

N° 125
251.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTABILIDAD ENZIMATICA EN
FLUIDOS SUPERCRTICOS



EXAMEN PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO QUIMICO
PRESENTA
SERGIO VALENTINOTTI M.



MEXICO, D.F. 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. Introducción.	1
2. Generalidades.	3
2.1 Fluidos Supercríticos.	3
3. Antecedentes.	10
3.1 Enzimas y formas de empleo.	10
3.2 Alcohol Oxidasa.	11
3.3 Reacciones Enzimáticas en Medios no Acuosos.	12
3.4 Reacciones Enzimáticas en Fluidos Supercríticos.	13
4. Materiales y Métodos.	17
4.1 Lavado del Soporte.	17
4.2 Inmovilización de la Enzima Alcohol Oxidasa.	18
4.3 Incubación de la Enzima Soportada en CO ₂ SC.	20
4.4 Determinación de la Actividad en Fase Acuosa.	21
4.5 Actividad Catalítica del Polvo Enzimático en CO ₂ SC.	22
4.6 Hidratación de la Enzima.	26
4.7 Sistema de Recirculación del Sustrato Disuelto.	27
5. Resultados y Discusión.	29
5.1 Incubación de la Enzima Soportada en CO ₂ SC.	29
5.2 Evaluación de la Actividad Catalítica de la Enzima Inmovilizada en Presencia de CO ₂ SC.	34
5.3 Sistema de Recirculación del Sustrato Disuelto.	37
6. Conclusiones.	39
7. Recomendaciones	41
8. Bibliografía.	43

1.

Introducción

La reciente conciencia ambiental ha motivado a los grupos de investigación a desarrollar un nuevo tipo de tecnología que no afecte al medio ambiente. Uno de los factores que altera de manera más severa al equilibrio ecológico es la contaminación generada por la industria química la cual produce desechos no reciclables a corto plazo. Muchas de las sustancias generadas artificialmente también existen en la naturaleza como producto de algún mecanismo biológico. El emplear estos productos en lugar de los sintetizados por la industria química representa una alternativa viable al problema ecológico. Para ello hace falta emplear los mismos mecanismos que emplea la naturaleza para producirlos y desarrollar la tecnología necesaria para escalar su producción. El secreto de todo esto reside en las enzimas. Estos catalizadores son los responsables de todas las conversiones biológicas que realizan los seres vivos. A raíz de lo mencionado anteriormente, en la última década se ha incrementado notablemente el estudio sobre sus mecanismos, estructura, estabilidad y aplicaciones.

En la actualidad, el empleo de estos biocatalizadores en la industria es limitado ya que su estudio se había enfocado principalmente a su empleo en medios acuosos, entorno en el cual se encuentran naturalmente. Es por ello que hasta hace poco se consideró y estudió la posibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticas en disolventes no acuosos. El ampliar el campo de aplicación de la enzimología constituye un gran adelanto que podría iniciar el empleo de las enzimas en sustratos difíciles de solubilizar en agua. Se han estudiado diversas técnicas y diversos solventes para llevar a cabo estas reacciones. Podemos mencionar entre las técnicas más importantes a las micelas invertidas, y como medios de reacción, los disolventes orgánicos. Estos últimos presentan problemas de tipo funcional, ya que además de la posible contaminación que se genera al emplearlos, la separación y solubilización de los productos y los sustratos

de la(s) reaccion(es) resultan complicados y costosos. En los últimos años se ha estado trabajando en la búsqueda de medios que permitan la solubilización de los sustratos y la fácil recuperación de los productos. Bajo este concepto, varias líneas de investigación a nivel mundial se están enfocando actualmente hacia la posibilidad de emplear como medio de reacción a los fluidos supercríticos, aprovechando las ventajas operacionales que estos ofrecen.

Los fluidos supercríticos son empleados en la actualidad en procesos de extracción debido a las extraordinarias cualidades de solubilización que presentan. Estas cualidades en algunos casos llegan a hacer el proceso industrial de extracción más ventajoso que el que emplea solventes orgánicos, por lo que además de estar registradas cientos de patentes involucrando fluidos supercríticos, ya existen procesos industriales consolidados que emplean extracción supercrítica.

El objetivo de esta investigación es estudiar la factibilidad de llevar a cabo una reacción enzimática de oxidación en un fluido supercrítico. En el departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química se tiene experiencia en el manejo de enzimas en disolventes orgánicos; existen estudios realizados por el Dr Eduardo Bárzana sobre el comportamiento de estas proteínas en medios no acuosos, por ejemplo utilizando sustratos en forma gaseosa. Por otro lado, en el departamento de Química Analítica de dicha facultad se cuenta con el conocimiento sobre cromatografía y extracción en fluidos supercríticos del M. en C. Santiago Capella y con la infraestructura de un equipo de cromatografía supercrítica. La conjunción de la experiencia e infraestructura de ambos grupos de trabajo hacen posible y facilitan el estudio aquí presentado.

2.

Generalidades

2.1 Fluidos Supercríticos

El término de Fluidos Super-Críticos (FSC) no es nuevo. De hecho fue hace más de 100 años cuando Hannay y Hogarth los describieron por primera vez (McHugh y Krukons, 1986). El estudio de los FSC se ha incrementado debido a que resultan una excelente opción para reemplazar a los disolventes orgánicos. Dentro de algunos años el uso de estos disolventes será muy limitado debido a restricciones impuestas por consideraciones ecológicas y toxicológicas que se están tomando. Es por esto que resulta atractivo utilizar sustancias afines al medio ambiente. Esto es particularmente válido para el CO_2 supercrítico (CO_2SC).

Un medio supercrítico es aquel en el que un fluido se encuentra a temperaturas y presiones por arriba de su punto crítico en el diagrama de equilibrio líquido-vapor y por lo tanto no se puede licuar al incrementar la presión del sistema (Figura 1.1).

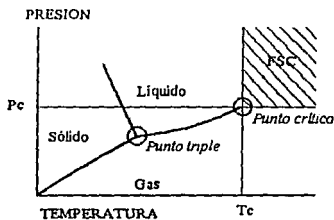


Figura 1.1
Diagrama de fases para una sustancia pura.

El hecho de encontrarse en la región supercrítica le confiere al fluido ciertas características muy peculiares como densidad, viscosidad y coeficiente de difusión intermedias entre las de un líquido y un gas *Tabla 1.1*

Propiedad	Gas	FSC	Líquido
Densidad (g/cm ³)	(0.6-2.0)x10 ³	0.2-0.9	0.6-1.6
Coefficiente de difusión (cm ² /s)	0.1-0.4	(0.2-0.7)x10 ³	(0.2-2.0)x10 ³
Viscosidad (g/cm s)	(1-3)x10 ⁴	(1-9)x10 ⁴	(0.2-3.0)x10 ²
Tensión superficial (dinas)	0	0	finito

Tabla 1.1
Propiedades típicas de gas, líquido y fluido supercrítico.
(Tomado de Ponce y Treviño 1989).

En la tabla anterior vemos como la densidad de los FSC es cercana a la de los líquidos, lo que les permite tener un poder disolvente relativamente alto similar al de los líquidos. Por otro lado la alta difusividad (en comparación con la de los líquidos) les proporciona una gran capacidad de penetración dentro del soluto. Su baja tensión superficial permite un buen "mojado" similar al de los gases. Además de lo anterior, quizá la característica más importante es la capacidad de modificar su densidad con pequeños cambios en la presión y/o en la temperatura según se observa en las *Figuras 1.2* y *Figuras 1:3* (NBS 1987)(McHugh y Krukonic , 1986).

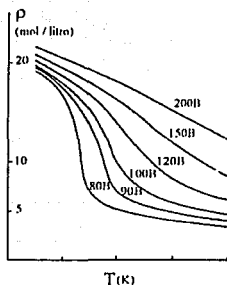


Figura 1.2
Variación isobárica de la densidad del CO_2

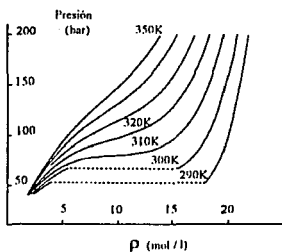


Figura 1.3
Variación isotérmica de la densidad del CO_2

Las consideraciones anteriores son válidas para casi cualquier fluido en condiciones supercríticas. En la *Tabla 1.2* se presentan los valores de algunas propiedades importantes para los fluidos más empleados como disolventes en condiciones supercríticas:

Sustancia	W (g/mol)	Tc (°C)	Pc (atm)	ρ (g/cm ³)	μ (debye)
Metano	16	-83	45.4	0.16	0
Etileno	28	9	49.7	0.22	0
Dióxido de Carbono	44	31	72.8	0.47	0
Etano	30	32	48.2	0.20	0
Hexafluoruro de Azufre	146	45	37.1	0.74	0
Amoniaco	17	132	111.3	0.24	1.5
n-Hexano	86.2	234	29.3	0.23	0
Etanol	46	243	63.0	0.28	1.7
Agua	18	374	217.7	0.32	1.8

Tabla 1.2
Propiedades de los principales FSC.
(Tomada de Ponce y Treviño 1989).

El FSC más empleado actualmente es el CO₂. Este posee la ventaja de que tiene puntos críticos relativamente bajos (Tc=32°C/Pc=73atm), no contamina, es económico y no es tóxico, lo cual permite su uso en productos alimentarios y de la salud.

Es de gran utilidad e importancia conocer el comportamiento de fases cuando se trabaja con FSC. En la *Figura 1.4* se muestra una gráfica para el CO₂ en función de la Presión Reducida $Pr = P/Pc$ y la Densidad Reducida $pr = \rho/\rho_c$ para varias isothermas de Temperatura Reducida $Tr = T/Tc$.

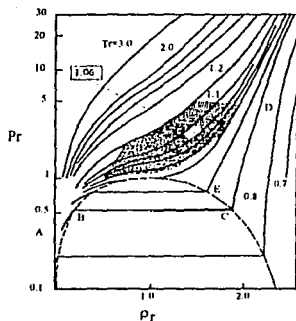


Figura 1.4
Isotermas presión densidad para CO₂

De esta gráfica, cuando $T < T_c$ ($T_r < 1$), si se comprime isotérmicamente el vapor (curva A-B) aparece un líquido de densidad C en equilibrio con el vapor. Al continuar con la condensación, el vapor desaparece y la curva C-D corresponde entonces a la compresión del CO₂ líquido.

Para T 's un poco mayores a T_c , se pueden alcanzar densidades cercanas a las del líquido en la región cercana a la P_c . Pequeños cambios en la presión significan grandes cambios de densidad.

Para $T \gg T_c$, son necesarias presiones muy altas para obtener densidades similares a las del CO₂ líquido.

Como se mencionó anteriormente, a mayores densidades, mejor poder disolvente, por lo que los procesos que involucran el uso de CO₂SC se llevan a cabo en la región sombreada de la *Figura 1.4*. Se puede inferir entonces que, bajo condiciones

isobáricas, la capacidad disolvente es mayor para T cercanas a Tc. Por otra parte, si el proceso es isotérmico, el poder disolvente es mayor para presiones mucho mayores a la Pc.

Este poder disolvente ajustable por variaciones en presión y temperatura representa el gran atractivo de los FSC como alternativa de interés a los disolventes orgánicos. Sin embargo, la polaridad de los sustratos debe ser tomada en cuenta. Para esto se emplean los cosolventes.

El CO₂ es una base de Lewis. Su dipolo inducido ácido/base le permite solvatar en condiciones supercríticas un gran número de sustancias (Lee y Markides, 1990). Para modificar su poder solvatante, se emplean los llamados cosolventes que son sustancias que modifican la polaridad de la mezcla con CO₂. Los cosolventes más empleados son metanol, etanol y acetona. El uso de cosolventes tiene sus limitaciones pues se deben de conocer bien los puntos críticos de la mezcla, ya que estos varían según la concentración de modificador que se le añade (Page et al. 1992). En la Figura 1.5 podemos observar un diagrama de fases para el CO₂ en el que se observa como se modifican las condiciones supercríticas al agregar un cosolvente.

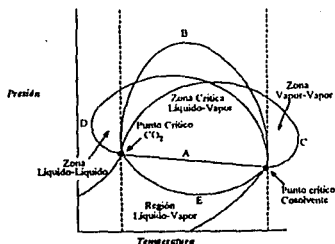


Figura 1.5
Comportamiento de fases del CO₂SC con modificadores.

La curva A nos muestra la zona crítica de equilibrio líquido-vapor entre los puntos críticos del modificador puro y del CO_2 puro. La separación l-v ocurre por debajo de la zona crítica, mientras que por arriba de esta se obtiene una sola fase. La línea recta que une los puntos críticos de la mezcla indica que los compuestos tienen poca desviación de la ley de Raoult; este es el caso en el que los componentes tienen propiedades físicas y puntos críticos similares. El comportamiento descrito por la curva B es el caso más común. Ocurre cuando los componentes tienen presiones críticas similares pero existen diferencias en temperaturas críticas. En el caso de que la temperatura crítica de la mezcla sea mayor que la de los componentes puros se obtendrá una curva tipo C, si la temperatura crítica es menor se obtendrá una curva tipo D. Cuando la curva de zona crítica es cóncava, línea E, el sistema tiene un comportamiento muy desviado de la ley de Raoult. Este comportamiento puede ocurrir con mezclas de compuestos polares y no polares (Page et al. 1992).

El uso de los FSC es cada vez mayor. Su primer empleo fue como disolvente para la extracción selectiva en productos naturales como cafeína de café y aceite esencial de lúpulo, (McHugh y Kruckonis, 1986), (Ponce y Treviño, 1989). Recientemente se ha empleado como fase móvil en cromatografía a altas presiones (Lee y Markides, 1990). Actualmente se trabaja intensamente en proyectos de investigación dirigidos a evaluar a los FSC como medio de una variedad de reacciones (Johnston, 1989). Con respecto a este último punto, una de las posibilidades más interesantes y novedosas es la de utilizarlos como medio para llevar a cabo reacciones enzimáticas (Nakamura, 1990).

3.

Antecedentes

3.1 Enzimas y formas de empleo

El empleo de las enzimas para fines industriales no es reciente. De hecho gran parte de los procesos que involucran catálisis biológica se conocen desde hace más de un siglo. En la actualidad se están optimizando estos procesos y a la vez utilizando el poder catalítico de estas proteínas para generar tecnología. El campo de aplicación industrial de las enzimas se ha diversificado grandemente. Encontramos ejemplos de su uso en la industria médica, analítica, alimentaria, farmacéutica e inclusive en la petroquímica (*Wiseman, 1980*).

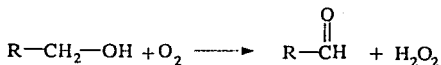
La manera tradicional de poner a la enzima en contacto con el sustrato es la de suspender a la proteína en el medio de reacción. La proteína puede estar encapsulada dentro de la célula que la generó o encontrarse pura. Este mecanismo es muy simple pero implica la pérdida de la enzima al querer recuperar el producto de la reacción. Una alternativa es la de inmovilizar a la enzima sobre un sustrato. Esto último permite el diseño de sistemas continuos además de la posible recuperación del catalizador. La inmovilización puede aplicarse sobre la enzima libre o sobre el microorganismo productor de esta. Al inmovilizar un biocatalizador se reduce la pérdida de éste durante el proceso, lo que aumenta significativamente su concentración y genera un mejor contacto con el sustrato (*Wiseman, 1980*). La enzima inmovilizada puede permanecer en el medio de reacción tanto como su estabilidad lo permita.

Por otro lado, las reacciones enzimáticas siempre se han llevado a cabo en medios acuosos. Esto tal vez por ser este el medio en el que la naturaleza nos las presentó. No existe en realidad una razón comprobada por la que deban de actuar bajo

estas condiciones. En los últimos años se han estudiado otro tipo de medios de reacción como son reacciones en fase gaseosa (*Bárzana et al, 1989 a y b*), disolventes orgánicos (*Zaks y Klibanov, 1984 y 1988*) y fluidos supercríticos (*Hammond et al 1985*), (*Randolph et al, 1985 y 1988*), (*Nakamura, 1990*).

3.2 Alcohol Oxidasa

La enzima que se empleó para este estudio fue la alcohol oxidasa, esta es una enzima proveniente de levaduras que es específica para alcoholes de cadena corta. Su acción catalítica resulta en la oxidación de estos para formar aldehidos:



La enzima Alcohol oxidasa proveniente de la levadura *Pichia pastoris* tiene un peso molecular de 675,000 daltons y su temperatura y pH óptimos son respectivamente: 35°C y 7.5.

Dentro de su estructura tiene 65 grupos SH por molécula, los cuales son sensibles a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, subproducto de la oxidación (*Couderec y Baratti, 1980*). Está constituida por 8 subunidades idénticas, las cuales están unidas por fuerzas electrostáticas (*Patel et al, 1981*).

Esta enzima se puede emplear para producir acetaldehído empleado como saborizante ó en sistemas de detección de alcohol.

Dentro del grupo de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química se cuenta con experiencia previa en el manejo de esta enzima (*Bárzana et al, 1989 a,b*).

3.3 Reacciones Enzimáticas en Medios no Acuosa

Casi todo el conocimiento existente sobre enzimas proviene de su estudio en medios acuosa. El empleo de otro tipo de disolventes para llevar a cabo reacciones enzimáticas, explícitamente disolventes orgánicos, podría ayudar a conocer el funcionamiento de estas proteínas y a explotar su uso al máximo (*Zaks y Klibanov, 1984*).

Hasta la fecha existen dos aproximaciones al empleo de disolventes orgánicos. La primera consiste en disolver a la enzima en una emulsión de surfactante. Se agrega la mezcla al disolvente orgánico y la enzima queda atrapada dentro de la micela. La característica anfipática del surfactante estabiliza a la enzima en formas llamadas micelas invertidas (*Zaks y Klibanov, 1988*). Si bien este tipo de acercamiento pone a la enzima en contacto cercano con el sustrato que cataliza, la enzima se sigue manteniendo esencialmente en un medio acuoso.

La segunda variante resulta de suspender a la enzima directamente en el disolvente. Las propiedades de la enzima en estos medios son distintas a las que presentan en agua. Entre otras cosas, aumenta su termoestabilidad, cambia su especificidad y catalizan sustratos difíciles de solubilizar en agua (*Zaks y Klibanov, 1984*).

Es importante aclarar que la acción catalítica de estas proteínas en disolventes orgánicos, también es afectada por el contenido de agua. Esta juega un papel dual, ya que por un lado es indispensable para mantener la conformación activa de la enzima y por el otro es uno de los factores que promueven la inactivación.

Cabe mencionar que la actividad enzimática en estos disolventes es menor a la observada en medios acuosa. Actualmente, con el uso de la ingeniería genética, se ha logrado sintetizar enzimas capaces de tener una actividad catalítica cercana a la que presentan en medios acuosa (*Blanch y Clark, 1991*).

Adicionalmente a las consideraciones ecológicas con respecto al uso de los disolventes orgánicos, la recuperación de los productos de reacción disueltos en ellos resulta muy laborioso. Sería idóneo emplear un medio de reacción en el cual la enzima conserve las cualidades que presenta en medios orgánicos, que simplifique el tren de operaciones unitarias necesario para la obtención final del producto y además, que su empleo no tenga repercusiones ecológicas. Recientemente se ha encontrado que los FSC en especial el CO_2SC pueden resolver los problemas anteriores y además incrementan de cierto modo las ventajas de emplear enzimas en disolventes no acuosos (Nakamura, 1990).

3.4 Reacciones Enzimáticas en Fluidos Supercríticos

La factibilidad de llevar a cabo una reacción enzimática en FSC depende básicamente de 3 factores:

1. Solubilidad del sustrato
2. Estabilidad de la enzima
3. Actividad de la enzima en condiciones supercríticas

Solubilidad:

La solubilidad de los sustratos en FSC se puede predecir teóricamente a partir de ecuaciones de estado que involucran sistemas binarios, ternarios o multifásicos. Experimentalmente, se han hecho estudios sobre la solubilidad de biomoléculas como esteroides y su comportamiento con cosolventes en CO_2SC (Weder, 1980).

Estabilidad

Existen reportes (*Nakamura, 1990*) de que muy altas presiones desnaturalizan a las proteínas, por lo que el fluido empleado debe de tener presiones críticas no muy elevadas. El CO₂SC no presenta una presión crítica muy alta, por lo que es un medio utilizable. Se publicó un artículo (*Taniguchi et al, 1987*) en donde se reporta el estudio de nueve enzimas sometidas a CO₂SC seco y con diferentes concentraciones de modificadores. En ningún caso se observó gran diferencia entre la actividad original y la residual.

Actividad

Los primeros estudios realizados se publicaron entre 1985-1986 (*Randolph et al, 1985*), (*Hammond et al, 1985*). Estos estudios preliminares indican la factibilidad de realizar una reacción enzimática en FSC. A partir de entonces se empezaron a estudiar a fondo diferentes reacciones enzimáticas tanto en batch como en flujo continuo. A continuación se presenta una tabla con los principales trabajos hechos al respecto hasta la fecha (*Tabla 3.1*):

Reacción	Enzima	Soporte	Reactor	Condiciones de reacción	[Sustrato]	[Agua]
Hidrólisis de P-Nitro-fenil fosfato	Fosfatasa alcalina	---	Batch	CO ₂ 35°C 100atm	7.6mM	56mM
Oxidación de p-cresol y p-cloro-fenol	Polifenol oxidasa	Perlas de vidrio (62-149 µm)	Batch y continuo	CO ₂ /O ₂ 36°C 340har ClIF ₃ /O ₂ 34°C 340har	<7.8mM	<83mM
Acidólisis de trioleína (a) con ácido esteárico (b)	Lipasa	Celita y resina de intercambio iónico (444µm)	Batch	CO ₂ 50°C 300atm	a 5.6mM b 17.6mM	0-57mM
Alcoholólisis de acetato de etilo con alcohol iso-amílico	Lipasa	Resina de intercambio iónico (444µm)	Continuo	CO ₂ 60°C 100har	320mM	0-63mM
Hidrólisis de glucosinatos → alilisotiocianatos.	Mirusinasa	Raíz de Rábano	Batch	CO ₂ 20/40°C 200har	3.2mM	11x10 ³ mM
Oxidación de Colesterol a 3colesten 4-ona	Colesterol oxidasa	Perlas de Vidrio(50µm)	Batch y continuo	CO ₂ 35°C 100atm	1mM (batch) 0.1mM (continuo)	570mM (batch) 58mM (continuo)
Acidólisis de tricaprilina con ácido oléico	Lipasa	Resina de intercambio iónico (444µm)	Batch	CO ₂ 60°C 100atm	---	---
Transesterificación de N-acetilfenil-amida(a) con etanol(b)	Subtilisina Carlsberg	---	Batch	CO ₂ 45°C 150har	(a) 56µM (b) 0.5-5% en CO ₂	---

Tabla 3.1
Resumen de las reacciones enzimáticas publicadas hasta 1990
(Tomada de Nakamura, 1990)

Retomando los elementos señalados anteriormente podemos sintetizar las ventajas que el uso de este fluido (CO₂SC) ofrece para ser utilizado como medio de reacciones enzimáticas:

- Las condiciones críticas, T_c y P_c , son lo suficientemente bajas como para no promover el deterioro de las proteínas y por ende de las enzimas.
- La gran variación de la densidad (*i.e.* de su poder como disolvente) a pequeños cambios en la temperatura y/o presión simplifican la manipulación de la selectividad de una reacción. Además, la polaridad puede ser ajustada fácilmente con la adición de un modificador por lo que una gran gama de sustratos pueden ser disueltos.
- Por su alta difusividad y su tensión superficial de casi cero se reducen las limitaciones de mojado y problemas difusionales para catalizadores heterogéneos *v.g.* enzimas inmovilizadas.
- Su baja toxicidad y baja reactividad e inocuidad hacia las proteínas permiten el empleo de éstas en su seno.
- Las etapas de recuperación de los productos y eliminación del disolvente se pueden efectuar mediante una simple reducción de la presión hasta llegar al estado gaseoso. Los productos pueden entonces cristalizarse, absorberse ó condensarse dependiendo de su naturaleza.

4.

Materiales y Métodos

Esta sección describe las técnicas empleadas para llevar a cabo la determinación de la estabilidad de la Alcohol Oxidasa en CO_2SC . Las etapas seguidas se enlistan a continuación y se describirán posteriormente junto con los materiales empleados en cada una. Los reactivos empleados fueron adquiridos de casas comerciales y eran todos de grado analítico

1. Lavado del soporte (DEAE celulosa, Vidrio de porosidad controlada y Alumina).
2. Inmovilización de la enzima Alcohol Oxidasa.
3. Incubación en CO_2SC de la enzima soportada.
4. Determinación de la actividad en fase acuosa.
5. Actividad catalítica del polvo enzimático en CO_2SC .
6. Hidratación de la enzima.
7. Sistema de recirculación del sustrato disuelto.

4.1 Lavado del Soporte

Los soportes DEAE Celulosa, Vidrio de Porosidad Controlada y Alúmina fueron adquiridos de SIGMA Chemical CO. El procedimiento de lavado para todos los soportes fue idéntico:

- [i] Se pesó una cierta cantidad de soporte y se suspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 1mM (pH 7.5) agitándola por 10min.
- [ii] Se dejó reposar la solución y se extrajo el excedente de líquido.

- [iii] Se repitieron los pasos [i] y [ii] tres veces.
- [iv] El soporte fué lavado con álcali ($\text{pH}\approx 11$) y posteriormente con solución de HCl para eliminar iones.
- [v] Se filtró la mezcla resultante y se lavó exhaustivamente con agua deionizada hasta que el sobrenadante presentaba un $\text{pH}\approx 6$.
- [vi] El material resultante se dejó secar bajo flujo de aire y una vez seco se almacenó en refrigeración.

4.2 Inmovilización de la Enzima Alcohol Oxidasa.

La enzima Alcohol Oxidasa (AO) se adquirió de la compañía PROVESTA ENZYMES (Bartlesville, Oklahoma) con las siguientes características: Actividad 1371 E.U./ml, Concentración de proteína 54.72 mg/ml, Actividad específica 25 E.U./mg donde una E.U. oxida 1 mMol de etanol a acetaldehído por minuto a 25°C y pH 7.5. Para mantener su estabilidad, esta debe almacenarse a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. La técnica empleada para inmovilizar a la enzima sobre 10g de soporte se describe a continuación. Cabe mencionar que para cualquiera de los tres soportes se siguió el mismo procedimiento.

- [i] Se pesó el soporte, previamente lavado y secado.
- [ii] 10ml de AO se mezclaron con 10 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 1mM (pH 7.5).
- [iii] Se añadió la mezcla de enzima - solución amortiguadora al soporte poco a poco mientras se mezclaba y se formaba una pasta homogénea. En el caso de la DEAE celulosa se necesitó agregar 5ml más de solución amortiguadora ya que este soporte es muy higroscópico.

[iv] La pasta formada se introdujo dentro del sistema de secado ilustrado en la *Figura 4.1*.

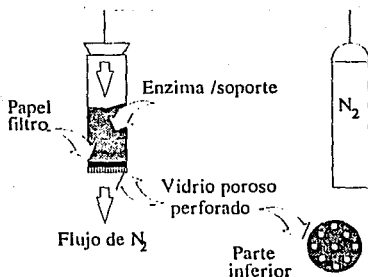


Figura 4.1
Técnica de Secado de la enzima inmovilizada.

Este sistema consta de un embudo de filtración al que se le hicieron pequeñas perforaciones en el vidrio sinterizado del fondo. Se colocó un papel filtro sobre el filtro de vidrio y la pasta sobre este último. Se tapó el frasco y se conectó a un tanque de N_2 . Se dejó pasar este gas inerte con el objeto de evitar la inactivación de la enzima por oxidación. Una vez seco, el catalizador enzimático se almacenó a una temperatura de $-5^{\circ}C$ y al vacío. A estas condiciones el preparado es estable alrededor de 6 meses.

4.3 Incubación de la enzima soportada en CO_2SC .

[i] La incubación se hizo de la manera que se indica en la *Figura 4.2*.

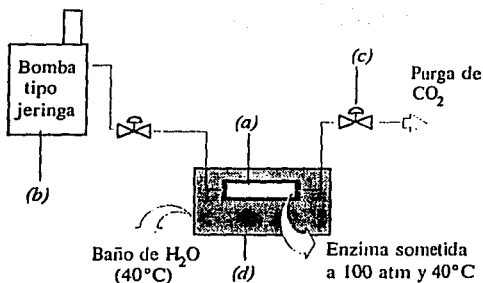


Figura 4.2
Sistema para la incubación de la enzima a CO_2SC

Se tomaron 20mg de polvo enzimático y se introdujeron dentro de la celda (a). Esta estaba conectada a una bomba tipo jeringa (b) la cual suministraba CO_2 a 100atm. Se eliminó con el CO_2 el aire contenido dentro de la celda a través de la purga (c). A continuación se selló herméticamente la celda y se introdujo dentro de un baño de agua a temperatura controlada de 40°C ($T > T_c$ para el CO_2).

Una vez cargada con enzima, la celda se incubó por diferentes intervalos de tiempo dentro del baño. Paralelamente se introdujo dentro del baño un frasco sellado que contenía la misma cantidad de polvo enzimático pero expuesto a una atmósfera de Nitrógeno (esto

con el fin de evitar la oxidación de la enzima con el aire). Este sistema se empleó como control (v.gr. sin tratamiento) y se incubó el mismo tiempo que el contenido de la celda (CO₂SC).

4.4 Determinación de la Actividad en Fase Acuosa.

- [i] Después de la exposición a CO₂SC se recuperó el polvo enzimático. Este se resuspendió en 1ml de una solución amortiguadora de fosfatos 1mM (pH 7.5). Para iniciar la reacción se agregó 1ml de una solución de etanol 80mM. La muestra se agitó vigorosamente y la velocidad inicial fue obtenida a partir de las concentraciones del acetaldehído formada. Para ello se hicieron inyecciones cada 5 minutos a un cromatógrafo de gases SIGMA II de Perkin Elmer. La columna empleada fue: *10% Carbowax 20M Chromosorb W HP de 6ft y 1/8in* y las condiciones del cromatógrafo: $T_{\text{horno}}=90^{\circ}\text{C}$ / $T_{\text{iny}}=120^{\circ}\text{C}$ / $T_{\text{det}}=120$ / *Flujo N₂=10ml/min (acarreador)*. Se siguió el mismo procedimiento para la enzima control. En ambos casos las muestras correspondían a 1, 6 y 24 horas de exposición. Esta determinación se realizó por triplicado.

4.5 Actividad Catalítica del Polvo Enzimático en CO_2SC .

- [i] Esta parte se hizo empleando el Sistema 1 mostrado en la *Figura 4.3*.

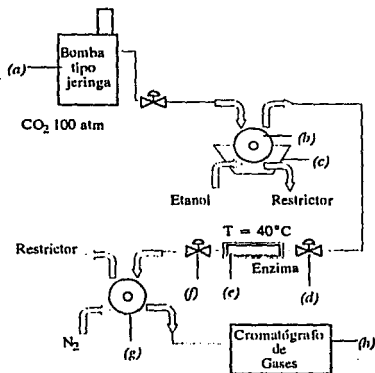


Figura 4.3
Sistema 1.-Inyección directa al cromatógrafo.

Se conectó una bomba tipo jeringa (a) que suministraba una mezcla de CO_2 y aire a 100atm a una válvula de inyección (b). Esta válvula en posición de inyección permitía el paso de los vapores de etanol contenidos dentro de su "loop"¹(c). La salida de la válvula estaba conectada a una válvula de paso (d), la cual permitía la entrada del gas (CO_2 + vapores de etanol) a la celda que contenía al polvo

¹Debido a la inexistencia de una palabra castellana para definir la tubería en la que se carga la muestra que será puesta en línea con el flujo se empleará la palabra del idioma inglés "loop".

enzimático (e). Dicha celda estaba encaquetada manteniendo su temperatura a 40°C. El flujo de salida de la celda fue controlado mediante otra válvula de paso (f) la cual distribuía el contenido de la celda a una nueva válvula de inyección (g). El loop de esta última² se llenaba con el contenido de la celda permitiendo que al momento de la inyección este se incorporara al flujo de N₂ que entraba al Cromatógrafo de Gases. Toda la tubería empleada para este sistema tenía un diámetro interno (DI) de 1/16 de pulgada y era de acero inoxidable.

El equipo empleado fue un sistema de extracción supercrítica SUPREX (Pittsburgh, Pennsylvania) que consta de:

- Una bomba de tipo jeringa con capacidad para 250ml de fluido a alta presión y una descarga con un rango desde 1 a 400atm.
- Un cromatógrafo de gases que utilizaba una columna capilar de *Carbowax 20M entrecruzada* $L = 25m$, $DI = .25mm$ y $df = .25\mu$, y las condiciones del cromatógrafo: $T_{horno} = 90^{\circ}C$ / $T_{iny} = 120^{\circ}C$ / $T_{det} = 120$ / Flujo N₂ = 10ml/min.
- Un controlador con el que se podía regular la presión de descarga de la bomba, la temperatura del inyector, la temperatura del horno del cromatógrafo y la temperatura de la celda de extracción.

²El loop de esta celda era interno por lo que no se muestra en el diagrama.

Operación:

El arreglo del sistema permitía llenar la celda de CO₂, aire y vapores de etanol manteniendola a 40°C el tiempo deseado de incubación. Una vez transcurrido éste, la composición del fluido contenido en la celda se determinaba con el cromatógrafo de gases.

Debido a los problemas operacionales que el sistema anterior presentaba y que se discutirán en el siguiente capítulo se ideó un nuevo arreglo, el cual se describe a continuación (Figura 4.4):

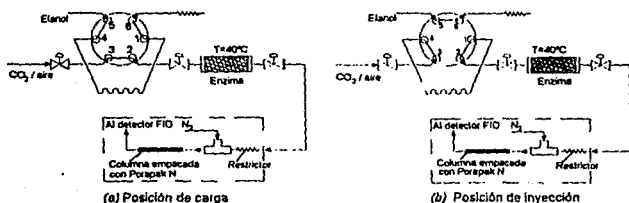


Figura 4.4
Inyección directa al cromatógrafo con columna empacada con PORAPAK N.

Una mezcla de CO₂/aire³ suministrada por una bomba tipo jeringa se hacía pasar a través de una válvula de inyección. Esta última, en posición de carga (a) permitía llenar el "loop" de vapores de etanol, mientras pasaba la mezcla atravesando el reactor que contenía a la enzima. De ahí pasaba por un restrictor y posteriormente por una

³La mezcla de CO₂/aire se hacía de la siguiente manera: En el recipiente de la bomba tipo jeringa, se colocaban 100ml de aire a 2 atm. Después se introducían 2.50ml de CO₂ a 6.5 atm y la mezcla se presurizaba hasta alcanzar 100atm.

Te, donde se incorporaba un flujo de N_2 que lo acarrea a una columna empacada con *Porapak N*. En la posición de inyección (b) se incorporaba el contenido del loop al flujo de CO_2 /aire. En el proceso batch, se cerraba la válvula de salida del reactor enzimático, mientras que en el continuo esta permanecía abierta. Durante la captura de los productos de reacción la precolumna se introducía en un baño de agua-hielo durante 20 minutos para evitar que los productos se perdieran.

El equipo empleado fue básicamente el mismo sistema de extracción supercrítica SUPREX utilizado en el caso anterior.

4.6 Hidratación de la Enzima

- [i] Se colocó una cantidad determinada de enzima dentro de la parte inferior de una caja de petri. Esta se introdujo dentro de un frasco que contenía algodón húmedo. Se selló el frasco al vacío y se introdujo en el refrigerador por 12 horas. De este modo se obtenía enzima húmeda con buena actividad residual. Se muestra un esquema en la *Figura 4.5*

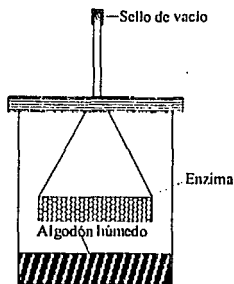


Fig 4.5
Sistema para hidratar a la enzima.

4.7 Sistema de Recirculación del Sustrato Disuelto.

- [i] Esta parte se hizo empleando el Sistema 2 descrito en la *Figura 4.6*.

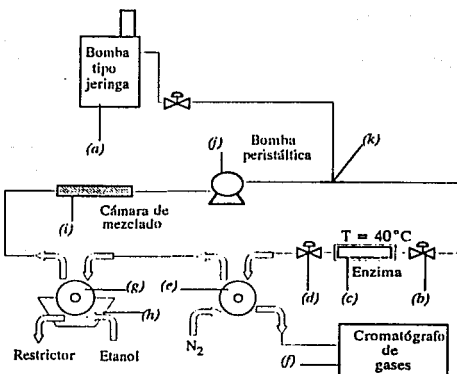


Figura 4.6.
Sistema 2- Recirculación del sustrato.

Una bomba tipo jeringa (a), que suministraba CO_2 a 100atm fue conectada a una válvula de paso (b), la cual permitía la entrada del fluido a una celda de extracción que contenía al polvo enzimático (c). Esta celda estaba enchaquetada para mantener su temperatura a 40°C . A la salida el sistema contaba con otra válvula de paso (d) a través de la cual pasaba el fluido a una válvula de inyección (e). El flujo proveniente de la celda pasaba por un loop cuyo contenido en el momento de la inyección se incorporaba al flujo de N_2 que

entraba al cromatógrafo de gases (j). Con la válvula de inyección (e) en posición de carga, el loop se conectaba a otra válvula de inyección (g). El loop de esta última (h) estaba lleno de vapores de etanol que al momento de la inyección se incorporaban al flujo de CO₂. La salida de la válvula era a una cámara de mezclado (i), para de ahí pasar a una bomba peristáltica (j). La descarga de esta última estaba unida, mediante una T (k) al flujo proveniente de la bomba tipo jeringa (a).

Toda la tubería empleada para este sistema, tenía un DI de 1/16 de pulgada y era de acero inoxidable. El equipo empleado fue el mismo sistema de extracción descrito para la técnica anterior además de una bomba de pistón marca BECKMAN con una capacidad de flujo de 10ml/min, una presión de succión máxima de 300atm y una presión de descarga de 390atm. La columna empleada en el cromatógrafo y las condiciones de operación de este fueron las mismas que en el sistema anterior.

Operación:

El arreglo del sistema permitía recircular su contenido mediante la bomba de pistón (h) y mantener la presión de 100atm en su interior gracias a la bomba tipo jeringa (a). Se cree, que el problema principal de este arreglo era nuevamente el bajo contenido de aire dentro del sistema.

5.

Resultados y Discusión

5.1 Incubación de la Enzima Soportada en CO₂SC

El objetivo principal de esta investigación consistió en estudiar la estabilidad de la enzima Alcohol Oxidasa (AO) en FSC. El primer paso fué determinar si esta sufría alguna modificación al estar expuesta a altas presiones. Existen información sobre la posibilidad de someter a las proteínas a altas presiones (*Weder, 1980*) sin afectarlas. Además se han reportado reacciones enzimáticas en este tipo de medios que indican que las enzimas no son afectadas drásticamente por estas condiciones (*McHugh y Krukonis, 1986*), (*Taniguchi et al, 1987*).

Con esta información y conociendo a *grosso modo* las propiedades del CO₂SC se procedió a incubar durante una hora en este fluido a la enzima inmovilizada en DEAE celulosa. Como se explicó en el capítulo anterior, se incubó también un control que recibió solamente el tratamiento térmico. Al resuspender a la enzima en medio acuoso y determinar su actividad se observó que el control no presentaba actividad producto de una termoinactivación. Por ello se decidió utilizar como segundo control a la enzima sin tratamiento térmico y almacenada a -5°C. La actividad de esta última fué menor que la que presentaba la enzima que había sido incubada. Esta prueba se realizó varias veces y el resultado fue similar en todos los casos.

Se procedió entonces a incubar a la enzima por periodos de tiempo mayores. Se hicieron pruebas a 6 y 24 horas por triplicado y en todas ellas se observó una clara retención de actividad. Cabe mencionar que para los dos tiempos de incubación la enzima que solamente recibió el tratamiento térmico también perdió por completo su actividad. Los resultados confirmaron el efecto de activación de la enzima en CO₂SC.

Su actividad no solo fué mayor que la de la enzima sin tratamiento, sino que a medida que se incrementaba el tiempo de exposición la actividad aumentaba. Esto se puede apreciar en la *Figura 5.1*.

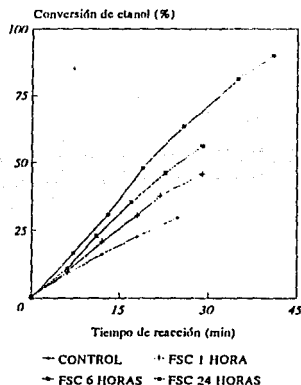


Figura 5.1
 Conversión de etanol para distintos tiempos de exposición a CO_2SC

Esta gráfica nos da una idea de como aumenta la conversión de etanol, y por lo tanto la actividad enzimática, para tiempos grandes de exposición. En esta figura el valor de tiempo expresado en las abscisas corresponde al tiempo de reaccion una vez suspendida la enzima tratada en medio acuoso. Debido a que se buscaba determinar la velocidad inicial de conversión y como el catalizador disminuye considerablemente su actividad despues de una hora, se presentan los datos hasta 45min. La pendiente de estas curvas graficada contra el tiempo de exposición nos permite calcular una actividad relativa que se presenta en la *Figura 5.2* en función del tiempo de incubación.

Se puede observar un claro aumento de actividad con el aumento del tiempo de exposición, por ejemplo, después de 24 horas la actividad es 2.5 veces mayor que la de la enzima sin tratamiento y almacenada en condiciones óptimas para retener su actividad.

Una posible causa de este fenómeno de activación es que el soporte empleado, al ser una resina, se deformaba con las altas presiones afectando con ello la estabilidad enzimática o la metodología de evaluación de la actividad catalítica.

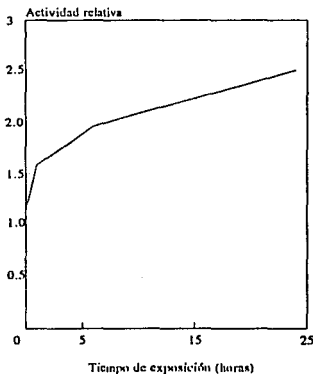


Figura 5.2
Actividad relativa de la enzima incubada en CO₂SC.

Para comprobar la hipótesis anterior se inmovilizó a la enzima en dos soportes rígidos: Vidrio de Porosidad Controlada y Alumina, esto se realizó con el mismo protocolo empleado para DEAE Celulosa. Las muestras así obtenidas se incubaron durante una hora en presencia de CO₂SC y nuevamente se observó que la actividad de

la enzima tratada era mayor que la de la muestra mantenida en refrigeración (enzima no expuesta), *Figura 5.3*.

Estos resultados confirman que el fenómeno de activación que presenta la enzima no está asociado a la naturaleza del soporte en el que se inmoviliza. El cambio tal vez sea en la estructura proteica a través de un reacomodo de las subunidades que conforman a la enzima, de manera que al ser sometidas a altas presiones, expresen mejor la actividad. Otra posibilidad es que exista algún tipo de interacción química con el medio (CO_2) que propicie el incremento en la actividad. Esto sin embargo, no pasa de meras especulaciones.

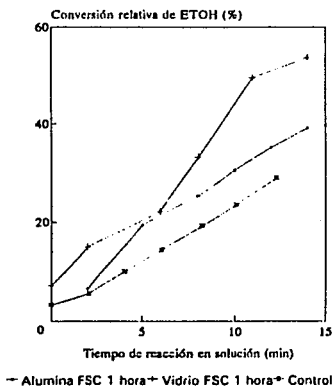


Figura 5.3
Exposición a CO_2SC de la enzima inmovilizada en soportes rígidos.

Los resultados obtenidos hasta aquí satisfacen la premisa de determinar si la enzima alcohol oxidasa es estable en CO_2SC . Dos líneas de investigación muy

interesantes se derivan a partir de los resultados obtenidos. La primera consiste en explicar el fenómeno de activación. Esta podría realizarse con un estudio detallado sobre la estructura de la enzima antes y después de la incubación. La segunda línea sería la de determinar la factibilidad de conducir una reacción enzimática en CO_2SC . Esta última constituye la segunda parte de esta tesis.

5.2 Evaluación de la Actividad Catalítica de la Enzima Inmovilizada en Presencia de CO_2SC

Para desarrollar esta parte del proyecto se empleó el sistema descrito en la *Figura 4.3* del capítulo de materiales y métodos. El soporte que se utilizó fue DEAE celulosa debido a la disponibilidad que de éste existía.

Las variables necesarias de controlar eran la cantidad de aire (oxígeno) y la cantidad de etanol que era posible solubilizar en CO_2SC . En la primera parte del proyecto se contaba con un reactor de volumen pequeño ($1 \times 0.5\text{cm}\phi$). Se investigó la solubilidad del etanol en CO_2SC . Las concentraciones requeridas eran muy bajas ($\approx 80\text{mM}$) por lo que, en base a la *Figura 5.4*, era posible tener esta cantidad solubilizada.

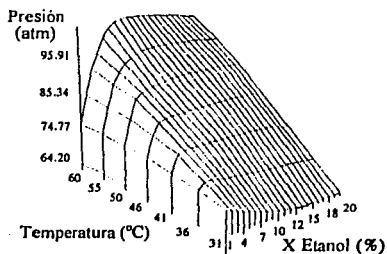


Figura 5.4
Superficie que muestra la solubilidad del etanol en CO_2SC para diferentes T y P
(Datos tomados de Page et al, 1992)

Después de incubar la enzima con vapores de etanol durante 2 horas, se determinó su contenido con un cromatógrafo de gases y se obtuvo el cromatograma mostrado en la *Figura 5.5*.

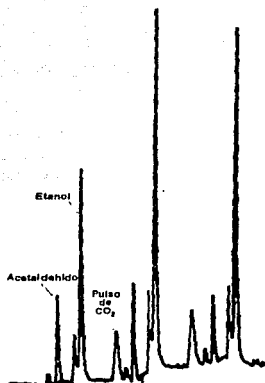


Figura 5.5
Cromatograma obtenido para la conversión enzimática en CO₂SC.

El experimento descrito demuestra claramente que existe reacción catalizada por la enzima. Con el objeto de mejorar la productividad del sistema se instaló un reactor de mayores dimensiones (4 x 0.5cmφ). La cantidad de enzima era mucho mayor y por lo tanto la cantidad de aire necesaria era mayor. Debido a que el aire contenido en los vapores de etanol no fue suficiente para evidenciar la reacción se optó por llenar parcialmente de aire la bomba tipo pistón. De este modo se aseguraba que el CO₂ estuviera saturado de aire. El nuevo sistema también constaba de una columna de 10 cm de un tubo de acero inoxidable DI de 1/16" empacada con Porapak N a la salida del reactor. Este polímero retiene fuertemente a los compuestos orgánicos.

Se hicieron pruebas incubando a la enzima con vapores de etanol para diferentes intervalos de tiempo. Es importante mencionar que no se observó una disminución en actividad aun después de haber utilizado el polvo enzimático por más de 48 horas.

Los resultados de estas pruebas muestran la aparición de un tercer compuesto *Figura 5.6*. No se pudo caracterizar este por medio de la cromatografía de gases por lo que se hicieron las pruebas utilizando como detector un espectrógrafo de masas. Los resultados indican que aparentemente se está formando acetona *Fig 5.6*.

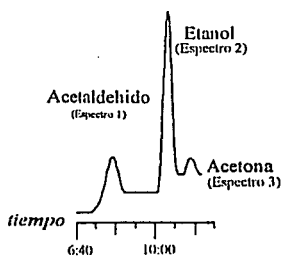


Figura 5.6
Cromatograma¹ que muestra la aparición del tercer compuesto

¹Este cromatograma se observó ya sea en la reacción con enzima seca así como con la enzima hidratada. Además coinciden los tiempos de retención con un blanco hecho de una mezcla de acetaldehído - etanol - acetona.

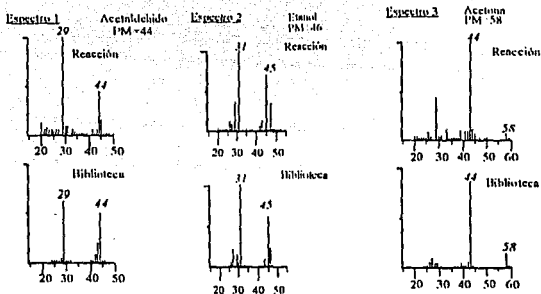


Figura 5.7
Comparación de espectros (biblioteca- reacción) para el cromatograma de la Figura 5.6

Si bien este producto adicional requiere ser confirmado, no procede de una reacción conocida para alcohol oxidasa, pues se trata de una carboxilación. Sin embargo la presencia de la enzima es indispensable para su formación.

Las pruebas se hicieron ya sea con la enzima seca así como con la enzima hidratada. En ambos casos se observó reacción aunque no se pudo evidenciar diferencia en la actividad debido a que este sistema no permitía resultados cuantitativos. De este modo, también resulta complicado determinar si el tercer compuesto (acetona) proviene del acetaldehído, del etanol, del CO_2 o de una combinación de alguno de ellos.

5.3 Sistema de Recirculación del Sustrato Disuelto.

Debido a que era importante cuantificar la cantidad de acetaldehído producido, para de ese modo obtener la cinética de la reacción en condiciones supercríticas, se diseñó el sistema 2, esquematizado en la *Figura 4.6*.

La ventaja que ofrece este sistema, es que ya sea el producto de reacción, como el sustrato empleado en esta, están disueltos en el CO_2SC , por lo que se cuantifican sin detener la reacción.

Debido a que no se conocía la velocidad a la que se solubilizaba el etanol en el CO_2SC se hicieron primero pruebas sin que existiera enzima dentro de la celda, monitoreando la concentración de etanol mediante inyecciones cada minuto al cromatógrafo de gases. Nunca se logró tener una concentración homogénea de etanol en el sistema, por lo que hubiera sido difícil monitorear el avance de la reacción dentro del sistema. Uno de los principales problemas es que no estaba en condiciones supercríticas (e.g. Tc) todo el sistema, por lo que la solubilización era mínima. Tal vez si se introdujera el sistema completo dentro de un horno a temperaturas mayores a 35°C se lograría solucionar el problema.

6.

Conclusiones

- La enzima alcohol oxidasa es estable a una presión de CO_2 de 100 atm y una temperatura de 40°C , condiciones que corresponden al estado supercrítico de este compuesto.
- La actividad enzimática se ve mejorada después de someter a la proteína bajo condiciones supercríticas. Al suspender a la enzima en medio acuoso después del tratamiento con CO_2SC se aprecia un incremento de hasta 2.5 veces la actividad original para 24 horas de exposición.
- El soporte en el que se inmoviliza a la enzima no influye en la activación que esta sufre. El fenómeno se observó tanto en soportes rígidos (vidrio de porosidad controlada y alumina), así como en soportes flexibles (DEAF celulosa).
- Existe actividad enzimática en condiciones supercríticas. Se obtuvieron resultados cualitativos que demuestran la existencia de una reacción en este medio.
- La enzima es estable y sigue convirtiendo etanol después de 48 horas de permanecer dentro de la celda con CO_2SC . Estos elementos indican que el sistema es apropiado para alcanzar altas productividades en comparación a otros (e.g. fase gaseosa).
- El papel del agua no pudo ser evaluado ya que no se contaba con un sistema mediante el cual se pudiera cuantificar la reacción. Sin embargo, el agua no inactiva a la enzima en medios CO_2SC . Se tiene evidencia de que también la enzima hidratada tiene actividad catalítica en medios supercríticos.
- Sería importante evaluar el papel del agua hidratando a la enzima con diferentes niveles de humedad.
- Es necesario montar un sistema para poder cuantificar la actividad de la enzima en condiciones supercríticas; una posibilidad es mejorar el sistema de recirculación propuesto en este trabajo.

- Se observó la formación de un compuesto que parece ser acetona como resultado de la acción enzimática en CO_2SC . Este no ha sido observado en medios acuosos, disolventes orgánicos o en fase gaseosa.

7.

Recomendaciones

El trabajo realizado muestra una clara posibilidad de realizar reacciones enzimáticas en este tipo de medios. Es importante no abandonarlo y tomar en cuenta los resultados obtenidos para poder avanzar hacia el objetivo final. Las siguientes consideraciones pueden ser útiles para lograrlo:

- El conocimiento de los fluidos supercríticos hasta la fecha es muy vago. En el desarrollo de este trabajo se encontró que algunos de los resultados que se reportan en la literatura no son 100% confiables. Tal fue el caso de la solubilidad del etanol en CO_2SC . En la literatura se presenta inclusive una gráfica de solubilidad (ver Fig. 5.4) pero no se menciona cuanto tiempo debe esperarse para obtenerla. Al parecer, y como posteriormente fue confirmado por el autor del artículo en cuestión, nunca se logra una solubilidad total, sino que el etanol se fragmenta y es en esos fragmentos donde ocurre la reacción, no en el seno del CO_2SC .
- Todavía no se conoce con exactitud el papel que juega el agua para darle la conformación activa a una enzima, ni la cantidad que esta requiere. Es muy difícil predecir cuál será la cantidad ideal para que se lleve a cabo una reacción en CO_2SC . Tal vez se pueda comparar este medio con el que genera algún disolvente orgánico, por ejemplo hexano, de manera de predecir su comportamiento.
- Los sistemas propuestos en esta tesis pueden conducir a obtener resultados cinéticos reproducibles. Es importante conocer perfectamente que es lo que puede estar ocurriendo en el interior del sistema. Las hipótesis que se generaron fueron hechas empíricamente a través de pruebas fallidas, las cuales proporcionaron mucha de la información que se tiene.

- El sistema de recirculación puede resultar muy útil para efectuar estudios cinéticos. Es recomendable para esto encontrar una manera en el que se permita un buen mezclado del medio con el sustrato de la reacción. Al parecer el incremento de presión ayuda a fragmentar el etanol y mejora su dispersión.
- Otro problema que no se pudo resolver completamente fue el contenido de oxígeno. En teoría se necesita una cantidad estequiométrica de este para poder regenerar a la enzima (ver antecedentes). En este caso el volúmen de CO_2 que contenía el sistema era desconocido y el adicionar el aire junto con el etanol (vapores de etanol) tal vez no fué la mejor solución. Este problema se resolvió parcialmente llenando la bomba con una mezcla aire- CO_2 . Sin embargo no se conoce la cantidad exacta de O_2 disuelto en el CO_2 . Es importante optimizar la preparación del medio supercrítico.

8.

Bibliografía

1. Bárzana E., Karel M., Klíbanov A.M. Enzymatic Oxidation of Ethanol in the Gaseous Phase. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.34, 1178-1185 (1989).
2. Bárzana E., Klíbanov A. M., Karel M. A Colorimetric Method for the Enzymatic Analysis of Gases. The Determination of Ethanol and Formaldehyde Vapors Using Solid Alcohol Oxidase. *Analytical Biochemistry* ,82, 109-115 (1989).
3. Blanch H.W., Douglas S.C. editores *Applied Biocatalysis*. Marcel Dekker Inc. Nueva York USA 1991.
4. Couderc R., Baratti J. Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 44(10) 2279-2289,1980.
5. Hammond D.A., Karel M., Klíbanov A.M. Enzymatic Reactions in Supercritical Gases, *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol 11 1985 pp 393-400.
6. Halling P.J., Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems, *Enzyme Microb. Technol.* , 1984, vol.6, Noviembre pp513-515.
7. Johnston K.P. *New Directions in Supercritical Fluid Science and Technology*. American Chemical Society Symposium Series 1989.
8. Kazandjian R. Z., Dordick J.S., Klíbanov A.M. Enzymatic Analyses in Organic Solvents, *Biotech. and Bioeng.* Vol 27, No3 Marzo 1986 pp 417-421.
9. Lee L.M., Markides K.E. editores, *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Chromatography Conferences Inc. Utah USA 1990.
10. Lehninger, *Biochemistry*, Segunda edición, Worth Publishers Inc., Nueva York 1975, USA, cap 8 y 9 (183-246)

11. McHugh M.A., Krukonis V.J., *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*, primera edición, Butterworths Publishers, USA MA 1986, Cap1-5
12. Nakamura K. *Biochemical reactions in Supercritical Fluids*. TIBTECH- octubre 1990 Vol 8. p288-292.
13. NBS Review of Supercritical Fluid Extraction, 1985.
14. Page S., Sheldon R., Lee M., *Fluid Phase Equilibria in Supercritical Fluid Chromatography with CO₂-Based Mixed Mobile Phases: A Review*, J. Microcol. Sep. 4, 91-122 (1992).
15. Patel N., Hou C.T., Laskin A.I., Derelanko P. *Microbial Oxidation of Methanol: Properties of Crystallized Alcohol Oxidase from a Yeast, Pichia sp.* Archives of Biochemistry and Biophysics Vol 210, No 2, Septiembre pp. 481-488, 1981.
16. Ponce L., Treviño C. *Avances y Perspectivas de los Procesos de Extracción Supercrítica*, documentos de Análisis y Prospectiva del Programa Universitario de Energía, México D.F. 1989.
17. Randolph T.W., Blanch H.W., Prausnitz J.M., Wilke C.R. *Enzymatic Catalysis in a Supercritical Fluid*. Biotechnology Letters Vol 7 No 5 325-328 (1985).
18. Randolph T.W., Clark D.S., Blanch H.W., Prausnitz J.M. *Cholesterol Aggregation and Interaction with Cholesterol Oxidase in Supercritical Carbon Dioxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol 85 pp 2972-2983, Mayo 1988.
19. Taniguchi M., Kamihira M., Kobayashi T. *Effect of Treatment with Supercritical Carbon Dioxide on Enzymatic Activity*. Agric. Biol. Chem. 51 (2) 593-594, 1987.
20. Weder J. *Effect of Supercritical Carbon Dioxide on Proteins*, ZLebensm Unters Forsch 171, 95-100 (1980), (alemania) reprint.
21. Wiseman Alan, *Handbook of Enzyme Biotechnology*, Segunda Edición, Ellis Horwood Limited, Inglaterra 1980.

22. Wong J.M., Johnston K.P. Solubilization of Biomolecules in Carbon Dioxide Based Supercritical Fluids. *Biotechnology Progress* Vol 2 No1 Marzo 1986 Pp29-39.
23. Zaks A., Klibanov A.M. Enzymatic Catalysis in Organic Media. *Science* Vol 224 Pp 1249-1251 1984.
24. Zaks A., Klibanov A.M. Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *The Journal of Biological Chemistry* Vol 263 No7 Marzo 3194-3201 (1988).