



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



EXCELENCIA
SEVERO
OCHOA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN QUÍMICA SOSTENIBLE

**ZEOLITAS DESLAMINADAS COMO SOPORTE PARA LA
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS**

PRESENTADO POR:

Carlos Quilis Romero

DIRIGIDO POR:

Dr. Urbano Díaz Morales

Ana Torrejón Cabello (AINIA)

Septiembre 2019

Resumen

El soporte de enzimas proporciona estabilidad térmica y química, posibilita establecer un proceso continuo en la industria, así como permite la separación del biocatalizador del medio de reacción. Para ello, se sintetizan diferentes zeolitas deslaminadas del tipo ITQ-2 con diferente relación Si/Al para su utilización como soporte, así como también se estudia el anclado de las enzimas al soporte. Seguidamente, se realiza la caracterización completa de los complejos formados. Para comprobar la eficacia de los biocatalizadores soportados sintetizados, se estudia la reacción de hidrólisis del enlace peptídico de las proteínas presentes en la harina de cáñamo catalizada por la enzima subtilisin de *Bacillus licheniformis*.

Índice

| | | |
|-------|---|------------|
| I. | Introducción..... | pág. 1-20 |
| 1. | La catálisis | pág. 1-4 |
| 1.1 | Catalizadores homogéneos..... | pág. 2 |
| 1.2 | Catalizadores heterogéneos..... | pág. 2-3 |
| 1.3 | Biocatalizadores..... | pág. 3-4 |
| 2. | Inmovilización de biocatalizadores..... | pág. 4-7 |
| 2.1 | Inmovilización por adsorción..... | pág. 6 |
| 2.2 | Inmovilización por enlace covalente..... | pág. 6 |
| 2.3 | Inmovilización por enlace cruzado o reticulado..... | pág. 7 |
| 2.4 | Atrapamiento o encapsulación..... | pág. 7 |
| 3. | Zeolitas..... | pág. 8-13 |
| 3.1 | Propiedades de las zeolitas..... | pág. 8-10 |
| 3.2 | Concepto de precursor laminar..... | pág. 10-11 |
| 3.3 | Precursor laminar tipo MWW..... | pág. 11 |
| 3.4 | Zeolita MCM-22..... | pág. 12-13 |
| 3.5 | Zeolita ITQ-1..... | pág. 13 |
| 4. | Deslaminación de zeolitas..... | pág. 14-17 |
| 4.1 | Zeolita deslaminada ITQ-2..... | pág. 15-17 |
| 4.1.1 | Método de síntesis..... | pág. 16 |
| 4.1.2 | Actividad catalítica..... | pág. 16-17 |
| 4.1.3 | Utilidad como soporte..... | pág. 17 |
| 5. | La enzima “alcalasa” del organismo <i>Bacillus licheniformis</i> .. | pág. 18-20 |
| 5.1 | Clasificación de las enzimas..... | pág. 18-19 |
| 5.2 | Subtilisin de <i>Bacillus licheniformis</i> | pág. 19-20 |
| II. | Objetivos..... | pág. 21 |

| | |
|--|-------------------|
| III. Procedimiento experimental..... | pág. 22-36 |
| 1. Técnicas experimentales..... | pág. 22-25 |
| 1.1 Difracción de Rayos X (DRX)..... | pág. 22 |
| 1.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)..... | pág. 22-23 |
| 1.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV)..... | pág. 23 |
| 1.4 Análisis elemental..... | pág. 24 |
| 1.5 Análisis termogravimétrico (TG)..... | pág. 24 |
| 1.6 Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP) | pág. 24 |
| 1.7 Adsorción de N ₂ | pág. 25 |
| 2. Reactivos..... | pág. 26 |
| 3. Preparación de los materiales laminares..... | pág. 27-30 |
| 3.1 Precursor laminar tipo MWW para formar la zeolita MCM-22..... | pág. 27-28 |
| 3.2 Precursor laminar tipo MWW para la formación de la zeolita ITQ-1..... | pág. 28-29 |
| 3.3 Zeolita deslaminada ITQ-2..... | pág. 29-30 |
| 4. Modificación superficial de los materiales deslaminados..... | pág. 31 |
| 5. Anclado de la enzima en la zeolita..... | pág. 32 |
| 6. Hidrólisis de la harina de cáñamo con la enzima alcalasa soportada..... | pág. 33-36 |
| | |
| IV. Resultados y discusión..... | pág. 37-59 |
| 1. Síntesis y caracterización de los materiales laminares..... | pág. 37-50 |
| 1.1 Difracción de Rayos X..... | pág. 37-40 |
| 1.2 Resonancia magnética nuclear..... | pág. 40-43 |
| 1.3 Adsorción de N ₂ y volumen de microporo..... | pág. 44-45 |
| 1.4 Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente..... | pág. 45-46 |

| | |
|--|------------|
| 1.5 Análisis elemental..... | pág. 46-47 |
| 1.6 Análisis termogravimétrico..... | pág. 47-50 |
| 2. Funcionalización de la superficie de las zeolitas y anclado de las enzimas..... | pág. 51-58 |
| 2.1 Organosilano 3-aminopropiltrióxysilano..... | pág. 51-52 |
| 2.2 Organosilano 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio..... | pág. 52-53 |
| 2.3 Anclado de la enzima subtilisin..... | pág. 54-58 |
| 3. Hidrólisis de la harina de cáñamo..... | pág. 58-59 |
| | |
| V. Conclusiones..... | pág. 60 |
| | |
| VI. Agradecimientos..... | pág. 61 |
| | |
| VII. Bibliografía..... | pág. 62-64 |

I. Introducción

1. La catálisis

La catálisis es el proceso por el cual se aumenta la velocidad de formación de productos en una reacción química debido a la presencia de un catalizador. Un catalizador es una sustancia química que interacciona con uno o varios reactivos, provocando que la reacción entre los reactivos suceda con un mecanismo distinto, el cual tiene una energía de activación menor que la reacción en condiciones normales¹. Cuando finaliza la etapa de reacción, el catalizador se regenera y por tanto no se consume en el proceso. Esto provoca que con muy poca cantidad de catalizador se consigan elevadas conversiones.

Los catalizadores no modifican el rendimiento de una reacción, sino que únicamente aumentan la velocidad de la reacción. No se habla de catalizadores que disminuyan la velocidad de reacción ya que en caso de estar presente un compuesto que aumente la energía de activación, la reacción aún podría continuar por la ruta no catalítica². Los compuestos que de hecho reducen la velocidad de reacción o directamente evitan que esta ocurra no son catalizadores, sino que se denominan inhibidores químicos¹.

Los procesos catalíticos se clasifican según los estados físicos de catalizadores y reactivos. Así, se diferencia entre la catálisis homogénea donde tanto los catalizadores como los reactivos se encuentran en el mismo estado físico (normalmente en estado líquido) y la catálisis heterogénea donde el catalizador se encuentra en un estado físico diferente a uno o varios reactivos (el catalizador suele encontrarse en estado sólido mientras que uno o varios reactivos se encuentran en estado líquido o gas). Finalmente, se hace una mención especial a la biocatálisis, en la que el catalizador es una enzima o una célula viva y los reactivos están, en su mayoría, en estado líquido.

1.1 Catalizadores homogéneos

En catálisis homogénea tanto los catalizadores como los productos se encuentran en la misma fase, normalmente la fase líquida, es por esto que se basa en la química en disolución. El catalizador puede ser una molécula orgánica, aunque los catalizadores homogéneos que más han llamado la atención en los últimos años son los que se basan en compuestos organometálicos de transición.

Por ejemplo, la síntesis industrial del ácido acético se produce por catálisis homogénea utilizando catalizadores organometálicos basados en iridio(III)³.

Las mayores ventajas que presenta este tipo de catálisis son las altas selectividades a los productos deseados así como su elevada actividad catalítica, además de que las condiciones de reacción suelen ser suaves.

Sin embargo, presenta grandes desventajas, como la gran dificultad y el coste de separar el catalizador del medio de reacción y la baja estabilidad térmica de los catalizadores.

1.2 Catalizadores heterogéneos

En catálisis heterogénea el catalizador y alguno o varios reactivos se encuentran en distintas fases. Los reactivos son líquidos o gases los cuales se adsorben en el catalizador, el cual está en fase sólida. Normalmente las reacciones en catálisis heterogénea se producen en cinco pasos: 1_ Difusión de los reactivos desde el medio de reacción hasta el catalizador. 2_ Adsorción de uno o varios reactivos sobre el catalizador. 3_ Reacción de los compuestos adsorbidos con otros igualmente adsorbidos o que están en el medio de reacción. 4_ Desorción de los productos de reacción. 5_ Difusión de los productos al medio de reacción.

Las propiedades más importantes en los catalizadores sólidos son la superficie específica y la accesibilidad de los reactivos al centro activo, lugar encargado de producir el fenómeno de la catálisis.

Ejemplos de este tipo de catálisis son la producción de amoníaco (alrededor de 144 millones de toneladas al año⁴) la cual está catalizada por óxidos de hierro soportados sobre alúmina, la producción de ácido sulfúrico (compuesto químico más producido en el mundo) la cual se basa en la utilización de óxidos de vanadio o la producción de diésel y gasolina en las refinerías, donde los catalizadores de referencia son las zeolitas.

Las ventajas de este tipo de catálisis son la facilidad de separar el catalizador del medio de reacción y su fácil reutilización. También presentan una estabilidad térmica y un tiempo de vida altos.

Sin embargo, existen desventajas tales como la dificultad de predecir con exactitud el mecanismo y las propiedades de los centros activos, la desactivación del centro activo, las condiciones severas de reacción, los problemas de difusión y la actividad y selectividad variable. Aun con todo esto, la catálisis heterogénea es la preferida por la industria debido al ahorro económico que supone la recuperación y reutilización del catalizador.

1.3 Biocatalizadores

En biocatálisis la reacción se lleva a cabo en estado líquido, los reactivos son moléculas orgánicas y el catalizador es un sistema biológico, ya sea una célula viva o una enzima⁵.

La mayor ventaja que proporcionan los biocatalizadores es su gran selectividad al producto deseado, y esto lo consiguen gracias a estas tres propiedades:

- Quimioselectividad: Los biocatalizadores pueden distinguir unos grupos funcionales de otros, así unos grupos funcionales reaccionan mientras que otros grupos funcionales sensibles a reaccionar, que en una reacción normal se hubiesen transformado, esta vez son protegidos y no reaccionan.
- Regioselectividad: Gracias a la estructura tridimensional de los biocatalizadores, se pueden distinguir grupos funcionales del mismo tipo dependiendo de su localización interna en el reactivo.

- Enantioselectividad: Ya que casi todas las enzimas están formadas por L-aminoácidos, los biocatalizadores son quirales y por tanto permiten la transformación de reactivos proquirales en quirales ya que únicamente reaccionan con uno de los dos enantiómeros.

Las desventajas de los biocatalizadores son las mismas que las de los catalizadores homogéneos, sin embargo, estas desventajas se pueden minimizar al soportar los biocatalizadores en soportes sólidos, posibilitando así la fácil separación del biocatalizador y su posible reutilización, además de incrementar su resistencia mecánica y térmica⁶.

2. Inmovilización de biocatalizadores

La inmovilización de un catalizador consiste en la localización fija de dicho catalizador en un soporte sólido manteniendo, en la medida de lo posible, la actividad catalítica original. Los biocatalizadores se han inmovilizado en una gran variedad de soportes sólidos, tales como resinas, geles orgánicos, sílices⁷ o más recientemente, sobre materiales mesoporosos tipo MCM-41 o SBA-15^{8,9}.

Esta inmovilización trae consigo ciertas ventajas:

- Permite trabajar en continuo, ya que las enzimas quedan retenidas en el soporte y esto permite la entrada continua de alimentación al reactor sin la pérdida del catalizador.
- En el caso de trabajar con un reactor en discontinuo, se consigue la reutilización del catalizador.
- Aumenta la productividad en reactores en continuo, al permitir la entrada constante de alimentación
- En el caso de trabajar con enzimas, se adquiere una resistencia a la desnaturalización (pérdida de la estructura terciaria y, por tanto, pérdida de la actividad catalítica) y a la proteólisis (degradación de proteínas por acción de peptidasas).

- Facilita la eliminación de contaminantes biológicos que puedan estar presentes en la alimentación, pues estos contaminantes estarían disueltos mientras que el catalizador biológico se encontraría soportado.

Sin embargo, la inmovilización de biocatalizadores también presenta ciertas desventajas:

- La actividad de la célula o enzima se puede ver seriamente comprometida con el método de inmovilización, perdiendo parte o la totalidad de su actividad.
- Si la difusión de reactivos y productos en el biocatalizador inmovilizado es más lenta que la velocidad de transformación de este, pueden crearse ciertas limitaciones en la actividad catalítica.
- La inmovilización de biocatalizadores añade una nueva etapa al proceso, lo que aumenta la complejidad en la preparación del sistema catalítico, además de aumentar el consumo de disolventes, hecho que puede comprometer la sostenibilidad del proceso.

Existen diversos tipos de métodos de inmovilización de enzimas atendiendo al mecanismo empleado^{10,11}:

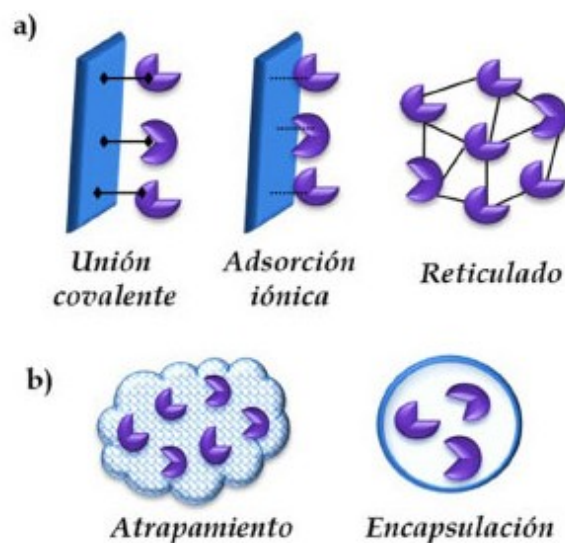


Figura 1: Tipos de inmovilización de una enzima. a) Mediante enlace químico, b) Mediante retención física.

2.1 Inmovilización por adsorción

El método por adsorción es el más simple y consiste en la interacción por puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals entre el biocatalizador y el soporte que presenta una superficie activa. Para ello, simplemente se ponen en contacto el soporte y una disolución que contenga al biocatalizador y, después de un tiempo, el biocatalizador se habrá anclado electrostáticamente a la superficie del soporte. La gran ventaja de este método es que la inmovilización no suele afectar a la actividad de las enzimas ni a la viabilidad de las células.

La limitación de este tipo de inmovilización es que se lleva a cabo gracias a la creación de enlaces débiles y, por tanto, un cambio de pH, de temperatura o de fuerza iónica del medio puede provocar la desorción del biocatalizador debido a la reversibilidad del proceso.

2.2 Inmovilización por enlace covalente

El método por enlace covalente consiste en la interacción covalente entre el biocatalizador, generalmente es una enzima ya que las células se pueden ver perjudicadas en la reacción de inmovilización, y un soporte que normalmente se encuentra previamente funcionalizado con una molécula orgánica que se encargará de hacer de puente entre el soporte y la enzima.

Este método necesita de más etapas que el método de adsorción, sin embargo, debido a que el enlace formado es fuerte, hay menos posibilidades de que se produzca la desorción de la enzima.

2.3 Inmovilización por enlace cruzado o reticulado

En ambos casos se logra la inmovilización del biocatalizador sin usar un soporte sólido, sino que es el propio biocatalizador el cual es capaz de agregarse, ya sea mediante el uso de un agente externo o por acción del propio biocatalizador, formando un aglutinado insoluble que presenta propiedades similares a un catalizador inmovilizado en un soporte sólido.

Si se utiliza un compuesto químico para lograr esta agregación, se habla de inmovilización por enlace cruzado. Esto se logra mediante la utilización de moléculas de bajo peso molecular con grupos funcionales que permiten el enlace con el biocatalizador. Un ejemplo es la utilización de glutaraldehído, el cual presenta dos grupos funcionales aldehído que se enlazan a los grupos amina de dos enzimas distintas, quedando estas dos enzimas unidas una a la otra.

La ventaja principal de este método es su sencillez, sin embargo este método es susceptible a pequeñas variaciones en la temperatura y el pH del medio de reacción.

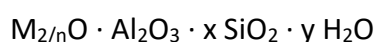
2.4 Atrapamiento o encapsulación

Este método se basa en la retención de los biocatalizadores en membranas semipermeables de poro controlado que permiten el paso de reactivos y productos. Sin embargo este método presenta grandes limitaciones debido a la posible pérdida de actividad del biocatalizador y a los problemas asociados a la baja transferencia de masa que pueden presentar reactivos y productos.

En este trabajo se ha elegido trabajar con la inmovilización de enzimas por adsorción sobre un soporte sólido debido a la sencillez del proceso y a la retención de la actividad de las enzimas.

3. Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos microporosos cristalinos constituidas por átomos de Si y Al coordinados tetraédricamente a cuatro átomos de oxígeno que pueden ser encontradas en la naturaleza o pueden ser sintetizadas y utilizadas en el ámbito industrial. En diciembre de 2018 se habían registrado 245 estructuras zeolíticas diferentes, pudiéndose encontrar únicamente 40 de estas estructuras zeolíticas en la naturaleza¹² y su composición química responde a la fórmula general:



Siendo M^{n+} un catión alcalino o alcalinotérreo, normalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} o Ba^{2+} , que se encarga de compensar la carga negativa de la red cristalina y x refiriéndose a la relación SiO_2/Al_2O_3 la cual va desde 2 a 10 en zeolitas naturales y de 1 a infinito en zeolitas sintéticas. Generalmente, en la estructura de las zeolitas no se encuentran enlaces Al-O-Al y esto es debido a que las cargas negativas producidas por la presencia de aluminio en red son más estables si se encuentran aisladas que si se encuentran formando clústeres de carga negativa. A esto se le conoce como la regla de Loewenstein¹³, conociéndose algunas excepciones como las zeolitas bichulita y sodalita.

La Comisión de Estructuras de la Asociación Internacional de Zeolitas (IZA) ha ideado un método de clasificación de zeolitas que consiste en un código de tres dígitos para clasificar zeolitas con la misma topología en la conectividad de los tetraedros sin tener en cuenta la simetría o tamaño de la celda unidad, las cuales varían con la composición química.

3.1 Propiedades de las zeolitas

Gracias a su composición química y estructura, las zeolitas presentan propiedades muy interesantes que despiertan gran interés en la industria:

- Características ácido-base: Las cargas negativas presentes en la red cristalina y generadas por la presencia de aluminio son compensadas por cationes inorgánicos y orgánicos, sin embargo, si se sustituyen estos cationes por

protones (ya sea por calcinación o por intercambio catiónico) se consigue crear centros ácidos tipo Brönsted en la zeolita. La fuerza y cantidad de estos centros ácidos depende de la relación Si/Al. Así, cuanto mayor es esta relación menos centros ácidos habrá en la red pero tendrán una elevada fuerza ácida. Por el contrario, cuanto menor es la relación Si/Al en una zeolita, más centros ácidos presentará, aunque estos serán de baja fuerza ácida.

- Microporosidad: La estructura de las zeolitas está formada por canales y cavidades y lo que da acceso a estos canales son ventanas (poros) formadas por un número determinado y uniforme de tetraedros. Según el tamaño del poro se clasifican las zeolitas como de poro pequeño (8 tetraedros, 8 MR), de poro mediano (10 MR), de poro grande (12 MR) y de poro extragrande (más de 12 MR). Esta característica confiere a las zeolitas la propiedad de tamiz molecular, pues son capaces de dejar entrar moléculas selectivamente atendiendo al tamaño de éstas y del poro de las zeolitas. La capacidad de adsorción de moléculas también viene controlada por la relación Si/Al, pues esta relación modifica la hidrofobia/hidrofilia de la red provocando así la mayor o menor adsorción de moléculas polares y apolares.
- Intercambio iónico: La presencia de cationes con gran movilidad en la red cristalina de las zeolitas permite que éstos puedan ser intercambiados por otros cationes. Cuanto menor es la relación Si/Al mayor es la cantidad de cationes presentes en la estructura y por tanto mayor capacidad de intercambio tendrá la zeolita.
- Catálisis: Las aplicaciones más importantes de las zeolitas se deben principalmente a su capacidad para catalizar reacciones ácidas. Son ampliamente utilizadas en el proceso del refinado del petróleo, desde el craqueo de hidrocarburos a la isomerización de olefinas. Su gran popularidad como catalizadores ácidos se debe principalmente a la morfología de las zeolitas, siendo de gran importancia el tamaño y disposición de los canales y cavidades, así como el tamaño de poro, pues esto va a condicionar la difusión de reactivos y productos al igual que va a favorecer o no la formación de intermedios de

reacción. A esta característica se le conoce como selectividad de forma y uno de los ejemplos más estudiados es la alquilación del tolueno con metanol utilizando la zeolita ZSM-5. En condiciones estándar, esta reacción daría una mezcla de productos de orto-, meta- y para-xileno. Sin embargo, gracias al tamaño de los canales de la zeolita se obtiene selectivamente el para-xileno ya que este es capaz de difundir mucho más rápido que sus otros dos isómeros.

Las zeolitas también se utilizan en química fina por su capacidad para catalizar reacciones básicas como, por ejemplo, la condensación de Knoevenagel entre el benzaldehído y derivados de éster malónico.

Aparte de reacciones tipo ácido-base, las zeolitas también pueden catalizar reacciones redox cuando se ha sustituido parte del silicio por elementos de transición como el Ti o el V. También es posible introducir átomos metálicos en el interior de las zeolitas, creando así catalizadores bifuncionales, pues se tiene la capacidad de catalizar reacciones ácido-base de las zeolitas y la capacidad de catalizar reacciones redox gracias a los metales introducidos. Un ejemplo es la utilización de Pd o Pt soportados sobre una zeolita para dar reacciones de deshidrogenación.

3.2 Concepto de precursor laminar

Dentro del amplio grupo de las zeolitas, se pueden encontrar algunas zeolitas cuya estructura final se obtiene por calcinación de un intermedio estable denominado precursor zeolítico laminar. Este precursor se compone de láminas de zeolita individuales separadas unas de otras por cationes y moléculas de solvatación, lo que permite llevar a cabo procesos previos a la síntesis final de la zeolita como el hinchamiento, la pilarización o la exfoliación, creando así materiales con poros de mayor tamaño que exhiben una mayor accesibilidad sin alterar las propiedades características de las zeolitas.

Cuando estos precursores laminares son sometidos a un proceso de calcinación se produce la unión de las láminas formando así la estructura tridimensional típica de las zeolitas¹⁴.

De las más de 250 estructuras zeolíticas descubiertas, muy pocas presentan características laminares, siendo las más estudiadas las del tipo MWW, como la zeolita MCM-22, y las del tipo FER, como la zeolita natural ferrierita. Nos centraremos en las del tipo MWW.

3.3 Precursor laminar del tipo MWW

Este material está formado por láminas de 2.5 nm de espesor con un único canal sinusoidal constituido por poros de 10 miembros (10 MR). La superficie del material laminar está plagada de una gran cantidad de grupos silanol (-SiOH) los cuales, al producirse la calcinación, reaccionan con los grupos silanol de las láminas adyacentes, condensando y formando así la estructura tridimensional típica de las zeolitas. Esta condensación produce un segundo sistema de poros constituidos por cavidades delimitadas por anillos de 12 miembros (12 MR) adquiriendo así dos sistemas de poros independientes de diferente tamaño, lo cual le confiere a este material una gran versatilidad.

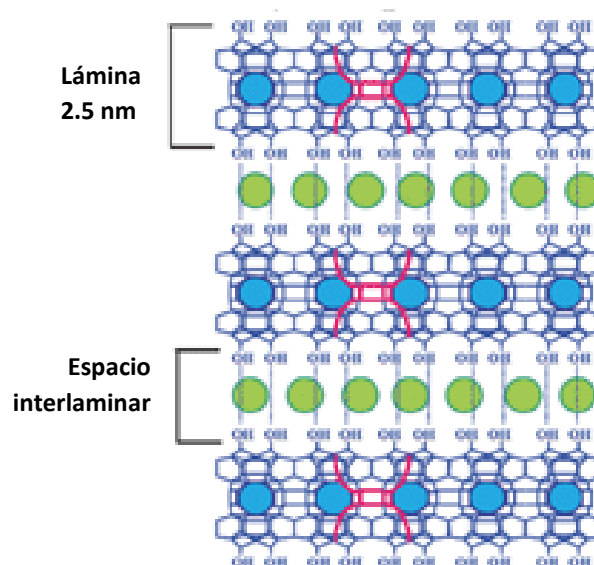


Figura 2: Esquema de la estructura del precursor laminar MWW¹⁵.

Este precursor laminar da origen a varios tipos de zeolitas tridimensionales como son la ERB-1, ITQ-1, SSZ-25, MCM-22 y PSH-3. Todas estas zeolitas son isoestructurales y se obtienen variando las condiciones de síntesis. Nos vamos a centrar en las zeolitas MCM-22 e ITQ-1.

3.4 Zeolita MCM-22

En 1990 Rubin y col. patentaron una zeolita denominada MCM-22¹⁶ la cual tenía la misma estructura que la zeolita denominada PSH-3 descrita en 1984 por Puppe y col¹⁷. Ambas zeolitas utilizaban como agente director de estructura o “template” hexametilenimina (HMI), logrando así una estructura cristalina formada por dos sistemas de poros independientes, ambos accesibles por anillos de 10 miembros (10 MR). Leonowicz y col. propusieron que la estructura cristalina de la zeolita MCM-22 estuviese formada por un sistema de poros el cual era un canal sinusoidal y bidereccional de 0.52 nm, mientras que el otro sistema fuese una serie de supercavidades con diámetro interno de 0.71 nm, altura de 1.82 nm y estarían delimitadas por anillos de 12 miembros (12 MR)¹⁸.

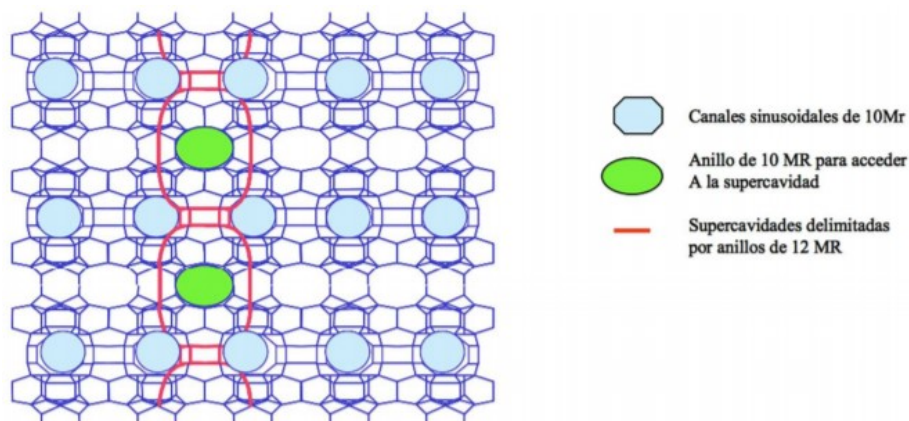


Figura 3: Esquema de la estructura de la zeolita MCM-22.

La zeolita MCM-22 se sintetiza en medio alcalino, utilizando sodio como catión de compensación de carga¹⁹, a temperaturas entre 135 a 150 °C y la reacción finaliza entre los 7 y 12 días. Es importante realizar la síntesis con agitación permanente ya que, en caso de realizar la síntesis en medio estático, no se obtiene una buena solubilidad de la sílice, lo que provoca que no se realice una cristalización satisfactoria de la zeolita

MCM-22 y por tanto se favorece la aparición de otras fases como la Mordenita, la Ferrierita o la zeolita MCM-49^{20,21}.

Entre las aplicaciones de la zeolita MCM-22 encontradas en la bibliografía, destacan las capacidades de esta zeolita para catalizar la aromatización de n-butano²², la isomerización de m-xileno, la alquilación de tolueno, la hidroisomerización de n-decano, el cracking de n-heptano²³ o la alquilación de benceno²⁴.

3.5 Zeolita ITQ-1

En el Instituto de Tecnología Química se patentó un material microporoso denominado ITQ-1 que presentaba una estructura cristalina idéntica a las zeolitas MWW, siendo la característica destacable de este material que era puramente silíceo, es decir, era una zeolita que no presentaba en su composición tetraedros de aluminio²⁵.

La síntesis se llevó a cabo utilizando dos moléculas orgánicas como agentes directores de estructura (ADE). Estas eran los hidróxidos de la hexametilamina (HMI) y del N,N,N-trimetiladamantamonio (TMAda) y, junto a cationes de sodio, eran capaces de estabilizar la estructura cristalina polianiónica así como facilitar la reproducibilidad de la síntesis²⁶. La presencia de dos moléculas orgánicas se debe a que las moléculas de TMA⁺ son demasiado voluminosas para estabilizar los canales sinusoidales de 10 MR de la estructura MWW y por tanto se necesita una molécula de menor tamaño, como es la molécula HMI.

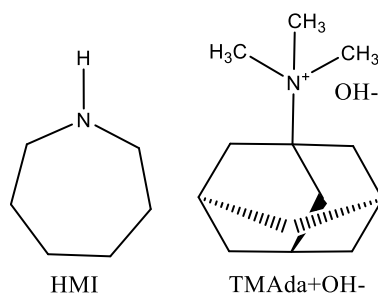


Figura 4: Estructura de los agentes directores de estructura Hexametilamina (HMI) y el hidróxido de N,N,N-trimetiladantamonio (TMAda⁺OH⁻).

4. Deslaminación de zeolitas

Como se ha explicado anteriormente, el precursor de las zeolitas tipo MWW es un precursor laminar y, por tanto, se compone de una repetición de láminas individuales situadas en planos paralelos del espacio las cuales están unidas entre sí por fuerzas débiles a lo largo del plano perpendicular al ordenamiento de las láminas. Estas fuerzas de unión interlaminar débiles permiten la modificación del precursor para obtener una zeolita con propiedades adicionales. Un ejemplo de ello son los materiales pilareados, los cuales presentan mesoporosidad debido a la incorporación de iones compensadores de carga grandes que funcionan como “pilares” conectando una lámina con otra, permitiendo así evitar la unión covalente de las láminas durante la eliminación de los ADE por calcinación²⁷.

Sin embargo, se puede llegar más lejos siendo el siguiente paso la separación completa de las láminas, lo que se conoce como el proceso de deslaminación. Durante este proceso se consigue la separación total de las láminas unidas por fuerzas débiles consiguiendo una dispersión total de las láminas²⁸. La característica más atractiva de estos materiales es la elevada superficie externa perfectamente ordenada, lo que permite la interacción catalítica con moléculas de gran tamaño molecular así como la posibilidad de ser utilizados como soportes de moléculas por su gran área superficial.

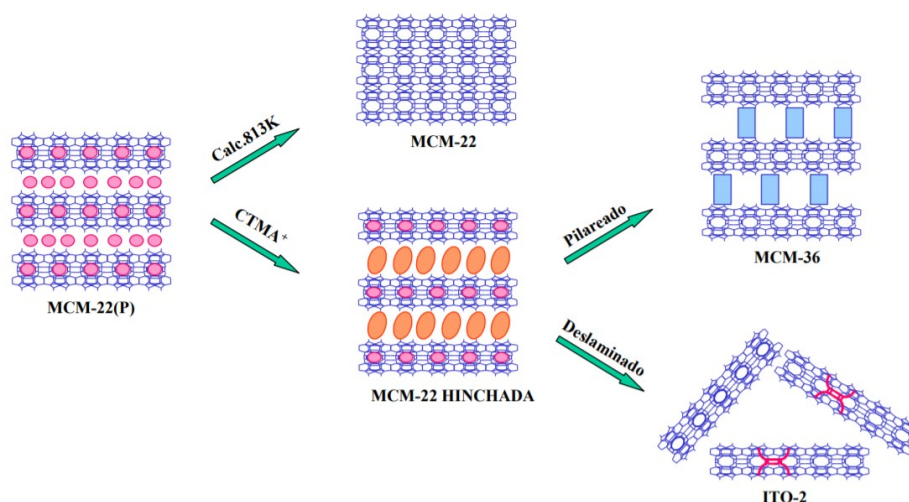


Figura 5: Esquema de la transformación del precursor laminar tipo MWW hasta la zeolitas MCM-22, la zeolita pilareada MCM-36 y la zeolita deslaminada ITQ-2²⁹.

El deslaminado de una zeolita se puede conseguir por diferentes métodos³⁰, siendo la utilización de varios métodos al mismo tiempo la forma más eficaz para un correcto deslaminado. Los métodos para la deslaminación se pueden clasificar en:

- Procesos mecánicos: Se consigue la exfoliación de las láminas mediante métodos físicos, como pueden ser la utilización de sistemas de ultrasonidos³¹, mecanismos de agitación, procesos de liofilización, etc.
- Procesos químicos: Se favorece la solvatación del catión interlaminar lo que provoca un aumento del tamaño de este y, por tanto, la separación de las láminas debido al debilitamiento de las fuerzas de atracción³².
- Intercalación de moléculas: Se introducen moléculas de gran tamaño lo que provoca la aparición de intermedios con las láminas separadas³³, lo cual ayuda a su desorden.

4.1 Zeolita deslaminada ITQ-2

La primera zeolita deslaminada que se consiguió describir fue la zeolita ITQ-2³⁴, la cual fue sintetizada por Corma y col. en 1997. Esta zeolita se sintetizó a partir del hinchamiento y deslaminado del precursor laminar tipo MWW del cual se ha hablado anteriormente consiguiendo láminas individuales de aproximadamente 2.5 nm de espesor proporcionando así una elevada área superficial ($>600 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) al material.

Estas láminas están formadas por una distribución hexagonal de unas unidades estructurales a modo de “copas”, las cuales se encuentran distribuidas a cada lado de las láminas. Las copas tienen una apertura formada por un anillo de 12 MR y cada copa está unida a la contraria mediante un doble anillo de 6 MR quedando unidas por su base. Por último, existe un sistema de canales sinusoidales de 10 MR que discurre alrededor de las copas por el interior de cada lámina.

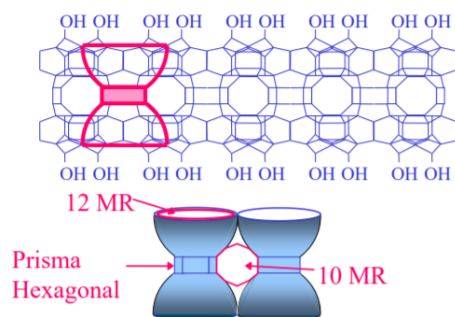


Figura 6: Esquema de la estructura de la zeolita deslaminada ITQ-2.

4.1.1 Método de síntesis

Para la síntesis de la zeolita deslaminada ITQ-2, primeramente se somete al precursor tipo MWW a una “etapa de hinchamiento” la cual consiste en introducir una molécula orgánica larga del tipo alquilamonio, normalmente hidróxido de hexadeciltrimetilamonio (CTMA^+OH^-) o tetrabutilamonio (TBA^+OH^-), con el objetivo de conseguir un distanciamiento interlaminar el cual se puede observar mediante difracción de rayos X. A continuación, se somete a la zeolita a una segunda etapa, la “etapa de deslaminado” la cual tiene como objetivo separar por completo a las láminas que ya estaban distanciadas a causa de la primera etapa. Para ello, se somete a la zeolita hinchada a un tratamiento energético, preferiblemente ultrasonidos (50 W, 50 Hz). Finalmente y, tras una etapa de lavado y centrifugado, se calcina el producto para eliminar la materia orgánica y así obtener la zeolita deslaminada ITQ-2.

4.1.2 Actividad catalítica

En cuanto a su actividad catalítica, se ha comprobado que el proceso de deslaminación no modifica la actividad de la zeolita en aquellos casos donde la catálisis se realizaba de forma efectiva, como por ejemplo en la reacción de cracking de n-decano. Esto es debido a que no se modifica el carácter ácido de los centros catalíticos en el proceso del deslaminado. En cambio, sí que se ha reportado un aumento del valor de la constante cinética cuando se compara una zeolita tipo MWW con la zeolita deslaminada ITQ-2 para las reacciones de cracking de 1,3-diisopropilbenceno (DIPB) y

gasoil^{35,36}. Este aumento de la actividad catalítica se debe principalmente a la gran accesibilidad que proporciona la zeolita deslaminada a moléculas grandes como las anteriormente nombradas, evitando así los problemas de difusión asociados al cracking de estas moléculas al utilizar un catalizador tipo MWW.

4.1.3 Utilidad como soporte

La zeolita ITQ-2 ha despertado un gran interés como soporte inorgánico de enzimas. Uno de los grandes problemas de las enzimas es su baja estabilidad térmica, lo cual dificulta tanto su reciclaje como su aplicación a nivel industrial y es por esto que desde hace mucho tiempo se vienen buscando soportes que mejoren la estabilidad térmica de las enzimas sin perjudicar su actividad catalítica, con el fin de asegurarse la reutilización y reciclaje de estas. Se han utilizado una gran variedad de soportes tales como geles inorgánicos, resinas, sílices o, más recientemente, tamices moleculares mesoporosos como MCM-41 o SBA-15^{37,38}. Sin embargo, la estabilidad limitada en medio acuoso de estos materiales, así como la posibilidad de que se bloqueen sus canales debido al amplio volumen de las enzimas provocan que su función como soporte para catálisis enzimática sea bastante reducida.

Es por esto que la zeolita deslaminada ITQ-2 funciona como soporte para enzimas, pues su elevada superficie externa ($>700 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), su gran accesibilidad y su distribución regular de grupos silanoles la convierten en un soporte enzimático ideal.

5. La enzima “alcalasa” del organismo *Bacillus licheniformis*

5.1 Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican según la reacción que son capaces de catalizar y, para ello, se les asigna a cada tipo de enzima un código numérico de cuatro cifras llamado número EC (Enzyme commission number)³⁹.

El primer número EC es el más importante, pues identifica el grupo al que pertenece la enzima y por tanto la reacción química que cataliza. Están indicados en la Tabla 1:

Tabla 1: Clasificación de las enzimas según el primer número EC.

| Grupo | Reacción catalizada | Reacción típica |
|----------------------------------|--|--|
| EC 1. Oxidorreductasas | Reacciones rédox y de transferencia de átomos de H, O o electrones desde un compuesto a otro | $AH + B \rightarrow A + BH$ (reducido) $A + O \rightarrow AO$ (oxidado) |
| EC 2. Transferasas | Transferencia de un grupo funcional tipo metil-, acil-, amino- o fosfato desde un compuesto a otro | $AB + C \rightarrow A + BC$ |
| EC 3. Hidrolasas | Formación de dos productos por la hidrólisis de un sustrato | $AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$ |
| EC 4. Liasas | Adición o eliminación no hidrolítica de grupos funcionales de un sustrato. Puede haber rotura de enlaces C-C, C-N, C-O o C-S | $RCO_2COOH \rightarrow RCOH + CO_2$ |
| EC 5. Isomerasas | Isomerización de una molécula | $AB \rightarrow BA$ |
| EC 6. Ligasas | Unión de dos moléculas con síntesis de nuevos enlaces tipo C-C, C-N, C-O o C-S con la rotura simultánea de una molécula de ATP | $X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + Pi$ |

De estos seis tipos de enzimas, una de las más interesantes a nivel industrial son las hidrolasas (EC. 3) ya que son el único grupo que no necesitan un cofactor, un compuesto auxiliar que interviene en la reacción, para realizar la reacción catalítica, lo que se traduce en procedimientos más simples y baratos.

5.2 Subtilisin de *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis es una bacteria de tipo Gram + que habita normalmente en aguas y suelos y que utiliza la liberación de esporas como mecanismo de conservación y proliferación. Además, es una bacteria anaeróbica facultativa, lo que le permite vivir y desarrollarse en presencia y ausencia de oxígeno. Esta bacteria se utiliza a nivel industrial para la fabricación de antibióticos, productos químicos y enzimas a partir de sus productos extracelulares⁴⁰.

Una de las enzimas procedentes de la bacteria *Bacillus licheniformis* más utilizada es la enzima subtilisin (también conocida como alcalasa), la cual es una serin proteasa alcalina que es usada ampliamente en detergentes. Al ser una serin proteasa alcalina, tiene la función de catalizar la hidrólisis de enlaces peptídicos en péptidos y proteínas presentando en su centro activo un aminoácido tipo serina el cual resulta esencial para la reacción catalítica⁴¹. Es capaz de trabajar a pH y temperaturas altos y es por esto que es utilizada en la industria como aditivo en detergentes. Su número EC es el 3. 4. 21. 62 el cual la identifica como una hidrolasa (3.), que actúa sobre enlaces peptídicos (3. 4.), en cuyo centro activo se encuentra un aminoácido serina (3. 4. 21.) y que pertenece a la subclase subtilisina.

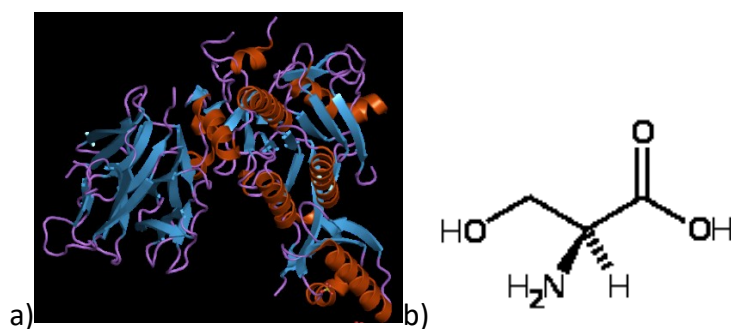


Figura 7: a) Estructura tridimensional de la enzima subtilisin. b) Estructura del aminoácido serina.

Por último, aparte de ser utilizada en detergentes, la enzima subtilisin también se utiliza junto a la enzima flavourizima, otra peptidasa, para romper completamente todos los enlaces peptídicos de las proteínas^{42, 43}. Por una parte, la enzima subtilisin se encarga de romper las grandes moléculas de proteína en pequeños residuos peptídicos de pocos aminoácidos y, por otra parte, la enzima flavourizima se encarga de romper los enlaces peptídicos restantes de estos residuos peptídicos, consiguiendo así la rotura total de las moléculas iniciales. La utilización de ambas enzimas conjuntamente despierta gran interés debido a la posibilidad de conseguir aminoácidos libres a partir de proteínas vegetales para luego volver a ensamblarlos para conseguir proteínas animales de origen vegetal, hecho que es muy atractivo para la industria alimenticia.

Ya que la utilización de esta enzima junto a la enzima flavourizima está ampliamente extendida en la industria alimenticia, se pretende mejorar la reutilización y reciclaje de la enzima alcalasa con el fin de abaratar costes y conseguir que este tipo de reacciones sea más sostenible.

II. Objetivos

Como se ha visto a lo largo de la introducción, las zeolitas deslaminadas presentan todas las características y propiedades catalíticas de las zeolitas 3D más convencionales, pero además presentan una elevada área superficial y una gran accesibilidad, lo que las hace idóneas para la inmovilización de enzimas, como la estudiada en el presente trabajo, la enzima subtilisin proveniente de la bacteria *Bacillus licheniformis*.

Por tanto, los objetivos de esta tesis son:

- Síntesis del precursor laminar de la zeolita MCM-22 con diferentes relaciones Si/Al.
- Síntesis del precursor laminar pura sílice de la zeolita ITQ-1.
- Exfoliación de los precursores obtenidos para la síntesis de la zeolita deslaminada ITQ-2 con diferentes relaciones Si/Al.
- Caracterización de todas las zeolitas sintetizadas.
- Recubrimiento de la superficie de la zeolita ITQ-2 con un organosilano que facilite posteriormente el anclaje de enzimas.
- Anclado de la enzima subtilisin a la zeolita ITQ-2 modificada mediante enlaces electrostáticos.
- Realizar pruebas catalíticas del complejo zeolita-enzima en reacción.
- Estudiar cómo afecta la relación Si/Al de la zeolita soporte en la reacción de hidrólisis enzimática.

III. Procedimiento experimental

1. Técnicas de caracterización

1.1 Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una de las técnicas más importantes cuando se trabaja con materiales cristalinos como las zeolitas, ya que cada fase cristalina posee un difractograma único que la identifica. Esta técnica permite obtener información acerca de la cristalinidad y orden a largo alcance de una muestra sólida cristalina. Esta técnica se basa en cómo los átomos situados en los planos reticulares del cristal reflejan los rayos X, de forma que se cumple la siguiente ecuación:

$$\lambda=2d(hkl)\text{sen}\theta \quad (1)$$

Donde λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d es la distancia que existe entre los planos de reflexión con índices de Miller ($h\ k\ l$) y θ el ángulo de incidencia de la radiación sobre el cristal.

La obtención de los difractogramas se realizó utilizando un difractómetro CUBIX PRO PANalytical, equipado con un detector PANalytical X'celerator. Se usó radiación de rayos X de $\text{Cu K}\alpha$, y un voltaje e intensidad de tubo de 45 kV y 40 mA respectivamente. El rango de medida fue de 2° a 40.0° (2θ), con un paso de 0.020° (2θ) y un tiempo de medida de 0.3 segundos por paso. Para la interpretación de los difractogramas se empleó el programa X'Pert HighScore Plus.

1.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es, probablemente, la técnica más importante en química orgánica, aunque también es ampliamente utilizada cuando se trabaja con materiales sólidos. Su importancia radica en que puede analizar tanto sólido como líquidos, además de que es capaz de aportar información del entorno químico local de los núcleos estudiados. Se basa en la interacción entre el campo magnético nuclear y un campo magnético aplicado. Cuando una muestra se introduce en un campo magnético,

se produce un desdoblamiento energético de los estados nucleares del átomo estudiado y a esto se le conoce como el efecto Zeeman.

El equipo genera un espectro para cada tipo de núcleo, siempre que este tenga un spin nuclear distinto de cero, y el entorno químico del núcleo estudiado aparece representado por una señal a un desplazamiento químico determinado.

En este trabajo se ha utilizado el RMN de líquidos para confirmar la correcta preparación del director de estructura 1-trimetiladamantamonio utilizando para ellos los espectros de ^1H y ^{13}C y el RMN de sólidos para estudiar la estructura de las zeolitas sintetizadas utilizando para ello los núcleos ^{29}Si y ^{13}C .

1.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV)

Esta técnica se ha utilizado para cuantificar la cantidad de enzima que se ha conseguido soportar en las zeolitas laminares. La espectroscopía UV se basa en la interacción entre los electrones de valencia de las moléculas de la muestra con radiación perteneciente al rango del ultravioleta cercano, la región visible y la región del infrarrojo cercano (entre 380 nm y 780 nm). Cuando estos electrones absorben una cantidad concreta de energía son capaces de pasar del estado fundamental a un estado excitado y, cuando estos se relajan y vuelven al estado fundamental, es posible que la diferencia de energía se libere en forma de un fotón cuya longitud de onda corresponde a la diferencia energética de los niveles involucrados. Como cada molécula tiene unas transiciones moleculares específicas, se pueden realizar estudios cualitativos y cuantitativos.

El análisis de los datos se basa en la ley de Lambert-Beer y para la realización de los espectros se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

1.4 Análisis Elemental

Con esta técnica se consigue saber el porcentaje en peso de los átomos de C, N, H y S presentes en la muestra. A partir de dichos datos y calculando la relación C/N se puede determinar si el compuesto director de estructura de una zeolita se encuentra intacto en el interior del material o, por el contrario, si ha sufrido algún tipo de degradación durante la síntesis.

La técnica se basa en la oxidación total de la materia orgánica para formar N_2 , CO_2 y H_2O mediante su combustión a $1000^\circ C$. Los gases formados se analizan con el cromatógrafo de gases EA 1108 CHNSO de Fisons Instruments.

1.5 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico permite cuantificar la pérdida de masa que sufre una muestra sólida a medida que se va aumentando la temperatura hasta un valor establecido. En el caso de las zeolitas, las pérdidas iniciales se deben a la evaporación de agua y más tarde a la eliminación de los agentes directores de estructura.

Los análisis térmicos se efectuaron sobre zeolitas en el rango de temperaturas de $20-800^\circ C$, a una velocidad de calentamiento de $10^\circ C/min$ y bajo un flujo de aire de $20 mL/min$. El equipo empleado fue un analizador Mettler Toledo TGA/SDTA851e.

1.6 Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP)

Esta técnica se basa en la emisión de radiación por parte de un elemento al producirse una relajación desde un estado excitado por un plasma al estado fundamental. La longitud de onda de la radiación emitida es característica de cada elemento y la intensidad de la radiación proporciona, siguiendo la ley de Lambert-Beer, la concentración de dicho elemento. Las medidas se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de emisión de plasma acoplado Varian 715-ES.

1.7 Adsorción de N₂

Para determinar las propiedades texturales de las zeolitas se ha utilizado las isothermas de adsorción/desorción de N₂ a la temperatura del nitrógeno líquido (77K). En concreto, se ha utilizado esta técnica para conocer el volumen de microporo, la superficie específica y la distribución de tamaño de poro.

Para ello, primeramente la muestra tiene que ser tratada, pastillando y tamizándola para que tenga un tamaño de partícula entre 0.4 y 0.6 mm. A continuación, por desgasificación a 400°C y durante varias horas se asegura que los poros se encuentren vacíos y libres de cualquier molécula que pudiese estar retenida en su interior. El equipo utilizado para realizar las isothermas fue el equipo Micrometrics ASAP 2420.

2. Reactivos

Los reactivos utilizados para la síntesis de todos los materiales laminares, así como los reactivos utilizados para realizar las pruebas catalíticas con las enzimas se listan a continuación:

Agua MiliQ, Milipore
Aluminato sódico, Sigma Aldrich
Silice amorfa, Aerosil 200, Degusa
Amberlita, IRN-78, Supelco
Hexametenimina 99%, Sigma Aldrich
Hidróxido sódico 98%, Alfa
Carbonato potásico sesquihidratado 99%, Sigma Aldrich
Cloroformo 99%, Sigma Aldrich
Yodometano 99%, Acros
Hidrocloreuro de 1-Adamantanamina 99%, Sigma Aldrich
Cloruro sódico 99%, Fisher
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 99%, Acros Organics
Tetrapropilamonio 99%, Sigma Aldrich
Ácido clorhídrico 37%, Sigma Aldrich
3-aminopropiltrióxysilano 99%, Sigma Aldrich
Cloruro de N-trimetoxysililpropil-N,N,N- trimetilamonio 50% en metanol,
Abcr labs
Tolueno 99%, Scharlab
Diclorometano 99.8%, Sigma Aldrich
Proteasa de Bacillus licheniformis 2.4 U/s, Sigma Aldrich
Harina de cáñamo provista por el centro tecnológico AINIA

3. Preparación de los Materiales Laminares

3.1 Precursor laminar tipo MWW para formar la zeolita MCM-22

Para la preparación del precursor laminar para obtener la zeolita MCM-22 con una relación Si/Al de 15 se realiza una suspensión acuosa formada por 0.675 g de aluminato sódico, 6 g de dióxido de silicio, 4.96 g de hexametenimina en 80.71 g de agua MiliQ. A continuación, se lleva la mezcla hasta un pH básico de alrededor de 13.5 utilizando 0.375 g de hidróxido sódico y se mantiene en agitación magnética durante 2 horas. Una vez se ha conseguido una mezcla homogénea, es introducido en autoclaves de acero inoxidable con una funda interna de teflón, manteniéndose a 150°C, rotación constante de 60 rpm y con presión autógena durante 7 días. Una vez finalizado este periodo, los autoclaves son enfriados con agua y el contenido es filtrado y lavado con agua destilada hasta que el pH del agua de lavado sea neutro. Finalmente, el material se seca a 100°C durante 24 horas.

Este precursor MWW puede ser calcinado en mufla para eliminar la materia orgánica y así obtener la zeolita MCM-22 con una relación Si/Al de 15 gracias al colapsado de las láminas. El programa de calcinación utilizado para ello se ilustra en la Figura 8:

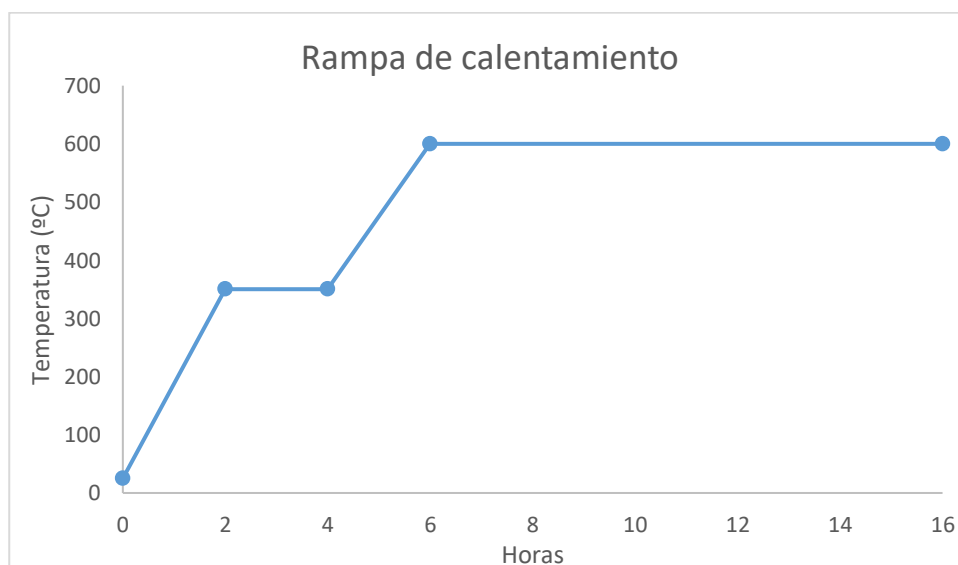


Figura 8: Programa de calcinación del precursor MWW para la obtención de la zeolita MCM-22.

Para la preparación del precursor para obtener la zeolita MCM-22 con una relación Si/Al de 50 se sigue un procedimiento similar al explicado anteriormente. Se realiza una suspensión acuosa formada por 0.193 g de aluminato sódico, 5.3 g de dióxido de silicio, 4.374 g de hexametilenoimina en 71.30 g de agua MiliQ. A continuación, se lleva la mezcla hasta un pH básico de alrededor de 13.5 utilizando 0.543 g de hidróxido sódico y se mantiene en agitación magnética durante 2 horas. Una vez se ha conseguido una mezcla homogénea, es introducido en autoclaves de acero inoxidable con una funda interna de teflón, manteniéndose a 140°C, rotación constante de 60 rpm y con presión autógena durante 11 días. Finalmente, se procede de la misma forma que con el precursor anterior: filtrado, lavado y secado del material.

De igual forma que con el precursor anterior, se puede obtener la zeolita MCM-22 con una relación Si/Al de 50 mediante el colapso de las láminas que lo forman utilizando una mufla para realizar la calcinación del material orgánico presente.

3.2 Precursor laminar tipo MWW para la formación de la zeolita ITQ-1

Para la preparación del precursor laminar que formará la zeolita ITQ-1 primeramente se necesita sintetizar el témplate ya que este no es un compuesto comercial. Para la síntesis del témplate, se mezcla en un matraz de 1 L 30 g de carbonato potásico, 300 mL de cloroformo, 34.2 g de iodometano y 15 g del compuesto orgánico hidrocloreuro de 1-adamantanamina. Se mantiene agitando durante 3 días y, una vez finalizado este periodo, se vuelve a añadir 15 g de iodometano para que este compuesto se encuentre en exceso. Pasados 7 días, se filtra, se lava con CH_3Cl y se elimina el disolvente mediante la utilización de un rotavapor. Se vuelve a lavar con éter, se seca a vacío y se obtiene el compuesto $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{I}$. Finalmente, se intercambian los aniones I^- por OH^- con la utilización de una resina de intercambio aniónico, obteniéndose así el compuesto N,N,N-trimetiladantamonio ($\text{TmAda}^+\text{OH}^-$).

Una vez se ha obtenido el témplate orgánico ya se puede proceder a realizar la síntesis del precursor para la formación de la zeolita ITQ-1, la cual es un análogo estructural de la zeolita MCM-22 con la singularidad que en su estructura no se encuentran tetraedros de aluminio, sino que es una zeolita puramente silíceas. Se realiza

una suspensión acuosa formada 5 g de dióxido de silicio, 0.486 g de NaCl, 2.559 g de hexametilamina y 33.54 g de N,N,N-trimetiladantamonio en 36.73 g de agua MiliQ y se mantiene en agitación magnética durante 2 horas. Esta vez no es necesaria la adición de NaOH ya que se consigue llegar a un pH básico con la utilización de los dos témplates orgánicos y, al no estar presente en la estructura zeolítica los átomos de aluminio, se evita tener presente la acidez de las zeolitas. Este hecho provoca la necesidad de añadir NaCl para introducir los cationes Na^+ encargados de estabilizar la estructura del precursor durante su síntesis. Una vez se ha conseguido una mezcla homogénea, esta se introduce en autoclaves de acero inoxidable con una funda interna de teflón, manteniéndose a 140°C , rotación constante de 60 rpm y con presión autógena durante 11 días. Finalmente, se procede de la misma forma que con el precursor anterior: filtrado, lavado y secado del material.

3.3 Zeolita deslaminada ITQ-2

La zeolita deslaminada ITQ-2 se puede obtener a partir del precursor laminar MWW. Su preparación consta de cuatro etapas:

- a) Hinchamiento
- b) Dispersión
- c) Floculación
- d) Calcinación

En el primer proceso, hinchamiento, se realiza una disolución acuosa de 5 g de precursor laminar y 30 g de agua MiliQ que se mezcla con 100 g de una solución de hexadeciltrimetilamonio $(\text{CTMA})^+\text{OH}^-/\text{Br}^-$ (25% en peso) con 30 g de otra solución de tetrapropilamonio $(\text{TPA})^+\text{OH}^-/\text{Br}^-$ (40% en peso), siendo el intercambio de los aniones Br^- por los aniones OH^- del 50% para el CTMA y del 30% para el TPA empleando una resina DOWEX SBR. La relación en peso alcanzada es CTMA (20): TPA (6): precursor (1).

La mezcla se deja durante 16 horas, con agitación magnética y a 80°C (en el caso del precursor pura sílice se calienta hasta los 52°C , ya que a más temperatura se disuelve). Una vez transcurrido este tiempo, se procede a la etapa de dispersión. Para

ello se somete la mezcla con el material hinchado a un tratamiento de ultrasonidos con una frecuencia de 50 Hz y una potencia de 50 Vatios durante 1 hora. Con este tratamiento se consigue la dispersión de las láminas y, por tanto, la deslaminación del material. A continuación, se acidifica la suspensión con HCl 1 M hasta alcanzar un pH entre 3.0 y 3.5, lo cual provoca la floculación del material sólido que estaba altamente disperso. Finalmente, las láminas se recuperan mediante sucesivos centrifugados a 12000 rpm durante 15 minutos cada una, hasta conseguir un pH neutro. El sólido obtenido es secado a 60°C durante 12 horas.

Por último, la etapa de calcinación se realiza en un reactor de cuarzo a 540°C con flujo de aire y nitrógeno. El programa de temperatura y flujo de gases se representa en la Figura 9:

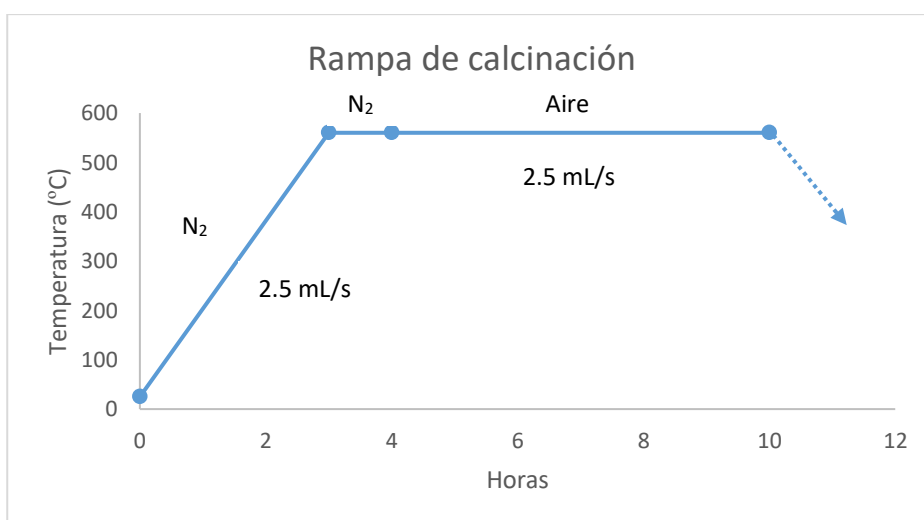


Figura 9: Programa de calcinación para la preparación de la zeolita ITQ-2

4. Modificación superficial de los materiales deslaminados

La superficie de las zeolitas ITQ-2 con diferente relación Si/Al se ha modificado con organosilanos para aportarle las características electrostáticas adecuadas para el anclado de la enzima alcalasa utilizando el método de adsorción (enlace electrostático).

Para ello, primero se utilizó el organosilano 3-aminopropiltriethoxysilano (obteniendo la zeolita N-ITQ-2) y posteriormente, por razones que se explicaran en el apartado de resultados, se utilizó el cloruro de 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio (obteniendo la zeolita A-ITQ-2). La estructura de ambos se muestra en la Figura 10:

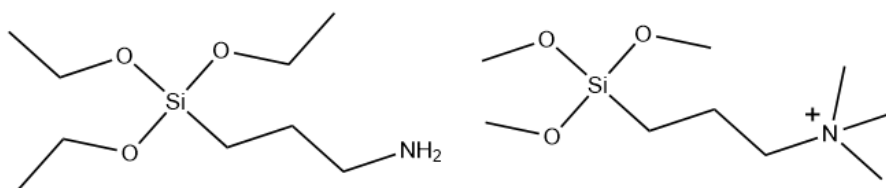


Figura 10: Estructura de los organosilanos 3-aminopropiltriethoxysilano y 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio respectivamente.

Para la síntesis de N-ITQ-2 y A-ITQ-2 se sigue el mismo procedimiento. Primeramente se somete a la zeolita a un proceso de deshidratación calentando hasta 400°C durante 2 horas y a vacío 1 g de ITQ-2 en un tubo Schlenk. A continuación, se añaden el agente sililante (en el caso de la amina se utilizan 0.921 g y en el caso del amonio se utilizan 2.146 g) y 7.6 g de tolueno y se mantiene agitando, con temperatura ambiente y con atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. Una vez se han mezclado bien todos los reactivos, se añaden otros 7.6 g de tolueno, se eleva la temperatura hasta 80°C y se deja reaccionando durante 16 horas, manteniendo las mismas condiciones de agitado y atmósfera. Finalmente, se filtra y se lava con CH₂Cl₂ y se deja secando en la estufa a 60°C.

La relación estequiométrica de los reactivos es zeolita (1): ag. sililante (0.25): tolueno (10), consiguiéndose una buena distribución del agente sililante en la superficie de las láminas zeolíticas para posteriormente realizar un óptimo anclado de las enzimas.

5. Anclado de la enzima en la zeolita

En este apartado se pretende realizar un enlace electrostático entre las cargas negativas superficiales de las enzimas con las cargas positivas asociadas a los grupos amina de la superficie de la zeolita N-ITQ-2 y a los grupos amonio de la zeolita A-ITQ-2. La Figura 11 ilustra la unión que se establecería entre las enzimas y el soporte:

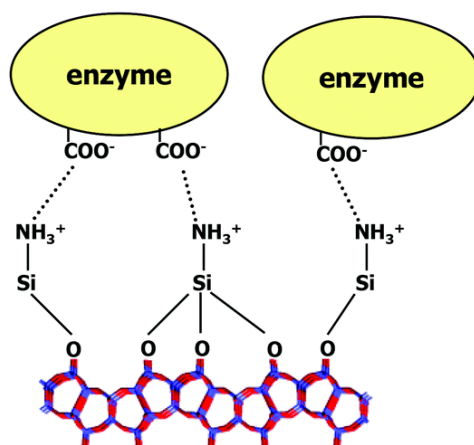


Figura 11: Representación de una unión electrostática entre unas enzimas y una zeolita cuya superficie ha sido modificada con grupos amina.

Para el anclado de la enzima utilizando como soporte la zeolita N-ITQ-2 se mezcla 1 g de la zeolita con 50 mL de una disolución acuosa de la enzima 1×10^{-4} M y se deja agitando a 0°C durante 4 horas. Una vez pasado este tiempo, se filtra y se lava con agua destilada fría. Se deja secar a vacío sin calentar, pues un calentamiento excesivo podría provocar el desnaturalizado de las enzimas.

Para el anclado de la enzima utilizando como soporte la zeolita A-ITQ-2 se sigue el mismo procedimiento que con la zeolita N-ITQ-2 pero a la mezcla de reacción también se añade NaOH 0.1 M hasta pH 10.

Para comprobar que el anclado de la enzima se ha realizado de forma satisfactoria, se mide la absorbancia de la disolución utilizada antes de ponerla en contacto con el soporte y después de la reacción de anclado. La diferencia de señales corresponde al porcentaje de enzima que se ha anclado en los soportes zeolíticos.

6. Hidrólisis de la harina de cáñamo con la enzima alcalasa soportada

Para estudiar la actividad de la enzima soportada y poder compararla con la actividad de la enzima libre se escoge como reacción de estudio la hidrólisis de la harina de cáñamo. La composición de la harina de cáñamo se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2: Información nutricional de la harina de semillas de cáñamo

| Información nutricional harina de cáñamo | |
|--|-----------------------------------|
| | masa (g) por cada 100 g de harina |
| Grasas (de las cuales saturadas) | 14.6 (8) |
| Hidratos de carbono (de los cuales azúcares) | 23 (5.3) |
| Proteína | 40.2 |
| Fibra alimentaria | 2.3 |
| Humedad | 8.2 |

La Figura 12 muestra el mecanismo de hidrólisis en medio básico de una amida, es decir, de un enlace peptídico como el que hay presente en las proteínas de la harina de cáñamo.

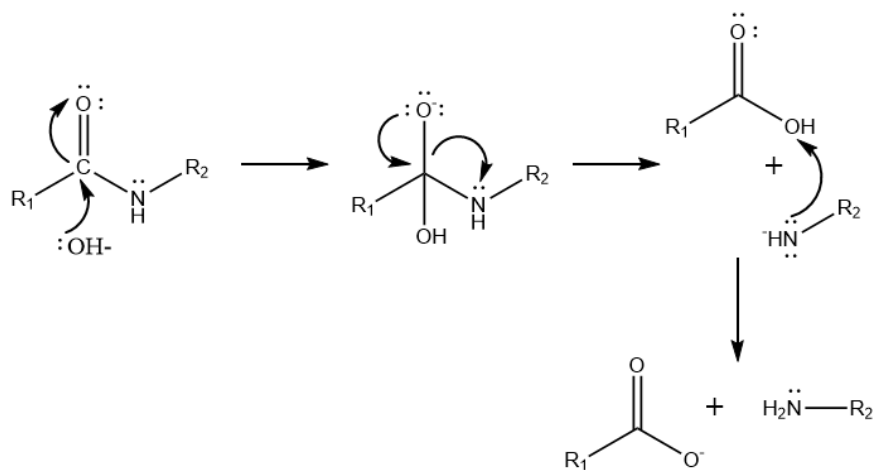


Figura 12: Mecanismo de la hidrólisis de una amida en medio básico

Aunque esta reacción necesita ser promovida para que inicie, se puede observar que el control del pH es de suma importancia ya que, además de afectar directamente a la reacción de hidrólisis, también está estrechamente relacionado con el anclaje de la enzima al soporte.

Para comprobar la efectividad de la enzima se observará la diferencia entre el ensayo que contiene la enzima responsable de la hidrólisis con aquel que no contiene enzima. Por ello es necesario realizar cuatro ensayos:

- I. Ensayo sin enzima
- II. Ensayo con el soporte
- III. Ensayo con enzima libre
- IV. Ensayo con enzima soportada

El primer ensayo, sin enzima, sirve para ver cómo se comporta la harina de cáñamo en las condiciones de reacción. Para ello, se pesa 1.0 g de harina de cáñamo y se mezcla con 50 mL de agua MiliQ. La mezcla se agita con agitación magnética, se añade NaOH 0.1 M gota a gota hasta alcanzar un pH de 10 y se calienta a 40°C durante 1 hora. A continuación, se eleva la temperatura hasta 85°C durante 15 minutos y finalizado este periodo, se procede a centrifugar la mezcla a 15000 rpm durante 20 minutos hasta que el agua de lavado salga limpia. Se deja secando a vacío durante 24 horas y se pesa el sólido obtenido.

La resta entre el sólido inicial y el sólido obtenido la denominamos *m. sol.* y se refiere a la porción de harina que, en las condiciones de reacción, se solubiliza y por tanto se elimina con el agua de lavado en el centrifugado. Esta masa corresponde a materia orgánica soluble presente en la harina compuesta por hidratos de carbono, sales o humedad entre otros y ha de ser tenida en cuenta en todos los ensayos para no cometer errores en las pesadas.

$$m. sol. = m. inicial - m. final \quad (2)$$

El segundo ensayo, con el soporte, sirve para ver si el propio soporte zeolítico es capaz de realizar la reacción de hidrólisis de las proteínas de la harina de cáñamo. Al realizar la hidrólisis de una proteína, los residuos formados son mucho más pequeños que la proteína de la cual provienen y, por tanto, ya no son insolubles en agua y pasan a formar parte de la disolución.

Para realizar este ensayo, primero se prensa y tamiza el soporte para que tenga un tamaño de partícula entre 2 mm y 0.6 mm, ya que de esta forma se podrá separar el soporte fácilmente de la harina de cáñamo. A continuación, se pesa 1.0 g de harina de cáñamo, 0.5 g del soporte zeolítico y se mezclan con 50 mL de agua. Al igual que en el primer ensayo, se añade NaOH 0.1 M hasta pH 10, agitación continua y se calienta hasta 40°C durante 1 hora. Superada esta etapa, se aumenta la temperatura a 85°C durante 15 minutos y se filtra utilizando un tamiz de 0.4 mm para poder separar el soporte zeolítico del residuo sólido de la harina de cáñamo. A continuación, se centrifuga, se lava, se seca y se pesa.

La resta entre la masa inicial de harina y la masa final idealmente debería ser igual a la masa solubilizada que se obtiene con el primer ensayo. En caso de ser menor, significa que el soporte de alguna forma influye sobre la harina de cáñamo.

Con el tercer ensayo, con enzima, se conoce cuál es la actividad de la enzima libre. Para ello, se pesa 1.0 g de harina, se mezcla con 50 mL de una disolución de alcalasa 1×10^{-4} M y se sigue el mismo procedimiento que con el ensayo sin enzima. En este ensayo, la etapa de aumentar la temperatura a 85°C durante 15 minutos es importante ya que con ello se consigue la desnaturalización de la enzima y, por tanto, se detiene la reacción de hidrólisis, evitando así que la reacción continúe en las etapas posteriores de centrifugado y lavado. La masa hidrolizada corresponde a los péptidos solubilizados debido a la acción de la enzima sobre las proteínas de la harina de cáñamo, y por tanto, es una medida de su actividad.

$$m. \text{ hidr.} = m. \text{ inicial} - m. \text{ final} - m. \text{ sol.} \quad (3)$$

Si no estuviese la enzima, no habría parte de las proteínas que se solubilizarían y, por tanto, la ecuación 3 daría 0. Sin embargo, la actuación de las enzimas provoca la solubilización de los péptidos, disminuyendo así la masa final de harina obtenida. Con la

resta de la masa final y de la masa soluble a la masa inicial se obtiene la masa que se ha solubilizado por acción de las enzimas.

Conociendo la cantidad de proteína en la harina de partida se puede obtener el porcentaje de proteína solubilizada:

$$\% \text{ prot. sol.} = \frac{m.\text{hidr.}}{m.\text{inicial} \cdot \% \text{ proteina harina}} \cdot 100 \quad (4)$$

En el caso de la harina de cáñamo con la que se trabaja, el porcentaje de proteína es del 40.2%.

Finalmente, el último ensayo, con enzima soportada, nos permite conocer cómo afecta a la actividad de la enzima que ha sido soportada en la zeolita ITQ-2. Al mismo tiempo, permite ver si las diferentes relaciones Si/Al de los materiales preparados (15, 50 y ∞) influyen en la reacción de hidrólisis.

Para realizar este último experimento, se utiliza la misma metodología que en el segundo ensayo, sin embargo, en este caso la zeolita deslaminada actúa como soporte de la enzima alcalasa que es la encargada de llevar a cabo la hidrólisis.

IV. Resultados y discusión

1. Síntesis y caracterización de los materiales laminares

1.1 Difracción de rayos X

Se realiza el análisis estructural de los materiales laminares sintetizados por difracción de rayos X. Gracias a esta técnica se consiguen observar los cambios en el orden laminar conforme se deslaminan las zeolitas. Para ello, en las Figuras 13, 14 y 15 se muestran los difractogramas de los precursores laminares, los precursores laminares hinchados, las zeolitas ITQ-2 resultantes tras la calcinación de este último y, finalmente, se muestran las zeolitas 3D MCM-22 que se hubiesen obtenido al calcinar los precursores laminares iniciales.

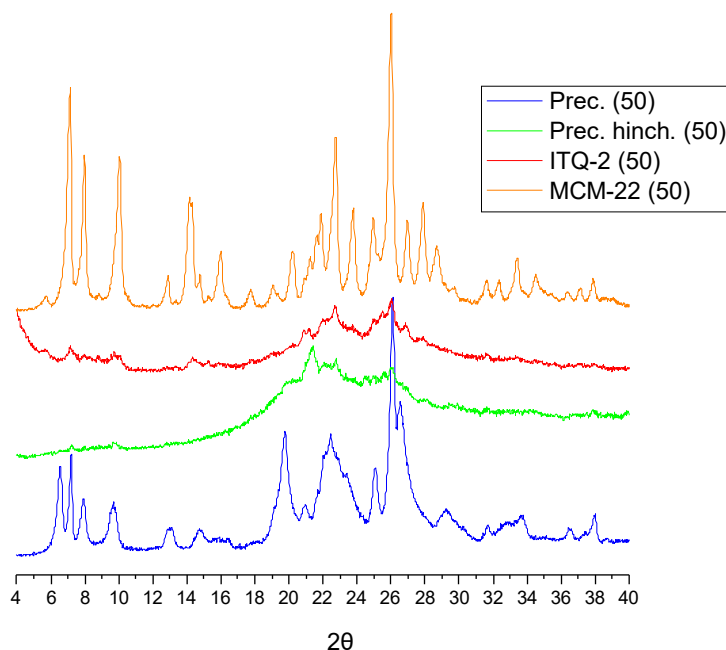


Figura 13: Comparación de los difractogramas de rayos X del precursor laminar tipo MWW, el precursor laminar hinchado, la zeolita ITQ-2 y la zeolita MCM-22; todas ellos con una relación Si/Al=50.

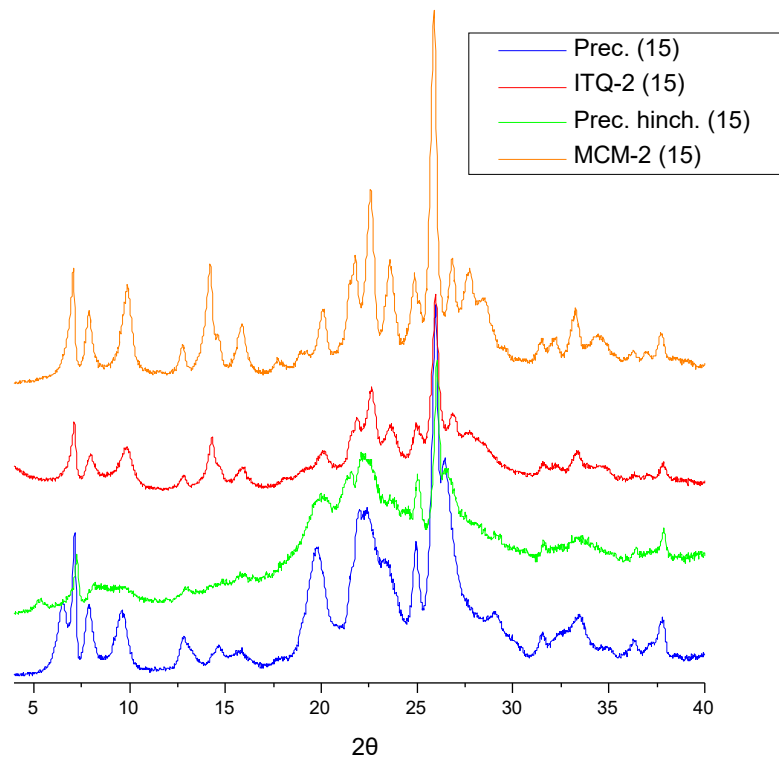


Figura 14: Comparación de los difractogramas de rayos X del precursor laminar tipo MWW, el precursor laminar hinchado, la zeolita ITQ-2 y la zeolita MCM-22; todas ellos con una relación Si/Al=15.

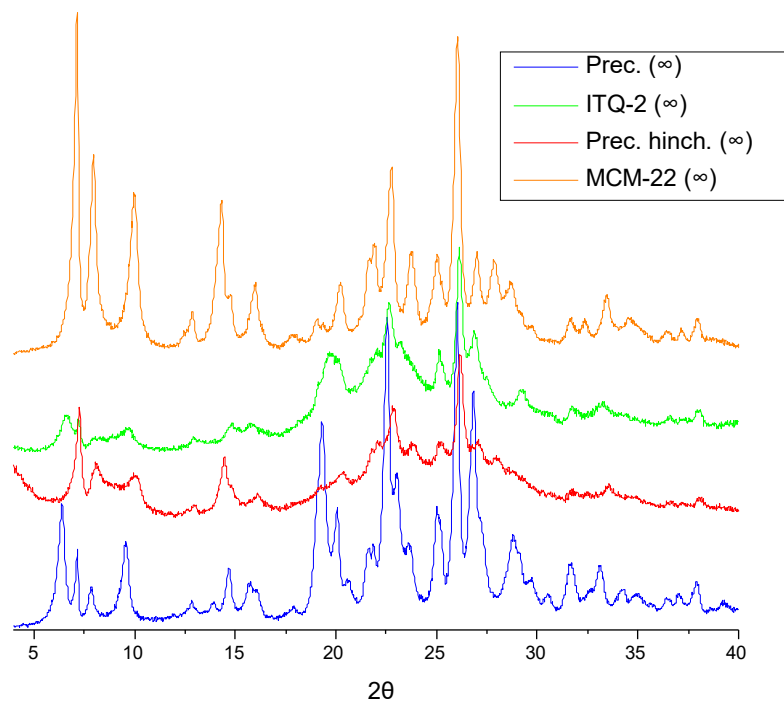


Figura 15: Comparación de los difractogramas de rayos X del precursor laminar tipo MWW, el precursor laminar hinchado, la zeolita ITQ-2 y la zeolita MCM-22; todas ellos con una relación Si/Al= ∞ .

Gracias a estos difractogramas se puede demostrar el paso de un precursor laminar a una zeolita tridimensional cuando este se calcina. Para ello, vamos a estudiar uno de los difractogramas y nos vamos a centrar únicamente en el precursor laminar tipo MWW y en la zeolita MCM-22 resultante:

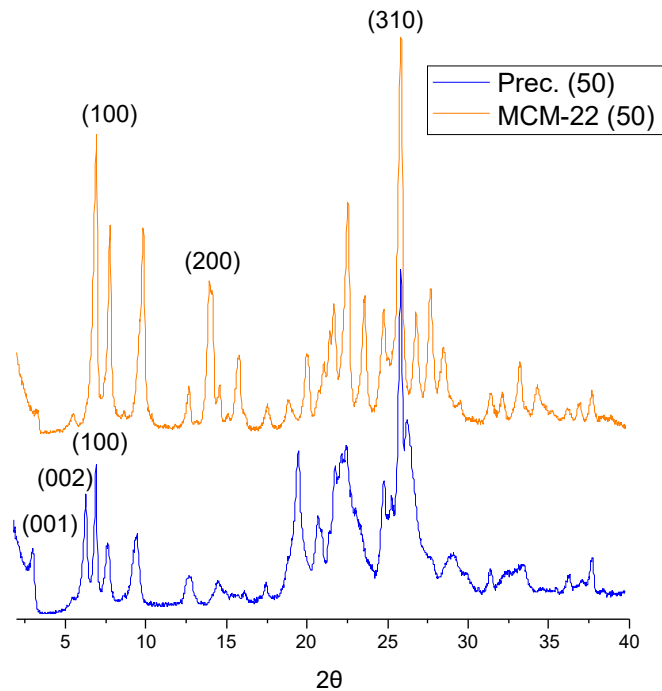


Figura 16: Comparación de los difractogramas de rayos X del precursor laminar tipo MWW y de la zeolita MCM-22 resultante de la calcinación del anterior. Ambos tienen una relación Si/Al=50.

En la Figura 16 se puede observar como las reflexiones 001 , presentes en el precursor laminar, desaparecen y no están presentes en la zeolita calcinada debido a que estas reflexiones indican el orden de las láminas que se sitúan perpendiculares al eje c . Sin embargo, los picos correspondientes a las reflexiones $h00$, $0k0$ y $hk0$, los cuales son intrínsecos de la propia estructura de cada lámina, permanecen invariables y esto demuestra que la estructura laminar del precursor tipo MWW continua inalterable. Además, se observa que las reflexiones 001 y 002 en el precursor laminar, las cuales indican una distancia interlaminar de 2.75 nm (láminas y materia orgánica), desaparecen casi por completo debido a la eliminación de la materia orgánica por calcinación y al colapso de las láminas cuando se forma la zeolita 3D MCM-22.

En cuanto al deslaminado del precursor, en las Figuras 13, 14 y 15 se puede observar cómo, en el proceso de hinchado y deslaminado, las señales se van ensanchando debido a la reducción del tamaño de cristal y a la reducción del orden a larga distancia, datos que concuerdan con una dispersión de forma aleatoria de las láminas que conformaban el precursor laminar.

1.2 Resonancia magnética nuclear

Con esta técnica se puede obtener información del entorno de coordinación de los átomos de silicio y analizar cómo estos cambian cuando se realiza el deslaminado de la zeolita laminar.

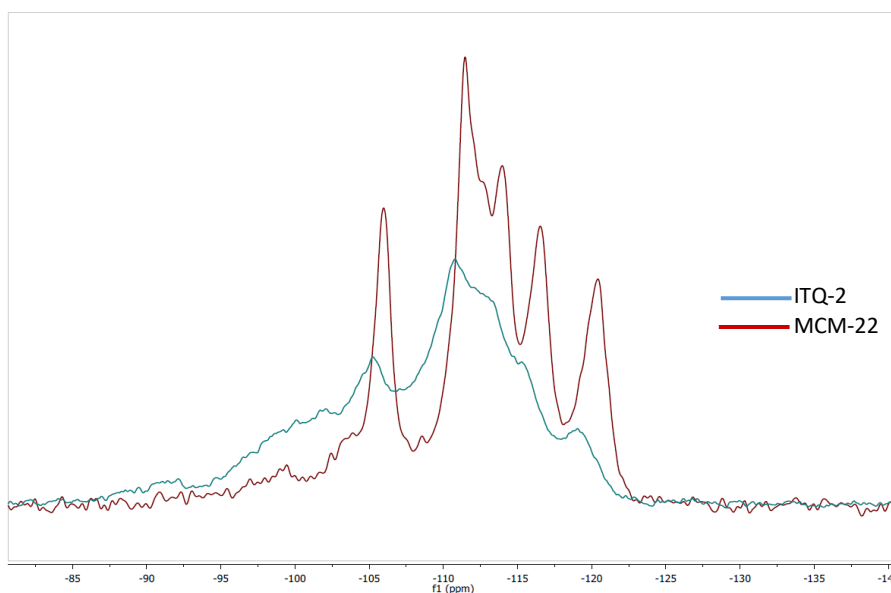


Figura 17: RMN de ^{29}Si de las zeolitas MCM-22 y ITQ-2 con relación $\text{Si}/\text{Al}=\infty$.

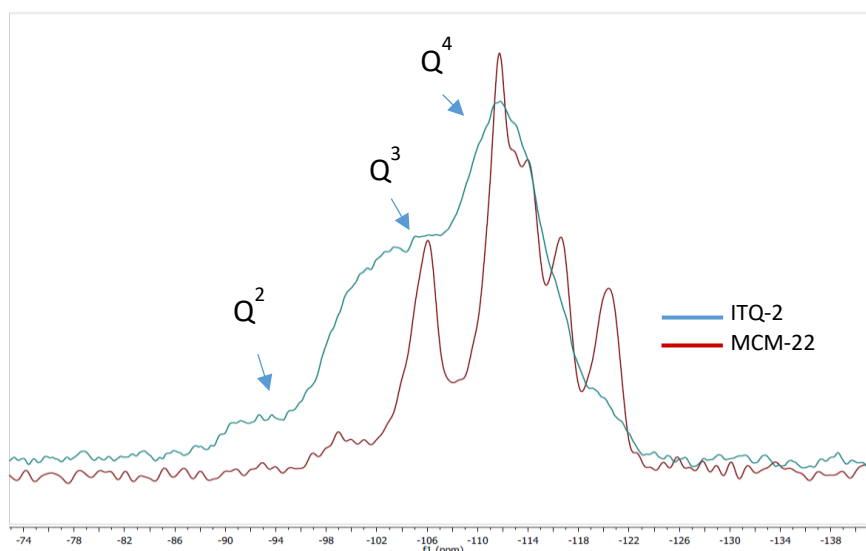


Figura 18: RMN de ^{29}Si de las zeolitas MCM-22 y ITQ-2 con relación Si/Al=50.

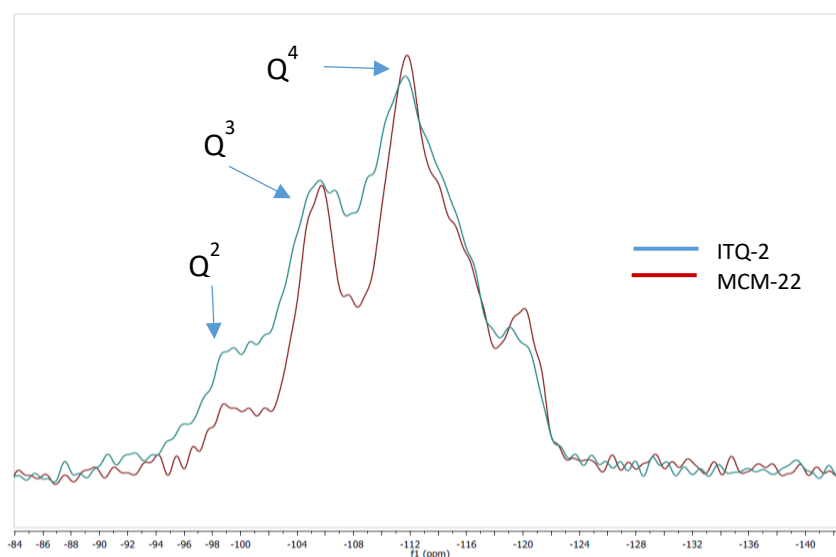


Figura 19: RMN de ^{29}Si de las zeolitas MCM-22 y ITQ-2 con relación Si/Al=15.

En la Figura 17 se muestra el RMN de las zeolitas puramente silíceas, donde se distinguen diversos picos los cuales corresponden a las diferentes posiciones cristalográficas de los átomos de silicio dentro de la red cristalina. Al producirse el deslaminado, estos picos se ensanchan debido al proceso de exfoliación y desorden alcanzado.

En cambio, en los espectros de las zeolitas con aluminio de red (Figuras 18 y 19) no se diferencian los átomos de silicio respecto a su posición cristalográfica, sino a su

entorno de coordinación. El pico Q4, el cual es el más abundante, corresponde a átomos de silicio rodeados de otros cuatro átomos de silicio (4Si). A continuación, el pico Q3 corresponde a un entorno del tipo $\equiv\text{Si-R}$, donde R es un grupo OH (silanoles de la superficie de las láminas) o O-Al (átomos de silicio de red que están junto a un átomo de aluminio). Finalmente, el pico Q2 corresponde a un entorno del tipo $=\text{Si-R}_2$, donde los grupos R pueden ser grupos OH germinales (silanoles de los bordes de las láminas), pueden ser dos grupos O-Al (átomo de silicio de red junto a dos átomos de aluminio) o puede ser un grupo OH y otro O-Al.

También se registran los espectros de ^{13}C de los agentes directores de estructura (ADE) presentes en los diferentes materiales zeolíticos alterados.

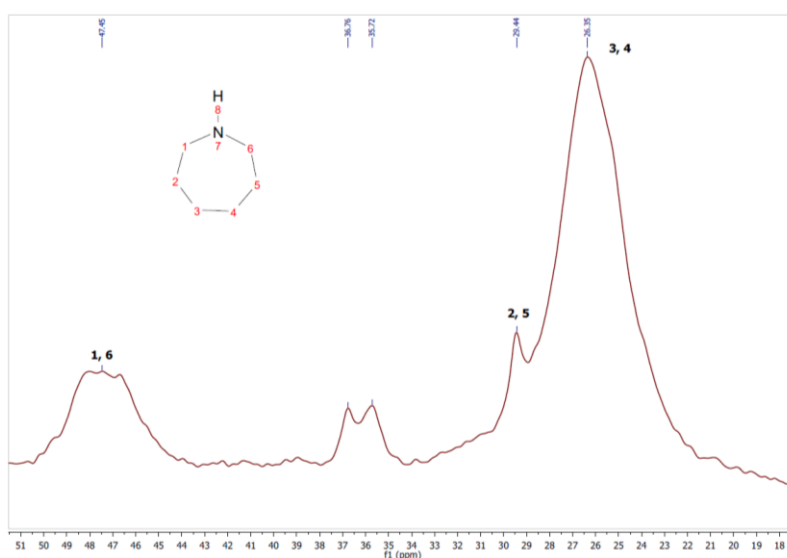


Figura 20: RMN de ^{13}C del ADE HMI en el precursor laminar tipo MWW con relación Si/Al=15.

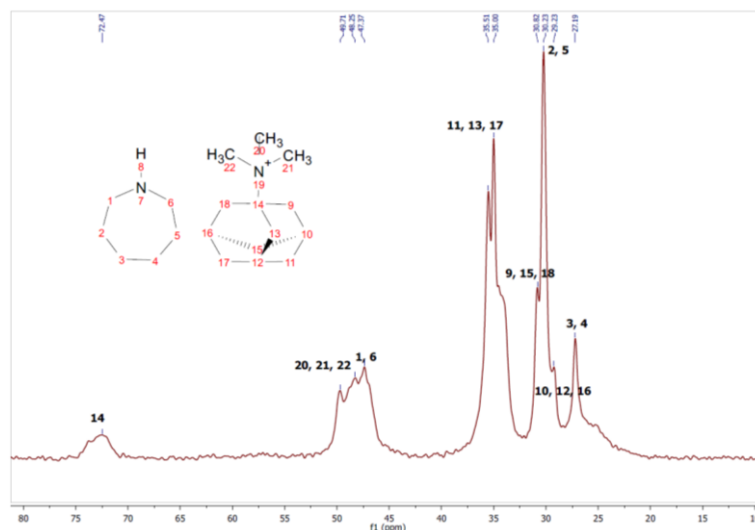


Figura 21: RMN de ^{13}C de los ADE HMI y TMA^+ en el precursor laminar tipo MWW con relación $\text{Si}/\text{Al}=\infty$.

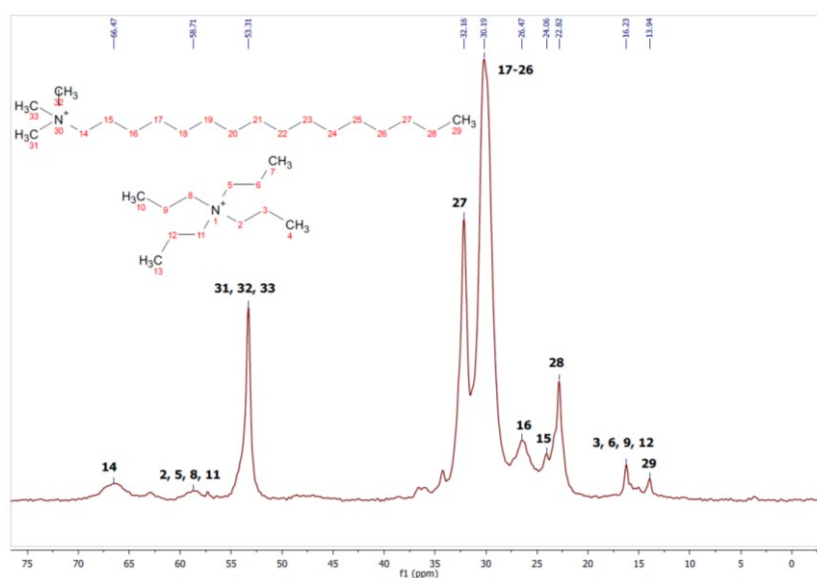


Figura 22: RMN de ^{13}C de las moléculas orgánicas CTMA^+ y TPA^+ en el precursor laminar hinchado tipo MWW con relación $\text{Si}/\text{Al}=50$.

Los picos registrados en los tres espectros se ajustan bien a las moléculas orgánicas utilizadas, demostrando que se han introducido correctamente en las zeolitas y que no han sufrido ninguna modificación durante este proceso.

1.3 Adsorción de N₂ y volumen de microporo

Finalmente, otra de las técnicas que nos puede dar información del proceso de deslaminado de los precursores laminares son los estudios de adsorción de N₂. Con estos estudios se puede conocer las propiedades texturales de las zeolitas y, con ellos, comprobar hasta qué nivel se ha producido la exfoliación, ya que un mayor grado de deslaminación de la zeolita provoca un aumento de su área superficial. En la Tabla 3 se encuentran los datos referentes a las zeolitas MCM-22 y a las zeolitas ITQ-2 sintetizadas en este proyecto:

Tabla 3: Propiedades texturales de las zeolitas MCM-22, ITQ-1 y ITQ-2.

| Muestra (rel. Si/Al) | Área BET (m²/g) | t-Plot área microporo (m²/g) | t-Plot área superficial externa (m²/g) | t-Plot volumen microporo (cm³/g) |
|---------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|
| MCM-22 (15) | 457 | 382 | 75 | 0.183 |
| ITQ-2 (15) | 590 | 250 | 340 | 0.119 |
| MCM-22 (50) | 393 | 300 | 94 | 0.147 |
| ITQ-2 (50) | 630 | 115 | 515 | 0.051 |
| ITQ-1 (∞) | 389 | 339 | 50 | 0.163 |
| ITQ-2 (∞) | 686 | 155 | 532 | 0.071 |

Como reflejan los datos de la Tabla 3, el proceso de deslaminación se traduce en un gran aumento del área superficial debido a la dispersión de las láminas que forman la estructura cristalina de las zeolitas MCM-22 y ITQ-1.

En la Figura 23 se comparan las isothermas de adsorción de N₂ para la zeolita ITQ-2 y la zeolita MCM-22 con relación Si/Al=50. Se observa que la cantidad de N₂ adsorbida por la zeolita ITQ-2 es mucho mayor a la adsorbida por la zeolita MCM-22, lo cual indica una mayor superficie específica debido a que la zeolita ITQ-2 es un material deslaminado con una distribución al azar de las láminas que la componen. Figura 23:

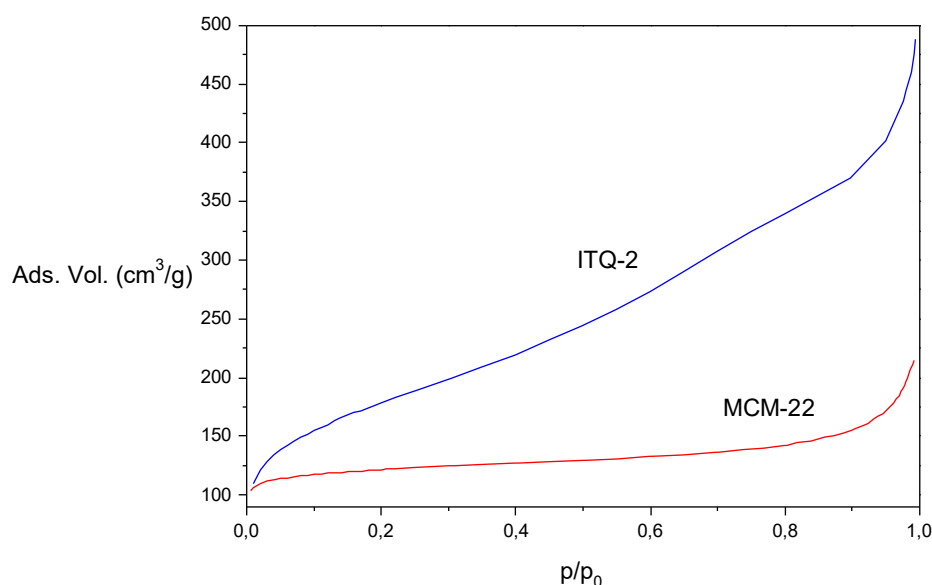


Figura 23: Isothermas de adsorción de N₂ de las zeolitas MCM-22 e ITQ-2 con una relación Si/Al=50.

1.4 Espectroscopia de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente

Mediante un ICP se ha comprobado si la relación Si/Al real de las zeolitas sintetizadas corresponde con los datos teóricos.

Tabla 4: Datos recogidos a través del ICP de las zeolitas deslaminadas ITQ-2

| Muestra | [Si] (ppm) | [Al] (ppm) | Rel. Si/Al real | Rel. Si/Al teórica |
|------------|------------|------------|-----------------|--------------------|
| ITQ-2 (15) | 409353.0 | 30557.5 | 13.4 | 15.0 |
| ITQ-2 (50) | 421416.0 | 8909.4 | 47.3 | 50 |

Como se puede observar en los datos recogidos en la Tabla 4, la relación molar Si/Al de las zeolitas deslaminadas sintetizadas no se aleja demasiado del valor teórico. Con este dato, se demuestra que las zeolitas sintetizadas se han obtenido de forma satisfactoria y, por tanto, son aptas para realizar estudios de adsorción de enzimas sobre estas.

En este estudio no se ha incluido la zeolita deslaminada ITQ-2 (∞) ya que no hay átomos de aluminio presentes en la estructura cristalina de esta zeolita y, por tanto, no se puede comparar la concentración de silicio con ningún otro dato.

1.5 Análisis elemental

Con esta técnica, lo que se quiere conocer es si las moléculas orgánicas utilizadas como témpate para la síntesis de los precursores laminares, así como las moléculas orgánicas utilizadas para el proceso de hinchado y deslaminación, se han introducido correctamente en la estructura de la zeolita.

Tabla 5: Resultados del análisis elemental de los precursores laminares y de los precursores laminares hinchados con distintas relaciones Si/Al.

| | Rel. Si/Al | %N | %C | %H | C/N |
|---------------------------|------------|------|------|-----------|------|
| Precursor laminar | ∞ | 1,9 | 16,1 | 2,7 | 8,7 |
| | 15 | 2,2 | 13,2 | 2,5 | 6,0 |
| | 50 | 2,1 | 11,8 | 2,3 | 5,6 |
| Precursor hinchado | ∞ | 1,4 | 19,0 | 3,7 | 13,6 |
| | 15 | 1,8 | 19,6 | 3,7 | 11,0 |
| | 50 | 1,8 | 27,7 | 5,4 | 15,6 |
| | nº C | nº N | nº H | M (g/mol) | C/N |
| HMI | 6 | 1 | 13 | 99 | 6,0 |
| TMAda | 13 | 1 | 24 | 194 | 13,0 |
| CTMA | 19 | 1 | 42 | 284 | 19,0 |
| TPA | 12 | 1 | 28 | 186 | 12,0 |

En el análisis elemental hay que comprobar si la relación C/N experimental corresponde con la teórica. Así pues, para los precursores laminares con relaciones Si/Al de 15 y 50, la relación C/N teórica es 6 ya que la única molécula orgánica introducida en la síntesis es el témpate HMI. La relación C/N de ambos precursores es muy cercana a

6, lo que indica que el ADE se ha introducido correctamente en la zeolita y no ha sufrido ninguna variación.

Por el contrario, el precursor laminar de relación $\text{Si/Al}=\infty$ presenta una relación C/N más elevada a sus silicoaluminatos estructuralmente análogos. Este hecho es debido a que para la síntesis de este precursor laminar también se introduce el ADE TMA, el cual presenta una relación C/N mucho más elevada que el ADE HMI. Sin embargo, se puede observar como el dato experimental, 8.7, se encuentra dentro del rango de los dos ADE, es decir, 6.0 y 13.0, lo que confirmaría que ambos ADE se han introducido en la estructura zeolítica.

En cuanto a los precursores hinchados, se observa como la relación C/N de estos ha aumentado en gran medida debido a la introducción de las moléculas orgánicas CTMA y TPA, las cuales no solo se introducen en la estructura interlaminar, sino que también se intercambian por las moléculas de HMI y TMA, lo cual resulta en relaciones C/N más altas y distintas entre los diferentes precursores laminares.

1.6 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico es otra de las técnicas que sirven para conocer si todas las moléculas orgánicas que estaban presentes en el medio de reacción se han introducido en los materiales zeolíticos, así como para conocer la estabilidad hidrotérmica de los materiales.

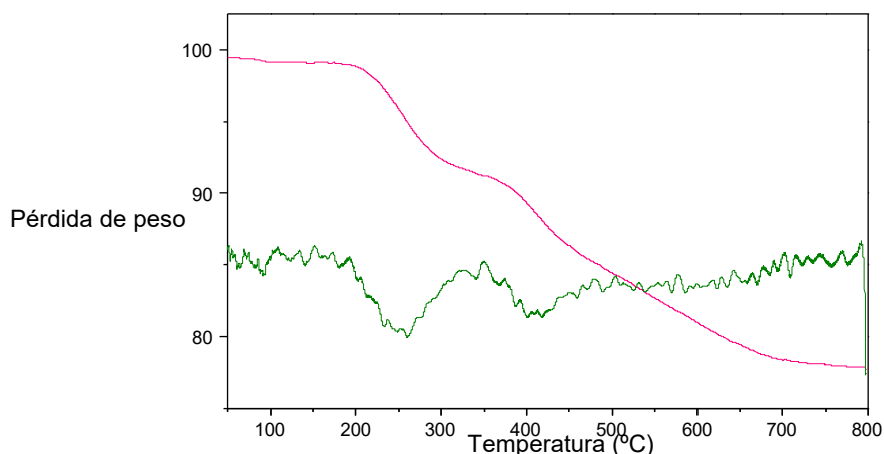


Figura 24 Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación $\text{Si/Al}=\infty$.

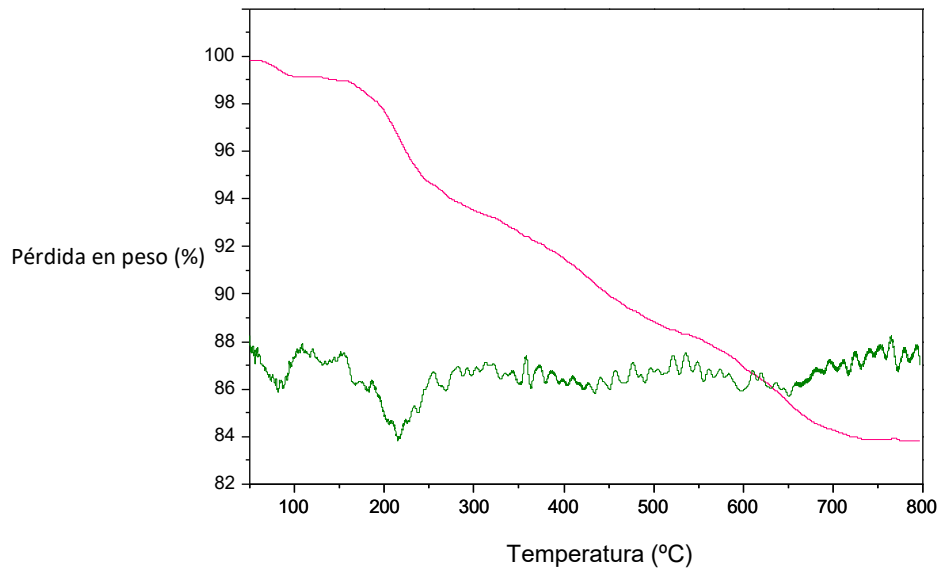


Figura 25: Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación Si/Al=50.

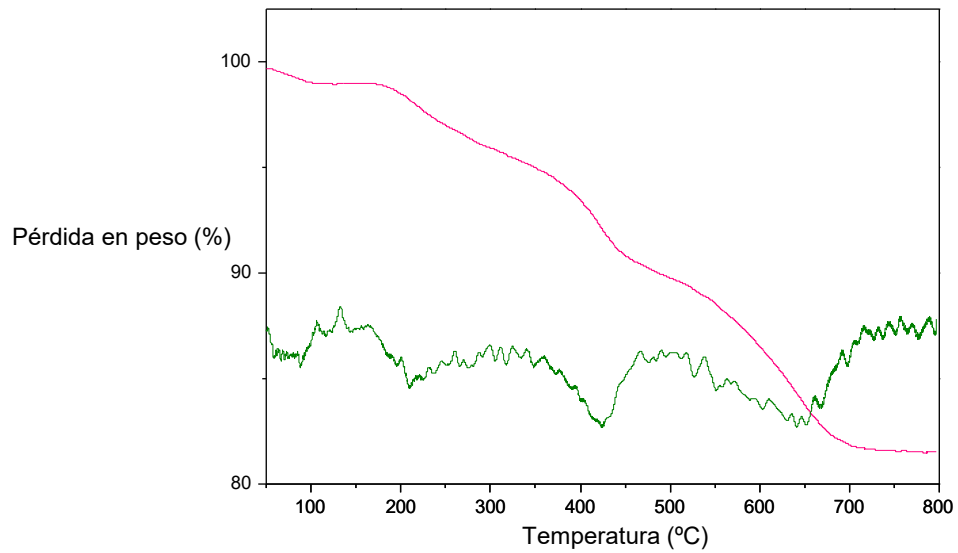


Figura 26: Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación Si/Al=15.

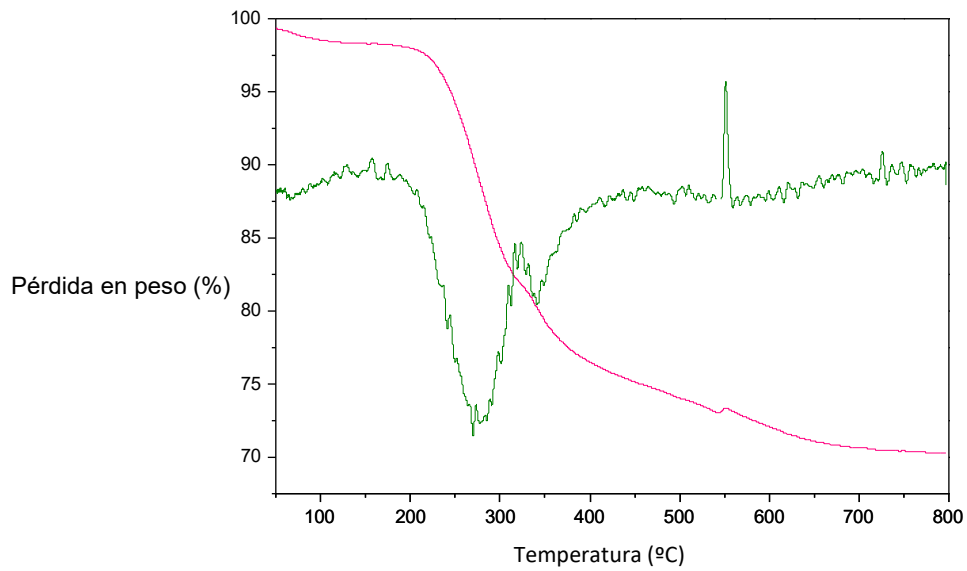


Figura 27: Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación $\text{Si/Al}=\infty$ que ha sufrido un proceso de hinchamiento.

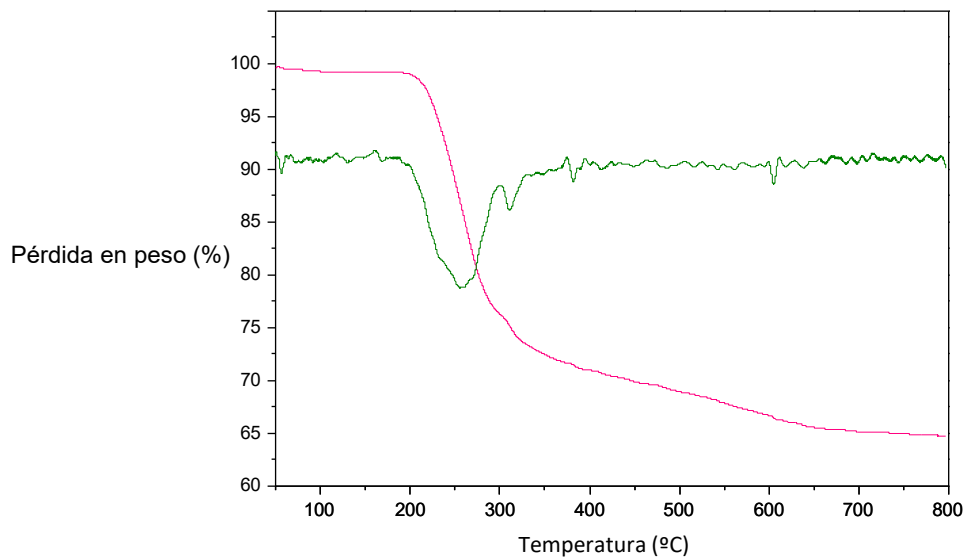


Figura 28: Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación $\text{Si/Al}=50$ que ha sufrido un proceso de hinchamiento.

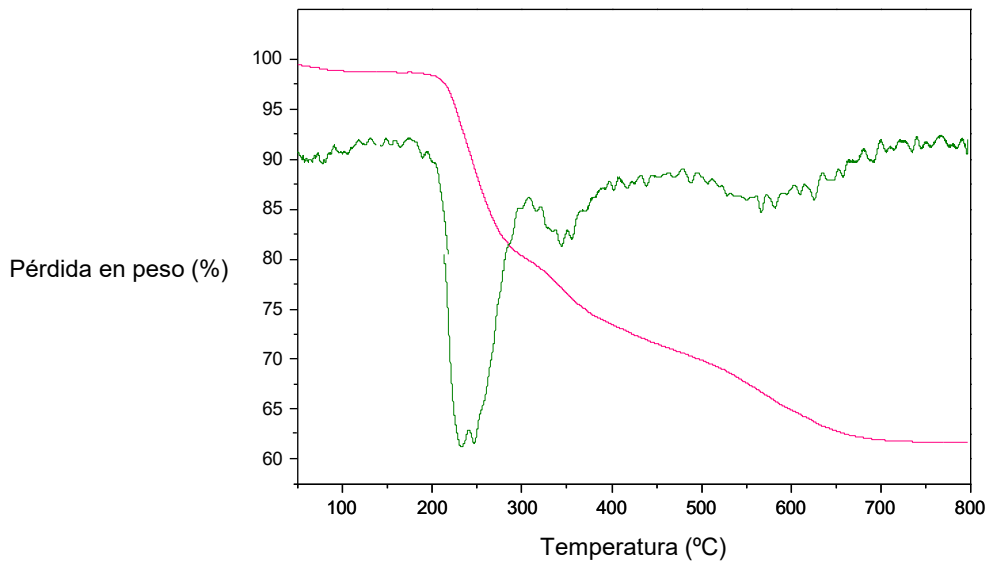


Figura 29: Análisis termogravimétrico del precursor laminar tipo MWW con una relación Si/Al=15 que ha sufrido un proceso de hinchamiento.

En las Figuras 24, 25 y 26, las cuales corresponden a los termogramas de los precursores laminares, se puede observar cómo se produce una pérdida de peso de entre el 18% y el 22%. Inicialmente, entre el inicio del calentamiento y 100°C, la pérdida de peso registrada se asocia a la evaporación de las moléculas de agua presentes en el material. A continuación, entre 100°C y 350°C, se produce la calcinación de la materia orgánica y, finalmente, la pérdida de peso registrada a partir de 350°C se asocia a la condensación de los silanoles superficiales de las zeolitas, los cuales producen moléculas de agua que son las que provocan la disminución del peso de la muestra en este rango de temperaturas. Estos resultados están en consonancia con los datos teóricos, los cuales indican que entre un 15% y un 25% del peso final del precursor corresponde a la incorporación del ténplate.

En cuanto a los precursores hinchados, se puede observar en las Figuras 27, 28 y 29 cómo se produce una pérdida de peso mucho mayor que en los casos anteriores (alrededor de entre un 25% y un 40%) que corresponde a la presencia del TPA⁺OH⁻ pero sobre todo al CTMA⁺OH⁻ el cual se encuentra en mucha más cantidad en el espacio interlaminar

2. Funcionalización de la superficie de las zeolitas y anclado de las enzimas

2.1 Organosilano 3-aminopropiltriethoxysilano

Para la funcionalización de la superficie de las zeolitas deslaminadas ITQ-2 se utiliza el organosilano 3-aminopropiltriethoxysilano (Figura 10) ya que se ha comprobado su eficacia en el soporte de enzimas en estudios anteriores obteniéndose la zeolita deslaminada N-ITQ-2⁴⁴.

Para comprobar que la funcionalización se ha realizado con éxito, se realiza el análisis elemental y el espectro de RMN de ¹³C, los cuales se muestran en la Tabla 6 y en la Figura 30, respectivamente.

Tabla 6: Análisis elemental de las zeolitas deslaminadas y funcionalizadas N-ITQ-2.

| | Rel. Si/Al | %N | %C | %H | C/N |
|------------------------------|------------------------|------|------|------|-----|
| N-ITQ-2 | ∞ | 1,2 | 7,5 | 1,8 | 6,4 |
| | 15 | 1,2 | 7,8 | 1,9 | 6,5 |
| | 50 | 1,1 | 6,6 | 1,9 | 5,8 |
| | Enlaces con el soporte | nº N | nº C | nº H | C/N |
| 3-aminopropiltriethoxysilano | 1 | 1 | 7 | 18 | 7 |
| | 2 | 1 | 5 | 13 | 5 |
| | 3 | 1 | 3 | 8 | 3 |

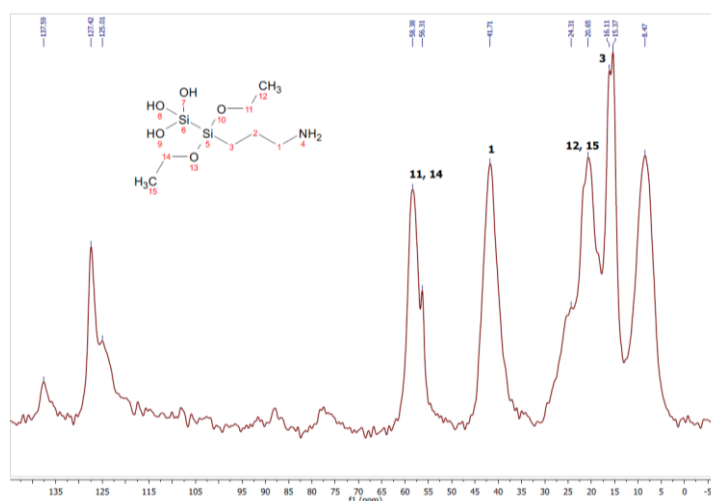


Figura 30: RMN de ¹³C del organosilano 3-aminopropiltriethoxysilano anclado a la superficie de una zeolita deslaminada ITQ-2.

El organosilano 3-aminopropiltrióxido presenta 3 radicales etóxido (-O-CH₂-CH₃) unidos a un átomo de silicio. Estos tres grupos etóxido pueden reaccionar con los silanoles superficiales en la zeolita deslaminada ITQ-2 para dar etanol, provocando que el átomo de silicio de este organosilano quede anclado covalentemente a la superficie zeolítica. Sin embargo, es muy improbable que los tres grupos etóxido de una misma molécula reaccionen, siendo lo más probable que únicamente reaccione un único grupo etóxido con los silanoles distribuidos en la superficie de las láminas de la zeolita ITQ-2.

Es este hecho el que explica que las relaciones C/N de las tres zeolitas deslaminadas N-ITQ-2 (Tabla 6) se encuentren cercanas a 7, ya que este valor es el que indica que solamente se ha realizado el anclado con un enlace.

En el RMN (Figura 30) se puede observar la aparición de picos parcialmente desdoblados. Esto, es debido al hecho explicado anteriormente, pues la pérdida de un grupo etóxido modifica ligeramente el entorno de coordinación de los átomos medidos, provocando un ligero desplazamiento de los picos registrados.

2.2 Organosilano 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio

La utilización del organosilano 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio (Figura 10) se debe a que se observó que el organosilano anteriormente mencionado, 3-aminopropiltrióxido, no era eficiente a la hora del anclado de la enzima subtilisin por motivos que se explicaran en el siguiente punto. Con este otro organosilano se obtuvo la zeolita A-ITQ-2.

Para comprobar que esta molécula se ha anclado correctamente a la superficie de las zeolitas se realiza un análisis elemental y un RMN de ¹³C.

Tabla 7: Análisis elemental de las zeolitas deslaminadas y funcionalizadas A-ITQ-2.

| | Rel. Si/Al | %N | %C | %H | C/N |
|---|------------------------|------|------|------|-----|
| A-ITQ-2 | ∞ | 1,2 | 6,9 | 1,8 | 5,8 |
| | 15 | 1,2 | 7,0 | 1,9 | 5,8 |
| | 50 | 1,1 | 6,6 | 1,9 | 5,2 |
| | Enlaces con el soporte | nº N | nº C | nº H | C/N |
| 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio | 1 | 1 | 8 | 21 | 7 |
| | 2 | 1 | 7 | 18 | 5 |
| | 3 | 1 | 6 | 15 | 3 |

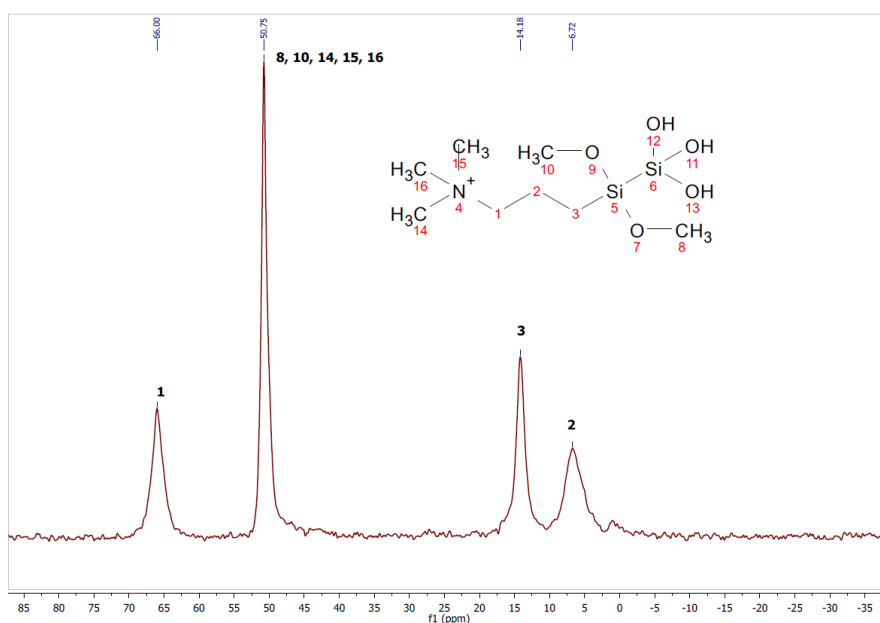


Figura 31: RMN de ¹³C del organosilano 3-(trimetoxysilil)propan-N,N,N-trimetilamonio anclado a la superficie de una zeolita deslaminada ITQ-2.

Con este organosilano sucede el mismo hecho que con el organosilano tipo amina, y es que el organosilano tipo amonio presenta tres grupos metóxido para anclarse a la superficie de la zeolita, sin embargo, lo más común es que el anclado de la molécula solamente se realice por uno de los grupos alcóxido terminales. En la Tabla 7 se puede evidenciar este comportamiento, pues la relación C/N de las tres zeolitas deslaminadas se encuentra entre 7 y 5, y por tanto, el anclado del organosilano a la zeolita se realiza con uno o dos enlaces.

2.3 Anclado de la enzima subtilisin

Primeramente, se realizó el anclado de la enzima subtilisin sobre las zeolitas deslaminadas N-ITQ-2. Para ello, se puso en contacto una disolución de la enzima con el soporte zeolítico y se varió la temperatura para conocer como afectaba este parámetro a la reacción de anclado. Los resultados se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8: Porcentaje de enzima anclada a la zeolita deslaminada ITQ-2 (15) en función de la temperatura y el tiempo de reacción.

| Ensayo | Temperatura de reacción (°C) | Tiempo de reacción (h) | Porcentaje de enzima anclada a la superficie (%) |
|--------|------------------------------|------------------------|--|
| 1 | 0 | 1 | 32 |
| 2 | 0 | 4 | 35 |
| 3 | 25 | 1 | 27 |
| 4 | 25 | 24 | 43 |
| 5 | 40 | 24 | 29 |

Los ensayos muestran como, al aumentar la temperatura de reacción, el anclado de la enzima sobre la zeolita deslaminada disminuye (ensayos 1, 3, 4 y 5). Además, se confirma como al aumentar el tiempo de reacción (ensayos 1, 2, 3 y 4) se incrementa el porcentaje de enzima anclada a la superficie zeolítica, llegándose a alcanzar anclajes del 43% al transcurrir 24 horas de reacción. Es por esto que se escogió, como condiciones para el anclaje de la enzima, 0°C y 4 horas de reacción.

A continuación, se realizó la reacción de anclado sobre los tres tipos de zeolita deslaminada N-ITQ-2 que se habían sintetizado con diferente relación Si/Al, así como la reacción de anclado sobre las zeolitas deslaminadas sin funcionalizar.

Tabla 9: Cantidad de enzima subtilisin anclada a la superficie de distintas zeolitas laminares. Los ensayos se realizan a 0°C y durante 4 horas de reacción.

| Zeolita | Porcentaje de enzima anclada a la superficie (%) |
|----------------------|---|
| ITQ-2 (15) | 66 |
| ITQ-2 (50) | 70 |
| ITQ-2 (∞) | 76 |
| N-ITQ-2 (15) | 35 |
| N-ITQ-2 (50) | 25 |
| N-ITQ-2 (∞) | 15 |

A partir de la Tabla 9 podemos deducir tres hechos: (1) En las zeolitas deslaminadas sin funcionalizar se consigue un mayor porcentaje de anclado de las enzimas cuando menos aluminio hay presente en la estructura zeolítica. (2) En las zeolitas deslaminadas funcionalizadas se consigue un mayor porcentaje de anclado de las enzimas cuando más aluminio hay presente en la estructura zeolítica. (3) El anclado de enzimas es más efectivo cuando las zeolitas deslaminadas no están funcionalizadas con la amina en superficie.

Estos tres sucesos se podrían explicar suponiendo que la enzima no se ancla a la amina, tal como se había predicho, si no que se ancla a los silanoles de la superficie de las zeolitas. Esto provoca que haya mucha más cantidad de enzimas en la superficie de las zeolitas deslaminadas sin funcionalizar que en las que sí que se han funcionalizado previamente con la amina. Así, también se explican las tendencias observadas respecto a la cantidad de aluminio en la estructura zeolítica en las zeolitas sin funcionalizar, ya que cuanto más aluminio hay presente, menos silanoles hay disponibles para realizar la reacción de anclado. Por último, también se explica la tendencia en las zeolitas funcionalizadas, pues a mayor aluminio en red, menos aminas hay presentes en la superficie de la zeolita y por tanto más concentración de silanoles hay presentes.

Este hecho se produciría porque no se habría tenido en cuenta el punto isoeléctrico de la enzima. Las enzimas están constituidas por aminoácidos los cuales se diferencian por el residuo -R (-H para la glicina, -CH₃ para la alanina, -CH₂-SH para la

cisteína, $-\text{CH}_2\text{-OH}$ para la serina...), presentando algunos de estos grupos características ácidos-base. La distribución y concentración de estos aminoácidos con propiedades ácidos-base en cada proteína o enzima provoca que cada una de estas presente un punto isoeléctrico distinto. Cuando el pH de la disolución es igual al punto isoeléctrico de la enzima, esta se encuentra sin carga (neutra) y, al alejarse de este pH la molécula empieza a adquirir carga eléctrica (positiva si el pH baja y negativa si el pH sube).

El punto isoeléctrico de la enzima subtilisin es de 9.4⁴¹ mientras que el punto isoeléctrico de una zeolita se encuentra entre 2 y 4⁴⁵. Al pH de trabajo (6-7), la amina anclada en la superficie está protonada y, por tanto, presenta una carga positiva. De igual forma, la enzima subtilisin también está cargada positivamente, en cambio, los silanoles superficiales se encuentran desprotonados y, por tanto, con carga negativa. Todo esto provoca que la enzima se ancle directamente sobre el soporte zeolítico en vez de sobre la amina anclada.

Por todo esto, se decidió cambiar el organosilano tipo amina por un organosilano tipo amonio, ya que si se aumenta el pH hasta 10 para que la enzima esté cargada negativamente, el organosilano tipo amina se protona (sin carga) mientras que esto no ocurre con el organosilano tipo amonio (mantiene la carga positiva), favoreciéndose la interacción iónica enzima-soporte. Es por ello, que una vez se obtienen las zeolitas deslaminadas A-ITQ-2 se realiza el anclado de las enzimas.

Para conocer la cantidad de enzima soportada se mide el espectro UV de la disolución restante una vez acabada la reacción, y para ello, se realiza una recta de calibrado a distintas concentraciones de la enzima subtilisin en agua (Figura 32).

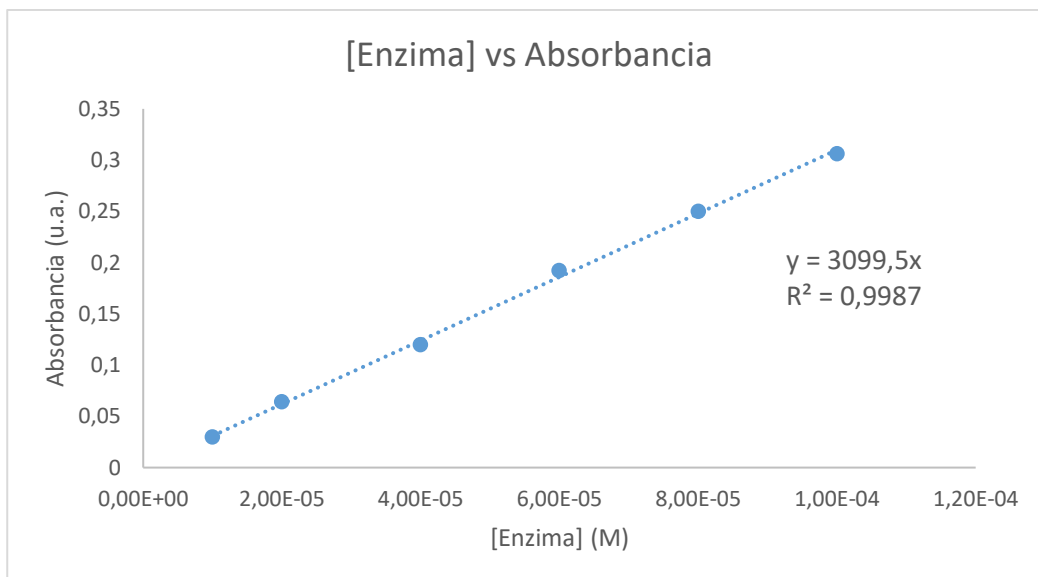


Figura 32: Absorbancia frente a concentración de la enzima subtilisin.

Los resultados del anclaje de la enzima sobre los distintos soportes zeolíticos preparados se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10: Cantidad de enzima anclada a la superficie de las zeolitas deslaminadas A-ITQ-2. Las reacciones se llevan a cabo a 0°C y durante 4 horas.

| Zeolita | pH | Porcentaje de enzima anclada a la superficie (%) |
|----------------------|-----|--|
| A-ITQ-2 (15) | 6-7 | 26 |
| A-ITQ-2 (15) | 10 | 2.5 |
| A-ITQ-2 (50) | 10 | 3.0 |
| A-ITQ-2 (∞) | 10 | 4.0 |

Como se puede observar en la Tabla 10, con el ensayo a pH 6-7 (sin modificar el pH de la propia disolución) se obtienen resultados similares con la zeolita N-ITQ-2 que con la zeolita A-ITQ-2.

En cuanto a los ensayos a pH 10, por los resultados obtenidos resulta evidente que la reacción no ha funcionado. Esto puede estar provocado por la gran cantidad de aniones OH⁻ presentes en la disolución y que compiten con la enzima, también cargada

negativamente, por enlazarse electrostáticamente con las cargas positivas de los organosilanos tipo amonio de la superficie de las zeolitas.

El paso siguiente sería intentar mantener el pH con la utilización de disoluciones tampón o estudiar el efecto de la concentración NaOH en el medio de reacción. Sin embargo, por problemas de tiempo no se han podido explorar estas opciones y se plantea como trabajo para el futuro.

3. Hidrólisis de la harina de cáñamo

Se realizan ensayos de hidrólisis de la harina de cáñamo con la enzima libre, empleando únicamente el soporte zeolítico y con la enzima soportada directamente sobre las zeolitas deslaminadas ITQ-2 (E-ITQ-2). Los resultados se muestran en la Tabla 11:

Tabla 11: Resultados de los ensayos de hidrólisis de la harina de cáñamo.

| Ensayo | Catalizador utilizado | pH | Masa insoluble tras la reacción (g) | Porcentaje de proteína solubilizada (%) |
|--------|----------------------------|----|-------------------------------------|---|
| 1 | Blanco | 8 | 0.526 | - |
| 2 | Blanco | 10 | 0.629 | - |
| 3 | Enzima libre | 8 | 0.394 | 30.0 |
| 4 | Enzima libre | 10 | 0.258 | 31.8 |
| 5 | Soporte ITQ-2 (15) | 10 | 0.450 | 8.0 |
| 6 | Soporte ITQ-2 (50) | 10 | 0.447 | 8.5 |
| 7 | Soporte ITQ-2 (∞) | 10 | 0.444 | 9.0 |
| 8 | E-ITQ-2 (15) [66%] | 10 | 0.481 | 2.0 |
| 9 | E-ITQ-2 (50) [70] | 10 | 0.477 | 1.7 |
| 10 | E-ITQ-2 (∞) [76] | 10 | 0.474 | 1.5 |

Entre corchetes se indica el porcentaje de enzima anclada sobre el soporte zeolítico.

Los ensayos 1 y 2 son el blanco de reacción a pH 8 y 10 que sirven para conocer la porción de harina de cáñamo que es soluble en las condiciones de reacción y sin la

presencia de ningún catalizador. Los ensayos 3 y 4 se realizan para conocer la actividad de la enzima libre, es decir, sin estar soportada. Se realizan a pH 8 y 10 para comprobar a qué pH la enzima era más activa. No obstante, los resultados muestran que la enzima es capaz de catalizar la reacción de hidrólisis casi con la misma eficacia para ambos pHs.

Con los ensayos 5, 6 y 7 se comprobó que los soportes zeolíticos, aunque de forma muy poco eficaz, eran capaces de catalizar la reacción de hidrólisis, solubilizando alrededor del 8% de la proteína total.

Finalmente, los ensayos 8, 9 y 10 sirven para conocer cuál es la actividad de la enzima anclada en los soportes zeolíticos. Al analizar los resultados, se llega a la conclusión de que la enzima soportada no es capaz de catalizar la reacción de hidrólisis cuando esta se encuentra directamente enlazada a la superficie del soporte. Son necesarios más ensayos en el futuro para encontrar el porqué de este comportamiento y mejorarlo.

V. Conclusiones

1. Se ha llevado a cabo la síntesis de los precursores laminares tipo MWW con distintas relaciones Si/Al.
2. Con los precursores laminares obtenidos se ha sintetizado por calcinación las zeolitas MCM-22 y ITQ-1 correspondientes.
3. Se ha realizado el proceso de deslaminado de los precursores laminares para obtener la zeolita deslaminada ITQ-2 con diferentes relaciones Si/Al.
4. Todos los materiales sintetizados, desde los precursores laminares hasta las zeolitas obtenidas de estos, se han caracterizado mediante distintas técnicas físico-químicas.
5. Se ha realizado exitosamente la funcionalización de la superficie de las zeolitas deslaminadas ITQ-2 con dos organosilanos distintos.
6. Se ha conseguido el anclado de la enzima subtilisin de *Bacillus licheniformis* directamente a la superficie de la zeolita deslaminada ITQ-2, sin embargo, no se ha conseguido la interacción electrostática eficaz de esta enzima con los grupos amina y amonio presentes en los organosilanos anclados en la superficie de los soportes zeolíticos. Por tanto, en el futuro se necesitan buscar nuevas estrategias para el anclado de la enzima sobre los soportes zeolíticos.
7. Los catalizadores enzimáticos soportados sintetizados no han sido capaces de desarrollar correctamente la reacción de hidrólisis de la harina de cáñamo. Es necesaria la realización de más ensayos catalíticos con el fin de encontrar un biocatalizador soportado apropiado para realizar esta reacción.

VI. Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Urbano Díaz por acogerme en su grupo de investigación y permitirme trabajar junto a él. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, Raquel, Marta, Sebas, Alejandro y Candela que tantas veces han tenido que responder mis constantes preguntas sobre cualquier tema que se me viniese a la cabeza. A continuación, quiero agradecer a los responsables de los equipos de caracterización por su excelente trabajo y su gran disposición a ayudarme siempre que ha habido duda o problema. Por supuesto, tampoco me puedo olvidar de mis compañeros de Máster con los que tantas horas he pasado a lo largo de este curso y, en especial, a mi amigo y compañero de laboratorio Ismael por todo lo que hemos vivido juntos en el laboratorio de Síntesis 3. Por último, me gustaría agradecer a la Cátedra AINIA-UPV por el apoyo recibido para la realización de este Trabajo de Fin de Máster y a Ana Torrejón, coordinadora del proyecto desde el centro tecnológico AINIA, por su disponibilidad y por la atención dedicada a esta tesis.

VII. Bibliografía

- [1]. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- [2]. Laidler, K.J. and Meiser, J.H. (1982) *Physical Chemistry, Benjamin/Cummings*, p. 425.
- [3]. Lancaster, Mike (2002). *Green Chemistry, an Introductory Text*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. pp. 262–266.
- [4]. "United States Geological Survey, Mineral Commodity Summaries" (PDF). USGS. January 2018.
- [5]. Faber, Kurt (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry* (6th ed.). Springer.
- [6]. Bhangale A., Kathryn L., Richard A., *Macromolecules*, 2012, **45**, 7000–7008.
- [7]. Klibanov M.A. *Science*, 1983, **219**, 722-726.
- [8]. Gimonkinsel M.E., Jiménez V.L., Washmon L., Balkus K.J., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1998, **117**, 373-380.
- [9]. Han Y. J., Stucky G.D., Butler A., *Journal of American Chemical Society*, 1999, **121**, 9897-9904.
- [10]. Woodward, J. J. *Microbiol.* 1988, **8**, 91-102.
- [11]. Fernando-Ochoa R., Osuna-Castro J., Velazque-Mendoza C.V., Escalante-Minakata P., Ibarra-Junquera V., *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2011, **3**, 42–56
- [12]. Database of Zeolite Structures". iza-structure.org. International Zeolite Association. 2017. Consultado el 10 de septiembre de 2019.
- [13]. Fletcher R.E, Sanliang L., Slater B., *Chem. Sci.*, 2017,**8**, 7483-7491.
- [14]. Ravishankar R., Joshi P.N. Tamhankar S., Sivansanker S. Shiralkar V.P., *Adsorption Science and Technology*, 1998, **16**, 607-621.
- [15]. Leonowicz M.E., Lawton J.A., Lawton S.L. Rubin M.K., *Science*, 1994, **15**, 2-8.
- [16]. Rubin M. K., et al., U.S. Patent, 49454325, 1990.
- [17]. Puppe L., Weisser J., *U.S. Patente*, 4439409, 1984.
- [18]. Breck D., Ed. J. Wiley, 1974.
- [19]. Corma A., Corell C., Pérez-Pariente J., *Zeolites*, 1995, **15**, 2-8.

- [20]. Ravishankar R., Sen T., Ramaswamy V., Soni H.S., Ganapathy S., *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1994, **84**, 331-338.
- [21]. Guray I., Warywoda J., Baç N., Sacco A., *Microporous and Mesoporous Materials*, 1999, **15**, 241-251.
- [22]. Kumar N., Lindfors L.E., *Applied Catalysis A: General*, 1996, 147, 175-187.
- [23]. Corma A., Corell C., Martinez A., Pérez-Pariente J. *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1994, **84**, 859-866.
- [24]. Corma A., Martínez-Soria V., *Journal of Catalysis*, 200, **192**, 163-173.
- [25]. Camblor M. A., Diaz-Cabañas M.J., Corell C., Corma A., *Patente Española*, P9501553, 1995.
- [26]. Camblor M. A., Diaz-Cabañas M.J., Corma A., Baerlocher C., *Journal Physical Chemistry B*, 1998, **102**, 44-51.
- [27]. Lagaly G., *Solid State Ionics*, 1986, **22**, 43-51.
- [28]. Pergher S.B. Tesis Doctoral, Instituto de Tecnología Química, Universidad Politécnica de Valencia, 1997.
- [29]. Corma A., Díaz U., Fornés V., *Patente Española*, P200100268.
- [30]. Jacobson A.J., *Materials Science Forum*, 1994, **152-153**, 1-12.
- [31]. Suslick K.S., Price G.J., *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1999, **29**, 295-396.
- [32]. Van Olphen H. A Wiley-Interscience Publication, Ed. John Wiley & Sons, 1963.
- [33]. Mallouk T.E. Gavin J.A. *Acc. Chem. Res.*, 1998, 31, 209-217.
- [34]. Corma A., Fornés V., Pergsher S.B.C, *Patente Mundial*, WO9717290A1.
- [35]. Emeis C.A., *Journal of Catalysis*, 1993, 141 (2), 347-354.
- [36]. Corma A., Fornés V., Guil J.M., Pergsher S.B.C. Maesen Th.L., Buglass J.G. *Nature*, 1998, **396**, 353-356.
- [37]. Gimonkinsel M.E., Jiménez V.L., Washmon L., Balkus K.J., *Stud, Surf, Sci, Catal.* 1998, **117**, 373-380.
- [38]. Han Y.J., Stucky G.D. Butler A., *Journal of American Chemical Society*, 1999, 121, 9897-9904.
- [39]. Webb E., (1992), *Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology and the Nomenclature and Classification of Enzymes*, Londres, Reino Unido, Academic Press. Inc.

- [40]. Veith B., Herzberg C. Steckel S., Feesche J., Heinz Maurer K., Ehrenreich P., Bäumer S., Henne A., Liesegang H., Merkl, Rainer E., Armin G., Gerhard., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **7**, 204–211
- [41]. Markland FS., Smith E.L., *The Enzymes*, 1971, **3**, 561–608.
- [42]. Lee Y.J., Lee H.D., Lee C.H., *Food Research International*, 2001, **34**, 217-222.
- [43]. Hrčková M., Rusňáková M., Zemanovič J., *Czech J. Food Sci.*, 2002, **20**, 7-14.
- [44]. Corma A., Fornes V., Rey F., *Advanced Materials*, 2004, **14**, 71-74.
- [45]. Liu X., Mäki-Arvela P., Aho A., Vajglova Z., Gun'ko V.M., Heinmaa I., Kumar N., Eränen K., Salmi T., Murzin D.Y., *Molecules*, 2018, **23**, 946.