



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

FACULTAD DE QUÍMICA

“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA
EN UN REACTOR ENZIMÁTICO DE LECHO
EMPAcado CON RECIRCULACIÓN”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:

I. Q. HUGO ALBERTO MONTENEGRO PEREIRA

TUTOR:

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS

Reciban mis sinceros agradecimientos aquellas personas que colaboraron de una u otra forma en la realización de este trabajo de investigación, especialmente:

- A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría y por ser una Institución preocupada por la investigación y la educación.

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por su ayuda y capacitación en el estudio de la Maestría.

- Al Dr. Eduardo Bárzana García, por su valiosa asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

- Al Dr. Rafael Herrera Nájera, por su orientación y enseñanzas en el transcurso de la Maestría.

- Al Dr. Miquel Gimeno, por su tiempo, sugerencias y ayuda en este trabajo.

- A los Doctores miembros del Jurado por su amabilidad en la revisión y observaciones al presente trabajo.

DEDICATORIA

- A DIOS:** Por su inmenso amor, por su misericordia, por su fidelidad y por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de mi vida.
- A JESUCRISTO:** Porque sólo por medio de El, puedo llegar a Dios. Y porque Jesucristo es mi Salvador.
- A MI ESPOSA:** Celeste Carolina González Sierra de Montenegro, por su amor que llena mi vida de felicidad. Por su apoyo, comprensión, paciencia y porque siempre ha estado a mi lado.
- A MIS PADRES:** Hugo Humberto Montenegro Ramos y María del Carmen Pereira Herrera, por todo su amor que me han dado.
- A MIS HERMANOS:** Erick Antonio y Rosa Amelia, por su cariño y apoyo de siempre.
- A TODA MI FAMILIA:** Con especial cariño y apoyo incondicional.
- A MIS AMIGOS:** En especial.

4.3.4	Usos industriales de las lipasas.....	39
4.3.5	Inmovilización de lipasas.....	40
4.3.6	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	42
4.4	Disolvente de la reacción.....	44
4.5	Agua en la reacción.....	46
4.5.1	Actividad de agua en el sistema de la reacción.....	47
4.6	Descripción de la reacción enzimática de hidrólisis de diésteres de luteína a luteína.....	49
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	53
5.1	Enzima y sustrato.....	53
5.2	Materiales y reactivos.....	53
5.3	Equipo.....	54
5.4	Metodología.....	54
5.4.1	Ajuste del a_w del biocatalizador.....	54
5.4.2	Ajuste del a_w del disolvente.....	54
5.4.3	Procedimiento general de la reacción.....	55
5.4.4	Diseño experimental.....	57
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
6.1	Hidrólisis de diésteres de luteína en isooctano a diferentes valores de flujo y concentración inicial utilizando como catalizador de la reacción, a la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	60
6.2	Perfil de concentración de sustratos y productos.....	65
6.3	Productividad del biorreactor en función del tiempo de reacción.....	69
6.4	Ciclos de actividad del biocatalizador en el reactor.....	70
6.5	Comparación de conversión y velocidad inicial entre el reactor de lecho empacado con recirculación total y el reactor de tanque agitado por lotes..	71
7.	CONCLUSIONES.....	72
8.	RECOMENDACIONES.....	74
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Estructura química de un carotenoide.....	9
FIGURA 2	Carotenoides más distribuidos en la naturaleza.....	11
FIGURA 3	Espectro UV visible de luteína.....	12
FIGURA 4	Carotenos encontrados en los tejidos y plasma humanos.....	14
FIGURA 5	Clasificación de la luteína como pigmento natural.....	15
FIGURA 6	Cristales de luteína purificada.....	16
FIGURA 7	Luteína libre encontrada en vegetales.....	17
FIGURA 8	Éster de luteína encontrada en pétalos de flores.....	17
FIGURA 9	Estructura química de la <i>trans</i> -luteína.....	18
FIGURA 10	Reacción de isomerización <i>trans-cis</i> luteína.....	19
FIGURA 11	Espectro de absorción para la luteína.....	20
FIGURA 12	Análisis HPLC de ésteres de luteína.....	20
FIGURA 13	Análisis de ésteres de luteína HPLC después de ser saponificados.....	21
FIGURA 14	Proceso de ingestión de la luteína en el humano.....	23
FIGURA 15	Diagrama de distribución de luteína en el pigmento macular.....	25

FIGURA 16	La flor de Cempasúchil.....	27
FIGURA 17	Proceso industrial para obtención de luteína de la flor de Cempasúchil...	28
FIGURA 18	Árbol de decisión que muestra las opciones para seleccionar la configuración de biocatalizador y biorreactor.....	30
FIGURA 19	Reacción de hidrólisis catalizada por una lipasa.....	34
FIGURA 20	Plegamiento común de las lipasas.....	36
FIGURA 21	Estructura de la tapa que cubre el sitio activo de las lipasas.....	38
FIGURA 22	Efecto sobre la eficiencia de actividad enzimática.....	41
FIGURA 23	Estructura tridimensional esperada de la lipasa <i>Rhizomucor miehei</i>	43
FIGURA 24	La estructura del 2,2,4 trimetilpentano.....	46
FIGURA 25	Reacción enzimática y química de hidrólisis de ésteres de luteína.....	49
FIGURA 26	Mecanismo de acilación-desacilación del glicérido en el sitio activo.....	50
FIGURA 27	Esquema del reactor de lecho empacado utilizado para la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína.....	55
FIGURA 28	Curva patrón de diésteres de luteína.....	57
FIGURA 29	Conversión de diésteres de luteína en isooctano, para varios valores de concentración inicial de diésteres de luteína y en función del flujo a través del reactor $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $t = 18\text{ h}$	61

FIGURA 30	Esquema del lecho empacado de la enzima Lipozyme.....	62
FIGURA 31	Hidrólisis de los diésteres de luteína para varios valores de concentración de sustrato inicial y flujo (2 h de reacción).....	63
FIGURA 32	Perfil de velocidad de reacción inicial a distintas concentraciones iniciales de diéster, para dos flujos a través del reactor.....	64
FIGURA 33	Cromatograma del sustrato en isooctano sin lipasa, $t = 0$ h.....	65
FIGURA 34	Cromatograma del sistema de reacción en isooctano con lipasa. A las 72 h de reacción, $T = 60$ °C, $C_s = 0.05$ mg/mL y $F = 370$ mL/h.....	66
FIGURA 35	Cambios en concentración de sustratos y productos en la reacción enzimática. $T = 60$ °C, $C_s = 0.05$ mg/mL y $F = 370$ mL/h.....	67
FIGURA 36	Adsorción de carotenoides sobre el catalizador.....	68
FIGURA 37	Productividad del reactor de lecho empacado para la hidrólisis de los diésteres de luteína en isooctano, catalizada por la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> para una concentración inicial de 0.05 mg/mL y una velocidad de flujo de 370 mL/h.....	69
FIGURA 38	Actividad de la lipasa en 6 ciclos de reacción. Cada ciclo de 18 h, $T = 60$ °C, $C_s = 0.05$ mg/mL y $F = 370$ mL/h.....	70
FIGURA 39	Hidrólisis de diésteres de luteína en isooctano en el reactor de lecho empacado. $T = 60$ °C, $C_s = 0.01$ mg/mL y $C_{enz} = 5$ mg/mL.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Datos del espectro visible de varios carotenoides en dos disolventes.....	13
TABLA 2	Fuentes naturales de luteína.....	16
TABLA 3	Ácidos grasos encontrados en las xantofilas de la flor de Cempasúchil.....	18
TABLA 4	Clasificación de la Flor de Cempasúchil.....	27
TABLA 5	Fuentes principales de lipasas.....	35
TABLA 6	Aplicación industrial de lipasas microbianas.....	39
TABLA 7	Sistemas de reacción para las lipasas, disolvente y proceso.....	44
TABLA 8	Forma en que la polaridad del disolvente afecta la actividad catalítica de la enzima.....	45
TABLA 9	Actividades de agua obtenida a partir de sales saturadas en agua a 25 °C....	48
TABLA 10	Distribución experimental de tratamientos.....	58
TABLA 11	Análisis de varianza del modelo de dos factores con efecto fijo ($\alpha = 0.05$)..	59
TABLA 12	Ecuaciones obtenidas por mínimos cuadrados de los datos a tiempos cortos, para conocer la velocidad inicial de reacción.....	63

RESUMEN

La reacción de hidrólisis de diésteres de luteína a luteína en isooctano como medio de reacción, catalizada por la lipasa comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), $T = 60$ °C y actividad de agua inicial en la lipasa (a_w) = 0.113, fue llevada a cabo en un reactor de lecho empacado con recirculación. Los fines principales a buscar al utilizar este reactor fueron: el efecto que tiene la concentración inicial de sustrato y el flujo a través del reactor sobre la conversión y la velocidad inicial de reacción, la variación de la productividad del reactor con el tiempo, la retención de actividad de la enzima durante ciclos de reacción y la comparación del reactor de lecho empacado con el reactor por lotes, previamente estudiado (González, 2006), en términos de la conversión y la velocidad inicial de reacción.

El reactor de lecho empacado consiste de un tubo de vidrio enchaquetado y mantenido a 60 °C por un baño de agua. Para la recirculación del sustrato con flujo descendente se utilizó una bomba peristáltica. Todo el equipo fue aislado con lana de vidrio para evitar pérdidas de calor y para la protección de la luz. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard HPLC para determinar la concentración de reactantes y productos en el transcurso de la reacción.

Se encontró que la conversión y la velocidad inicial de la reacción dependen inversamente con el flujo a través del reactor de lecho empacado. La velocidad inicial de reacción aumentó con la concentración inicial de sustrato. En 18 horas se llegó a un 100% de conversión de diésteres de luteína a monoéster y luteína libre con una concentración inicial de sustrato de 0.05 mg/mL y un flujo de 370 mL/h. La productividad del reactor disminuye notablemente a partir de las 24 horas de reacción cuando el rendimiento de luteína obtenido es de 0.87.

La actividad enzimática se mantuvo con ligera disminución a lo largo de cinco ciclos de reacción, operados a una concentración inicial de diésteres de 0.05 mg/mL, una velocidad de flujo de recirculación de 370 mL/h y tiempos de reacción de 18 horas.

Por otro lado, bajo las mismas condiciones de reacción: temperatura, concentración inicial de sustrato y enzima en los dos reactores por lotes, el reactor de lecho empacado con recirculación total mostró una mayor conversión y velocidad inicial de reacción comparado con el reactor de tanque agitado. Esto pudo haber ocurrido porque la forma de mezclado en el reactor de lecho empacado mejoró el proceso de transporte del diéster de luteína al biocatalizador.

ABSTRACT

The hydrolysis reaction of lutein diester to lutein in isooctane, catalyzed by the commercial lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and initial water activity in the lipase (a_w) = 0.113, was carried out in a packed bed reactor with recirculation. The main objectives were: determining the effect of the initial substrate concentration and flow rate through the reactor on the conversion and initial reaction rate, the variation of the productivity of the reactor with time, retention of enzyme activity during reaction cycles, and comparison of the packed bed reactor with the batch reactor previously studied (González, 2006) in terms of the conversion and initial reaction rate.

The packed bed reactor consists of a jacketed glass column maintained at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ by a water bath. We used a peristaltic pump for the recirculation of the substrate with down flow. The whole equipment was isolated with glass wool to avoid lost of heat and protection of the light. A Hewelt Packard HPLC was used to determine the concentration of reactants and products in the course of the reaction.

It was found that the conversion and initial reaction rate inversely depends with the flow rate through the packed bed reactor. The initial reaction rate increased with the initial substrate concentration. In 18 hours, the reaction reached a 100% of conversion of diester lutein to monoester and free lutein with an initial substrate concentration of 0.05 mg/mL and a flow rate of 370 mL/h. The productivity of the reactor notably diminished starting from the 24 hours of reaction at a yield of obtained lutein of 0.87.

The enzymatic activity steadily decreased along five reaction cycles, operated to an initial lutein diester concentration of 0.05 mg / mL, a flow rate of recirculation of 370 mL / h and reaction time of 18 hours.

On the other hand, with the same conditions of reaction: temperature, initial substrate concentration and enzyme, the packed bed reactor with total recirculation showed bigger conversion and initial rate reaction when compared to the batch reactor. The better might be occurred through an improved mixing inside the packed bed reactor that enhanced the transport of lutein diester to the biocatalyst.

1. INTRODUCCIÓN

La luteína es clasificada como una xantofila dentro del grupo de pigmentos llamados carotenoides y se encuentra en forma natural principalmente en verduras, frutas, pétalos de flores y en algunos granos. En algunos vegetales como espinaca, alfalfa, perejil, brócoli, lechuga, la luteína se encuentra en su forma libre, lo que significa que no tiene ningún otro tipo de molécula enlazada a ella. Por otra parte, la luteína encontrada en frutas, granos y pétalos de flor como la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*), está químicamente enlazada a varios tipos de ácidos grasos, por lo que se dice que la luteína está esterificada. Los humanos no pueden sintetizar la luteína, por lo que es necesario obtenerla de la dieta (Kritchevski, 1999). La luteína en forma libre es asimilada más fácilmente por el cuerpo que sus diésteres (Hadden *et al.*, 1999).

La luteína en el cuerpo humano tiene varios usos y beneficios. En la salud del ojo tiene un papel específico como agente protector del daño por exposición a la luz ultravioleta del sol, donde la luteína podría ofrecer una protección a las células de la mácula ocular actuando como antioxidante. El consumo de luteína puede reducir el riesgo de sufrir degeneración macular asociado a la edad, cataratas y otras enfermedades oculares. La luteína como carotenoide, puede ayudar a evitar las enfermedades cardiovasculares (Howard *et al.*, 1996). En la salud de la piel, puede tener un efecto protector contra el daño inducido por los rayos ultravioleta, pero también como un colector de radicales libres. Otra aplicación de la luteína es como colorante natural para alimentos procesados para humanos y animales, principalmente como suplemento alimenticio en la industria de aves de corral (Tyczkowski y Hamilton, 1991), para coloración de la piel de pollos y la yema del huevo (Alam *et al.*, 1968).

Industrialmente, la luteína se extrae de la flor de Cempasúchil ya que presenta la ventaja que el 80% de sus pigmentos son diésteres de luteína. Para la extracción de los diésteres se utiliza hexano, seguido de un proceso de saponificación con hidróxido de potasio del extracto de diésteres con el que se obtiene la luteína en forma libre, así como la sal sódica de ácidos grasos. Un proceso alternativo a esta saponificación y de corte biotecnológico resulta del uso de enzimas lipasas que son enzimas que catalizan la hidrólisis de diésteres de

luteína para la producción de luteína libre, en medio orgánico. Por lo que utilizando la enzima, podrían realizarse simultáneamente los dos pasos, la extracción con hexano y la desesterificación, sin necesidad de realizar la saponificación que es un paso adicional en el proceso.

La reacción de hidrólisis de ésteres de luteína ha sido investigada en un reactor por lotes con agitación para evaluar qué lipasa, disolvente y actividad de agua dan mejor resultado, encontrando que las mejores conversiones y actividad enzimática se llevan a cabo con la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM 1M) en isooctano y con una actividad de agua $a_w = 0.113$ (González, 2006).

De acuerdo con especificaciones del fabricante, esta lipasa inmovilizada es termoestable, activa en un gran número de disolventes orgánicos y puede ser usada tanto en operación con reactor agitado por lotes, como también en reactor tipo columna, pero se prefiere en reactores de lecho empacado (Novozymes A/S).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar una columna isotérmica con lecho empacado de enzima inmovilizada lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) con recirculación total, para saber si puede ser mejorada la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Establecer la funcionalidad existente entre la concentración inicial de sustrato y el flujo de recirculación sobre la conversión y la velocidad inicial de la reacción.
- ❖ Determinar la productividad del reactor de lecho empacado para una concentración inicial de diéster de luteína y un flujo de recirculación en función del tiempo de reacción.
- ❖ Comparar la conversión y velocidad inicial de reacción de diéster de luteína obtenidas en el reactor de lecho empacado con recirculación, contra las mostradas en el reactor por lotes.
- ❖ Determinar la estabilidad de la lipasa de *Rhizomucor miehei* en el reactor de lecho empacado.

3. HIPÓTESIS

La hidrólisis enzimática de diésteres de luteína aumentará su conversión y velocidad inicial al operar la reacción en un reactor de lecho empacado con recirculación, en comparación con el arreglo tipo tanque agitado, debido a una mejora en el transporte de sustratos y productos al catalizador.

4. ANTECEDENTES

4.1 SUSTRATO Y PRODUCTO DE LA REACCIÓN: DIÉSTER DE LUTEÍNA Y LUTEÍNA

4.1.1 CAROTENOIDES

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos formados por 40 átomos de carbono organizados bajo un “esquema” tipo terpenoide como se muestra en la Figura 1, derivados biosintéticamente de ocho unidades juntas de isopreno (C_5H_8). En su mayoría son solubles en disolventes apolares y de coloraciones que están entre el amarillo (β -caroteno) y el rojo (licopeno) (Tafoya y García Hernández, 1993).

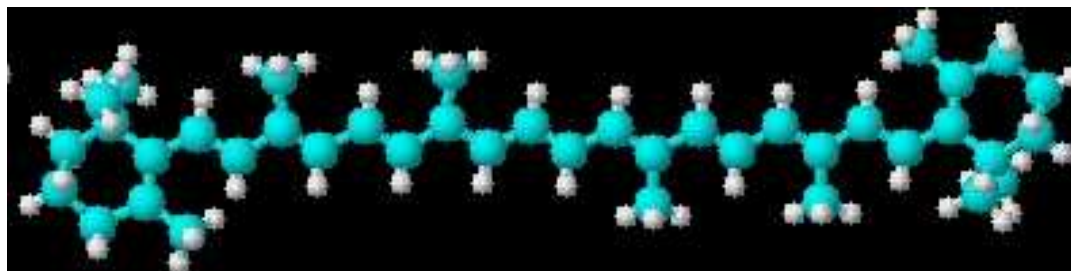


FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE UN CAROTENOIDE

Los carotenoides debido principalmente a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen fácilmente por efecto de la luz, la temperatura y el aire, factores que se deben considerar al momento de realizar su extracción y purificación. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide (isomerismo *cis* y *trans*), la temperatura también favorece reacciones térmicas de degradación. El aire, debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidróxilos y peróxidos, entre otros (Mercadante, 1998).

Por estas razones, la extracción de carotenoides se realiza preferiblemente en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, en ausencia de oxígeno (con una atmósfera artificial de nitrógeno) y las muestras deben ser almacenadas en la oscuridad a una temperatura cercana a los $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mercadante, 1998). Además se debe realizar lo más rápido posible y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos.

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos sólo contienen carbono e hidrógeno (β -caroteno, licopeno) mientras que las xantofilas contienen además oxígeno (luteína) (Oliver y Palou, 2000). La Figura 2 muestra algunos ejemplos de los carotenoides con mayor distribución en la naturaleza.

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias y muy pocos se han reportado en animales, particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar y otros como los colores rojizos de las plumas del flamenco que son debidos a la cataxantina. En los animales superiores, el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial pues es precursor de la vitamina A.

A los carotenoides se les encuentra en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como glucósidos. Sin embargo, los glucósidos carotenoides son muy raros, un ejemplo de estos últimos es la crocina.

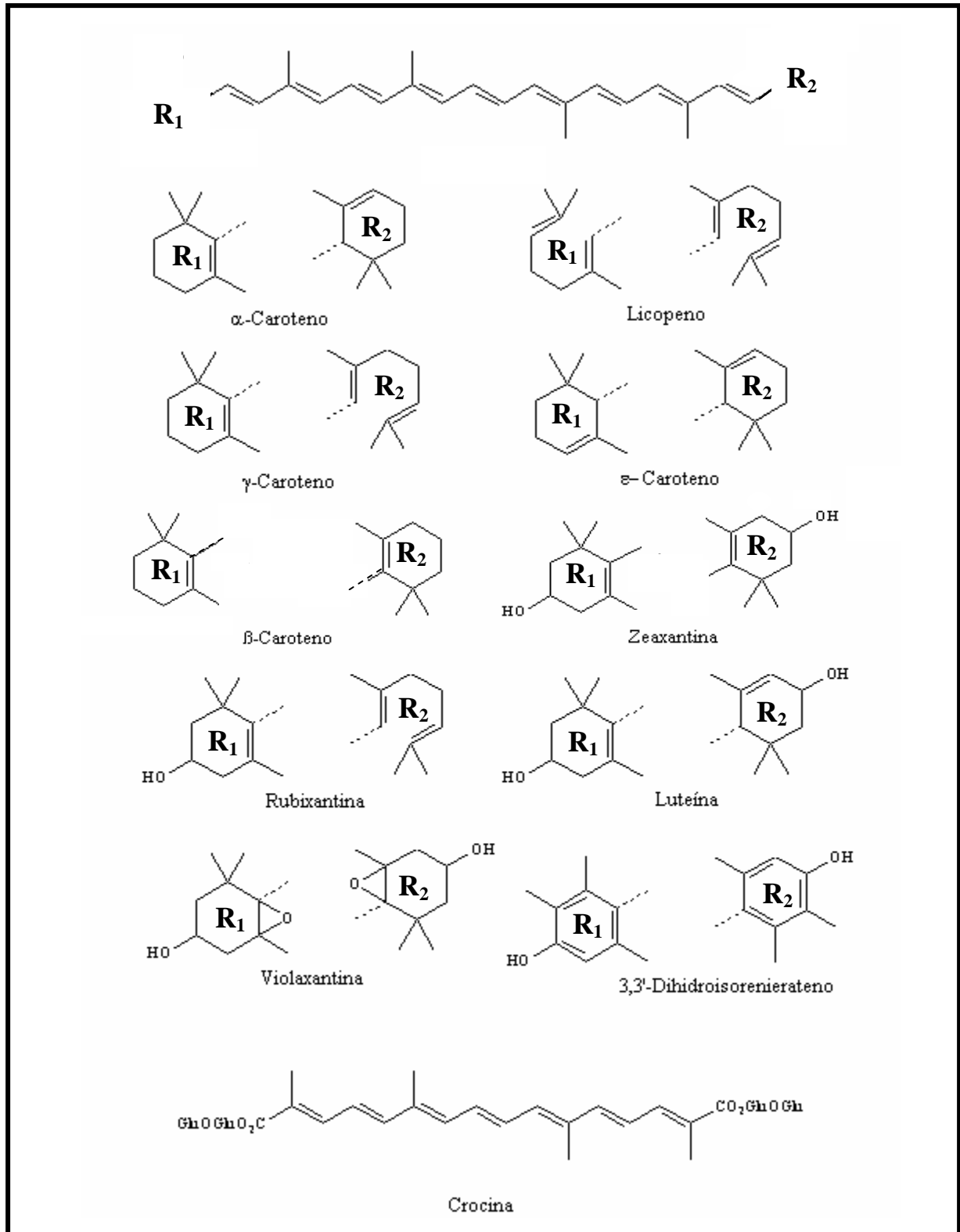


FIGURA 2. CAROTENOIDES MÁS DISTRIBUIDOS EN LA NATURALEZA (OLIVER Y PALOU, 2000)

Los carotenoides en el reino vegetal se encuentran principalmente en partes aéreas de las plantas, especialmente en: hojas, tallos, flores, frutos (como tomate y pimentón) y en menor proporción en raíces (zanahoria).

Es relativamente fácil identificar la mayoría de carotenoides por comparación de muestras y estándares mediante la cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia. Sin embargo cuando se tienen carotenoides que no es posible identificar por tales métodos, es necesario recurrir a los métodos espectrales como UV-visible, IR-infrarrojo, EM –masas y RMN-resonancia magnética nuclear.

El espectro visible de los carotenoides es bastante característico en el intervalo de 400 a 500 nm. Se observa un máximo alrededor de 450 nm y generalmente se aprecian dos máximos a cada lado. La Figura 3 muestra el espectro UV-visible de luteína en hexano y metanol (Zang *et al.*, 1997). La Tabla 1 presenta los datos de los espectros visibles de algunos carotenoides en n-hexano y en cloroformo (Mercadante, 1998).

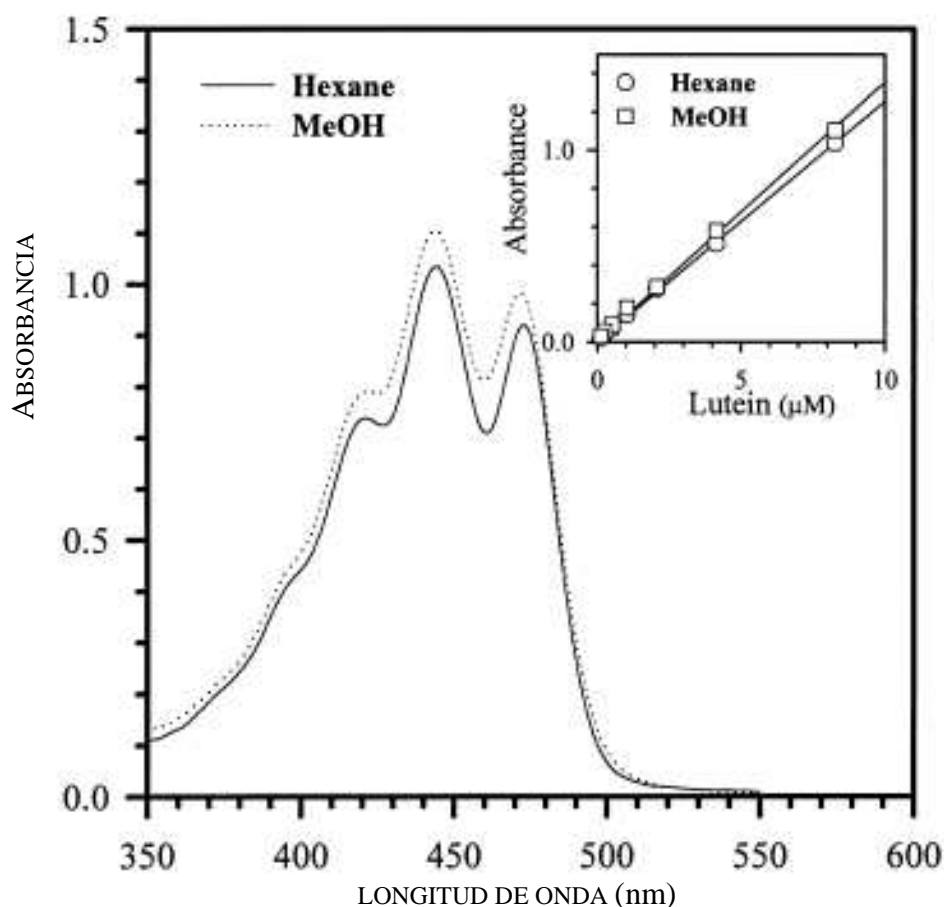


FIGURA 3.

ESPECTRO UV-VISIBLE DE LUTEÍNA (7 μ M) EN HEXANO (LÍNEA SÓLIDA) Y METANOL (LÍNEA PUNTEADA) EN PRESENCIA DE 10 μ g/mL DE BHT (ZANG *ET AL.*, 1997).

TABLA 1. DATOS DEL ESPECTRO VISIBLE DE VARIOS CAROTENOIDES EN DOS DISOLVENTES (MERCADANTE, 1998).

PIGMENTO	MÁXIMOS DE ABSORCIÓN (NM)	
	n-Hexano o Éter de Petróleo	Cloroformo
α -Caroteno	422, 444, 473	454, 485
β -Caroteno	425, 451, 482	466, 497
γ -Caroteno	437, 462, 494	447, 475, 508
ϵ -Caroteno	419, 444, 475	418, 442, 471 (Etanol)
Licopeno	446, 472, 505	456, 485, 520
Luteína	420, 447, 477	428, 456, 487
Violaxantina	443, 472	424, 452, 482
Zeaxantina	423, 451, 483	429, 462, 494
Neoxantina	415, 437, 466	421, 447, 477
Rubixantina	432, 462, 494	439, 474, 509
Fucoxantina	425, 450, 478	457, 492
Criptoxantina	425, 451, 483	433, 463, 497

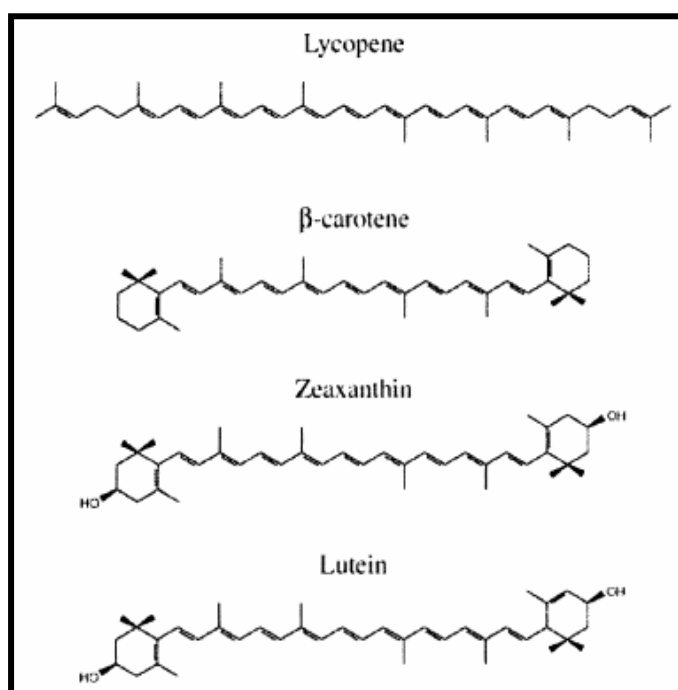
En la pasada década, la investigación en el mundo ha generado un creciente interés sobre los compuestos naturales carotenoides. El esfuerzo de científicos y nutriólogos en todo el mundo se ha enfocado en el rol potencial de carotenoides en la prevención de varias enfermedades crónicas. De los más de 600 carotenoides que han sido identificados, sólo de 40 a 50 están presentes en una dieta típica occidental.

Algunos de ellos tienen una actividad pro vitamina A que son de interés en las poblaciones con deficiencias en vitamina A. Adicionalmente, estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que los carotenoides son excelentes antioxidantes y podrían tener otras propiedades funcionales en humanos aparte de su actividad de vitamina A (Alves y Shao, 2004).

Muchos estudios epidemiológicos han encontrado que un incremento en el consumo de frutas y vegetales ricos en carotenoides están asociados en la reducción del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, así como en la disminución de problemas relacionados con el corazón (Alves y Shao, 2004).

Los más importantes carotenoides encontrados en la sangre humana incluyen α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina (Figura 4). De éstos, solamente la luteína y la zeaxantina son encontrados en la retina del ojo humano (Alves y Shao, 2004).

FIGURA 4.
CAROTENOS
ENCONTRADOS EN
LOS TEJIDOS Y
PLASMA HUMANOS
(ALVES Y
SHAO, 2004).



4.1.2 LUTEÍNA

Una clasificación de la luteína como pigmento natural se observa en la Figura 5.

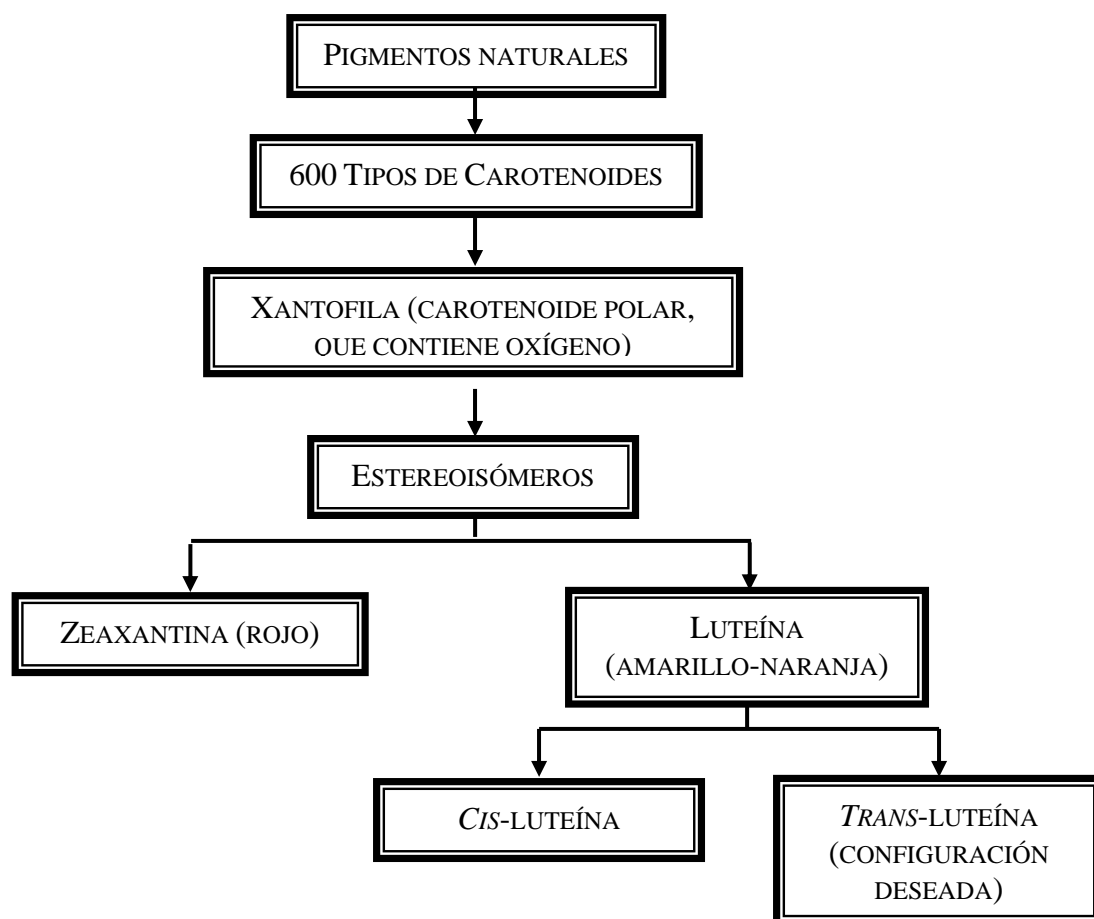


FIGURA 5. CLASIFICACIÓN DE LA LUTEÍNA COMO PIGMENTO NATURAL (ALVES Y SHAO, 2004).

La luteína es una xantofila. El término xantofila se refiere a un oxicaroteno. La luteína (α -Xantofila, 3-3' dihidroxi- α caroteno) viene del latín “*luteo*” amarillo y es un pigmento natural de la familia de los carotenoides. La luteína tiene aplicación como colorante, suplemento alimenticio, propiedades medicinales y prevención de enfermedades, como se detallará más adelante. El peso molecular de la luteína es 568.9 g/mol (Gau *et al.*, 1983).

La luteína es ampliamente encontrada en la naturaleza, principalmente en vegetales y frutas (Tabla 2).

TABLA 2. FUENTES NATURALES DE LUTEÍNA
(HART Y SCOTT, 1995; SOMMERBURG *ET AL.*, 1998).

FORMAS EN QUE SE ENCUENTRA LA LUTEÍNA	FUENTE NATURAL	EJEMPLO
Libre	Vegetales	Espinaca, tomate, alfalfa, col, perejil, brócoli, lechuga, col de bruselas, repollo, zanahoria pequeña, alverja verde y calabaza
Ésteres de ácidos grasos	Flores	La planta más abundante fuente de luteína es la flor de Cempasúchil.
	Frutos	Melón, toronja roja, naranja, papaya
	Planta forrajera	Alfalfa
	Granos	Maíz

A pesar de que la luteína no es evidentemente observable en los vegetales verdes y frondosos (Figura 7), debido al enmascaramiento del efecto de la clorofila, cristales purificados de luteína de estos vegetales dan un color naranja amarillo como se observa en la Figura 6.



FIGURA 6.
CRISTALES DE
LUTEÍNA
PURIFICADA
(ALVES Y SHAO, 2004).

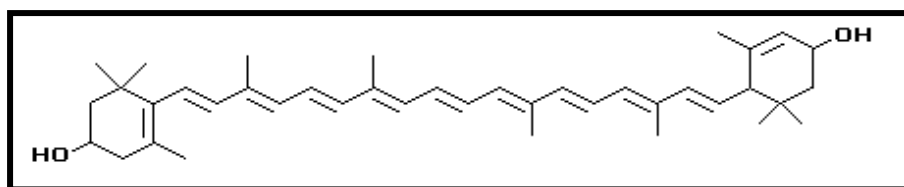


FIGURA 7. LUTEÍNA LIBRE ENCONTRADA EN VEGETALES.

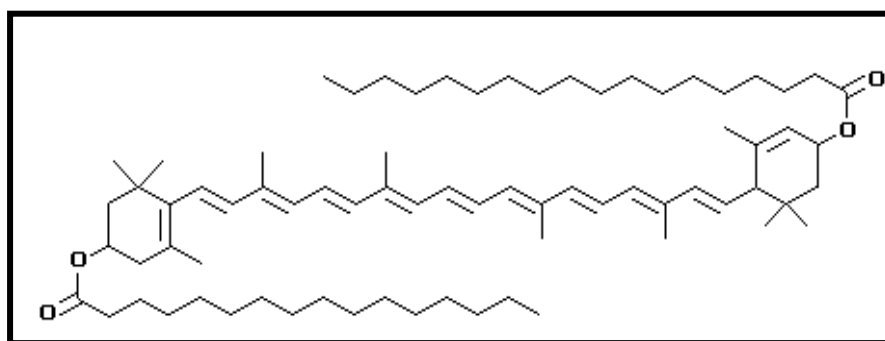


FIGURA 8. ÉSTER DE LUTEÍNA ENCONTRADA EN PÉTALOS DE FLORES
COMO LA FLOR DE CEMPASÚCHIL (*TAGETES ERECTA*).

La luteína en la naturaleza es generalmente encontrada como una mezcla en combinación con diferentes proporciones de carotenoides. Desde el punto de vista industrial, la flor de Cempasúchil tiene la ventaja de que las mezclas de xantofilas obtenidas de las flores son extremadamente altas en un solo compuesto, 80% de luteína esterificada con ácidos grasos (Rivas, 1989).

La naturaleza de los ácidos grasos varía dependiendo de la variedad de flor de Cempasúchil usada (Figura 8), así como de factores externos tales como localización geográfica de cultivo, condiciones climáticas (verano vs. invierno) y las prácticas agrícolas como el riego y la fertilización. Un perfil típico de ácidos grasos encontrados en las xantofilas de flor de Cempasúchil se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3. ÁCIDOS GRASOS ENCONTRADOS EN LAS XANTOFILAS DE LA FLOR DE CEMPASÚCHIL (BIOQUIMEX, 2002).

ÁCIDOS GRASOS SATURADOS		COMPOSICIÓN (%)
Ácido palmítico	(C ₁₆)	44.5
Ácido mirístico	(C ₁₄)	23.0
Ácido araquidónico	(C ₂₀)	12.0
Ácido esteárico	(C ₁₈)	11.0
Ácido láurico	(C ₁₂)	2
ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS		
Ácido linoléico	(C _{18:2})	3.0
Ácido oléico	(C _{18:1})	2.0
Ácido linolénico	(C _{18:3})	1.0
OTROS ÁCIDOS GRASOS		1.5

Entre los isómeros conocidos, la *trans*-luteína es la estructura química normal de la luteína encontrada en la naturaleza (Figura 9).

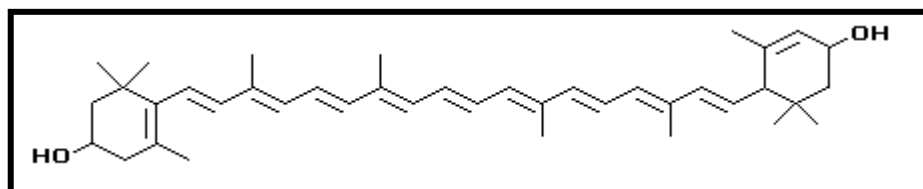


FIGURA 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA *TRANS*-LUTEÍNA (BIOQUIMEX, 2002).

Por su parte, la *cis*-luteína es el nombre genérico de una serie de derivados de la luteína obtenidos por la acción del calor, oxígeno y/o luz por una reacción conocida como isomerización *trans/cis* (Britton, 1995). Ellos pueden ser varios productos *cis*-luteína pero los más comunes son aquellos mostrados en la Figura 10. Toda la *cis*-luteína puede ser derivada de la luteína libre o bien de los ésteres de luteína.

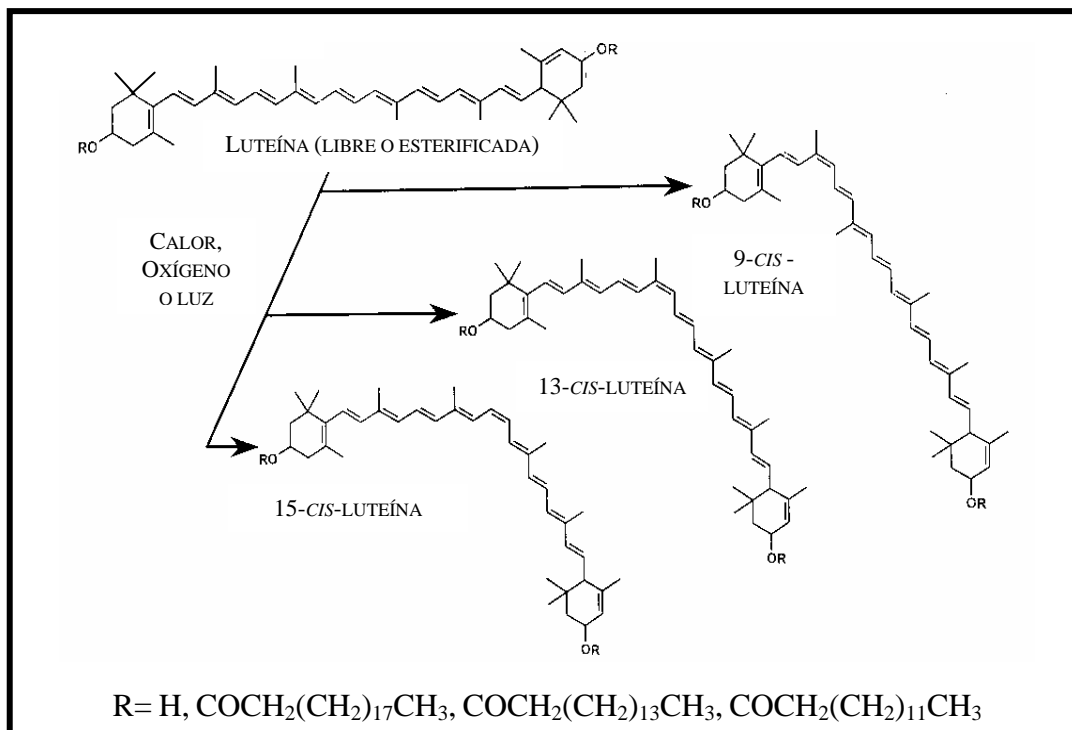


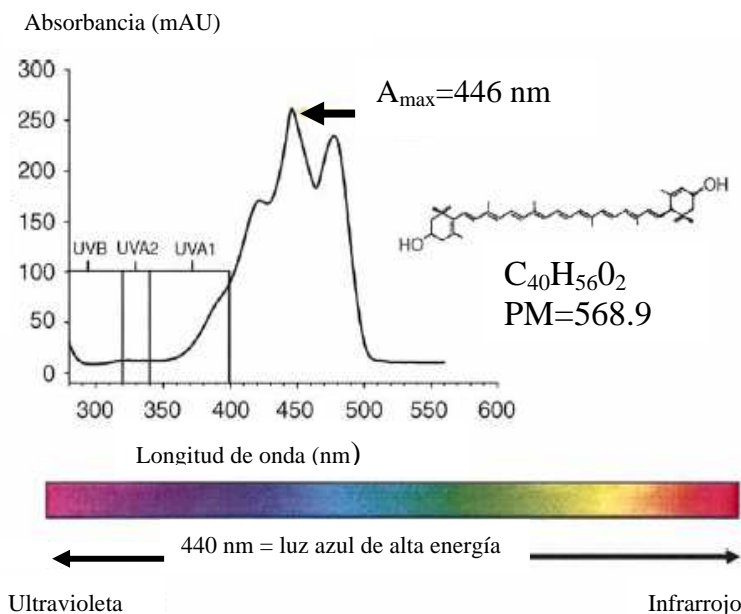
FIGURA 10. REACCIÓN DE ISOMERIZACIÓN *TRANS-CIS* LUTEÍNA. ESTA REACCIÓN ES REVERSIBLE, ASÍ QUE BAJO CIERTAS CONDICIONES ALGUNAS *CIS*-LUTEÍNAS PUEDEN SER REVERTIDAS A LAS ORIGINALES *TRANS*-LUTEÍNAS (BIOQUIMEX, 2002).

4.1.2.1 ANÁLISIS DE ÉSTERES DE LUTEÍNA Y LUTEÍNA LIBRE

4.1.2.1.1 ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE

La luteína presenta un pico de absorción máximo a 446 nm en el espectro de luz visual (Figura 11). Sin embargo, esta señal no permite distinguir entre la forma de luteína libre o esterificada.

FIGURA 11.
 ESPECTRO DE ABSORCIÓN PARA
 LA LUTEÍNA.
 EL PICO DE ABSORCIÓN DE
 LUTEÍNA MAX. ESTÁ EN 446 nm
 LO CUAL CORRESPONDE EN EL
 ESPECTRO DE LUZ VISIBLE A LA
 LONGITUD DE ONDA DE LUZ AZUL.
 LA LUZ AZUL ES LA MÁS ALTA
 ENERGÍA DE LUZ VISIBLE
 (ALVES Y SHAO, 2004).



4.1.2.1.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTO DESEMPEÑO (HPLC)

Para distinguir y cuantificar las especies de luteína es necesario aplicar una separación cromatográfica. El HPLC da el perfil de diferentes diésteres de ácidos grasos de luteína como porcentaje de cada diéster simple presente en la muestra y por lo tanto su concentración (Dachtler *et al.*, 1998).

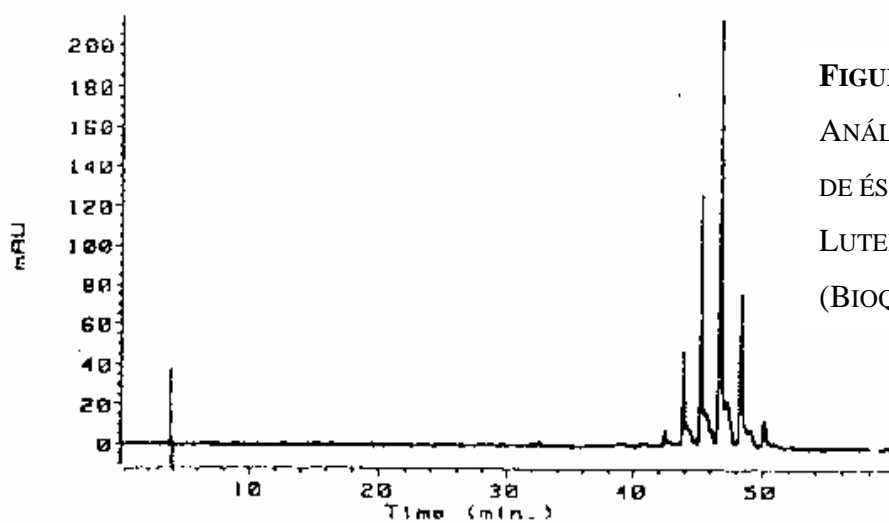


FIGURA 12.
 ANÁLISIS HPLC
 DE ÉSTERES DE
 LUTEÍNA
 (BIOQUIMEX, 2002).

En la Figura 12, los 6 picos principales corresponden a 6 diferentes ésteres de luteína. En la Figura 13 se muestra un análisis de ésteres de luteína HPLC después de ser saponificados. Los picos 4 y 5 representan a la luteína y zeaxantina respectivamente. Los picos 1, 2, 3, 6 y 7 han sido asignados como isómeros *cis* de luteína libre.

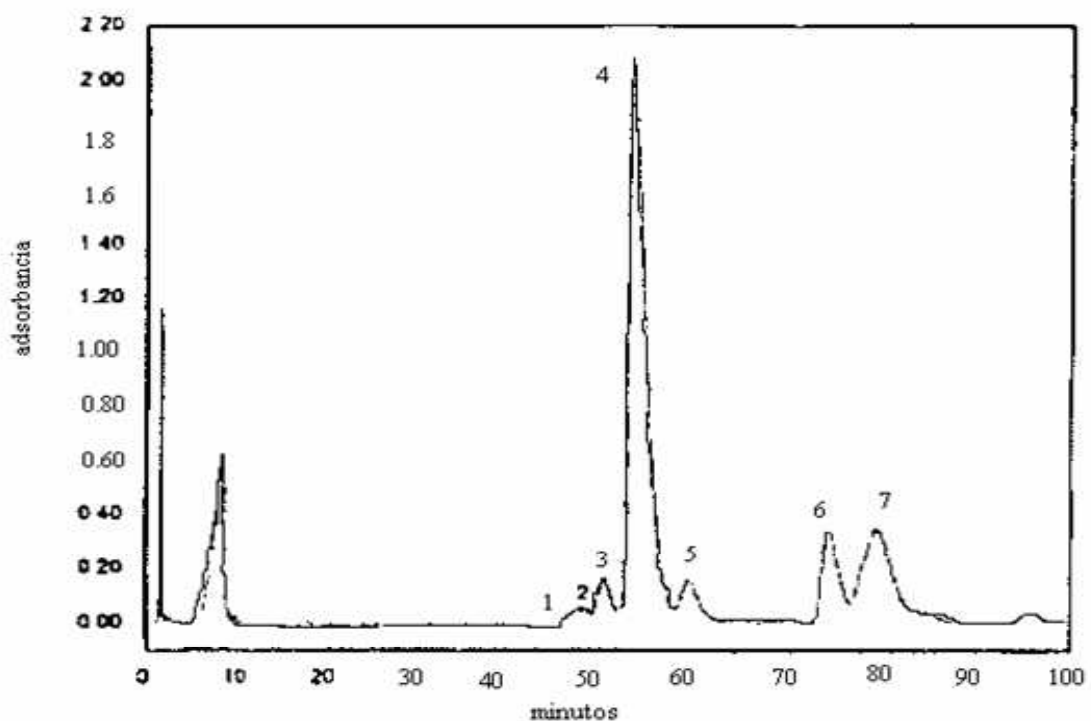


FIGURA 13.

ANÁLISIS DE ÉSTERES DE LUTEÍNA HPLC DESPUES DE SER SAPONIFICADOS. LA MUESTRA QUE SE SAPONIFICÓ CORRESPONDE A EXTRACTO CRUDO DE FLOR DE CEMPASÚCHIL. (BIOQUIMEX, 2002).

4.1.2.2 USOS DE LA LUTEÍNA

La luteína es un colorante natural que se utiliza en alimentos procesados para humanos y animales, principalmente como suplemento alimenticio en la industria de aves de corral, para coloración de los tejidos grasos de pollos y la yema del huevo (Alam *et al.*, 1968), crustáceos como el camarón y pescado como el salmón (Navarrete *et al.*, 2005). También como pigmento amarillo vegetal para el teñido de lana, pieles, telas e hilos a un nivel semi industrializado (Castello, 1988).

La luteína también es usada como suplemento nutricional, basado esto en su importante función biológica ya que se ha reportado como agente de prevención contra el cáncer (Chew *et al.*, 1996), inhibición de auto oxidación de lípidos celulares (Zhang *et al.*, 1991), protección en contra del daño celular inducido por oxígeno (Martin *et al.*, 1996) y prevención de la degeneración macular relativa a la edad (Seddon *et al.*, 1994).

La luteína no puede ser sintetizada por el humano por lo que debe ser obtenida a través de la dieta (Kritchevski, 1999). En el cuerpo humano, la luteína es encontrada en tejidos tales como: hígado, páncreas, ovarios, testículos, mácula, cristalino y retina del ojo. Recientemente, la luteína ha incrementado su popularidad como ingrediente activo usado en las industrias de suplementos nutricionales, encontrándose entre los 10 fitoquímicos recomendados por Food and Drug Administration (FDA) como suplemento nutricional (Alves y Shao, 2004).

La biodisponibilidad de luteína es la fracción de nutriente ingerido que está disponible para la utilización en funciones normales fisiológicas o de almacenamiento. Está basada principalmente como una medida de la concentración de nutriente en el plasma después de la ingestión y como una función del tiempo. Estudios de biodisponibilidad han mostrado que la luteína es absorbida en el cuerpo humano y se encuentra en el plasma sanguíneo en forma de luteína libre (Figura 14).

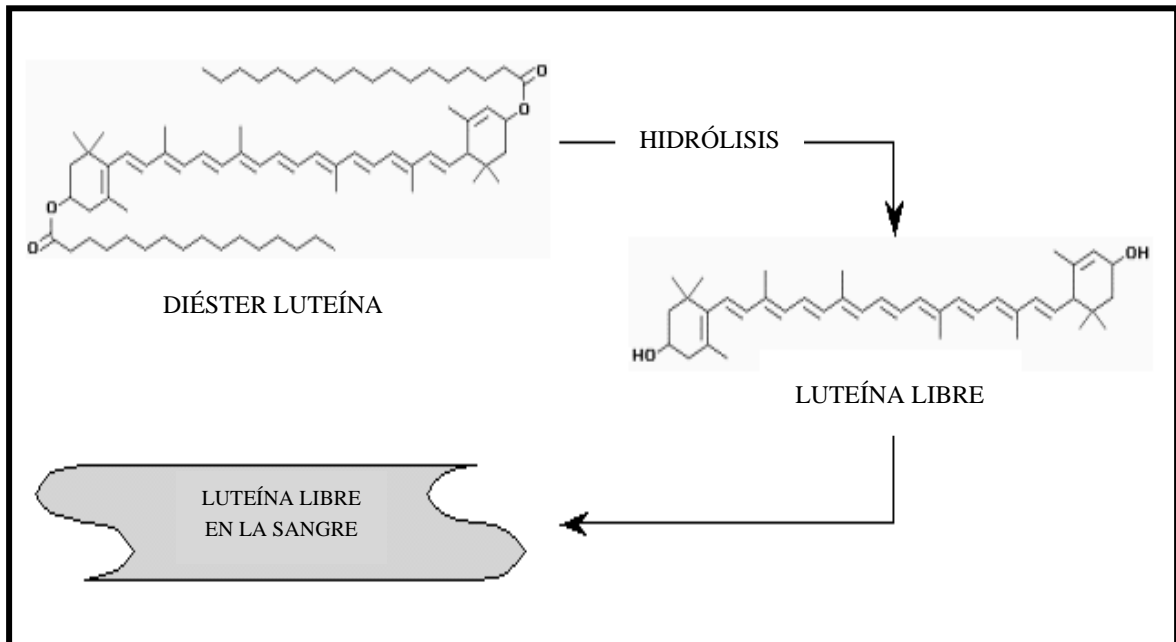


FIGURA 14. PROCESO DE INGESTIÓN DE LA LUTEÍNA EN EL HUMANO
(CASTENMILLER Y WEST, 1998).

Al igual que en el caso de α , β caroteno y las vitaminas liposolubles, la velocidad de absorción de la luteína en el plasma depende del contenido de grasa y proteínas en la dieta (Su *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la biodisponibilidad relativa de luteína de vegetales es más alta que la del α caroteno. Existen también reportes indicando que la cantidad de fibra dietética afecta la absorción de luteína y carotenoides en general (Bioquimex, 2002).

En la misma forma que los triglicéridos y grasas son hidrolizados en el tracto digestivo a los correspondientes ácidos grasos para ser absorbidos, los ésteres de luteína son también hidrolizados a ácidos grasos y luteína libre; la cual es entonces absorbida dentro del plasma sanguíneo y de allí a los diferentes tejidos, dónde es depositada, tales como la mácula del ojo.

Ciertas enzimas como las lipasas son activas en la hidrólisis de ésteres en el tracto digestivo. Estas enzimas son producidas en el páncreas por un mecanismo que es regulado por la presencia de grasa en el estómago y el duodeno. Al igual que en el caso de luteína libre, la biodisponibilidad de ésteres de luteína es también mejorada por el contenido de grasas en alimentos (Granado *et al.*, 1998).

4.1.2.2.1 LA LUTEÍNA EN EL OJO

La luteína y la zeaxantina son los dos carotenoides dominantes de la retina humana. Están presentes sobre el 36% y 18% del total del contenido de carotenoides en la retina, respectivamente (Landrum y Bone, 2001).

La luteína y la zeaxantina son selectivamente depositados en la sangre a la mácula. La mácula es una pequeña área de la retina responsable de la visión central y rica en conos receptores que permiten tener la máxima agudeza visual (Krinsky *et al.*, 2003). La luteína y la zeaxantina son los únicos carotenoides detectados en el cristalino humano, el cual es otro tejido crítico en la visión (Yeum, 1995). Se ha incrementado la evidencia que sugiere que la ingesta en la dieta de antioxidantes (carotenoides) puede proteger contra la oxidación de las proteínas del cristalino y el subsecuente desarrollo de cataratas.

En particular, el pigmento macular es un punto amarillo visible (mácula lútea) encontrado principalmente en la parte central de la retina. La más alta concentración de pigmento es encontrada en esta región y cae muy rápidamente hacia la parte exterior como se muestra en la Figura 15.

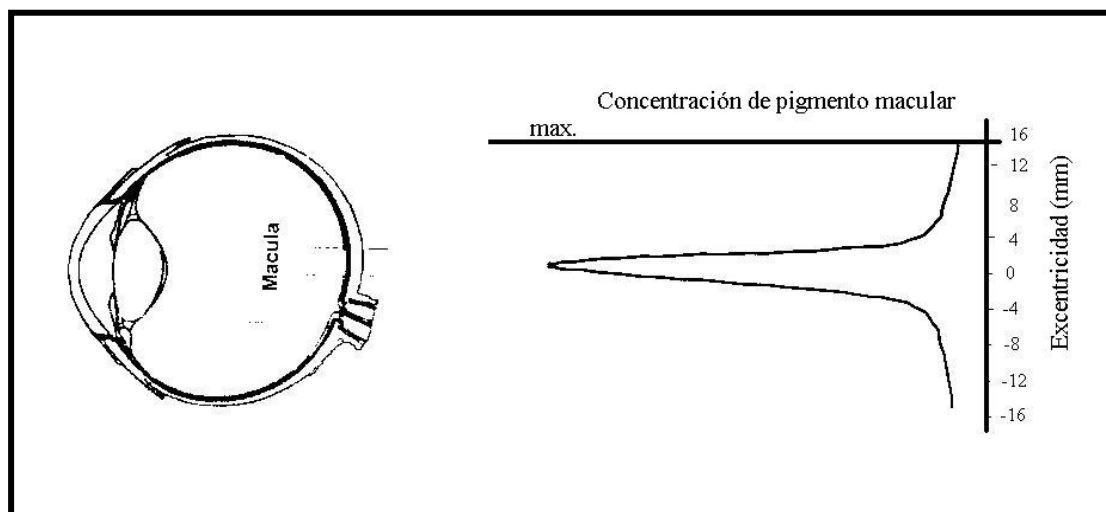


FIGURA 15. DIAGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE LUTEÍNA EN EL PIGMENTO MACULAR (BIOQUIMEX, 2002).

Es bien conocida la importancia de la luteína para la salud del ojo. Los niveles de luteína han mostrado que están inversamente relacionados con el riesgo de enfermedades oculares, incluyendo la degeneración macular relativa a la edad (AMD) (Eye Disease Case–Control Study Group, 1993; Mares-Perlman *et al.*, 2002; Seddon *et al.*, 1994) e incluso podría ayudar a mejorar la función visual de pacientes que ya sufren de AMD y otras enfermedades oculares.

La degeneración macular asociada con la edad es una enfermedad progresiva y no tratable que es la causa principal de ceguera irreversible en personas de alrededor de 65 años de edad.

4.1.2.2 OTROS BENEFICIOS DE LA LUTEÍNA EN LA SALUD

También los carotenoides han sido extensamente estudiados como agentes que previenen el cáncer. Datos disponibles de estudios realizados sugieren que la luteína tiene un efecto protector en contra del cáncer de pulmón (Holick *et al.*, 2002; Le Marchand *et al.*, 1995, 1993; Michaud *et al.*, 2000).

Asimismo, la presencia de luteína en la piel ayuda a la reducción del daño inducido por rayos ultravioleta (Chen *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 1995; Stahl *et al.*, 2000, 2002; Wingerath *et al.*, 1998).

Los carotenoides y los tocoferoles son conocidos por ser eficientes antioxidantes y capaces de remover especies de oxígeno reactivas generadas durante un esfuerzo foto oxidativo, que podría proteger la piel de la luz ultravioleta que induce eritema.

Se ha reportado que la ingesta de luteína reduce el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Alves y Shao, 2004). También podría ayudar a mantener la salud del corazón disminuyendo el riesgo de arteriosclerosis provocado por la edad (Dwyer *et al.*, 2001; Mares-Perlman *et al.*, 2002) y enfermedades coronarias del corazón.

4.1.2.3 FLOR DE CEMPASÚCHIL

La luteína puede ser obtenida de las paredes de las células de los pétalos de la flor Cempasúchil (*Tagetes erecta*), la cual contiene 1.6% de carotenoides y aproximadamente el 80% de esa parte corresponde a ésteres de luteína (Philip y Berry, 1976). Mientras otras fuentes, tales como la espinaca deshidratada o el alfalfa tienen un muy bajo contenido de luteína libre (<0.5%) y una mezcla variada de otros nutrientes.

La flor de “Cempasúchil” (Figura 16) es una planta nativa de México. Cempasúchil quiere decir en Náhuatl "flor de 20 pétalos" (Tabla 4). Se ha utilizado desde hace siglos como una planta ornamental y medicinal. Es una flor compuesta que varía en las tonalidades de anaranjado a amarillo, siendo muy aromática.

En México existen 32 de las 55 especies conocidas de esta flor, tanto de forma silvestre como cultivada; su cultivo se extiende principalmente por los Estados de Chiapas, Tabasco, Michoacán, Jalisco, Durango, Guerrero, Estado de México, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tlaxcala y Veracruz, como también se puede encontrar en Centro América y Panamá (Cortés, 2006). La planta alcanza alturas entre 50 y 100 cm.



FIGURA 16.
LA FLOR DE
CEMPASÚCHIL

TABLA 4.
CLASIFICACIÓN DE LA
FLOR DE CEMPASÚCHIL

REINO	PLANTAE
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
ORDEN	ASTERALES
FAMILIA	ASTERACEAE
GÉNERO	TAGETES
ESPECIE	ERECTA

4.1.2.4 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LUTEÍNA

Los diésteres de luteína se pueden obtener por extracción con hexano de la flor de Cempasúchil y posteriormente por un proceso de saponificación del extracto de diésteres, se obtiene la luteína. El diagrama de proceso se observa en la Figura 17 (Navarrete *et al.*, 2005).

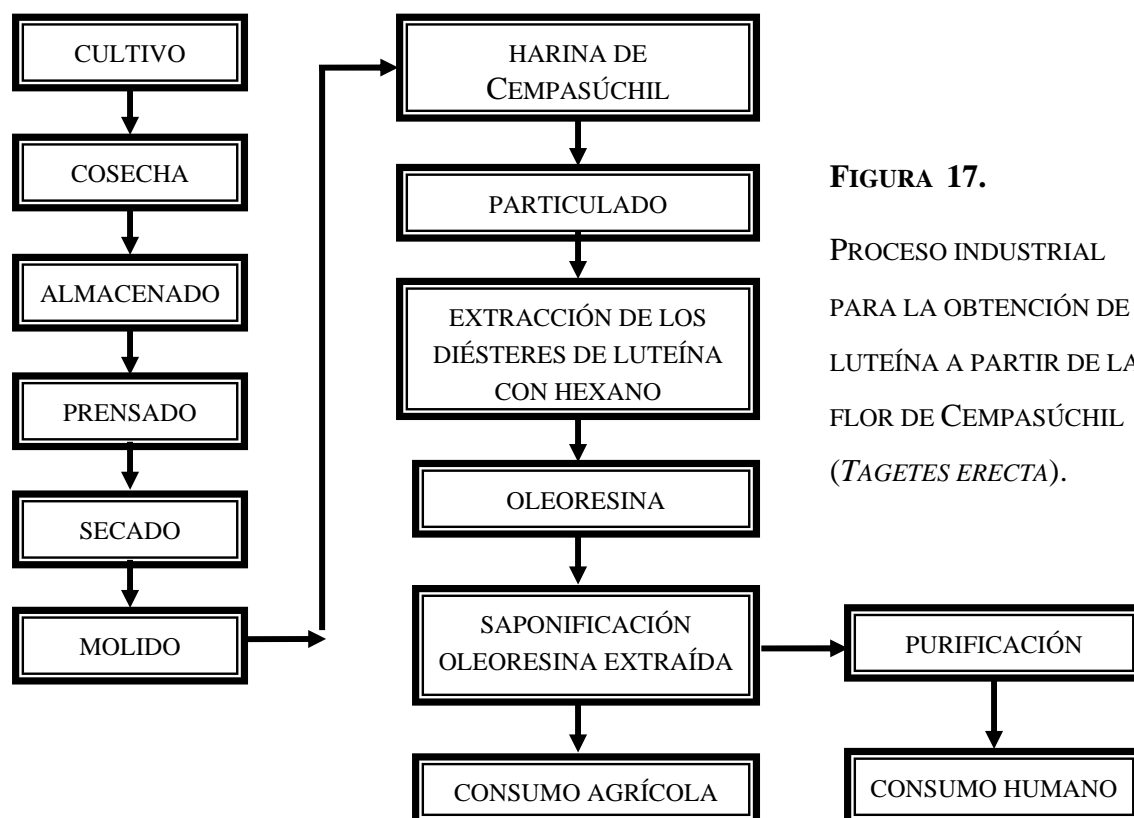


FIGURA 17.
PROCESO INDUSTRIAL PARA LA OBTENCIÓN DE LUTEÍNA A PARTIR DE LA FLOR DE CEMPASÚCHIL (*TAGETES ERECTA*).

Un proceso alternativo a esta saponificación es usando enzimas en medio acuoso (Delgado y Paredes, 1997). Bajo este enfoque, estudios previos del grupo de investigación han determinado que la lipasa de *Rhizomucor miehei*, es una enzima que cataliza eficientemente la hidrólisis de diésteres de luteína en medio orgánico (González, 2006).

Las ventajas de trabajar en disolventes orgánicos son de aumentar la solubilidad del sustrato, mejorar la termoestabilidad de la enzima, una más eficiente recuperación del producto y la posibilidad de llevar a cabo reacciones que son suprimidas por el agua (Klibanov, 1986).

Por lo que utilizando la enzima podrían realizarse los dos pasos simultáneamente es decir, la extracción con disolvente orgánico y la desesterificación sin realizar entonces la saponificación con químicos corrosivos, que es un paso adicional en el proceso.

4.2 REACTORES ENZIMÁTICOS

4.2.1 CLASIFICACIÓN

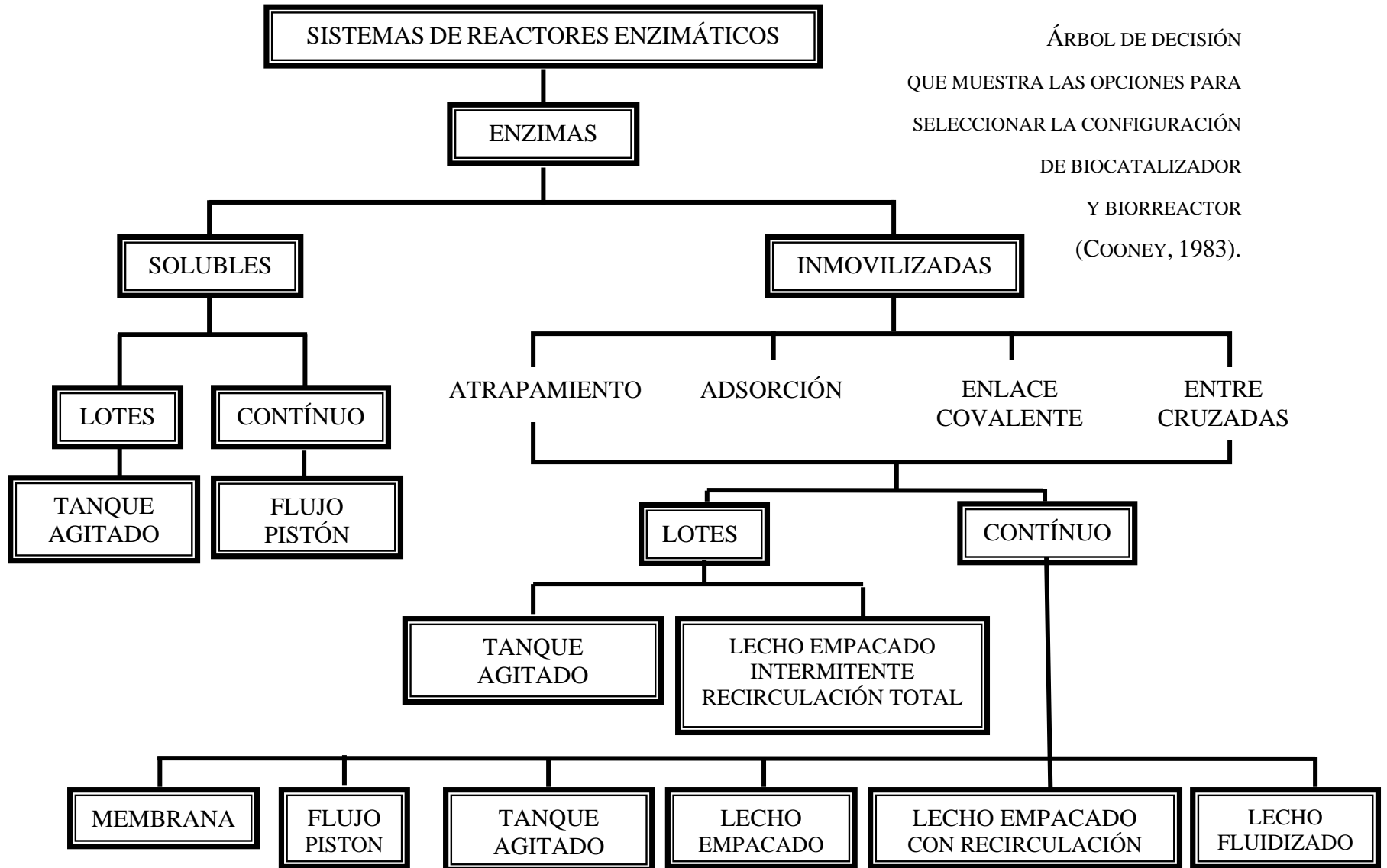
Un reactor enzimático consiste en un recipiente o una serie de recipientes, usados para obtener una conversión deseada por medios enzimáticos. Considerando el rol central de un biorreactor en una industria, se han construido en una variedad de tamaños y formas.

El objetivo de un biorreactor es minimizar el costo de fabricación de un producto de alta calidad, con esto también, aumentar la velocidad de formación y calidad de un producto, mejorar la operación aséptica e innovar formas para eliminar los pasos limitantes de velocidad especialmente de transferencia de calor y de masa, así como mejorar la subsecuente recuperación de producto (Cooney, 1983).

Hay varios tipos de biorreactores y de biocatalizadores, la combinación de estos tipos provee la elección para un sistema de operación, resumido en la Figura 18.

FIGURA 18.

ÁRBOL DE DECISIÓN
QUE MUESTRA LAS OPCIONES PARA
SELECCIONAR LA CONFIGURACIÓN
DE BIOCATALIZADOR
Y BIORREACTOR
(COONEY, 1983).



4.2.2 REACTOR DE LECHO EMPACADO

Por su alta eficiencia, bajo costo, fácil construcción, operación y mantenimiento, los reactores de lecho empacado han sido tradicionalmente usados para reacciones catalíticas a gran escala en la industria química en general. Para reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas los reactores de lecho empacado son los más ampliamente usados.

En estos reactores, los gránulos de enzima inmovilizada son usualmente empacados dentro de una tubería o columna enchaquetada para una operación isotérmica. Con esto se provee una mayor área de superficie por unidad de volumen de reacción.

En presencia de una fase simple, el bombeo podría ser hacia arriba (evitando un exceso de acanalamiento) o hacia abajo (tomando ventaja de las fuerzas de gravedad). En una situación bifásica, las dos fases podrían ser bombeadas en direcciones opuestas (flujos contracorriente) con la más densa fluyendo hacia abajo o en la misma dirección (flujo paralelo). Existen caídas de presión normalmente asociadas con este tipo de reactor, especialmente con gránulos pequeños, pero con la contraparte que con gránulos pequeños las limitaciones difusionales son disminuidas (Balcao *et al.*, 1996).

En el presente estudio se seleccionó un reactor empacado operado por lotes con recirculación. El fabricante de la enzima lipasa Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei* (NOVO) señala en su hoja técnica que:

*“Es un catalizador robusto y estable,
que puede ser aplicado en procesos de reacción en columna”.*

Las características de un biorreactor de lecho empacado con enzima inmovilizada con recirculación son (Balcao, 1996; Pitcher, 1983; Vulfson *et al.*, 2001):

- ❖ Las enzimas son a menudo usadas en forma inmovilizada en la industria ya que eso facilita su uso para ser operado en continuo y ofrecen la posibilidad de reutilizar la enzima repetidamente mientras ésta permanezca activa.
- ❖ Una carga de biocatalizador variable.
- ❖ Una carga de fluido variable.
- ❖ La conversión por el paso a través del catalizador es pequeña, por ello se le considera diferencial.
- ❖ Lograr reacciones libres de resistencia a la transferencia de masa y calor aumentando la velocidad en el lecho empacado de enzima.
- ❖ Hacer más lento el progreso de la reacción utilizando una carga más grande de fluido o menos catalizador.

Como en cualquier sistema catalítico heterogéneo, la difusión externa e interna puede afectar grandemente la velocidad de reacción. Las consideraciones de transferencia de masa indican que la forma, tamaño de la partícula, tamaño del poro, cantidad de enzima por partícula y velocidad de flujo de sustrato pueden afectar la velocidad de reacción (Vulfson *et al.*, 2001).

Como regla general, un rápido flujo alrededor del soporte del catalizador da una velocidad superficial alta, lo cual reducirá la resistencia a la transferencia de masa externa, pero en contraparte, puede reducir la posibilidad de tiempo de contacto entre las moléculas de sustrato y el sitio activo de la enzima. La velocidad de flujo es usada para controlar predominantemente el grado de conversión en un reactor de flujo continuo. En el caso presente, el reactor tiene recirculación completa por lo que también se utiliza como una forma de mezclado (Balcao, 1996; Pitcher, 1983; Vulfson *et al.*, 2001).

Un número de estudios han sido publicados sobre la aplicación de enzimas inmovilizadas en reactores de lecho empacado para llevar a cabo reacciones enzimáticas. El trabajo reportado investiga principalmente los siguientes tópicos (Vulfson *et al.*, 2001):

1. Efecto de las condiciones de reacción en el proceso (el contenido de agua, la temperatura, el flujo y la concentración inicial de sustrato).
2. Cinética de las reacciones enzimáticas en particular.
3. Caídas de presión.
4. Transferencia de masa.

En esta investigación se consideraron los efectos de las condiciones de reacción: velocidad de recirculación a través del reactor y concentración inicial de sustrato. Los parámetros que se fijaron para controlar la reacción enzimática fueron la temperatura (60 °C), la actividad de agua inicial en la enzima, el tipo y la concentración de enzima.

La velocidad de disminución de actividad del catalizador es un parámetro crucial en la economía del proceso. Por consiguiente, debe hacerse una medición exacta de la temperatura, control del agua y control de calidad de la alimentación (Vulfson *et al.*, 2001).

El criterio para calcular la cantidad de enzima en el reactor de lecho empacado es el mismo que en todos los casos, como en los reactores de lecho empacado que utilizan catalizadores químicos. Normalmente se tiene la necesidad de producir una cierta cantidad de producto (en este caso a través de una hidrólisis) con una determinada velocidad (expresada por el caudal de alimentación).

Para lograr esto hay que introducir en el reactor una cantidad necesaria de biocatalizador que permita realizar la reacción y que a la vez no reduzca el caudal que se requiere. Es una solución de compromiso entre tener mucha capacidad para producir una reacción y que al mismo tiempo no produzca una caída muy grande en el caudal.

4.3 ENZIMA LIPASA

4.3.1 LIPASAS

Las enzimas son catalizadores poderosos y altamente específicos respecto a sus sustratos. Las enzimas lipasas también conocidas como acil glicerol hidrolasas EC 3.1.1.3 (Verger, 1997) son capaces de catalizar la hidrólisis y la síntesis de acilgliceroles de cadena larga, en función del potencial químico de las especies presentes, Figura 19 (Martinelle *et al.*, 1995).

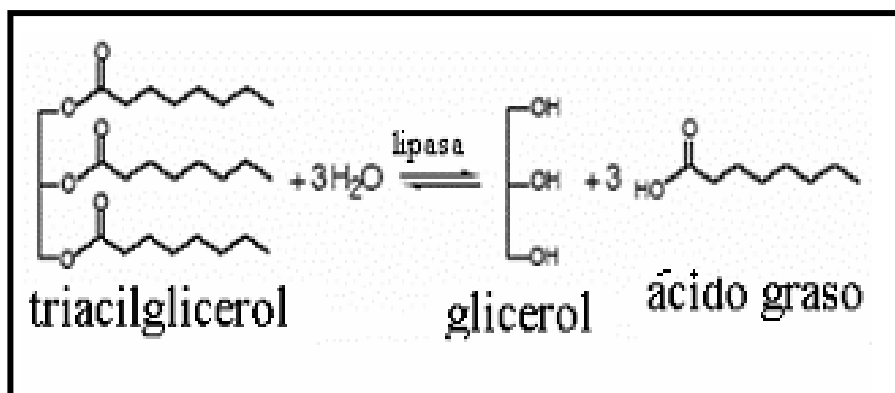


FIGURA 19.
REACCIÓN DE
HIDRÓLISIS,
CATALIZADA
POR UNA LIPASA.

Las enzimas lipasas se encuentran ampliamente en microorganismos, plantas y animales. Las lipasas comerciales son de origen microbiano, principalmente de bacterias, hongos (*Rhizomucor miehei*) y levaduras (*Candida antarctica*) (Jaeger y Reetz, 1998). La siguiente tabla enumera las fuentes principales de lipasas que parecen ser las más ampliamente usadas en biotecnología:

TABLA 5. FUENTES PRINCIPALES DE LIPASAS (JAEGER Y REETZ, 1998).

ORIGEN	M (kDa)	ESPECIFICIDAD	APLICACIONES
LIPASA ORIGEN MAMÍFERO			
Lipasas de páncreas humano	50	sn-1,3	Síntesis orgánica, Ayuda digestiva
Lipasa gástrica humana	50	sn-3 (estable en ácido)	
Lipasa páncreas porcino	50	sn-1,3	
Lipasa pancreática de cerdo Guinea	40	sn-1,3	
LIPASA ORIGEN FUNGAL			
<i>Cándida rugosa</i>	60	No específica	Síntesis orgánica
<i>Cándida antarctica B</i>	60	sn-1,3	Síntesis orgánica
<i>Geotrichum candidum</i>	60	Cis-	Oleoquímica
<i>Humicola lanuginosa</i>	30	No específica	Detergentes
<i>Rhizomucor miehei</i>	30	sn-1,3	Síntesis orgánica, manufactura de queso
<i>Aspergillus oryzae</i>	30		Síntesis orgánica, manufactura de queso
<i>Penicillium camembertii</i>	30	sn-1,3	Monoglicéridos
<i>Rhizopus delemar</i>	41	sn-1,3	Oleoquímica
<i>Rhizopus oryzae</i>	41	sn-1,3	
<i>Rhizopus arrhizus</i>	41	sn-1,3	
LIPASAS ORIGEN BACTERIANO			
<i>Pseudomonas glumae</i>	33	No específica	Detergente, síntesis orgánica
<i>Burkholderia cepacia</i>	33	No específica	Síntesis orgánica
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	33	sn-1,3	Detergente
<i>Pseudomonas mendocina</i>	33	sn-1,3	Detergente
<i>Chromobacterium viscosum</i>	33	sn-1,3	Síntesis orgánica
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	43	sn-1,3	
<i>Fusarium solani</i>	22		Detergente

4.3.2 GENERALIDADES DE LAS LIPASAS

- ❖ Peso molecular 20 a 60 kDa.
- ❖ Contienen 2 a 15% de carbohidratos.
- ❖ pH óptimo = 8 a 9 lipasas animales; 5.5 a 8.5 microbianas.
- ❖ T óptima = 30 a 60 °C.

En la siguiente figura se observa el plegamiento común de las lipasas.

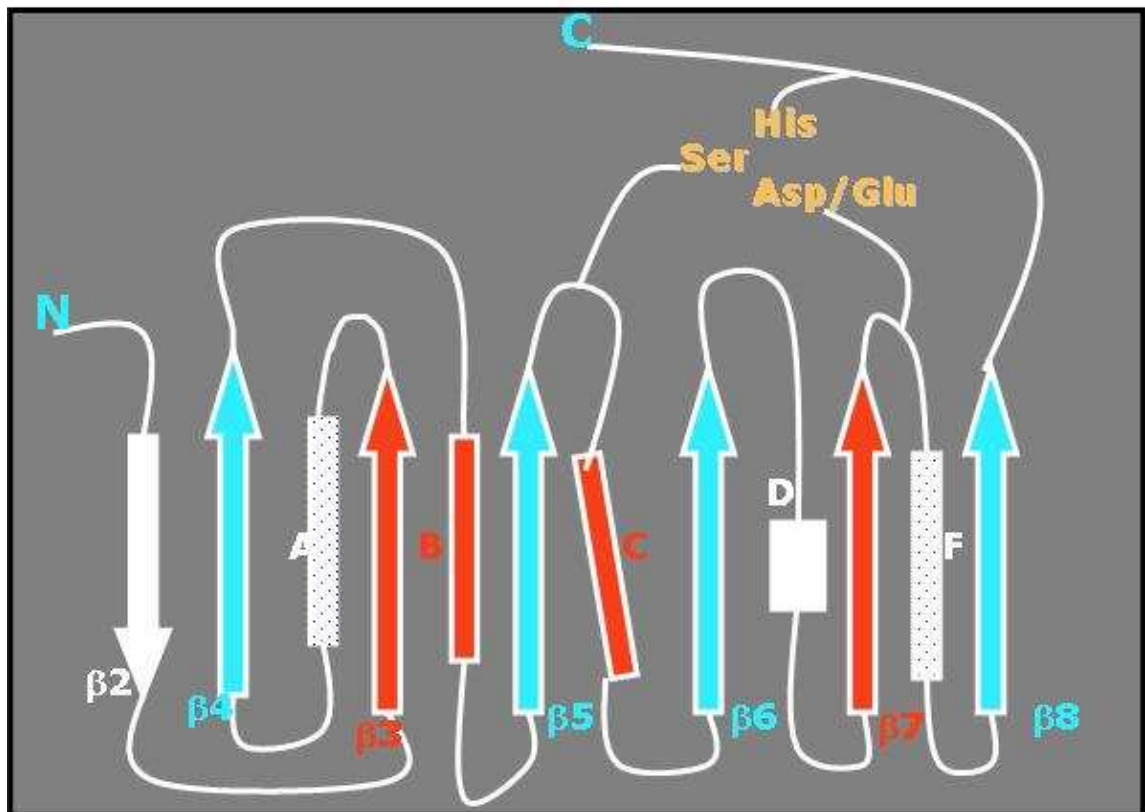


FIGURA 20. PLEGAMIENTO COMÚN DE LAS LIPASAS (SCHMID Y VERGER, 1998)

En la Figura 20, se observa en rojo los motivos comunes a todas las lipasas; en blanco, los motivos presentes en la mayoría de las lipasas. Las hélices A y F están en el lado cóncavo de las hebras β . La hélice D está a menudo compuesta de una sola vuelta. El patrón de plegamiento α/β está compuesto por un “centro” de β hebras rodeado por hélices α típico de numerosas hidrolasas. El sitio activo está compuesto de una triada catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu (Brady *et al.*, 1990).

El sitio catalítico de muchas lipasas no está expuesto a la superficie, sino que está metido en un túnel hidrofóbico protegido por residuos hidrofóbicos que actúan como una “tapa”. Esta tapa hidrofóbica cuando se pone en contacto con el disolvente se abre, generando una estructura catalíticamente activa y da acceso al sustrato. Las lipasas están activas solamente cuando se han adsorbido en una interfase agua/lípido en lo que se conoce como mecanismo de activación interfacial en las lipasas (Uppenberg *et al.*, 1994). Esto se ilustra en la Figura 21.

4.3.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE UNA LIPASA

Los criterios para la selección de una lipasa como catalizador pueden ser (Jaeger y Reetz, 1998):

- ❖ Amplia especificidad en el sistema de reacción.
- ❖ Exhiben una alta enantioselectividad.
- ❖ Actividad en el sistema de reacción.
- ❖ Estabilidad en el sistema de reacción.
- ❖ Estables en disolventes orgánicos.
- ❖ No requieren cofactores.
- ❖ Disponibilidad para ser usada en el proceso.

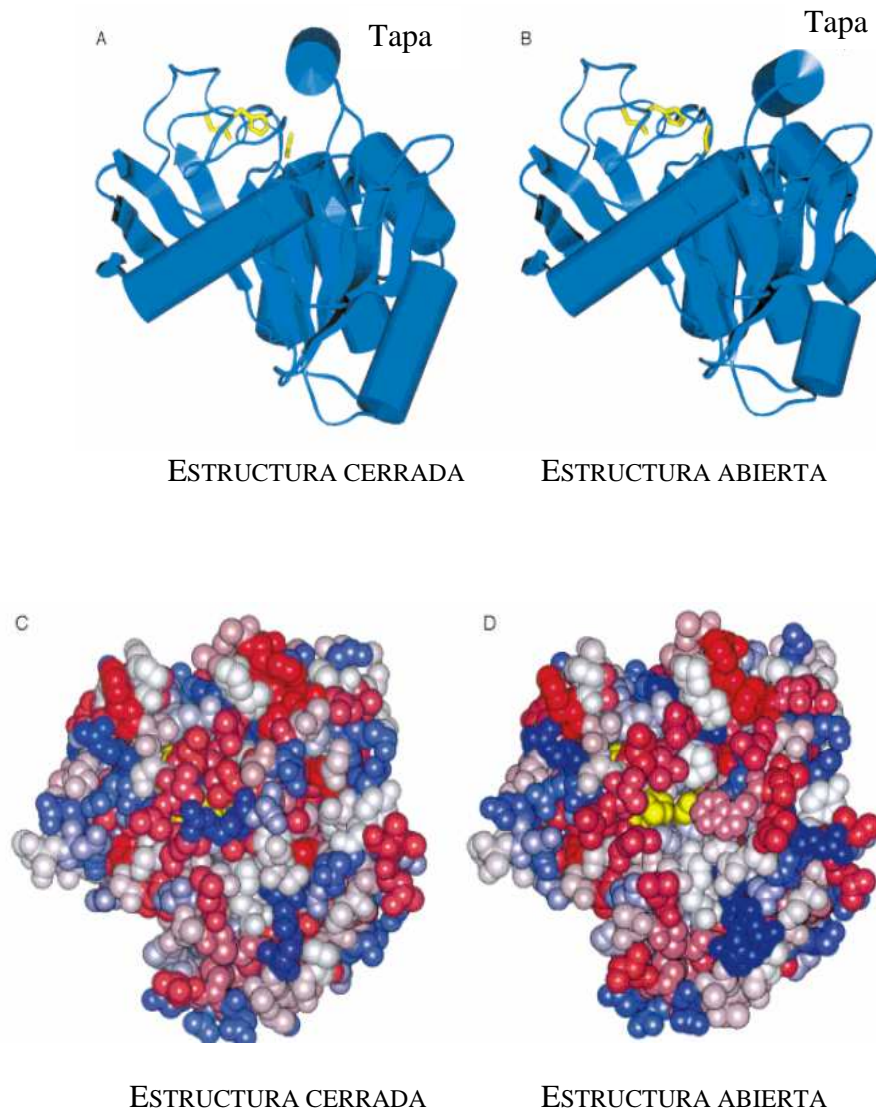


FIGURA 21. (SCHMID Y VERGER, 1998)

- A) y B) MUESTRA LA FORMA ESTRUCTURADA DE LA TAPA QUE CUBRE EL SITIO CATALÍTICO DE LAS LIPASAS.
- C) y D) VISTA DE ARRIBA DE LA LIPASA DE *RHIZOMUCOR MIEHEI*. EN ROJO ZONAS POLARES, EN AZUL ZONAS HIDROFÓBICAS Y EN AMARILLO EL SITIO ACTIVO.

4.3.4 USOS INDUSTRIALES DE LAS LIPASAS

Las principales aplicaciones industriales de las lipasas microbianas están resumidas en la Tabla 6.

TABLA 6. APLICACIÓN INDUSTRIAL DE LAS LIPASAS MICROBIANAS (VULFSON, 1994).

INDUSTRIA	ACCIÓN	PRODUCTO O APLICACIÓN
Detergentes	Hidrólisis de grasas	Remoción de manchas de aceites
Productos lácteos	Hidrólisis de grasas de leche, maduración de queso, modificación de grasas de mantequilla	Desarrollo de agentes de sabor en leche, queso y mantequilla
Industria del pan	Mejoramiento del sabor	Prolongación de la vida de anaquel
Bebidas	Mejoramiento del aroma	Bebidas
Aderezos de alimentos	Mejoramiento de la calidad	Mayonesa, aderezos
Alimentos saludables	Transesterificación	Alimentos saludables
Carne y pescado	Desarrollo de sabor	Productos cárnicos y pescado, remoción de grasas
Grasas y aceites	Transesterificación e hidrólisis	Manteca de cacao, margarina, ácidos grasos, glicerol, mono y digliceridos
Químicos	Enantioselectividad, síntesis	Quiral
Farmacéuticos	Transesterificación e hidrólisis	Lípidos especiales, ayudas digestivas
Cosméticos	Síntesis	Emulsión, hidratantes
Cuero	Hidrólisis	Productos de cuero
Papel	Hidrólisis	Mejora de la calidad del papel
Limpieza	Hidrólisis	Remoción de grasas

En particular, el uso de lipasas en síntesis orgánica está siendo cada vez más importante debido a que catalizan una amplia variedad de transformaciones químico, regio y estereoselectivas (Kazlauskas *et al.*, 1998). Estas enzimas trabajan en la interfase hidrofílica-lipofílica y además toleran disolventes orgánicos en la mezcla reaccionante. Las enzimas en medio orgánico sin fase acuosa, se sabe que despliegan propiedades inusuales y útiles. Esto ha sido firmemente investigado y establecido en sistemas enzimáticos no acuosos para síntesis y biotransformaciones (Klibanov, 1997).

La estereoselectividad de las lipasas ha sido usada para resolver varias mezclas racémicas de ácidos orgánicos, alcoholes y aminas en sistemas bifásicos inmiscibles (Klibanov, 1990). Alcoholes racémicos pueden también ser resueltos hacia formas enantioméricamente puras por lipasas. Asimismo, acilan ciertos esteroides, azúcares y derivados de azúcares con una alta regio selectividad (Sharma, 2001). En particular, las lipasas han sido usadas exitosamente como catalizadores para la síntesis de ésteres y amidas. Los ésteres producidos de ácidos grasos de cadena corta, tienen aplicaciones como agentes saborizantes en la industria de alimentos (Vulfson, 2001).

4.3.5 INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS

Las lipasas son solubles en disoluciones acuosas, pero sus sustratos naturales (lípidos) no lo son. Aunque el uso apropiado de un disolvente orgánico o un emulsificante ayuda a sobrepasar el problema de un íntimo contacto entre el sustrato y la enzima, el uso práctico de las lipasas en tal sistema de reacción posee dificultades tecnológicas (contaminación de los productos con actividad residual de la enzima) y dificultades económicas (uso de la enzima para un solo paso en el reactor). Si la lipasa es inmovilizada, entonces ésta llega a ser una fase independiente dentro del sistema de reacción, la cual podría ser fácilmente retenida en el reactor por medios mecánicos con las ventajas concomitantes en prevenir contaminación de los productos y extender la vida activa de la enzima (Katchalski, 1993).

Las propiedades de una enzima inmovilizada están gobernadas por las propiedades de la enzima y del material de soporte. El soporte podría ser un líquido como en las micelas inversas o un sólido, como comúnmente se encuentra en la mayoría de los protocolos empleados de inmovilización (Vulfson *et al.*, 2001). En general, los métodos de inmovilización más ampliamente usados son aquellos basados en procesos de adsorción. Estos son generalmente simples, efectivos, no requieren el uso de químicos potencialmente dañinos y no provocan grandes pérdidas en la actividad de las lipasas. Este es el caso de la lipasa comercial empleada en el presente estudio.

La eficiencia de una reacción catalizada por la enzima inmovilizada está también en función de la carga de enzima por gramo de soporte, ya que esta carga determinará que la reacción sea controlada por cambios conformacionales de la enzima en el soporte, o bien por el control de transferencia de masa, como se observa en la Figura 22 (Vulfson *et al.*, 2001).

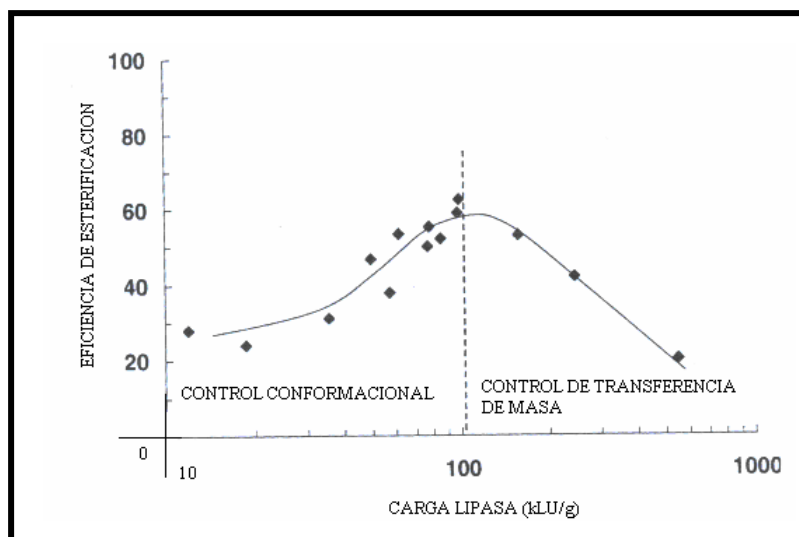


FIGURA 22. EFECTO SOBRE LA EFICIENCIA DE ACTIVIDAD ENZIMATICA PARA ESTERIFICACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE LIPASA DE *RHIZOMUCOR MIEHEI* ABSORBIDA SOBRE ACCUREL EP100 (VULFSON *ET AL.*, 2001).

4.3.6 LIPASA DE *RHIZOMUCOR MIEHEI*

La clasificación de la enzima lipasa del hongo *Rhizomucor miehei* (www.pdb.org) es la siguiente:

- ❖ CLASE: Proteína α y β .
- ❖ PLEGAMIENTO: Hidrolasa α/β
- ❖ SUPERFAMILIA: Hidrolasa (carboxílica estereasa) - α/β
- ❖ FAMILIA: Lipasa de hongos
- ❖ DOMINIO: Lipasa triacilglicerol hidrolasa
- ❖ ESPECIE: Hongo *Rhizomucor miehei*

La estructura molecular de la enzima lipasa de *Rhizomucor miehei* es conocida y con las siguientes propiedades (Brady *et al.*, 1990):

- ❖ Cadena polipeptídica de 269 residuos (peso molecular = 29.472 kDa)
- ❖ Residuos plegados en un dominio con hoja β con ramales paralelos, conectados por horquillas, asas y segmentos helicoidales.
- ❖ Tres enlaces disulfuro estabilizan el plegamiento de la molécula.
- ❖ La estructura tridimensional esperada de la lipasa de *Rhizomucor miehei* obtenida de una base de datos de proteínas, se observa en la Figura 23.

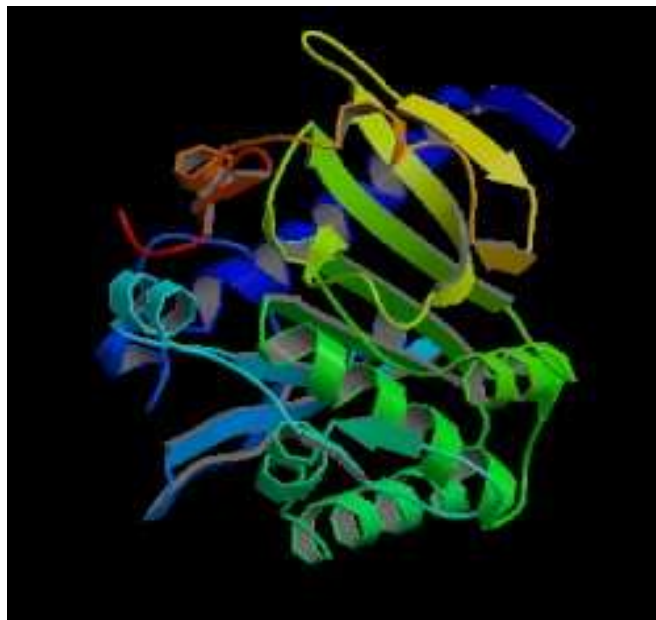


FIGURA 23.
 ESTRUCTURA
 TRIDIMENSIONAL
 ESPERADA DE LA LIPASA
 DE *RHIZOMUCOR MIEHEI*
 (WWW.PDB.ORG).

Tres residuos forman el centro catalítico: His 257, Asp 203 y Ser 144 (Brady *et al.*, 1990). Esta triada catalítica está cercana a la superficie, pero no completamente expuesta al disolvente ya que está escondida bajo una corta hélice anfipática (residuos 85 a 91), la cual actúa como “párpado”, abriéndose el sitio activo cuando la enzima es absorbida en la interfase de agua-disolvente (Miled *et al.*, 2001).

La lipasa comercial de *Rhizomucor miehei* Lipozyme, se encuentra inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico (Novozymes A/S), con aproximadamente 14% (w/w) de proteína adsorbida sobre la resina (Valérie *et al.*, 1999).

MICROORGANISMO DE PRODUCCIÓN:	Plasmido recombinante introducido y expresado en <i>Aspergillus oryzae</i>
MICROORGANISMO DONADOR:	<i>Rhizomucor miehei</i>

Esta lipasa es producida comercialmente en forma extracelular por fermentación sumergida del microorganismo de producción, el cual está genéticamente modificado.

Resulta importante señalar que cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas con grado alimenticio, de acuerdo con las normas de las siguientes organizaciones: (Novozymes A/S)

- ❖ Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives.
- ❖ Food Chemical Codex.

4.4 DISOLVENTE DE LA REACCIÓN

Las reacciones enzimáticas se pueden llevar a cabo en una gran variedad de disolventes como medios de reacción, como se muestra en la siguiente tabla.

TABLA 7 SISTEMAS DE REACCIÓN PARA LAS LIPASAS, DISOLVENTE Y PROCESO (Vulfson *et al.*, 2001).

DISOLVENTE USADO COMO MEDIO DE REACCIÓN	PROCESO	
Agua	Hidrólisis	
Sistema disolvente miscible y agua	Hidrólisis o síntesis	
Sistema disolvente inmiscible y agua		
Medio de reacción no acuoso	Síntesis	Sistema con bajo contenido de agua
Medio de reacción anhidro		
Fluídos supercríticos		
Sistema micelar inverso		
Fase gas		
Líquidos iónicos		

Recientemente el número de estudios de enzimología no acuosa ha aumentado considerablemente para usar enzimas en disolventes orgánicos. En éstos, al igual que en el medio acuoso, la actividad, especificidad y estabilidad de las enzimas son fuertemente dependientes de las condiciones de la reacción.

El disolvente orgánico puede afectar las interacciones entre la enzima y el sustrato por alterar las fuerzas intermoleculares tales como enlaces de hidrógeno, interacciones electroestáticas, van Der Waals y fuerzas hidrofóbicas. Por lo tanto, es posible que las propiedades del disolvente orgánico y la cantidad de agua enlazada a la enzima determinen la actividad de la enzima, convirtiéndose esto en dos nuevos factores que podrían jugar un rol en el sistema de reacción, como la selección del disolvente y el nivel de agua residual (Vulfson *et al.*, 2001).

La polaridad del disolvente orgánico puede afectar la actividad catalítica al distorsionar la capa esencial de agua que estabiliza al biocatalizador como se ve en la Tabla 8 (Laane *et al.*, 1987).

TABLA 8. FORMA EN QUE LA POLARIDAD DEL DISOLVENTE AFECTA LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA. EL LOGARITMO DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN LOG P, ES UNA MEDIDA CUANTITATIVA DE LA POLARIDAD DEL DISOLVENTE.

POLARIDAD DEL DISOLVENTE	LOG P	ACTIVIDAD CATALÍTICA <i>(que ha sido afectada por la polaridad del disolvente al distorsionar la cap esencial de agua)</i>
polar	$\text{Log P} < 2$	baja
moderada	$2 < \text{Log P} < 4$	moderada
apolar	$\text{Log P} > 4$	alta

De tal forma que la cantidad de agua exacta asociada con la enzima y la reacción varía dependiendo de la hidrofobicidad del disolvente orgánico (Laane *et al.*, 1987). Si el disolvente orgánico es de hidrofobicidad alta, mantendrá una mayor proporción de agua disponible para la enzima y la reacción; que si el disolvente es más hidrofílico, ya que éste tiende a quitar el agua adsorbida de la superficie de la enzima y de la reacción.

Para el caso presente, la hidrólisis del diéster de luteína en 2,2,4-Trimetilpentano o Isooctano (Figura 24) como medio de reacción ha dado buenos resultados de velocidad de reacción y conversión (González, 2006).

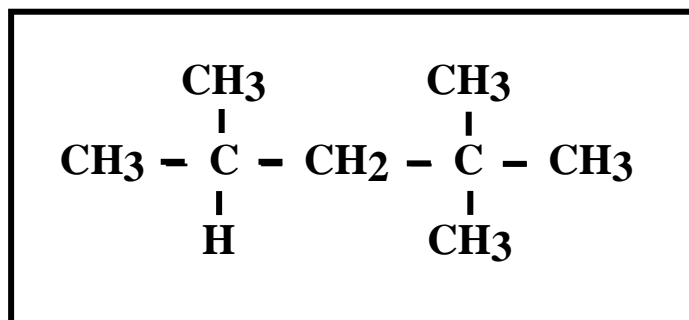


FIGURA 24. LA ESTRUCTURA DEL 2,2,4 TRIMETILPENTANO (Morrison y Boyd, 1976).

Se desprende de la Tabla 8, que el isooctano (hidrofóbico) tiene un logaritmo de coeficiente de partición $\log p > 4$, por lo que no distorsiona la capa esencial de agua manteniendo al biocatalizador en un estado activo (Laane *et al.*, 1987).

4.5 AGUA EN LA REACCIÓN

El agua tiene dos funciones: es esencial para que el catalizador enzimático mantenga su estado activo hidratado y segundo el agua es un reactante para las reacciones de hidrólisis. El nivel de agua residual tiene grandes efectos sobre el

comportamiento del biocatalizador en medios no acuosos (Zaks y Klibanov, 1988), y es crítico para el mejor desempeño de un biocatalizador (Vulfson *et al.*, 2001).

El contenido de agua total del sistema es a menudo conocido como la receta usada para preparar dicho sistema. Sin embargo, esto no es usualmente útil, particularmente como guía de comportamiento, porque el agua será particionada entre varias fases, por ejemplo en los límites del biocatalizador o en el soporte, disuelto en la fase orgánica o inclusive presente en la fase vapor (Arroyo *et al.*, 1996).

El descubrimiento de que las lipasas catalizan reacciones de síntesis y esterificación exitosamente bajo condiciones casi anhidras en medio orgánico (o sea el agua es eliminada, excepto la capa delgada esencial de agua, que mantiene a la enzima y requiere para mantenimiento de su integridad), ha hecho el intervalo posible de reacciones químicas más amplio.

Sin embargo, para el caso de la reacción de hidrólisis de diésteres de luteína donde el agua es un reactivo, se ha encontrado que la lipasa actúa en un disolvente orgánico con muy poca cantidad de agua (Mora, 2007).

4.5.1 ACTIVIDAD DE AGUA EN EL SISTEMA DE REACCIÓN

La actividad de agua indica la cantidad de agua disponible. Debido a que el disolvente que se utiliza como medio de reacción es hidrofóbico, con muy poca cantidad de agua se tiene una alta actividad en este sistema de reacción (Arroyo *et al.*, 1996).

La actividad de agua se define como la presión de vapor generada por la humedad presente en una muestra: $a_w = p/p_s$

donde:

p = presión parcial de vapor de agua.

p_s = presión de saturación de vapor de agua.

La actividad del agua inicial en este experimento tanto de la enzima lipasa de *Rhizomucor miehei* como del isooctano fue ajustada por equilibrio, con una disolución saturada de cloruro de litio y con tamiz molecular respectivamente, según se ha reportado previamente (González, 2006).

Los valores de actividad de agua a 25 °C más confiables y precisos son presentados para una selección de sales en la Tabla 9.

TABLA 9. ACTIVIDAD DE AGUA OBTENIDA A PARTIR DE SALES SATURADAS EN AGUA A 25 °C (VULFSON *ET AL.*, 2001).

LiCl	0.113	KI	0.689
KAt	0.225	NaCl	0.753
MgCl ₂	0.328	KCl	0.843
K ₂ CO ₃	0.432	KNO ₃	0.936
Mg(NO ₃) ₂	0.529	K ₂ SO ₄	0.973
NaBr	0.576		

Para el sistema estudiado, la temperatura empleada fue de 60 °C, que de acuerdo con lo que ha sido investigado, ofrece una buena actividad y termoestabilidad de la enzima. Asimismo, esta temperatura evita degradación de sustratos y productos, ya que los carotenos son muy inestables con la temperatura, especialmente la luteína libre. La temperatura de ebullición del disolvente isooctano es de 99 °C, lo que resulta ser otra razón para no trabajar a temperaturas mayores que la mencionada.

4.6 DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISIS DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA A LUTEÍNA

La enzima lipasa cataliza la hidrólisis de los diésteres de luteína en luteína como se observa en la Figura 25.

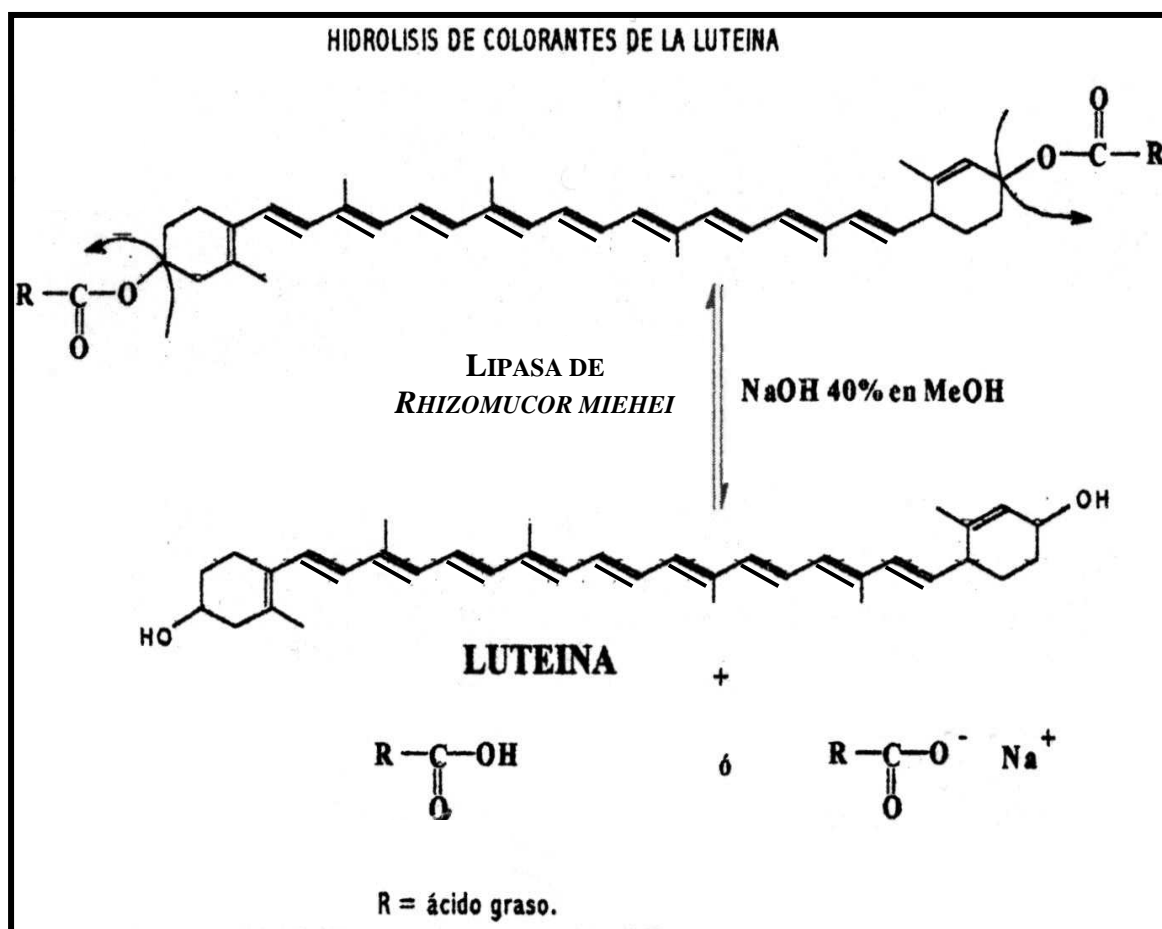


FIGURA 25. REACCIÓN ENZIMÁTICA Y QUÍMICA DE HIDRÓLISIS DE ÉSTERES DE LUTEÍNA.

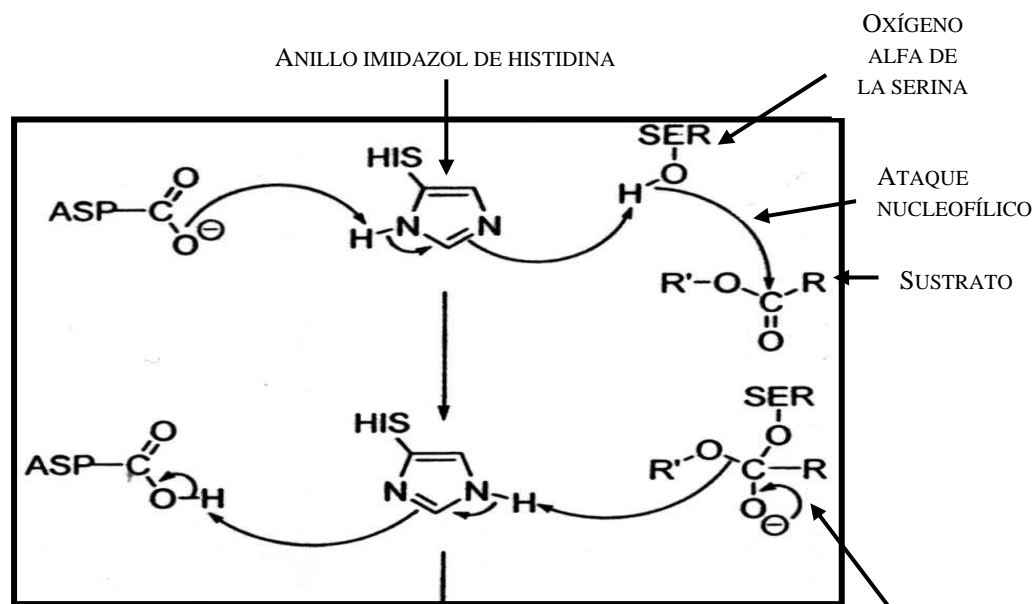
Los pasos del mecanismo de acilación–desacilación del glicérido en el sitio activo se observan en la Figura 26 (Reyes y Hill, 1994; Marangoni y Rousseau, 1995; Bousquet-Dubouch *et al.*, 2001).

FIGURA 26. MECANISMO DE ACILACIÓN-DESACILACION DEL GLICERIDO EN EL SITIO ACTIVO, DESCRITO EN CUATRO PASOS.

❖ **PASO 1**

Para la hidrólisis del éster catalizada por la enzima, en el primer paso de esta reacción se forma un complejo covalente enzima-acilo, por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo sobre el carbono del carbonilo del sustrato.

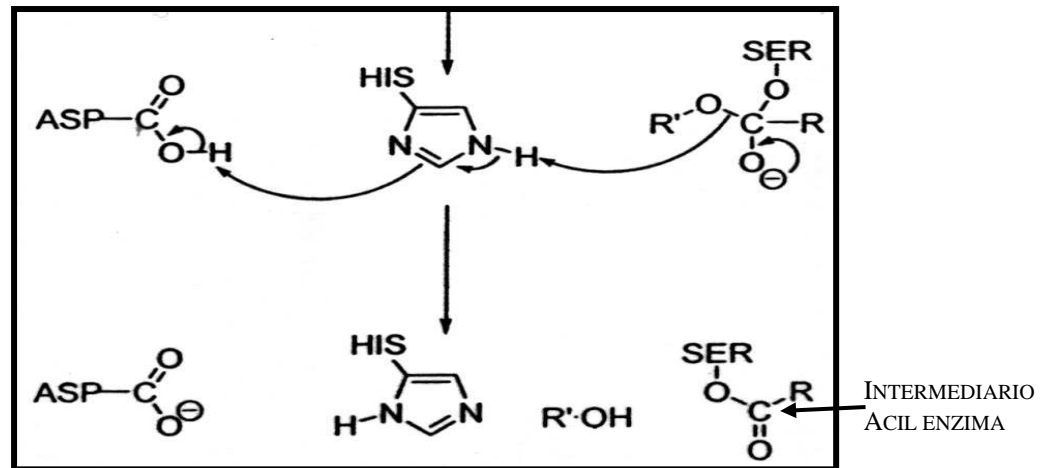
Así, la serina se convierte en un nucleófilo fuerte por la presencia de los residuos de histidina y aspartato. El anillo imidazol de la histidina se protona y se carga positivamente, estabilizando la carga negativa del aspartato.



COMPLEJO MICHAELIS-MENTEN ES.
INTERMEDIARIO TETRAÉDRICO No. 1

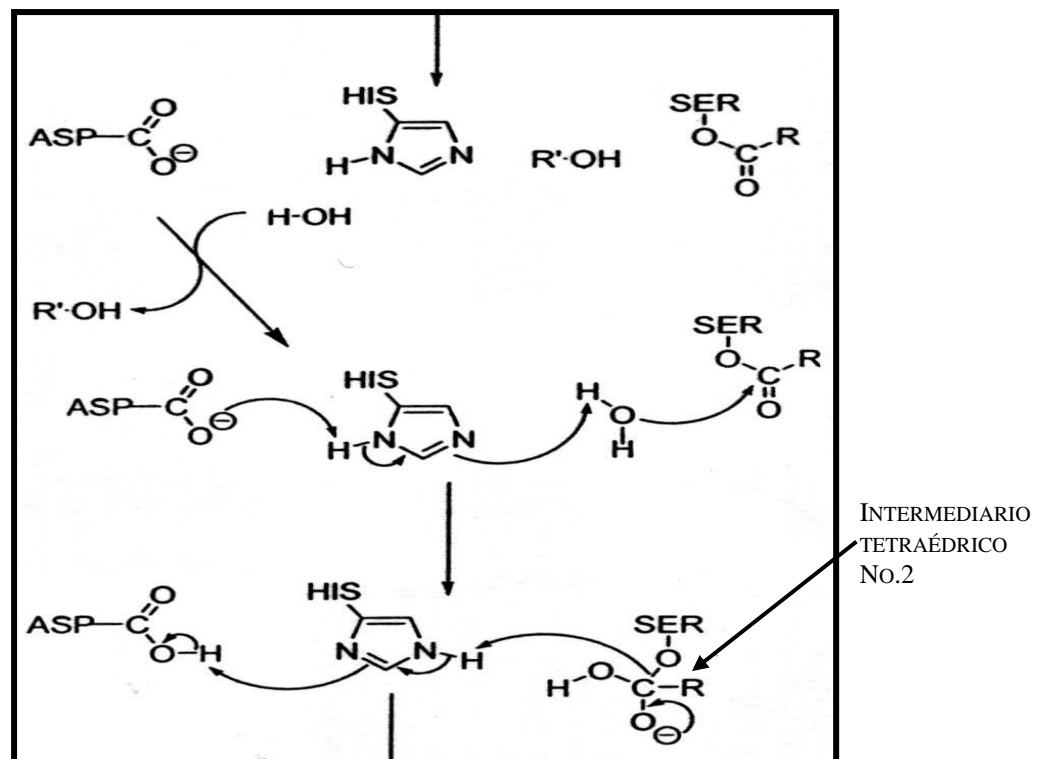
❖ **PASO 2**

El hidrógeno de la histidina enlaza al oxígeno del grupo alcohol saliente, es entonces cuando el rompimiento del enlace carbono oxígeno causa el desplazamiento del alcohol.



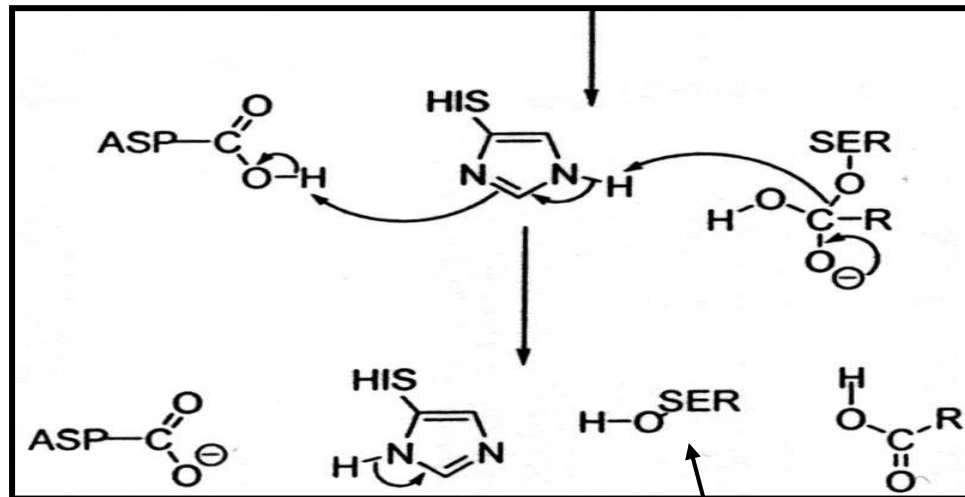
❖ **PASO 3**

A continuación, el ataque nucleofílico del agua causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono del carbonilo, produciendo un intermediario tetraédrico.



❖ **PASO 4**

Este intermediario tetraédrico se colapsa, desprendiendo el acilglicerol alterado y regenerando el sitio activo de serina.



SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA
LIBRE DE NUEVO

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 ENZIMA Y SUSTRATO

La enzima comercial Lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) fue amablemente donada por Novo, México. Está inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico y las partículas tienen un diámetro promedio entre 0.2 a 0.6 mm. La actividad enzimática es de 150 IUN/g (1 unidad Novo de interesterificación es definida como 0.01 w/w de triestearina convertido / {minuto * gramo}).

Como sustrato se empleó un extracto purificado de la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) con 80% de ésteres de luteína, amablemente proporcionado por Bioquimex-Natural S.A de C.V.

5.2 MATERIALES Y REACTIVOS

- ❖ Acetona, marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.7%.
- ❖ Metanol, marca J.T. Baker, grado HPLC, al 99.9%.
- ❖ Acetato de etilo, marca J.T. Baker grado HPLC, al 100%.
- ❖ Hexano, marca J.T. Baker grado reactivo analítico, al 95%.
- ❖ Isooctano (2,2,4-trimetilpentano), marca J.T. Baker, grado reactivo analítico, al 99.8%.
- ❖ Cloruro de litio, marca Sigma, con una pureza del 99%.
- ❖ Tamiz molecular marca Sigma con tamaño de poro de 3 Å.

5.3 EQUIPO

- ❖ Aparato para medir a_w marca Rotronic, modelo A2101.
- ❖ Balanza analítica, marca Ohaus, modelo AP2105.
- ❖ Congelador Revco, marca Legaci, modelo ULT390.
- ❖ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, marca Hewlett Packard serie 1100, con bomba cuaternaria, inyección automática y sistema de detección de arreglo de diodos.

El reactor consiste de una columna de vidrio enchaquetada con dimensiones de 2.0 cm de diámetro interno y 35 cm de alto. La mezcla de sustrato fue alimentada por arriba de la columna, usando una bomba peristáltica Master Flex L/S de Cole Parmer Easy-load modelo 7518-10. La temperatura del reactor fue mantenida constante por circulación de agua de un baño marca Heto Lab. Equipment AT₁₀. La columna empacada con Lipozyme IM y todo el sistema de reacción fue aislado con lana de vidrio para evitar pérdidas de calor.

5.4 METODOLOGÍA

5.4.1 AJUSTE DEL a_w DEL BIOCATALIZADOR

Para ajustar el a_w del biocatalizador a un valor de 0.113, se colocó el biocatalizador en placas de petri en desecadores que contenían una disolución sobresaturada de cloruro de litio, a presión reducida durante 45 minutos y almacenados durante 60 horas a 4 °C. Las mediciones del a_w se hicieron a 20 °C.

5.4.2 AJUSTE DEL a_w DEL DISOLVENTE

Para deshidratar el disolvente isooctano se puso en contacto con tamiz molecular de alta capacidad deshidratante (0.05 g tamiz / mL disolvente), durante 60 horas sin agitación.

5.4.3 PROCEDIMIENTO GENERAL DE LA REACCIÓN

Se realizó el montaje de una columna para lecho empacado de enzima inmovilizada para laboratorio, un esquema se muestra en la Figura 27. Se preparó una disolución “stock” de diésteres de luteína con una concentración de acuerdo con el diseño experimental. La disolución se dividió en porciones de 200 mL y se colocó en la columna que contiene el lecho empacado de biocatalizador con 1 g de biocatalizador/200 mL de disolución (previamente equilibrado a un valor de a_w). La circulación del sustrato se inició una vez alcanzada la temperatura de 60 °C en el reactor. La reacción se monitoreó a varios tiempos según diseño experimental, hasta un tiempo máximo de 18 horas.

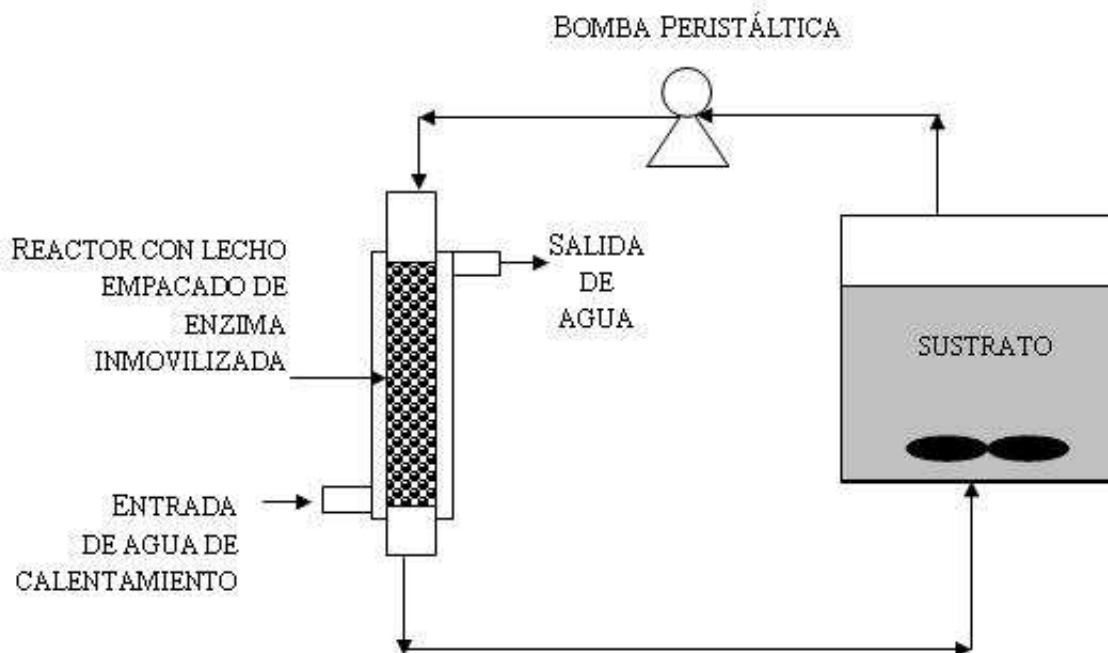


FIGURA 27. ESQUEMA DEL REACTOR DE LECHO EMPACADO UTILIZADO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA.

Al término de la reacción, se separó la disolución del recipiente externo. Asimismo, se extrajo el producto adsorbido en el soporte de la enzima con un lavado de hexano y varios de acetona. Se juntaron el sobrenadante y el colorante extraído, y la disolución se llevó a un aforo.

Para la cuantificación se tomaron dos muestras de 1 mL, a las cuales se les eliminaron los disolventes con una corriente de N₂ y se almacenaron a -70 °C. Para su análisis en HPLC, las muestras fueron disueltas en 1 mL de metanol y acetato de etilo (70:30). Las mediciones se realizaron por duplicado.

Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- ❖ Columna cromatográfica marca Waters: RP18 X-Terra, 150 mm x 4.6 mm, D.I. 5 µm.
- ❖ Lectura del detector: λ 330 nm y λ 446 nm.
- ❖ Fase móvil: metanol y acetato de etilo (70:30).
- ❖ Flujo: 0.8 mL/min.
- ❖ Volumen de inyección: 10 µL.
- ❖ Temperatura ambiente: 25 °C.

Se utilizó una curva patrón previamente investigada (González, 2006) y mostrada en la Figura 28. Ésta se construyó preparando una disolución de 0.16 mg de carotenos/mL de disolvente (hexano) y sus diluciones para cubrir el intervalo de concentraciones. Se consideró que sólo el 80% del sustrato son xantofilas.

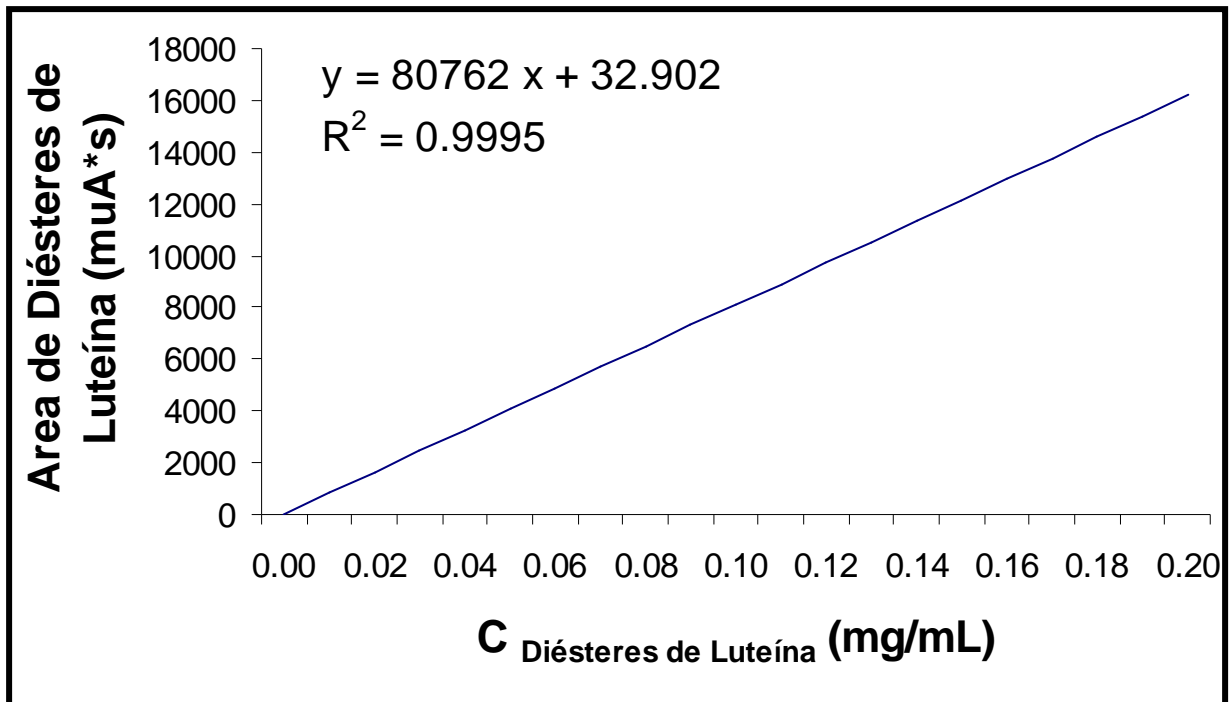


FIGURA 28. CURVA PATRÓN DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA (GONZÁLEZ, 2006).

5.4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño que se usó fue un experimento bifactorial 2 x 3 en un diseño completamente al azar con dos repeticiones. Se estudiaron los efectos de la concentración y el flujo sobre la conversión. Los niveles de los dos factores fueron:

- ❖ Flujo: Dos niveles F_1 y F_2
- ❖ Concentración: Tres niveles C_1 , C_2 y C_3

El número total de todas las posibles combinaciones entre los tres niveles del factor concentración y de los dos niveles del factor flujo fue de $2 \times 3 = 6$ tratamientos, los cuales se indican en la Tabla 10.

TABLA 10. DISTRIBUCIÓN EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTOS.

No.	Tratamiento	Flujo (mL/h)	C _{diésteres de luteína inicial} (mg/mL)
1	F ₁ C ₁	370	0.05
2	F ₁ C ₂	370	0.1
3	F ₁ C ₃	370	0.2
4	F ₂ C ₁	740	0.05
5	F ₂ C ₂	740	0.1
6	F ₂ C ₃	740	0.2

A cada conjunto de condiciones de reacción (tratamiento) se le asignó al azar dos soluciones de sustrato (repeticiones) del mismo tamaño (200 mL).

VARIABLES FIJADAS CONSTANTES:

- ❖ Temperatura de reacción 60 °C
- ❖ Disolvente orgánico isooctano.
- ❖ Tipo de enzima lipasa de *Rhizomucor miehei*.
- ❖ a_w inicial de la enzima 0.113
- ❖ Concentración de enzima 5 mg/mL.

MODELO ESTADÍSTICO DE LOS EFECTOS FIJOS:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 2$$

$$j = 3$$

$$k = 2 \text{ repeticiones.}$$

y_{ij} = Variable respuesta, la conversión de diésteres de luteína bajo las mismas condiciones de cada tratamiento y repetición.

μ = Efecto promedio global.

τ_i = Efecto del nivel i-esimo del factor flujo a través del reactor.

β_j = Efecto del nivel j-esimo del factor concentración inicial de diésteres de luteína.

$\tau_i\beta_j$ = Efecto de interacción entre el factor flujo y la concentración inicial de diésteres de luteína.

ε_{ijk} = Error experimental sujeto al azar.

N = 12 unidades experimentales.

Los cuadrados medios esperados seguidos directamente de F_0 calculada para los dos efectos principales y su interacción, se observan en la Tabla 11.

TABLA 11. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO DE DOS FACTORES CON EFECTOS FIJOS ($\alpha=0.05$).

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fo calculada	Fo tabla distribución F
Flujo A	1	0.0803	0.0803	24.33	5.99
Concentración inicial diésteres B	2	0.2456	0.1228	37.33	5.14
AB	2	0.0096	0.0048	1.45	5.14
Error	6	0.0198	0.0033		
Total	11	0.3553			

Al comparar los valores de F_0 , se observa que los efectos principales de flujo y concentración inicial afectan significativamente a la conversión de la reacción. Al realizar la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) la conversión obtenida con el tratamiento No 1 (Tabla 10), es significativamente mayor que los tratamientos 3, 5 y 6.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 HIDRÓLISIS DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA EN ISOCTANO A DIFERENTES VALORES DE FLUJO Y CONCENTRACIÓN INICIAL UTILIZANDO COMO CATALIZADOR DE LA REACCIÓN, A LA LIPASA DE *RHIZOMUCOR MIEHEI*

Basándose en los antecedentes investigados en reactores por lotes (González, 2006), la hidrólisis enzimática se trabajó de la siguiente forma:

- ❖ La enzima que realiza la hidrólisis de una mejor forma es la lipasa del hongo *Rhizomucor miehei*.
- ❖ La actividad de agua inicial de la enzima es de $a_w = 0.113$.
- ❖ El medio de reacción es el isooctano (2,2,4 trimetilpentano) que es hidrofóbico.
- ❖ La temperatura de reacción es de 60 °C.
- ❖ El reactor se trabajó con recirculación.

Variando la concentración inicial de diésteres de luteína y la velocidad de recirculación a través del lecho empacado para ver el efecto sobre la conversión de la hidrólisis de diésteres, se obtuvieron los resultados que se observan a continuación.

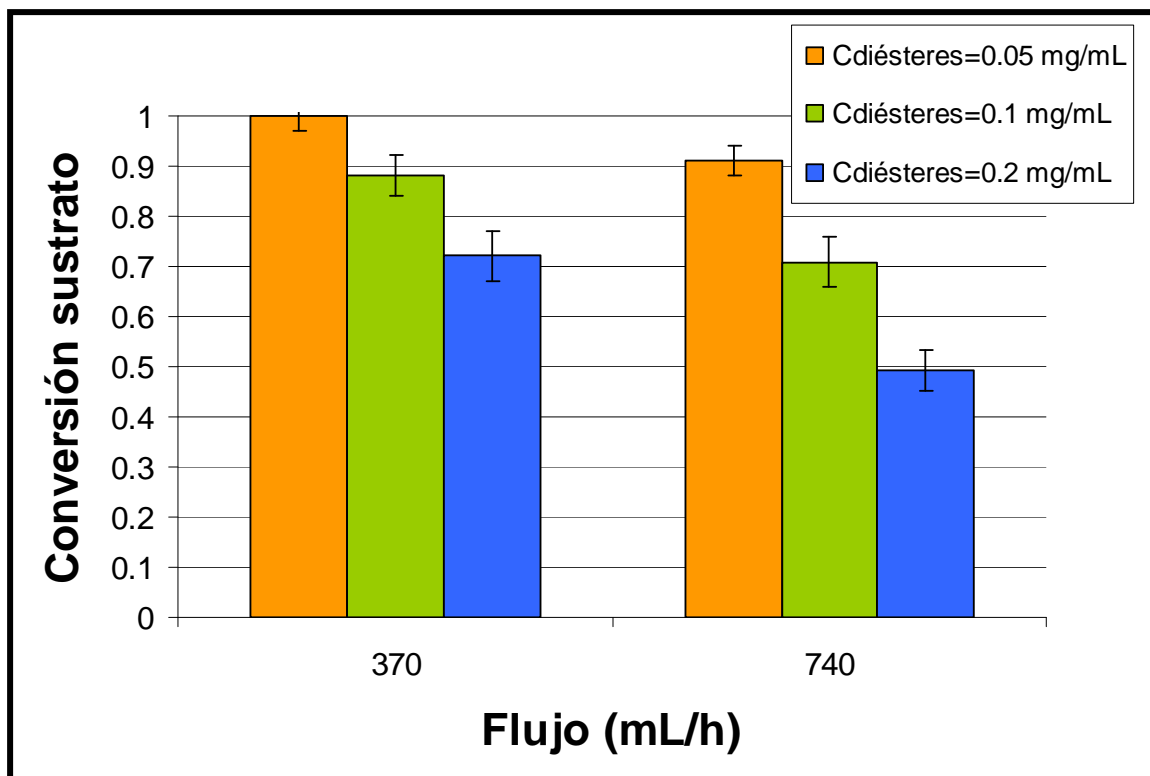


FIGURA 29. CONVERSIÓN DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA EN ISOOCTANO, PARA VARIOS VALORES DE CONCENTRACIÓN INICIAL DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA Y EN FUNCIÓN DEL FLUJO A TRAVÉS DEL REACTOR. $T = 60^{\circ}\text{C}$ Y $t = 18$ h.

Para la obtención de los datos de esta figura, se tomó en cuenta que todos los experimentos se trabajaron a la misma temperatura, en un tiempo de reacción de 18 horas y con la misma concentración de enzima 5 mg/mL en el reactor de lecho empacado. De acuerdo con lo esperado, al comparar los datos experimentales con diferentes concentraciones iniciales para un mismo flujo, se puede ver que la conversión más alta se obtiene con la menor concentración inicial de diéster de luteína.

Como se puede observar en la Figura 29, los puntos experimentales a cierta concentración inicial de diésteres, muestran que la conversión de diésteres de luteína disminuye conforme se duplica la velocidad de flujo a través del reactor. Esto no concuerda con la teoría que dice que un flujo mayor debiera de producir una mayor conversión (Fogler, 1999), ya que el flujo mayor elimina los problemas difusionales de

la capa límite alrededor del biocatalizador facilitando el transporte de sustratos y productos en el biocatalizador. Estudios realizados sobre reactores con lechos empacados señalan que para partículas catalíticas pequeñas y de formas poco esféricas como el biocatalizador Lipozyme, tienden a formar corrientes preferenciales en el lecho empacado principalmente a la par de las paredes del reactor Figura 30 (Nguyen y Balakotaiah, 1994; White y Tien, 1987; Winterberg y Tsotsas, 2000).

Adicionalmente, a pesar de que el sustrato a 740 mL/h pasó el doble de veces por el lecho empacado, el sustrato pasó más rápido por los caminos preferenciales por lo que hubo menos contacto con el resto del lecho empacado de enzimas; pero con el flujo de sustrato a 370 mL/h pasó menos veces por el lecho empacado pero a menor velocidad, lo que posiblemente provocó que hubiera más contacto con el resto del lecho empacado de enzimas.

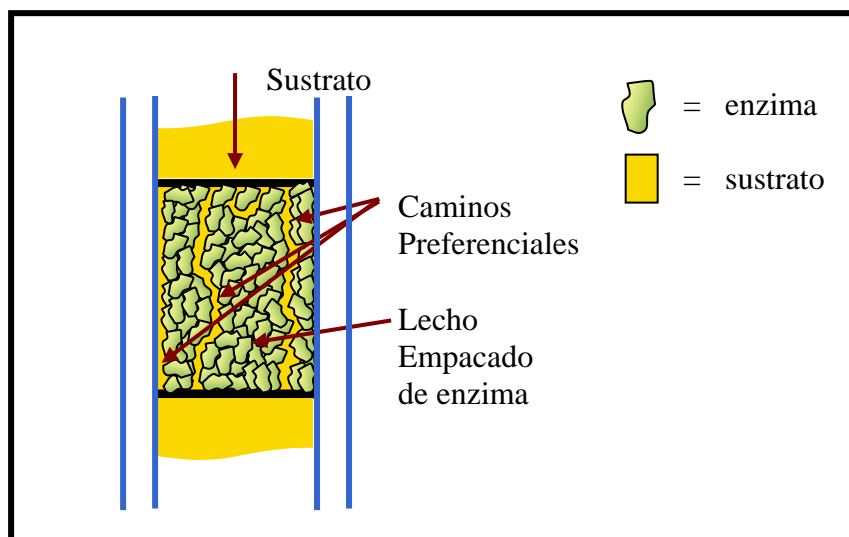


FIGURA 30. ESQUEMA DEL LECHO EMPACADO DE LA ENZIMA LIPOZYME.

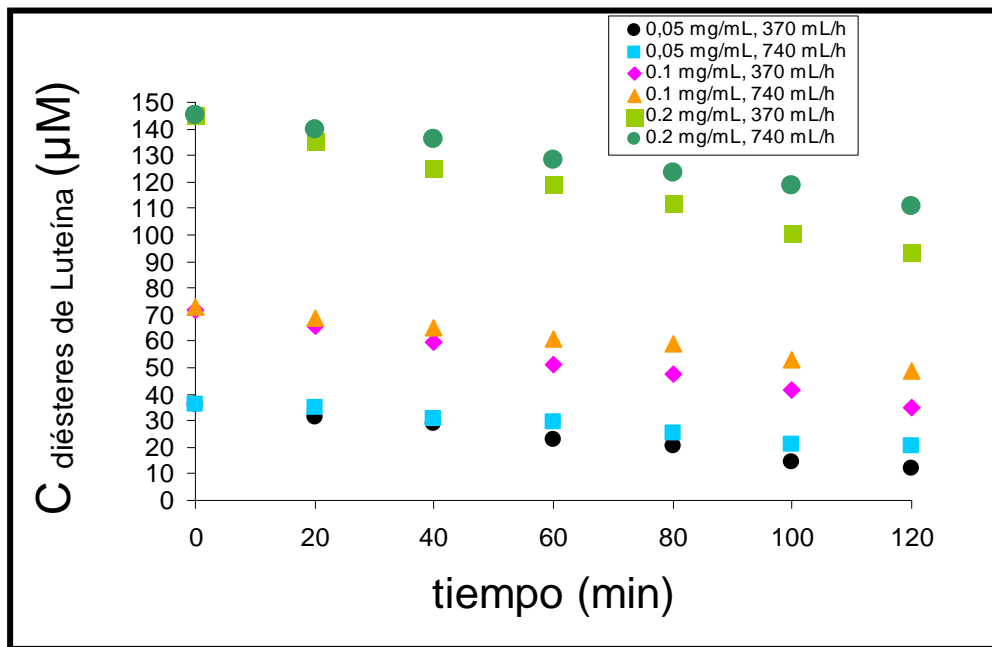


FIGURA 31. HIDRÓLISIS DE LOS DIÉSTERES DE LUTEÍNA PARA VARIOS VALORES DE CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO INICIAL Y FLUJO (2 h DE REACCIÓN).

Con los resultados de la Figura 31 y por medio de un ajuste de mínimos cuadrados de los datos obtenidos a tiempos cortos, se pudieron obtener las ecuaciones que se observan en la Tabla 12, cuyo valor absoluto de la pendiente equivale a la velocidad inicial de reacción.

TABLA 12. ECUACIONES OBTENIDAS POR MINIMOS CUADRADOS DE LOS DATOS A TIEMPOS CORTOS (FIGURA 31) PARA CONOCER LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCIÓN.

Concentración y Flujo	Ecuación
0.05 mg/mL - 370 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 12.16 t (\text{h}) + 35.88 \quad (r=0.996)$
0.05 mg/mL - 740 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 7.03 t (\text{h}) + 35.81 \quad (r=0.991)$
0.10 mg/mL - 370 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 18.4 t (\text{h}) + 72.61 \quad (r=0.998)$
0.10 mg/mL - 740 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 12.01 t (\text{h}) + 72.83 \quad (r=0.996)$
0.20 mg/mL - 370 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 25.72 t (\text{h}) + 145.47 \quad (r=0.998)$
0.20 mg/mL - 740 mL/h	$C (\mu\text{M}) = - 17.18 t (\text{h}) + 145.89 \quad (r=0.997)$

Los valores de velocidad inicial en función de la concentración de diéster inicial se presentan en la Figura 32. Se observa que la velocidad de reacción inicial disminuye al aumentar el flujo a través del reactor para una concentración de sustrato inicial.

Esta velocidad de reacción inicial aumenta a mayor concentración inicial de sustrato, lo cual coincide con el clásico modelo de la cinética de reacciones catalizadas enzimáticamente, que dice que la velocidad inicial de reacción es proporcional a la concentración inicial de sustrato.

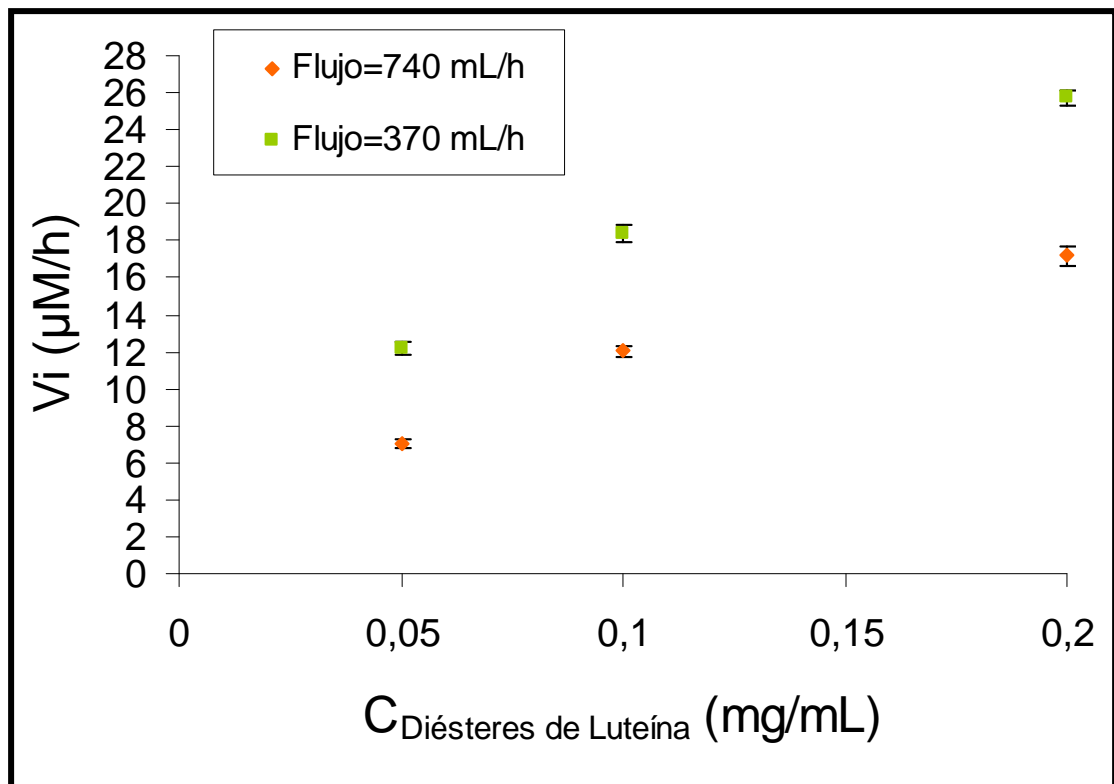


FIGURA 32. PERFIL DE VELOCIDAD DE REACCIÓN INICIAL A DISTINTAS CONCENTRACIONES INICIALES DE DIÉSTER, PARA DOS FLUJOS A TRAVÉS DEL REACTOR DE LECHO EMPACADO.

6.2 PERFIL DE CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS

Basándose en el hecho de que la mayor conversión ocurrió para la menor concentración inicial de diéster (0.05 mg/mL) y a la menor velocidad de recirculación (370 mL/h) se llevó a cabo esta reacción hasta un tiempo de 72 horas, para obtener el perfil final de concentraciones del diéster, monoéster y luteína (ver Figuras 33 y 34).

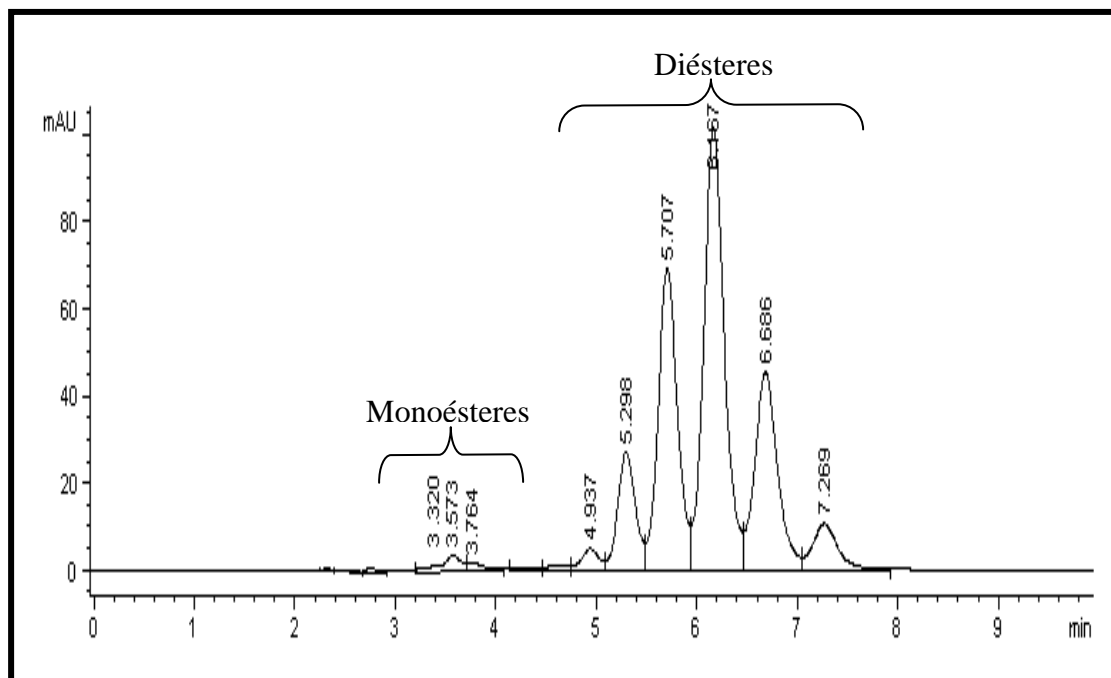


FIGURA 33. CROMATOGRAMA DEL SUSTRATO EN ISOCTANO SIN LIPASA, $t = 0$ h

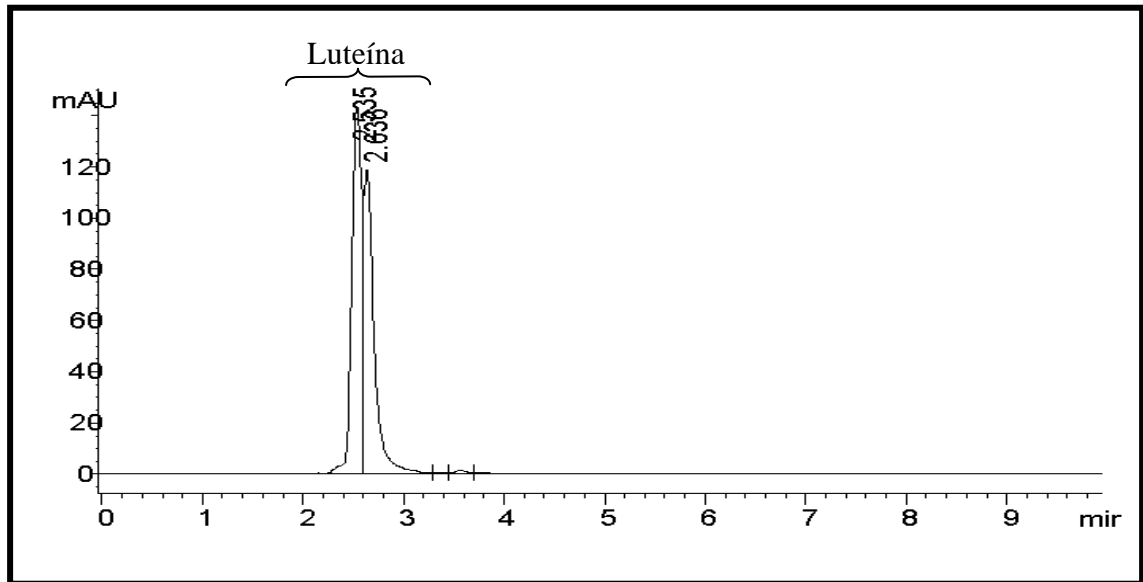


FIGURA 34. CROMATOGRAMA DEL SISTEMA DE REACCIÓN EN ISOCTANO CON LIPASA. A LAS 72 h DE REACCIÓN, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_s = 0.05\text{ mg/mL}$ Y $F = 370\text{ mL/h}$

Los resultados del perfil de concentración de sustratos y productos se presentan en la Figura 35.

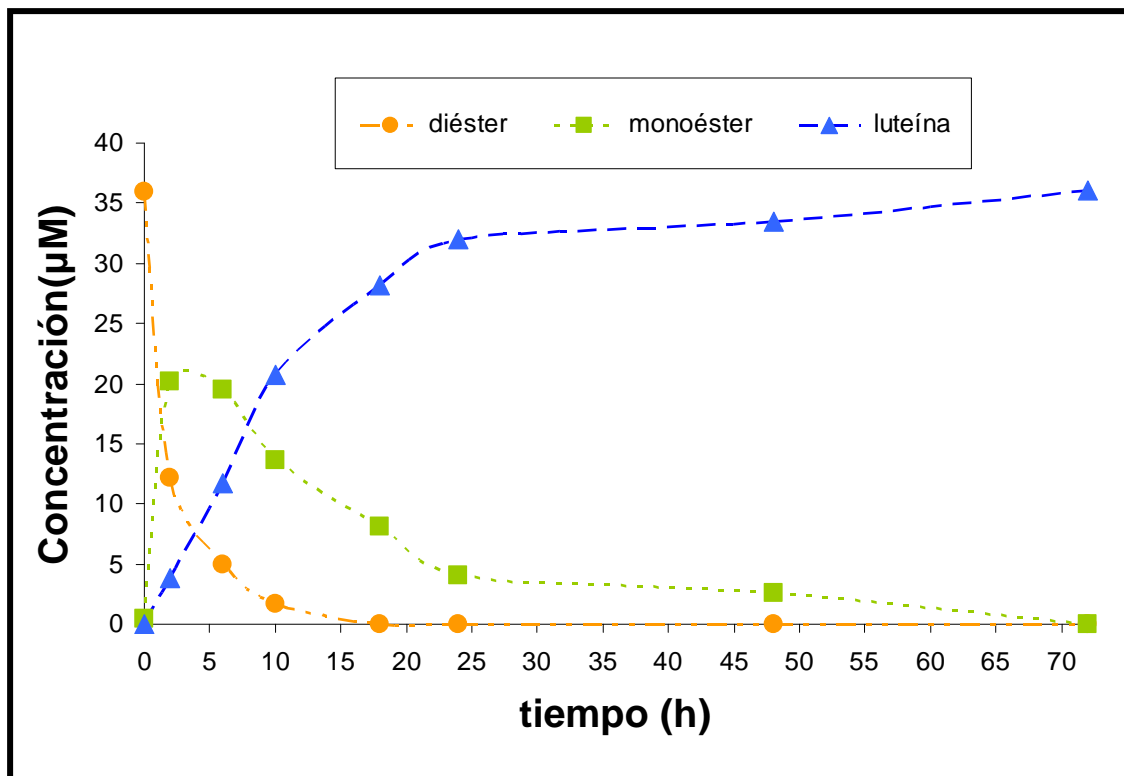


FIGURA 35. CAMBIOS EN CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA. $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_s = 0.05\text{ mg/mL}$ Y $F = 370\text{ mL/h}$

Claramente a las dieciocho horas todo el diéster de luteína ha reaccionado para formar monoéster y luteína. Durante las primeras seis horas de reacción, el monoéster se forma más rápido de lo que se forma la luteína. Esto es seguido de una fase con clara declinación del monoéster como del diéster original. A tiempos largos se obtiene una conversión de prácticamente 100% al producto objetivo, o sea la luteína libre.

En los antecedentes de esta investigación se ha hecho mención acerca de que las lipasas son capaces de catalizar la reacción inversa de la hidrólisis (la esterificación). Al inicio, la única reacción que puede llevarse a cabo enzimáticamente es la hidrólisis de los diésteres de luteína y no existen otras especies que puedan llevar a cabo las reacciones reversibles. Pero conforme la reacción procede, el agua se consume y una alta concentración de ácidos grasos, monoésteres y luteína se tienen en el medio de reacción; al darse estos elementos se demuestra que la reacción de

hidrólisis de diésteres de luteína a luteína es una reacción reversible (Tyczkowski y Hamilton, 1991), por lo que se debe alcanzar un equilibrio termodinámico.

De acuerdo al principio de Le Chatelier, sí en una reacción con equilibrio uno de los productos es eliminado del sistema, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación de más producto que se ha eliminado. Por ello es que aquí posiblemente se llegó al 100% de conversión porque se redujo la concentración de uno de los productos de la reacción, como lo fue la luteína. La forma en que se redujo la concentración de luteína del sistema de reacción es que a medida que avanza la reacción se adsorbe la luteína en el biocatalizador (Figura 36) sin embargo, la reacción de hidrólisis continúa (Figura 38) por lo que no está ocurriendo inhibición (Mora, 2007).

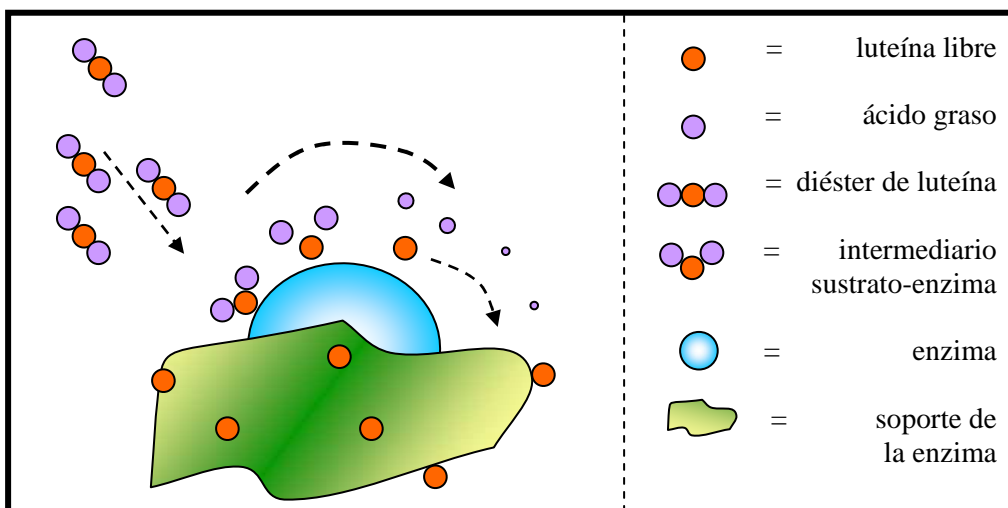


FIGURA 36. ABSORCIÓN DE CAROTENOIDES SOBRE EL CATALIZADOR.

El llegar a conversiones tan altas como del cien por ciento, aunque este proceso implique más tiempo, puede ser beneficioso ya que se elimina el problema de separación en los pasos de purificación posteriores al reactor, en este caso, la separación del diéster de luteína y la luteína. A pesar de lo anterior, de todas maneras siempre tiene que ser desorbida la luteína del biocatalizador, por medio de lavados con acetona.

6.3 PRODUCTIVIDAD DEL BIORREACTOR EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN

La productividad del reactor se define como los micromoles de luteína producidos por litro de mezcla reaccionante por gramo de enzima por tiempo de reacción en horas. Y el rendimiento de luteína se definió como micromoles de luteína producidos por micromoles de diéster de luteína alimentados, simbolizado como $Y_{l/dl}$ en la Figura 37.

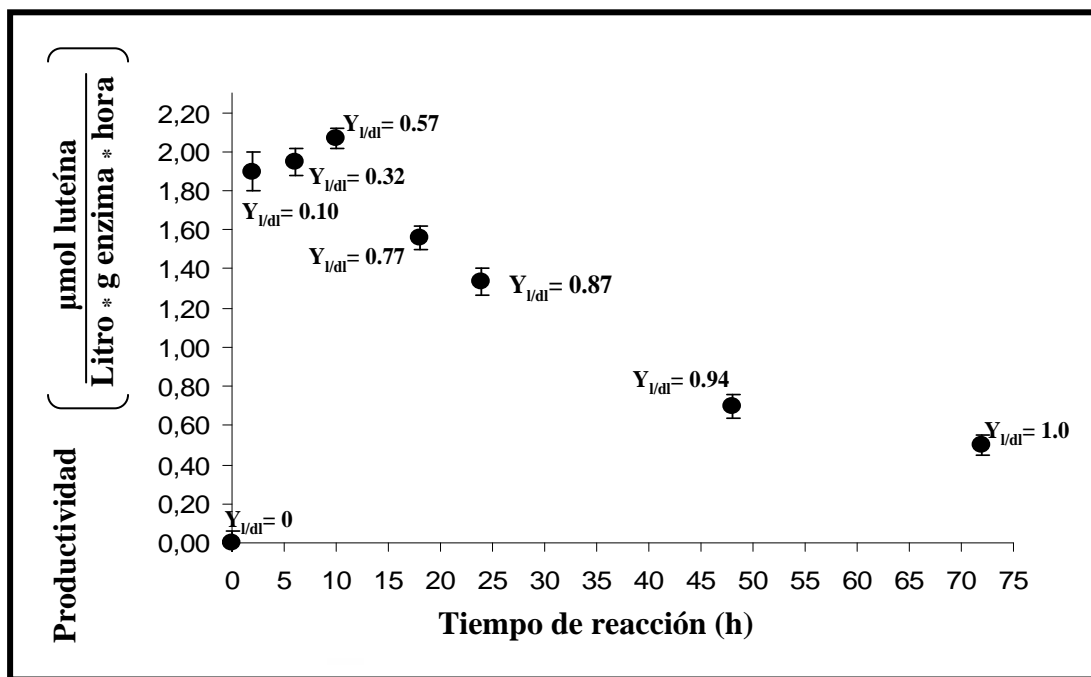


FIGURA 37. PRODUCTIVIDAD DEL REACTOR DE LECHO EMPACADO PARA HIDRÓLISIS DE LOS DIÉSTERES DE LUTEÍNA EN ISOCTANO CATALIZADA POR LA LIPASA DE *RHIZOMUCOR MIEHEI*, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_s = 0.05\text{ mg/mL}$ Y $F = 370\text{ mL/h}$ PARA CADA PUNTO EXPERIMENTAL OBTENIDO SE ESTABLECIÓ EL VALOR DEL RENDIMIENTO DE LUTEÍNA ($Y_{l/dl}$)

En esta figura se puede ver que a partir de un tiempo de reacción de 24 horas donde el rendimiento de luteína es de 0.87, la productividad del reactor va disminuyendo. Desde un punto de vista económico parece ser que no es recomendable el buscar rendimientos más altos a éste de 24 horas, ya que el rendimiento se incrementa muy poco para tiempos largos de reacción y a costa de una baja notable en la productividad.

6.4 CICLOS DE ACTIVIDAD DEL BIOCATALIZADOR EN EL REACTOR

Se llevó a cabo un experimento con varios ciclos de reuso para ver si se mantenía la misma actividad del biocatalizador en el reactor de lecho empacado. Los resultados se presentan en la Figura 38. Para ello, al final de cada paso se renovó la cantidad de diéster disponible al valor inicial de 0.05 mg/mL y se reajustó nuevamente el a_w inicial del biocatalizador (cada múltiplo de 18 horas).

Se puede observar que la actividad enzimática se mantuvo con una disminución paulatina en cinco ciclos de reacción.

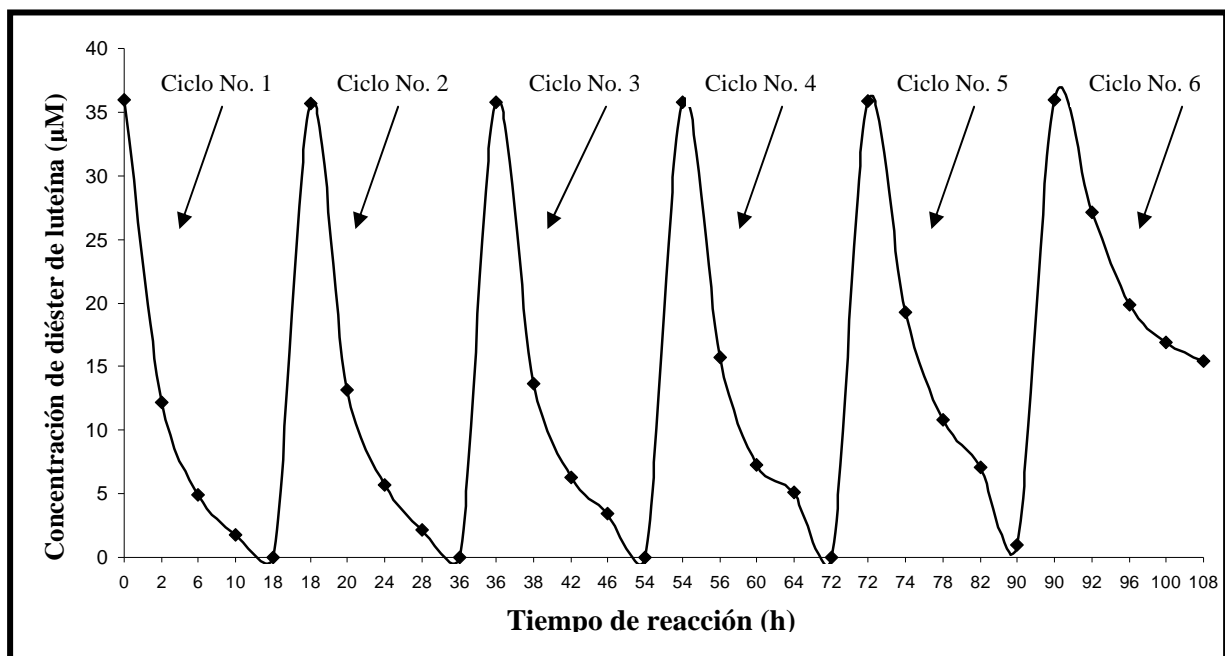


FIGURA 38. ACTIVIDAD DE LA LIPASA EN 6 CICLOS DE REACCIÓN. CADA CICLO DE 18 h, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_s = 0.05\text{ mg/mL}$ y $F = 370\text{ mL/h}$

6.5 COMPARACIÓN DE LA CONVERSIÓN Y LA VELOCIDAD INICIAL DE REACCIÓN ENTRE EL REACTOR DE LECHO EMPACADO CON RECIRCULACIÓN TOTAL Y EL REACTOR DE TANQUE AGITADO POR LOTES

La comparación entre los reactores por lotes, lecho empacado con recirculación total y tanque agitado (González, 2006) se realizó bajo las mismas condiciones de reacción (temperatura, concentración inicial de sustrato y concentración de enzima). En 24 horas, el diéster de luteína reaccionó en un 100% en el reactor de lecho empacado (Figura 39), mientras que en el reactor por lotes, aproximadamente un 96% (González, 2006) para el mismo período de tiempo.

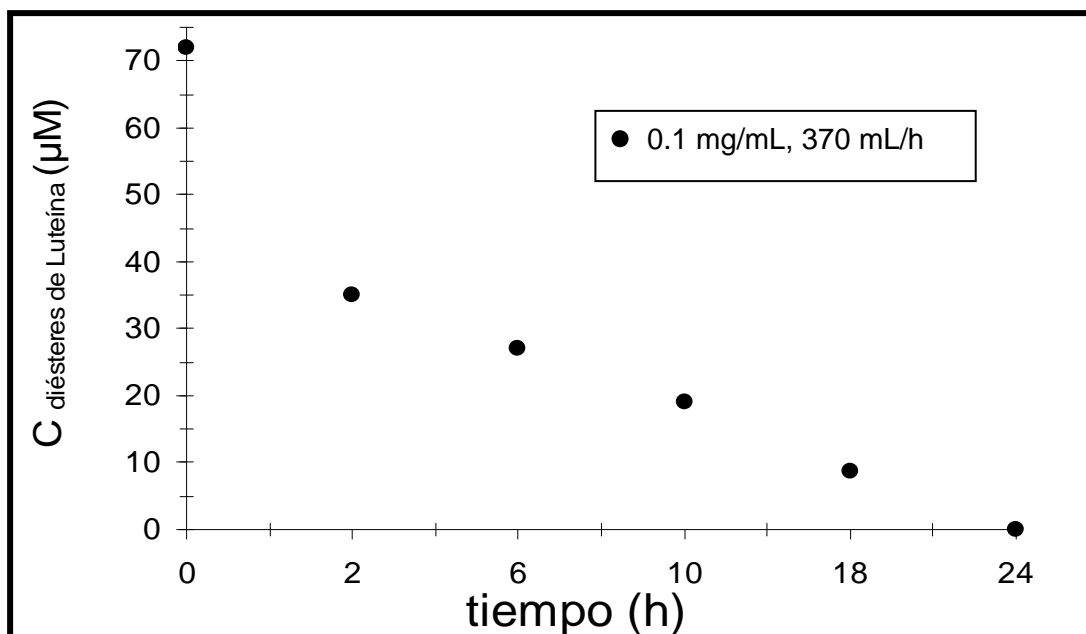


FIGURA 39. HIDRÓLISIS DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA EN ISOOCTANO EN EL REACTOR DE LECHO EMPACADO. $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C_s = 0.1\text{ mg/mL}$ Y $C_{enz.} = 5\text{ mg/mL}$

Al comparar las velocidades de reacción iniciales entre ambos reactores bajo las mismas condiciones de reacción, el reactor de lecho empacado presentó una velocidad inicial de $18.4\text{ }\mu\text{M/h}$ (Figura 32), mientras que el reactor por lotes mostró aproximadamente una velocidad inicial de $15.4\text{ }\mu\text{M/h}$ (González, 2006). Esta diferencia en las velocidades iniciales pudo haber ocurrido debido a una mejora en la transferencia de masa y eficiencia de contacto por el tipo de mezclado del reactor de lecho empacado y el reactor por lotes.

7. CONCLUSIONES

- ❖ La conversión de diésteres de luteína a luteína y las velocidades iniciales de reacción disminuyen al aumentar la velocidad de recirculación en el reactor, debido a que se reduce el tiempo de contacto entre enzima y sustrato.
- ❖ De las reacciones consecutivas de diéster a monoéster y de monoéster a luteína libre, en las primeras horas de reacción el intermediario se acumula, indicando que la primera reacción es rápida y la segunda reacción es lenta.
- ❖ La reacción de hidrólisis de diésteres de luteína se puede llevar a cabo en un reactor de lecho empacado con recirculación total utilizando como medio de reacción isooctano y temperatura de reacción 60 °C. Llegando a obtener una conversión del 100% de diésteres de luteína a monoéster y luteína libre, cuando la concentración inicial de sustrato es de 0.05 mg/mL y la velocidad de recirculación es de 370 mL/h en 18 h de reacción.
- ❖ El reactor de lecho empacado con recirculación da un rendimiento de luteína producida respecto a los diésteres de luteína alimentados de 0.87 en 24 horas de reacción. No es recomendable buscar rendimientos más altos, ya que el rendimiento se incrementa muy poco para tiempos largos de reacción, mientras que la productividad baja.
- ❖ La actividad enzimática presentó una ligera disminución durante los primeros 5 ciclos de reacción.
- ❖ Para las mismas condiciones de reacción en isooctano, la conversión de los diésteres de luteína en el reactor de lecho empacado con recirculación fue del 100 % en 24 horas, comparado con 96% para el reactor por lotes (González, 2006).

- ❖ La velocidad inicial de reacción para la hidrólisis de diésteres de luteína a luteína fue mayor en 1.20 veces en el reactor de lecho empacado con recirculación total que en el reactor por lotes (González, 2006).

8. RECOMENDACIONES

Se proponen algunas ideas que pueden ser sujetas a estudio en el futuro.

1. Realizar la reacción de hidrólisis con el reactor a diferentes diámetros y alturas de lecho empacado alimentando la mezcla de sustrato con flujo ascendente.
2. Inmovilizar la enzima lipasa de *Rhizomucor miehei* a diferentes soportes, determinando porcentajes de proteína inmovilizada. Optimizar condiciones de inmovilización, mediante diseño de experimentos.
3. Evaluar la estabilidad operacional del nuevo biocatalizador inmovilizado en el reactor de lecho empacado y comprobar los niveles de absorción del producto de la reacción, al soporte de inmovilización.
4. Definir y estudiar la reacción en condiciones de flujo continuo.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ ALAM, A., Creger, C. y Couch, J. (1968). Petals of Aztec Marigold, *Tagetes erecta*, as a Source of Pigment for Aviar Species. **Journal Food Science**; 33: 635-636.
- ❖ ALVES, A. y Shao, A. (2004). The science behind lutein. **Toxicology Letters**; 150: 57-83.
- ❖ ARROYO, M., Sánchez, J. y Sinisterra, J. (1996). A new method to determine the a_w range in which immobilized lipases display optimum activity in organic media. **Journal Biotechnology Technology**; 10(4): 263-266.
- ❖ BALCAO, V., Paiva, A. y Malcata, X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**; 18: 392-416.
- ❖ BIOQUIMEX. (2002). "Lutein". Xantopina Plus. With an Eye on Health. Artículo publicado por **Bioquimex Nutrition**. México D.F.
- ❖ BOUSQUET-Dubouch, M., Graber, M., Sousa, N., Lamare, S. y Legoy, M. (2001). Alcoholysis catalysed by *Candida Antarctica* lipases B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. **Biochimica et Biophysica Acta**; 1550(1): 90-99.
- ❖ BRADY, L., Brzozowski A., Derewenda, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg J., Christiansen, L., Høge Jensen, B., Nørskov, L., Thin, L. y Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**; 343: 767-770.
- ❖ BRITTON, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**; 9: 1551-1558.
- ❖ CASTELLO, Y. (1988). Colorantes naturales de México. Industrias Resistol SA. 1ª ed. P.p 109.
- ❖ CASTENMILLER, J. y West, C. (1998). Bioavailability and Bioconversion of carotenoids. **Journal Annual Review Nutrition**; 18: 19-38.
- ❖ CHEN, J., Wu, A., Pathak, M., Rius, F., Mihm, C., Goukassian, D. y Gonzalez, S. (2002). Dietary lutein and zeaxanthin partially prevent UVB-induced skin carcinogenesis in the SKh-1 hairless mouse model (Abstract). **In: Society for Investigative Dermatology. Los Angeles, CA.**
- ❖ CHEW, B., Wong, M. y Wong, T. (1996). Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Research**; 16: 3689-3694.
- ❖ COONEY, C. (1983). Bioreactors: Design and Operation. **Science**; 219: 728-733.
- ❖ CORTÉS, M. (2006). Estudio Químico de *Tagetes erecta* como recurso natural importante por su alto contenido de Carotenoides. **Tesis Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química. UNAM.**
- ❖ DACHTLER, M., Kohler, K. y Albert, K. (1998). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C30 bonded phase. **Journal of Chromatography B**; 720: 211-216.

- ❖ DELGADO, F. y Paredes, O. (1997). Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles. **Journal Agriculture Food Chemistry**; 45: 1097-1102.
- ❖ DWYER, J., Navab, M., Dwyer, K., Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T., Merx, C. y Fogelman, A. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis. **The Los Angeles Atherosclerosis Study Circulation**; 103: 2922–2927.
- ❖ EYE Disease Case–Control Study Group. (1993). Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. **Archives of Ophthalmology**; 111: 104-109.
- ❖ FOGLER, H. S. (1999). Elements of Chemical Reaction Engineering. Prentice Hall PTR. United States of America. Pp. 705.
- ❖ GAU, W., Ploscke, H. y Wünsche, Ch. (1983). Mass spectrometric identification of xanthophylls fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution. **Journal Chromatography**; 262: 277-284.
- ❖ GONZÁLEZ, J. (2006). Evaluación de disolventes en la reacción enzimática de hidrólisis de ésteres de luteína. **Tesis Maestría Ingeniería, Facultad Química, UNAM.**
- ❖ GRANADO, F., Olmedilla, B., Gil, E. y Blanco, I. (1998). Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects. **British Journal of Nutrition**; 80: 445-449.
- ❖ HADDEN, W., Watkins, R., Levy, L., Regalado, E., Rivadeneria, D., Van Breemen, R. y Schwartz, S. (1999). Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Glower Extract Used as Nutritional Supplement. **Journal Agriculture Food Chemistry**; 47: 4189-4194.
- ❖ HART, D. y Scott, K. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenes in vegetables and fruits in the UK. **Food Chemistry**; 54: 101-111.
- ❖ HOLICK, C., Michaud, D., Stolzenberg, R., Mayne, T., Pietinen, P., Taylor, R., Virtamo, J. y Albanes, D. (2002). Dietary carotenoids, serum beta carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. **American Journal Epidemiology**; 156: 536–547.
- ❖ HOWARD, A., Williams, N., Palmer, C., Cambcu, J., Evans, A., Foote, J., Marques, P., McCrum, E. y Ruidavets, J. (1996). Do hydroxy-carotenoids prevent coronary Heart disease? A comparison between Balfatst and Toulouse. **International Journal Vitamin Nutrition Research**; 66(2): 113-118.
- ❖ JAEGER, K. y Reetz, M. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**; 16: 396-403.
- ❖ KATCHALSKI, E. (1993). Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**; 11: 471-478.
- ❖ KAZLAUSKAS, R. y Bornscheuer, U. (1998). Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW New York: VCH editors. **Biotechnology**; 8: 37-192.
- ❖ KLIBANOV, A. (1986). Enzymes that work in organic solvents. **Chemistry Technology**; 16: 354-359.
- ❖ KLIBANOV, A. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. **Accounts of Chemical Research**; 23: 114-120.

- ❖ **KLIBANOV, A.** (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**; 15: 97–101.
- ❖ **KRINSKY, N., Landrum J. y Bone, R.** (2003). Biological mechanism of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Annual Review of Nutrition**; 23: 171–201.
- ❖ **KRITCHEVSKI, S.** (1999). β -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease. **Journal of Nutrition**; 129:5-8.
- ❖ **LAANE, C., Boeren, S., Vos, K. y Veeger, C.** (1987). Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. **Biotechnology Bioengineering**; 30: 81-87.
- ❖ **LANDRUM, J. y Bone, R.** (2001). Lutein; zeaxanthin; and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**; 385: 28-40.
- ❖ **LE Marchand, L., Harkin, J., Bach, F., Kolonel, L., Wilkens, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P., Beecher, G., Laudon, F. y Baque, P.** (1995). An ecological study of diet and lung cancer in the South Pacific. **International Journal Cancer**; 63: 18–23.
- ❖ **LE Marchand, L., Hankin, J., Kolonel, L., Beecher, G., Wilkens, L. y Zhao, L.** (1993). Intake of specific carotenoides and lung cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**; 2: 183–187.
- ❖ **MARANGONI, A. y Rousseau, D.** (1995). Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science and Technology**; 6: 329-335.
- ❖ **MARES-Perlman, J., Millen, A., Ficek, T. y Hankinson, S.** (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease overview. **Journal of Nutrition**; 132: 518S–524S.
- ❖ **MARTIN, K., Eailla, M. y Smith, J.** (1996). β Carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. **Journal of Nutrition**; 126: 2098-2106.
- ❖ **MARTINELLE, M., Holmquist, M. y Hult, K.** (1995). On the interfacial activation of *Candida Antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**; 1258: 272-276.
- ❖ **MERCADANTE, A.** (1998). Functions of Carotenoids. **Journal Agriculture Food Chemistry**; 46: 4102-4106.
- ❖ **MICHAUD, D., Feskanich, D., Rimm, E., Colditz, G., Speizer, F., Willett, W. y Giovannucci, E.** (2000). Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. **American Journal of Clinical Nutrition**; 72: 900–997.
- ❖ **MILED, F., Beisson, J., De Caro, A., De Caro, V. y Arondel, R.** (2001). Interfacial catalysis by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**; 11: 65-171.
- ❖ **MORA P., J. M.** (2007). Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua. **Tesis Doctorado Ingeniería Química, Facultad de Química, UNAM.**
- ❖ **MORRISON, R. y Boyd R.** (1976). Química Orgánica. Edición Revisada. Fondo Educativo Interamericano. E.U.A. Pp. 206.
- ❖ **NAVARRETE, J., Rangel, C., Jiménez, H., Botello, E. y Rico, R.** (2005). Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. **Food Research International**; 38: 159-165.
- ❖ **NGUYEN, D. y Balakotaiah, V.** (1994). Flow maldistributions and hot spots in down flow packed bed reactors. **Chemical Engineering Science**; 49: 5489-5505.
- ❖ **NOVOZYMES A/S,** Hoja del producto, Lipozyme RM 1M, Page 1:2 B 606d-GB.

- ❖ **OLIVER**, J. y Palou, A. (2000). Chromatographic Determination of Carotenoids in Foods. **Journal of Chromatography A**; 881: 543-55.
- ❖ **PENG**, Y., Lin, Y., Moon, T., Roe, D. y Ritenbaug, C. (1995). Concentrations and plasma-tissue-diet relationship of carotenoids, retinoids, and tocopherols in humans. **Nutritional Cancer**; 23: 233-246.
- ❖ **PHILIP**, T. y Berry, J. (1976). A Process for the Purification of Lutein-Fatty Acid Esters from Marigold Petals. **Journal Food Science**; 41: 163-164.
- ❖ **PITCHER**, W. (1983). Operation of Immobilized Enzyme Reactors. **Catalysis Review**; 10: 1-23.
- ❖ **REYES**, H. y Hill, C. (1994). Kinetic modelling of interesterification reactions catalysed by immobilized lipase. **Biotechnology Bioengineering**; 43: 171-182.
- ❖ **RIVAS**, J. (1989). Reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acids esters from marigold flower petal powder. **Journal of Chromatography B**; 464: 442-447.
- ❖ **SCHMID**, R. y Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angew Chemical International Edition**; 37: 1608-1633.
- ❖ **SEDDON**, J., Ajani, U., Sperduto, R., Hiller, R., Blair, N., Burton, T., Farber, M., Gragoudas, E., Haller, J., Miller, D., Jannuzzi, L. y Willet, W. (1994). Dietary carotenoids, vitamin A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. A multicenter study. **Journal of the American Medical Association**; 272: 1413-1420.
- ❖ **SHARMA**, R., Chisti, Y. y Banerjee, U. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**; 19: 627-662.
- ❖ **STAHL**, W. y Heinrich, U. (2000). Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light induced erythema in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**; 71: 795-798.
- ❖ **STAHL**, W. y Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. **Skin Pharmacol. Applied Skin Physiology**; 15: 291-296.
- ❖ **SOMMERBURG**, O., Keunen, J., Bird, A. y Van Kuijk, F. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **Journal Ophthalmology**; 82: 907-910.
- ❖ **SU**, Q., Rowley, K. y Balazs, N. (2002). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. **Journal Chromatography B**; 781: 393-418.
- ❖ **TAFOYA**, A. y García Hernández, F. (1993). Colorantes en Biotecnología Alimentaria. López-Munguía, A., Quintero, R. y García Garibay, M., eds. Limusa. México.
- ❖ **TYCZKOWSKI**, J. y Hamilton, P. (1991). Preparation of purified lutein and its diesters from extracts of marigold (*Tagetes erecta*). **Poultry Science**; 70: 651-654.
- ❖ **UPPENBERG**, J., Hansen, M., Patkar, S. y Jones, T. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*. **Structure**; 2: 293-308.
- ❖ **VALERIE D.**, Didier, C. y Alain, M. (1999). Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme and Microbial Technology**; 25: 194-200.
- ❖ **VERGER**, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**; 15: 32-38.
- ❖ **VULFSON**, E., Halling, P. y Holland, H. (2001). Enzymes in Nonaqueous Solvents. Humana Press; (1)1-12, (2):13-14, (49): 627-649.

- ❖ VULFSON, E. (1994). Industrial applications of lipases, in Lipases-their structure, Biochemistry and Application. (Woolley, P. and Petersen, S.B.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, Pp. 271-288.
- ❖ WHITE, S. y Tien, C. (1987). Analysis of flow channelling near the wall in packed beds. **Springer Wärme- und Stoffübertragung**; 21: 291-296.
- ❖ WINGERATH, T., Sies, H. y Stahl, W. (1998). Xanthophyll esters in human skin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**; 355: 271-274.
- ❖ WINTERBERG, M. y Tsotsas, E. (2000). Impact of tube to particle diameter ratio on pressure drop in packed beds. **American Institute of Chemical Engineers**; 46: 1084-1088.
- ❖ YEUM, K. (1995). Measurement of Carotenoids, Retinoids and Tocopherols in Human Lenses. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**; 36: 2756-2761.
- ❖ ZAKS, A. y Klibanov, A. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**; 263: 8017-8021.
- ❖ ZANG, L., Sommerburg, O. y Van Kuijk, F. (1997). Absorbance Changes of Carotenoids in Different Solvents. **Free Radical Biology Medicine**; 23, 7: 1086-1089.
- ❖ ZHANG, L., Cooney, R. y Bertram, J. (1991). Carotenoids enhance gap functional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis**; 12: 2109-2114.

- ❖ <http://www.pdb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1TGL>
(Fecha de última consulta: 25 de Mayo del 2007)