8.5.: Calibrado de la concentración de polisacáridos por el método de la Antrona.

8.6. Calibrado de ácido propiónico por cromatografía de gases

El calibrado para la determinación de ácido propiónico por el método descrito en el capítulo 3.2.2.1 se muestra en la fig. 8.6.

$$\text{Area pico} = 2.187 \cdot 10^3 + 1.817 \cdot 10^4 \cdot \text{Acido propiónico (mM)} \quad (r=0.9991)$$

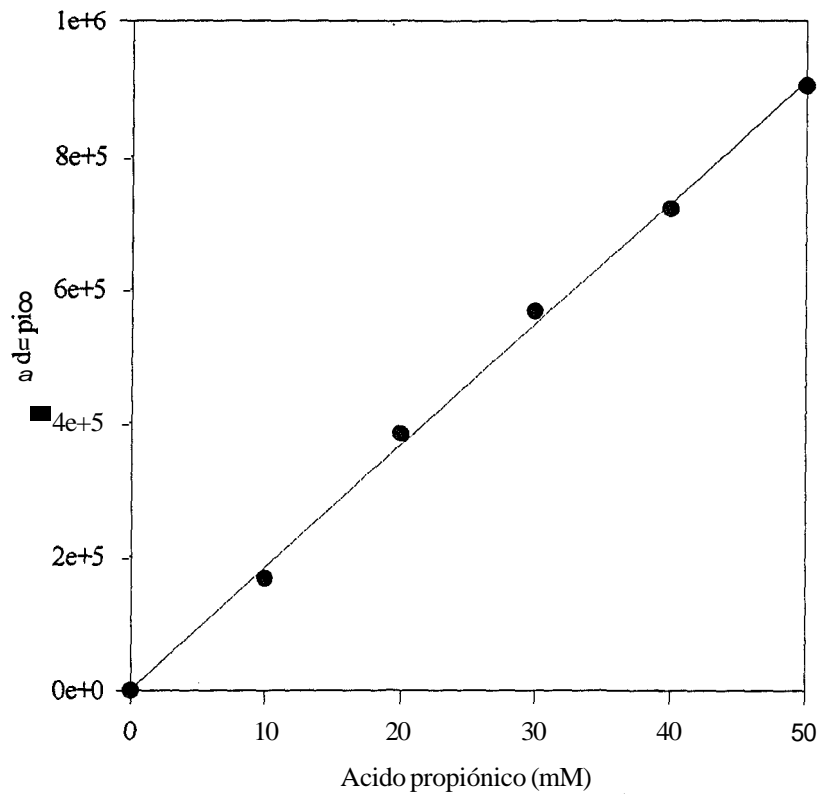


Fig. 8.6.: Calibrado de la concentración de ácido propiónico por cromatografía de gases.

8.7. Calibrado de propionato de n-butilo por cromatografía de gases

El calibrado para la determinación de propionato de n-butilo por el método descrito en el capítulo 3.2.2.2 se muestra en la fig. 8.7.

$$\text{Area pico} = 4.261 \cdot 10^4 + 5.874 \cdot 10^4 \cdot \text{Propionato de n-butilo (mM)} \quad (r=0.9991)$$

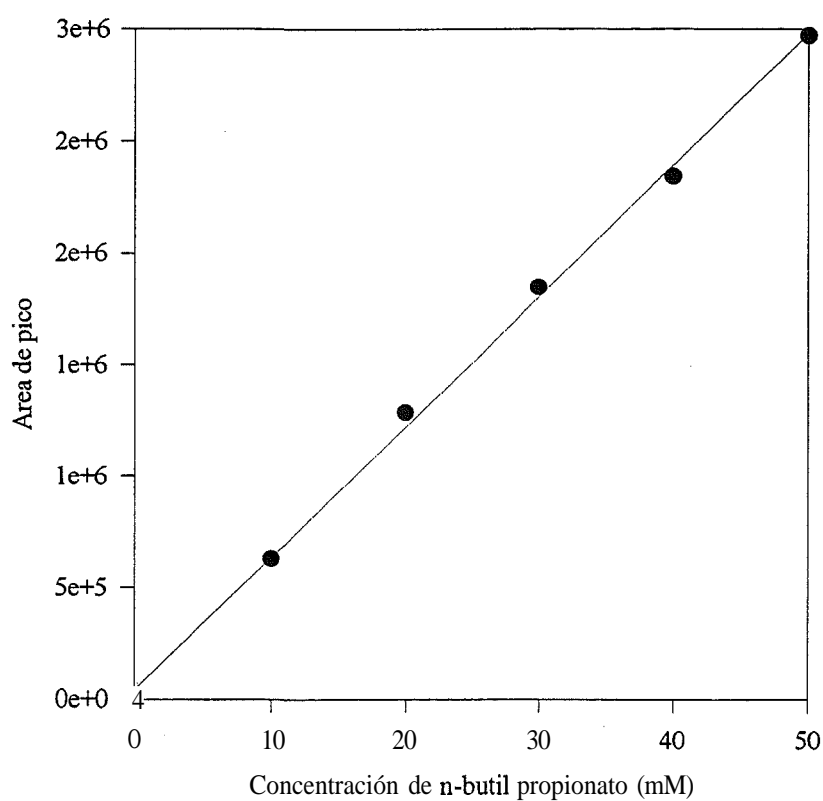


Fig. 8.7.: Calibrado de la concentración de propionato de n-butilo por cromatografía de gases.

8.8. Calibrado de hexanol por cromatografía de gases

El calibrado para la determinación de propionato de n-butilo por el método descrito en el capítulo 3.2.2.3 se muestra en la fig. 8.8.

$$\text{Area pico} = -6.530 \cdot 10^4 + 5.784 \cdot 10^4 \cdot \text{Hexanol (mM)} \quad (r=0.9980)$$

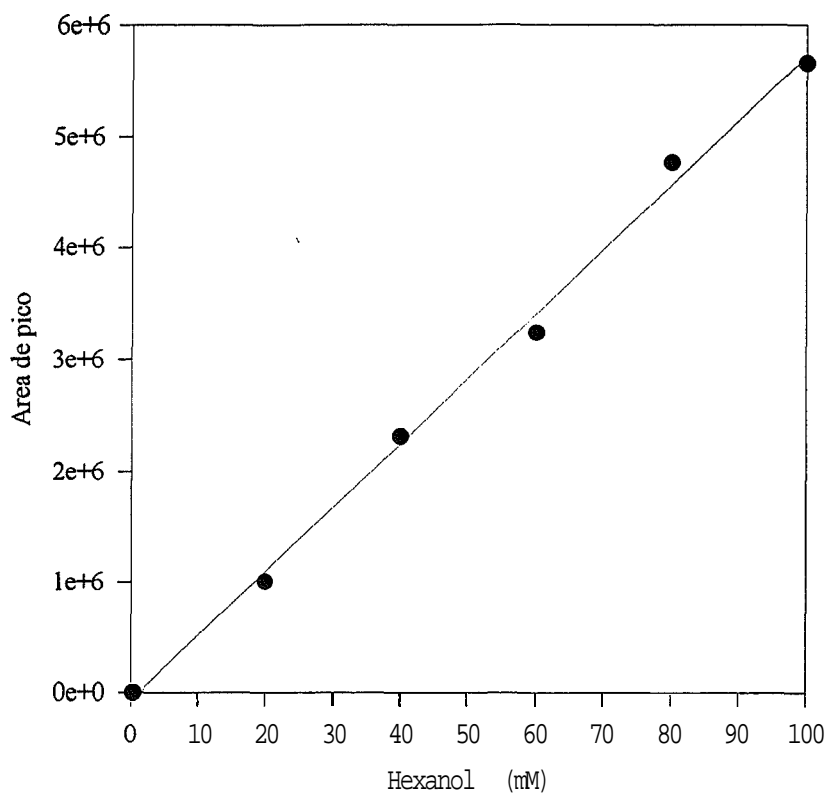


Fig. 8.8.: Calibrado de la concentración de propionato de n-butilo por cromatografía de gases.

8.9. Calibrado de butanol por HPLC

El calibrado para la determinación de butanol por el método descrito en el capítulo 3.2.2.4 se muestra en la fig. 8.9.

$$\text{Area pico} = 1.056 \cdot 10^5 + 1.532 \cdot 10^6 \cdot \text{Butanol (g/l)} \quad (r=0.9988)$$

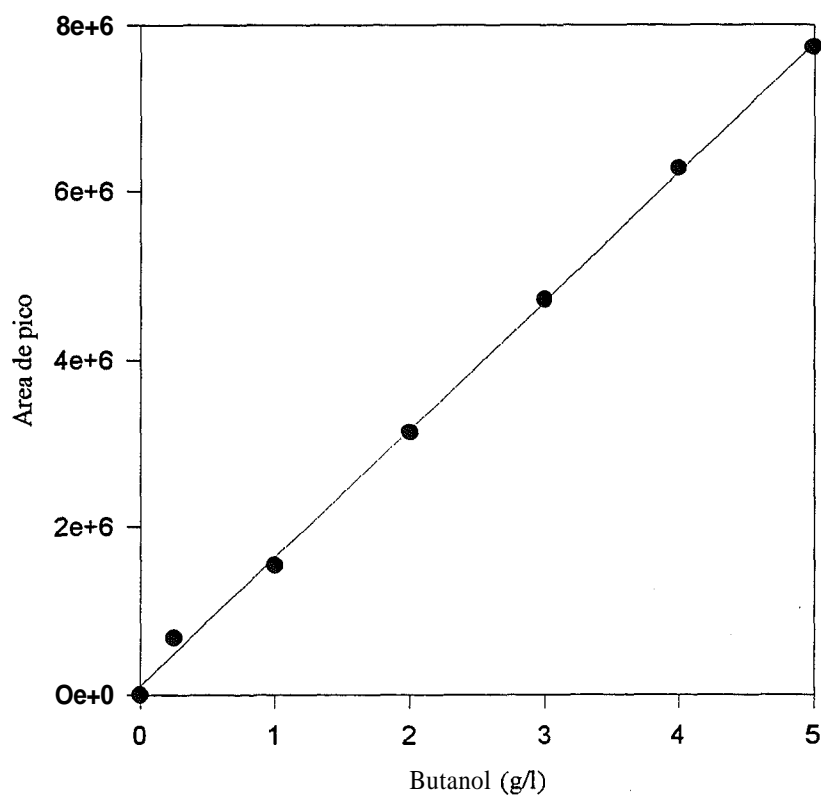


Fig. 8.9.: Calibrado de la concentración de butanol por HPLC.

8.10. Análisis de ibuprofeno por columna de HPLC quiral

En la figura 8.10 se muestran los resultados obtenidos para una inyección de ibuprofeno (mezcla racémica) en isooctano para todo el barrido de longitudes de onda (190-400 nm) y un cromatograma típico a la longitud de onda elegida (226 nm) donde se observa la separación de los dos enantiómeros.

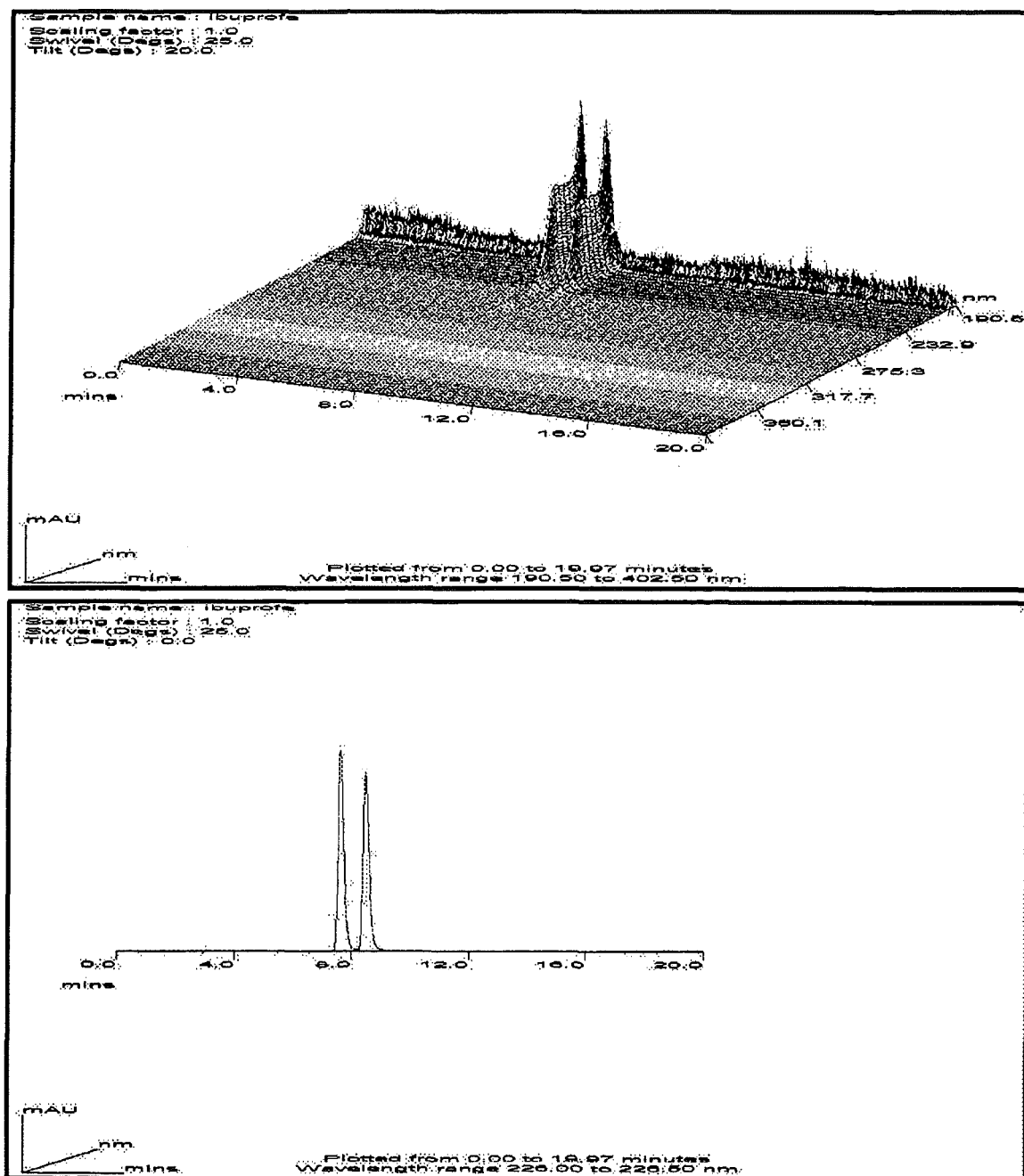


Fig. 8.10.: Cromatograma típico obtenido con ibuprofeno.

8.11. Análisis de ácido 2-fenil-propiónico por columna de HPLC quiral

En la figura 8.11 se muestran los resultados obtenidos para una inyección de ácido 2-fenil-propiónico (mezcla racémica) en isooctano para todo el barrido de longitudes de onda (190-400 nm) y un cromatograma típico a la longitud de onda elegida (220 nm) donde se observa la separación de los dos enantiómeros.

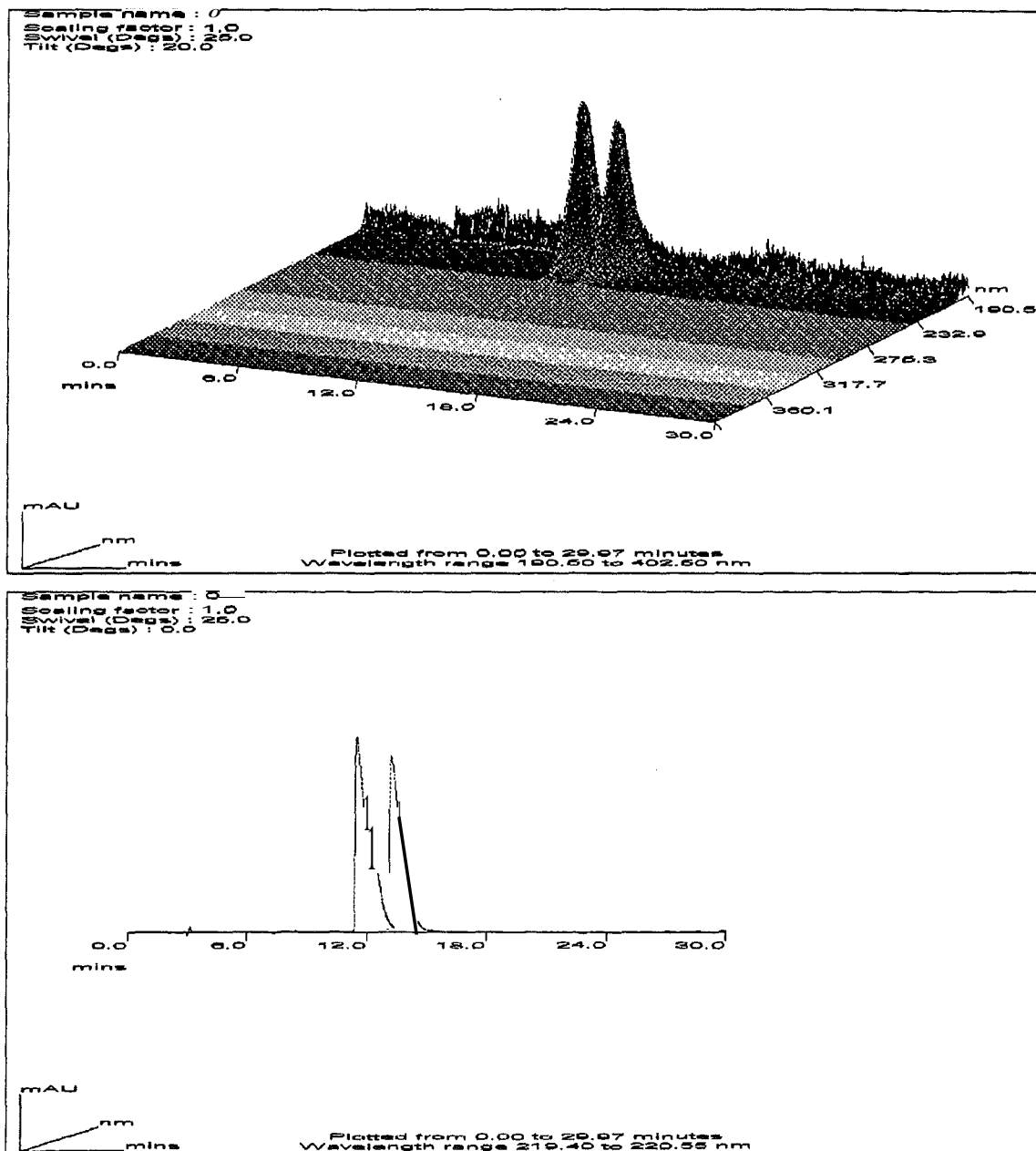


Fig. 8.11.: Cromatograma típico obtenido con ácido 2-fenil-propiónico.

8.12. Análisis de *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol por columna de HPLC quiral

En la figura 8.12 se muestran los resultados obtenidos para una inyección de *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol (mezcla racémica) en isooctano para todo el barrido de longitudes de onda (190-400 nm) y un cromatograma típico a la longitud de onda elegida (215 nm) donde se observa la separación de los dos enantiómeros.

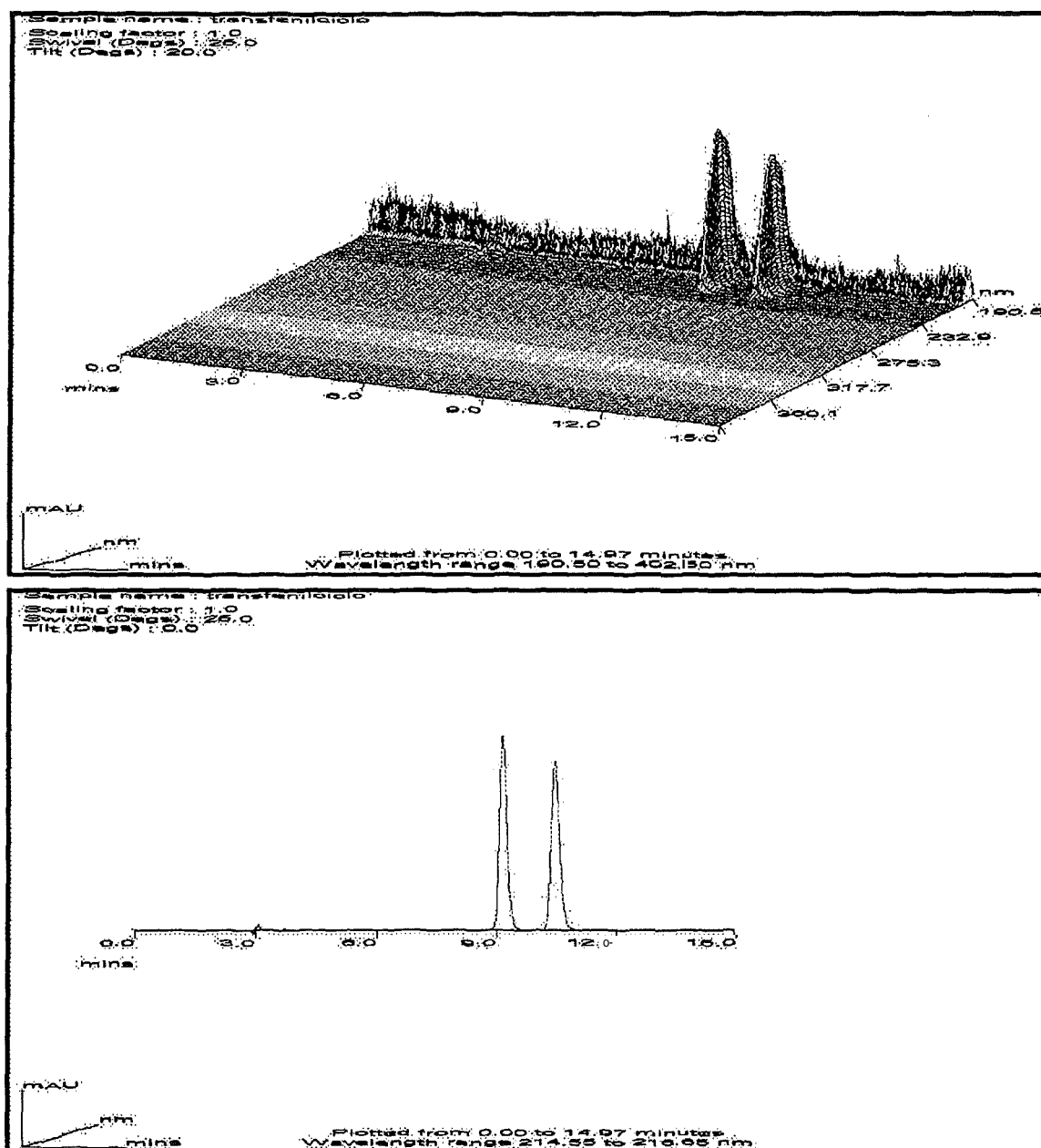


Fig. 8.12.: Cromatograma típico obtenido con *trans*-2-fenil-1-ciclohexanol.

8.13. Cromatografía en FPLC

Programas utilizados para las distintas cromatografías utilizadas programados en el software FPLC Director 1.03 de Pharmacia Biotech.

1) Cromatografía de intercambio iónico:

- Método de escalón:

t (min)	Acción	
0.00	FLOW	1.0
0.00	CONC_B	0.0
0.00	INJ_VALVE	Load
2.00	INJ_VALVE	Inject
6.00	CONC_B	0.0
11.00	CONC_B	22
15.00	CONC_B	22.0
17.00	CONC_B	28.0
19.00	CONC_B	28.0
19.00	CONC_B	45.0
23.00	CONC_B	45.0
23.00	CONC_B	100.0
30.00	CONC_B	100.0
30.00	END_METHOD	

- Método de gradiente:

0.0	FLOW	1.0
0.0	CONC_B	0.0
0.0	INJ_VALVE	Load
2.0	INJ_VALVE	Inject
10.0	CONC_B	0.0
50.0	CONC_B	100.0
60.0	CONC_B	100.0
60.0	END_METHOD	

2) Cromatografía de gel filtración:

0.0	FLOW	1.0
0.0	CONC_B	0.0
0.0	INJ_VALVE	Load
1.0	INJ_VALVE	Inject
120.0	FLOW	0.00
120.0	END_METHOD	

3) Cromatografía de interacción hidrofóbica:

0.0	FLOW	0.5
0.0	CONC_B	0.0
0.0	INJ_VALVE	Load
2.0	INJ_VALVE	Inject
5.0	CONC_B	0.0
110.0	CONC_B	100.0
130.0	CONC_B	100.0
130.0	END_METHOD	

8.14. Diseño de experimentos

Programa utilizado en el ajuste de los parámetros de función polinómica que describe la influencia de los factores en la esterificación del ibuprofeno:

```
C***** PROGRAMA FACTOR. FOR *****
C
C   PROGRAMA PARA DETERMINAR LOS COEFICIENTES DEL MODELO LINEAL
C   EL FICHERO DE DATOS 'FACTOR.DAT' ESTA ASIGNADO A LA UNIDAD 1.
C   VER FICHERO DE DATOS EJEMPLO.
C   EL FICHERO DE RESULTADOS 'FACTOR.RES' ESTA ASIGNADO A LA UNIDAD 2.
C   LES SUBROUTINES UTILITZADES SON MULTIP. POR (MULTIPLICA MATRIUS) I
C   DLINRG DEL PAQUETE IMSL.
C   LES DIMENSIONES HAN DE SER: (IP: PARAMETROS), (IEX: EXPERIMENTOS),
C   (IREP: REPLICAS)
C   USE MSIMSL
C   DOUBLE PRECISION X1,X2,X,XT,XX,X3,XXI,XTY,B,Y,FEST,ERR,X4
C   DOUBLE PRECISION SUM,SST,YMIG,SSM,SSCOR,SSR,SSFACT,R2,YMIG2
C   DOUBLE PRECISION SSLOF,SSPE
C   INTEGER IEX,IP,IREP,I,J
C
C   CAMBIAR LAS DIMENSIONES EN FUNCIÓN DE LOS VALORES DE IEX E IP.
C
A   DIMENSION X1(63),X2(63),X(63,11),XT(11,63),XX(11,11),X3(63),X4(6
3)
A   DIMENSION XXI(11,11),XTY(11,1),B(11,1),Y(63,1),FEST(63)
C
C   IEX=63
C   IP=11
C   IREP=3
C
C   OPEN (UNIT=1, FILE='C:\FORTRAN\FACTOR5.DAT')
C   OPEN (UNIT=2, FILE='C:\FORTRAN\FACTOR5.RES')
C
C   REWIND 1
C   READ (1,*) (X1(I),I=1,IEX)
C   READ (1,*) (X2(I),I=1,IEX)
C   READ (1,*) (X3(I),I=1,IEX)
C   READ (1,*) (X4(I),I=1,IEX)
C   READ (1,*) (Y(I,1),I=1,IEX)
C
C   CLOSE(1)
C
C   SE GENERA LA MATRIZ DE EXPERIENCIAS
C
C   DO 10 I=1, IEX
C   X(I,1)=1
C   X(I,2)=X1(I)
C   X(I,3)=X2(I)
C   X(I,4)=X3(I)
C   X(I,5)=X4(I)
C   X(I,6)=X1(I)**2
C   X(I,7)=X2(I)**2
C   X(I,8)=X3(I)**2
C   X(I,9)=X1(I)*X2(I)
C   X(I,10)=X1(I)*X3(I)
C   X(I,11)=X2(I)*X3(I)
C
10  CONTINUE
C
C   DO 20 I=1,IEX
C   DO 20 J=1,IP
C   XT(J,I)=X(I,J)
C
20  CONTINUE
C
C   CALL MULTIP(IP,IEX,XT,IEX,IP,X,XX)
C
C   CALL DLINRG(IP,XX,IP,XXI,IP)
```

```

C      ESCRIBE LA MATRIZ DE VARIANZA-COVARIANZA

      WRITE (2,80)
      DO I=1, IP
      WRITE (2,90) (XXI(I,J),J=1,IP)
      WRITE (6,90) (XXI(I,J),J=1,IP)
      END DO

      CALL MULTIP(IP, IEX, XT, IEX, 1, Y, XTY)

      CALL MULTIP(IP, IP, XXI, IP, 1, XTY, B)

C      VALORES ESTIMADOS PARA LOS PUNTOS DADOS
C      HAY QUE DAR LA FORMA DEL POLINOMIO!!!!.

      WRITE (2,190)
      DO 70 I=1, IEX
      FEST(I)=B(1,1)+B(2,1)*X1(I)+B(3,1)*X2(I)+B(4,1)*X3(I)+B(5,1)*X4(
a I)+B(6,1)*X1(I)**2+B(7,1)*X2(I)**2+B(8,1)*X3(I)**2+B(9,1)*X1(I)*
aX2(I)+B(10,1)*X1(I)*X3(I)+B(11,1)*X2(I)*X3(I)

c      COMPARA CON LOS VALORES EXPERIMENTALES

      ERR=(Y(I,1)-FEST(I))/Y(I,1)*100
      WRITE (2,200) FEST(I), Y(I,1), ERR
70     CONTINUE
      WRITE (2,100)
      WRITE (2,110) (B(I,1), I=1, IP)

C***** CÁLCULOS ESTADÍSTICOS *****
C      ANÁLISIS ANOVA

      SUM=0
      DO I=1, IEX
      SUM=SUM+Y(I,1)**2
      END DO
      SST=SUM
      SUM=0
      DO I=1, IEX
      SUM=SUM+Y(I,1)
      END DO
      YMIG=SUM/IEX

      SSM=YMIG**2*IEX

      SUM=0
      DO I=1, IEX
      SUM=SUM+(Y(I,1)-YMIG)**2
      END DO
      SSCOR=SUM

C      SUMA CUADRÁTICA DE LOS RESIDUOS
      SUM=0
      DO I=1, IEX
      SUM=SUM+(Y(I,1)-FEST(I))**2
      END DO
      SSR=SUM

C      SUMA CUADRÁTICA DE LOS EFECTOS DE LOS FACTORES
      SUM=0
      DO I=1, IEX
      SUM=SUM+(FEST(I)-YMIG)**2
      END DO
      SSFACT=SUM

      R2=SSFACT/SSCOR

      SUM=0
      DO I=52, 55
      SUM=SUM+Y(I,1)
      END DO
      YMIG1=SUM/(IREP+1)

      SLOF1=0

```

```

DO I=52,55
SLOF1=SLOF1+(YMIG1-FEST(I))**2
END DO

SUM=0
DO I=56,59
SUM=SUM+Y(I,1)
END DO
YMIG2=SUM/(IREP+1)

SLOF2=0
DO I=56,59
SLOF2=SLOF2+(YMIG2-FEST(I))**2
END DO

SUM=0
DO I=60,63
SUM=SUM+Y(I,1)
END DO
YMIG3=SUM/(IREP+1)

SLOF3=0
DO I=60,63
SLOF3=SLOF3+(YMIG3-FEST(I))**2
END DO

SUM=0
SUM=SLOF1+SLOF2+SLOF3
DO I=1,51
SUM=SUM+(Y(I,1)-FEST(I))**2
END DO
SSLOF=SUM

SUM=0
DO I=52,55
SUM=SUM+(Y(I,1)-YMIG1)**2
END DO
DO I=56,59
SUM=SUM+(Y(I,1)-YMIG2)**2
END DO
DO I=60,63
SUM=SUM+(Y(I,1)-YMIG3)**2
END DO

SSPE=SUM

F1=(SSFACT/(IP-1))/(SSR/(IEX-IP))
F2=(SSLOF/(54-IP))/(SSPE/(IEX-54))

WRITE (2,230)
WRITE (2,240) SSCOR,SSR,SSFACT
WRITE (2,241) SSPE,SSLOF,SST
WRITE (2,242) SSM,R2
WRITE (2,243) F1,F2

80  FORMAT(/,4X'MATRIZ DE VARIANZA-COVARIANZA',/)
90  FORMAT(8(1X,G9.3))
100 FORMAT(/,4X,'LOS PARÁMETROS ESTIMADOS SON:',/)
110 FORMAT(1X,6(G12.4,2X))
190 FORMAT(/,5X,'VALOR ESTIMADO',5X,'VALOR EXPERIM',8X,'% ERROR',/)
200 FORMAT(2X,E20.5,2X,F12.5,2X,E20.5)
230 FORMAT(/,4X,'SUMA DE CUADRADOS NECESARIOS PARA ANÁLISIS ANOVA',/)
240 FORMAT(2X,'SSCOR=',G12.6,/,2X,'SSR=',G12.6,/,2X,'SSFACT=',G12.6)
241 FORMAT(/,2X,'SSPE=',G12.6,/,2X,'SSLOF=',G12.6,/,2X,'SST=',G12.6)
242 FORMAT(/,2X,'SSM=',G12.6,'R2=',G12.6)
243 FORMAT(/,2X,'F1=',G12.6,'F2=',G12.6)

CLOSE (2)
STOP
END

C***** SUBROUTINAS NECESARIAS PARA EL PROGRAMA *****
C***** SUBROUTINA MULTIP.FOR *****

```

```

C      SUBROUTINA PARA MULTIPLICAR DOS MATRICES
C* *****
      SUBROUTINE MULTIP (NFILA,NCOLA,A,NFILB,NCOLB,B,C)

      DOUBLE PRECISION A,B,C
      INTEGER I,J,K,NFILA,NCOLA,NFILB,NCOLB
      DIMENSION A(11,63),B(63,11),C(11,11)
      IF (NCOLA.NE.NFILB) THEN
      WRITE (6,*)'LESMATRICES NO SE PUEDEN MULTIPLICAR'
      STOP
      END IF
      DO 10 I=1,NFILA
      DO 20 J=1,NCOLB
      SUM=0
      DO 30 K=1,NCOLA
      SUM=SUM+A(I,K)*B(K,J)
30    CONTINUÉ
      C(I,J)=SUM
20    CONTINUÉ
10    CONTINUÉ
      RETURN
      END

```

Programa utilizado para la optimización de la función polinómica hallada mediante el programa anterior:

```

C***** PROGRAMA OPTIMIZA. FOR *****
C      PROGRAMA PER DETERMINAR EL OPTIMO DE UNA FUNCIÓN
      USE MSIMSL
      INTEGER N,IBTYPE
      PARAMETER (N=2)
      INTEGER IPARAM(7),I
      REAL F,X(N),XGUESS(N),XSCALE(N),FSCALE,RE'ARAM(7),XLB(N),XUB(N)
      EXTERNAL FCN

      DATA FSCALE/1/,XGUESS/0,0,0,0/,XLB/-1,-1,-1,-1/,XUB/1,1,1,1/

      IBTYPE=0
      DO I=1,N
      XSCALE(I)=1
      END DO

      DO I=1,7
      IPARAM(I)=0
      RPARAM(I)=0
      END DO

C      LLAMADA ALA SUBROUTINA IMSL DE OPTIMIZACIÓN

      CALLBCONF(FCN,N,XGUESS,IBTYPE,XLB,XUB,XSCALE,FSCALE,IPARAM,RPAR
a AM,X,F)
      CALL FCN(N,X,F)
      WRITE(6,*) X,F
      END
C***** SUBROUTINAS NECESARIAS E'ARA EL PROGRAMA *****
C***** SUBROUTINA FCN.FOR *****
C      SUBROUTINA PARA EVALUAR LA FUNCIÓN
C*****
      SUBROUTINE FCN (N,X,F)
      INTEGER N
      REAL X(N),F,FOBJ

      FOBJ=4.040-0.01975*X(1)+0.4052*X(2)+0.03185*X(3)-0.03119*X(4)+0.
a 1039*X(1)**2-0.2646*X(2)**2-0.0925*X(3)**2+0.1390*X(1)*X(2)+0.07
a 35*X(1)*X(3)-0.1308*X(2)*X(3)
      F=-FOBJ
      RETURN
      END

```

8.15. Programa de control de la microbureta

Programa para comandar la microbureta desde el ordenador desarrollado en el lenguaje Borland Turbo C++ versión 3.0.

```

/* Programa para adicionar con la microbureta      */
/* Adición constante de x mL                        */

#include <stdlib.h>          /*Librería de funciones de utillería*/
#include <time.h>           /*Librería de funciones de fecha y hora*/
#include <string.h>        /*Librería de funciones para cadenas*/
#include <bios.h>          /*Librería de comunicaciones de hardware*/

#define COM1      0          /*Port serie COM1*/
#define ON 1          /*Ya su nombre lo indica*/
#define OFF 0          /*Son usadas por buretas y autocalib*/

int fin=0;                /*Variable de finalización de programa*/
unsigned char buretas=0;  /*Parámetro que indica si las microburetas est n o no
activadas*/
unsigned char accion=0;

time_t t_actual,         /*Tiempo en el instante actual*/
      t_crono,
      t_operacion;

int sig=3;
int dec, sign;
char *vol_rentat2;
char ret=13;
/*Valor de retorno de la subrutina de llenado y vaciado de las microburetas*/

/*Parámetros referidos a las microburetas*/

char carga[4]="00IP";    /*Matriz de entradas a las buretas*/
char descarga[4]="00OD"; /*Matriz de salidas de las buretas*/

void main(void)
{
void Adicion(void);
void Usar_bureta(int dec,char envio0[4],char envio1[4]);
void Teclas(void);

t_actual=time(NULL);
t_crono=time(NULL);
t_operacion=time(NULL);

do{
t_actual=time(NULL);

if (difftime(t_actual,t_operacion)>=15)
{
Adicion();
t_operacion=t_actual;
}

/*Buidat de la microbureta cada "segons" tminuts*/

t_actual=time(NULL);

if((buretas==ON)&&(accion==0))
{
t_crono=t_actual;
Usar_bureta(dec,descarga,vol_rentat2);
}
}
}

```

```
        accion=1;
    }

/*Emplenat de la bureta passat 10 segons del seu buidat*/

if ((difftime(t_actual,t_crono)>=10.0)&&(accion==1))
{
    Usar_bureta(dec,carga,vol_rentat2);
    accion=0;
    buretas=OFF;
}

Teclas();

}
while(fin==0);
return;
}

void Adicion(void)
{
float valor_afegit;
valor_afegit=125.0*2.5;
vol_rentat2=fcvt(valor_afegit,sig,&dec&sign) ;
buretas=ON;

return;
}

void Usar_bureta (intdec, char envio0 [4] , char envio1 [4])
{
    int n;
    char envioi [1]="N"; /*A eliminar*/
    bioscom(0, (0xA0|0x02|0x18|0x04), COM1);
    bioscom(1,envioi[0],COM1);
    bioscom(1,ret,COM1);
    for (n=1;n<4;n++)bioscom(1,envio0[n],COM1);
    for (n=0;n<dec;n++) bioscom(1,envio1[n],COM1);
    bioscom(1,ret,COM1);
    return;
}

void Teclas (void)
{
int teclapul;
if (bioskey(1)==0) return;

teclapul=bioskey(0);
switch(teclapul){
    case 0x11b:
        fin=1;
        break;
    case 0x1f13:
        system("command");
        break;
    default:
        break;
}

return;
}
```