

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE DIÉSTERES DE LUTEÍNA CON LIPASA DE
THERMOMYCES LANUGINOSA INMOVILIZADA (LIPOZYME TL IM)

TÉSIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO
PRESENTA:
LEONARDO RIOS SOLIS

México , D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Jurado asignado:

Presidente: Eduardo Bárzana García

Vocal: Hernández Luna Martín Guillermo

Secretario: Rubio Arroyo Manuel Fernando

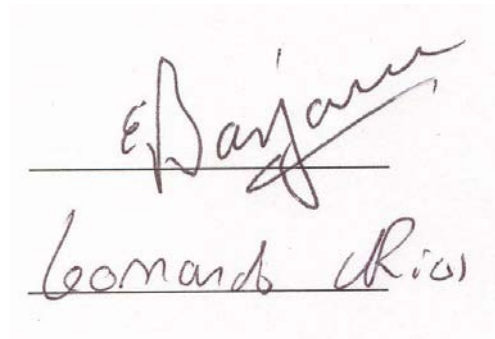
1er suplente: Klimova Berestneva Tatiana Eugenia

2do suplente: Flores de la Rosa Juvenal

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 314 Conjunto "E". Facultad de Química,
UNAM. México D.F.

Asesor del tema: Dr. Eduardo Bárzana García

Sustentante: Leonardo Rios Solis



The image shows two handwritten signatures in black ink on a light-colored background. The top signature is "E. Bárzana" written over a horizontal line. The bottom signature is "Leonardo Rios" also written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

He sido un hombre afortunado, a mis 25 años de edad, puedo afirmar que la suerte me ha sonreído. Y su mayor sonrisa, ha sido el darme una gran familia, sin duda alguna, la mejor familia que uno pudiera tener. Agradezco y les dedico de todo corazón este trabajo a mi padre, mi madre y mis dos hermosas hermanas.

Padre, gracias por enseñarme y darme ese ejemplo de como debe de ser un gran hombre. Te admiro por todo lo que has logrado, por lo mucho que te quieren los que te han encontrado, por lo mucho que has ayudado a todo aquel que has cruzado, pero sobre todo padre, te quiero, con un amor tan profundo que no se puede expresar con simples verbos. Gracias padre, por haber hecho lo imposible por hacer de mi vida un camino lleno de felicidad, quiero que sepas que lo has logrado.

Madre, gracias por enseñarme sonreírle siempre a la vida, a superar los obstáculos y sobre todo a vencerse a uno mismo. Has logrado que la palabra soledad no exista en mi camino, siempre me he sentido y sentiré acompañado, pues tu presencia nunca me ha faltado, y siempre me ha guiado. Te quiero, te adoro, te amo como ningún otro hijo lo hace hacía su madre. Gracias madre, por haber logrado que mi vida fuera como un dulce sueño en el paraíso.

Yasmín, quiero que sepas que eres un ejemplo para mí de lo hermoso que es una mujer de carácter triunfador. Te admiró por esa facilidad que tienes para encantar a quien te rodea, por esa fuerza de espíritu que tienes para llegar siempre a la meta, y por esa alegría que siembras en cada lugar en el que te hospedas. Te agradezco eternamente que te hayas siempre preocupado por tu hermano, aunque no lo creas, tus consejos y profunda comprensión han sido fundamentales en mis momentos de perdición, transformándolos desde su raíz, en etapas de triunfo e iluminación. Te quiero querida hermana, nunca olvides a tu hermano que te ama desde lo más profundo de su corazón.

Lucero, mi querida pequeña hermana, te has convertido en una inspiración y sostén para tu hermano. Gracias por todas esas palabras de ánimo y de cariño que me has brindado, y por todos esos momentos que he tenido el placer de compartir con tigo. Tu nobleza hacia mí me ha dejado sin palabras, y en verdad, han alegrado mi ser de una forma sin precedente. Te has convertido en una mujer grandiosa, tan hermosa, con inmensa sabiduría, tan dedicada, tan inteligente, que no tengo la menor duda de lo hermoso que será tu porvenir. Quiero que sepas que tu hermano te admira y esta orgulloso de ti, pero sobre todo que te ama como ningún otro hermano.

Karina, gracias por todos los hermosos momentos que hemos compartido juntos, gracias por ayudarme a descubrir quien soy realmente, por motivarme para que supere mis peores miedos, por ser luz en mis días oscuros, por brindarme toda tu confianza y sobre todo por hospedarme dentro de tu corazón. Soy feliz por haber conocido a una mujer hermosa llena de amor y de comprensión, que con sólo una sonrisa me derrite sin compasión. Tu sensibilidad por los pequeños detalles de la vida y tu amor por el conocimiento hacen de ti una mujer con una inteligencia inigualable. Siempre te seré eternamente agradecido por contagiarme con esa curiosidad tuya, que logró que descubriera mis verdades pasiones, y por lo tanto definiera mi rumbo. Karina, quiero

que sepas que te quiero, te adoro, te necesito con todo mi corazón y que mi felicidad depende de la existencia de la tuya, y que pase lo que pase, tú y yo por siempre juntos.

Agradezco a mis amigos, Christian, Cristina, Sarai, Gabriela, Bruno, Erika, Mauricio, Ioscani, Victor, Paulina, Alma, Brenda así como muchos otros más por enseñarme el verdadero valor de la amistad, por todas esas experiencias que hemos compartido y en muchos casos superado juntos, y sobre todo por aceptarme como soy.

Finalmente, agradezco a Eduardo Bárzana, por todas las enseñanzas que me brindó, por su paciencia y amabilidad con la que me trató, por enseñarme lo que es trabajar con dedicación, por inspirarme y dejarme encontrar mi profesión. Eduardo, gracias por permitirme descubrir cuales son mis deficiencias y ayudarme a eliminarlas de la mejor forma, pero sobre todo gracias por creer en mí y motivar mi autosuperación.

ÍNDICE

RESUMEN

CAPÍTULO I

1. Introducción y justificación del trabajo

CAPÍTULO II

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

2.2. Objetivos Particulares

CAPÍTULO III

3. Antecedentes

3.1. Los carotenoides

- 3.1.1. Introducción
- 3.1.2. Estructura química y clasificación de los carotenoides
- 3.1.3. Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides
- 3.1.4. Xantofilas en la flor de cempasúchil

3.2. Lipasas

- 3.2.1. Generalidades de las lipasas
- 3.2.2. Reacciones catalizadas por lipasas
- 3.2.3. Características del biocatalizador Lipozyme TL IM
- 3.2.4. Generalidades del uso de lipasas en medios no convencionales
- 3.2.5. Factores determinantes de la actividad enzimática en medios no convencionales

3.3. Estado del arte de la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína

CAPÍTULO IV

4. Materiales y métodos

4.1. Sustrato

4.2. Enzima

4.3. Disolventes y otros

4.4. Equipos

4.5. Métodos

- 4.5.1 Reacción de referencia
- 4.5.2. Determinación de la proteína total por mg de biocatalizador
- 4.5.3. Determinación de la estabilidad de Lipozyme TL IM
- 4.5.4. Hidrólisis de DL en isooctano
- 4.5.5. Reacción en CO₂ supercrítico
- 4.5.6. Adsorción de DL y de luteína libre
- 4.5.7. Determinación del área superficial BET

CAPITULO V

5. Resultados

5.1. Determinación del porcentaje de proteína del biocatalizador

5.2. Reacción de referencia

5.3. Estabilidad de Lipozyme TL IM

5.4. Hidrólisis de DL en isooctano

5.5. Hidrólisis de DL en CO₂ supercrítico

5.6. Adsorción de sustratos y productos en Lipozyme TL IM

- 5.6.1. Adsorción de DL en Lipozyme TL IM
- 5.6.2. Adsorción de luteína libre en Lipozyme TL IM

5.7. Área superficial BET de Lipozyme TL IM

5.8. Micrografías electrónicas de Lipozyme TL IM y Novozym 435

CAPITULO VI

6. Análisis de resultados y conclusiones

1. RESUMEN

Se efectuaron reacciones de hidrólisis enzimática de diésteres de luteína (DL) provenientes de la flor de cempasúchil (*tagetes erecta*) en isoctano utilizando una lipasa de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada en la forma comercial de Lipozyme TL IM (Novo-México). Los resultados demostraron que la reacción de hidrólisis se ve favorecida a bajas actividades acuosas (a_w). Este comportamiento es inusual para una reacción de hidrólisis enzimática. Se obtuvieron los parámetros cinéticos para la hidrólisis de los DL en isoctano a bajos valores de a_w , demostrando que la hidrólisis de los DL utilizando Lipozyme TL IM en isoctano es 2 veces más eficiente que la obtenida con Novozym 435 en hexano (Mora, 2007). Se ha planteado que el incremento en el a_w del biocatalizador genera la formación de múltiples capas de agua en la superficie de este último, generando interacciones hidrofóbicas con el sustrato e impidiéndole que tenga contacto con los sitios catalíticos de la enzima (López, 2002; González, 2005; Mora, 2007). Sin embargo, no existen resultados en la literatura que demuestren experimentalmente esta hipótesis.

En este trabajo se obtuvieron perfiles de adsorción tanto de luteína libre como de DL en el soporte de Lipozyme TL IM, a diferentes actividades acuosas, demostrando que la velocidad de adsorción de los DL se ve favorecida a bajos valores de a_w , mientras que la velocidad de adsorción de la luteína libre se ve favorecida a altos valores de a_w . A partir de una comparación entre los valores de las velocidades iniciales de adsorción y las velocidades iniciales de reacción, se demostró que la etapa limitante de la reacción de hidrólisis de DL en isoctano es el fenómeno de adsorción que ocurre preferentemente valores bajos de a_w . Estos resultados son los primeros en demostrar experimentalmente el efecto negativo que tiene el a_w en el fenómeno de partición de los DL en el biocatalizador.

Otro resultado demostró que Lipozyme TL IM presenta actividad catalítica en CO_2 supercrítico para hidrolizar los DL a bajos valores de a_w , obteniendo rendimientos similares a los obtenidos en isoctano después de 4 horas de reacción.

El biocatalizador Lipozyme TL IM presenta una vida media de 96 días para la reacción de hidrólisis de DL en isoctano a 60°C , lo cual indica que es un biocatalizador muy estable en medios orgánicos a temperaturas relativamente altas.

CAPITULO I

1. Introducción y justificación del trabajo

La luteína es un carotenoide utilizado industrialmente como colorante natural, además de ser comercializada como nutraceutico debido a sus efectos preventivos en la degeneración de la mácula del ojo, que es la parte que nos permite ver los detalles pequeños, y también contra ciertos tipos de cáncer (Khachik, 1995; Deshpande, 1996).

Comercialmente se obtiene luteína libre a partir de diésteres de luteína (oleoresina de la flor de cempasúchil) utilizando un proceso químico donde la etapa clave es la reacción de saponificación indicada a continuación.

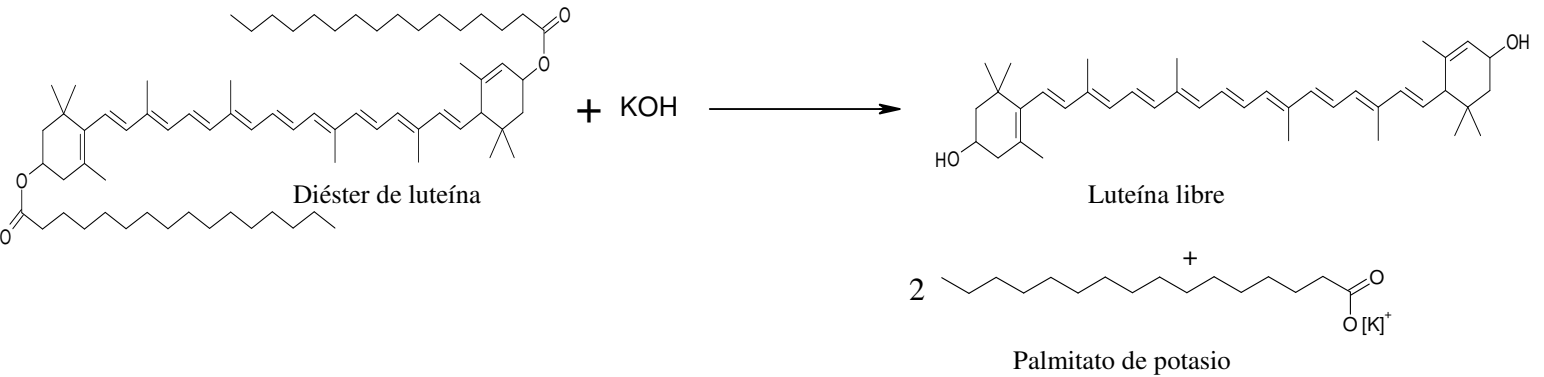


Figura 1. Reacción de saponificación de DL

En general, el proceso químico tradicional en el que se realiza la saponificación de los DL se puede resumir de la siguiente manera (Trujillo, 2005):

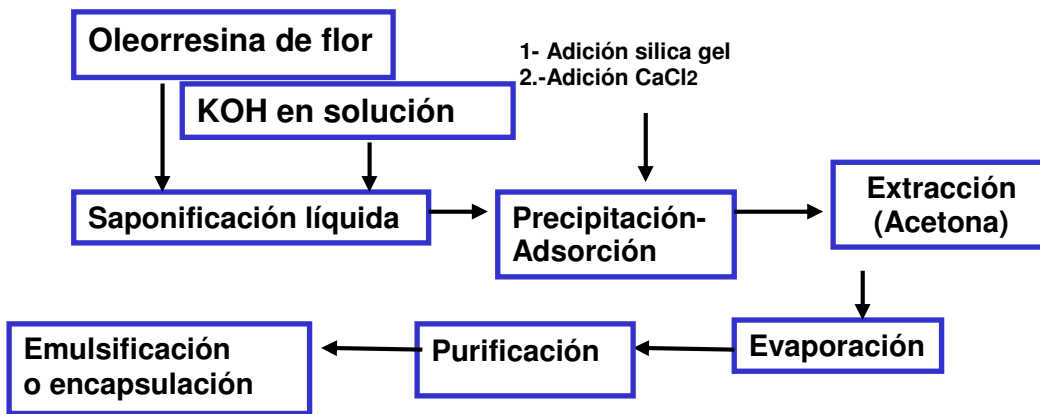


Figura 2. Proceso tradicional de producción de luteína libre

Este proceso industrial presenta las siguientes desventajas:

- ✓ Manejo de temperaturas que provocan la degradación de la luteína
- ✓ Baja estabilidad de la luteína en medio acuoso
- ✓ Altas viscosidades
- ✓ 70 % máximo de saponificación
- ✓ Reacciones secundarias
- ✓ Producciones de productos secundarios (jabones)
- ✓ Alto consumo de energía
- ✓ La luteína producida no es apta para consumo humano debido al uso de bases alcalinas.

Se ha demostrado que es posible hidrolizar los diésteres de luteína (DL) a partir de una reacción enzimática, utilizando lipasas inmovilizadas, en disolventes orgánicos o CO₂ supercrítico (Avila, 2000; López, 2002; González, 2005; Mora, 2007) , lo que conduce a que la etapa de extracción y de reacción se podrían llevar a cabo simultáneamente. En este trabajo se utilizó la lipasa comercial de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada (Lipozyme TL IM, Novo-México). Un atractivo de este biocatalizador es su relativo bajo costo en comparación con otros biocatalizadores similares, debido a un novedoso proceso de inmovilización en gránulos de base sílice.

La reacción enzimática de la hidrólisis de los DL tiene la particularidad de generar ácidos grasos libres en lugar de los jabones obtenidos en la saponificación.

El proceso biotecnológico se puede esquematizar de la siguiente forma:

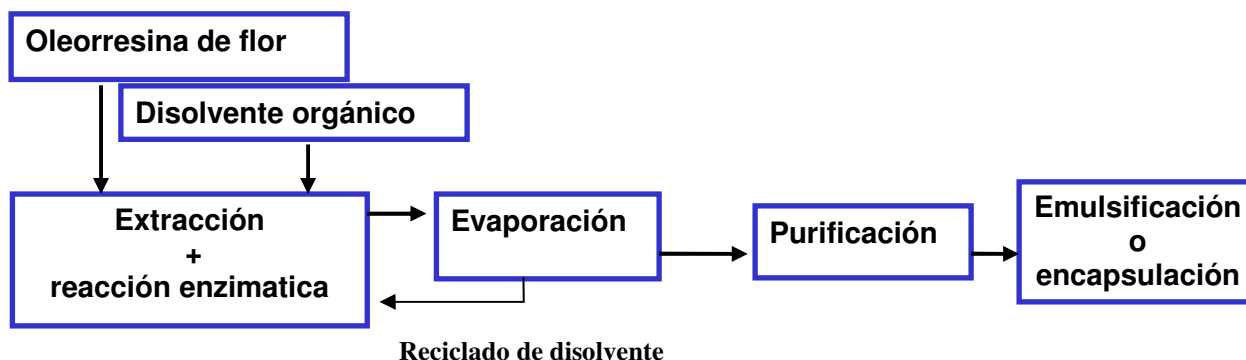


Figura 3. Proceso enzimático para la producción de luteína libre

Las múltiples ventajas de este proceso son:

- ✓ La etapa de reacción se realizaría de manera simultánea con la etapa de extracción
- ✓ No habría problemas relacionados con altas viscosidades
- ✓ Baja producción de subproductos
- ✓ Si se utilizara CO₂ supercrítico, el proceso sería 100% amigable con el medio ambiente.
- ✓ Posibilidad de obtener rendimientos mayores al 90 %
- ✓ Alta especificidad del biocatalizador
- ✓ La luteína producida sería apta para consumo humano.

Actualmente el implementar tecnologías más amigables con el medio ambiente, así como menos consumidoras de energía ha tomado una gran relevancia en nuestra sociedad. Una razón por la cual todavía no se han implementado este tipo de tecnologías es por su alto costo. He aquí la importancia de trabajos como el que se presenta a continuación que buscan desarrollar tecnologías sustentables, con una relación eficiencia/costo mayor que los procesos actuales, teniendo por lo tanto una mejor aceptación y rápida implementación, favoreciendo la coexistencia armoniosa entre el hombre y su entorno.

CAPITULO II

2. Objetivos

2.1 .Objetivo General

Evaluar la capacidad de Lipozyme para hidrolizar diésteres de luteína en un medio orgánico.

2.2. Objetivos Particulares

- Determinar los parámetros cinéticos para la reacción de hidrólisis de DL en isoctano.
- Determinar la estabilidad de Lipozyme TL IM en isoctano a 60°C.
- Evaluar cualitativamente la actividad enzimática en CO₂ supercrítico.
- Establecer el perfil de adsorción de DL y de luteína libre en el soporte de Lipozyme TL IM en función del a_w y su relación con la velocidad de reacción.
- Comparar el área superficial de Lipozyme TL IM y de Novozym 435 mediante el método de BET.

CAPITULO III

3. Antecedentes

3.1. Carotenoides

3.1.1. Introducción

La luteína es un carotenoide... probablemente haya escuchado hablar de ellos en las tiendas de vitaminas y suplementos alimenticios... ¿Pero que son realmente los carotenoides? Por que han tomado tanta relevancia actualmente en el mundo nutracéutico? La respuesta es muy simple y es lo que veremos a continuación.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos orgánicos liposolubles de color intenso (rojo, anaranjado y amarillo) que ocurren de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias (Davis, 1976; Britton, 1995). En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, o como agente protector contra la auto-oxidación. En los organismos no fotosintéticos, los carotenoides han sido vinculados a los mecanismos de prevención de la oxidación.

El beta caroteno es el carotenoide más abundante en la naturaleza y es muy importante para la dieta humana, debido a que es el precursor de la vitamina A. Se ha encontrado que las hortalizas amarillas tienen una mayor concentración de carotenoides amarillos (xantofilas) que tienen menor actividad como precursores de la vitamina A, pero que sin embargo, algunos de estos compuestos, como la luteína, pueden tener beneficios importantes para la salud debido a sus efectos antioxidantes. La luteína se encuentra en el centro de la retina del ojo como parte de los pigmentos maculares. La mácula es responsable de la visión detallada del ojo y estudios recientes han encontrado que la luteína es esencial para la visión normal, además de que como antioxidante reduce el daño de los radicales libres en esa parte del ojo (Deshponde, 1996). Los investigadores creen que el consumo de la luteína puede desacelerar el progreso de la degeneración de la mácula. Además de estas propiedades, algunos estudios sugieren que la luteína ofrece cierta protección contra enfermedades cardíacas, cardiovasculares y hasta cáncer (Khachik, 1995).

3.1.2. Estructura química y clasificación de los carotenoides.

En su estructura básica los carotenoides contienen un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras, como por ejemplo por hidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, isomerización, y introducción de funciones oxigenadas. Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides que ocurren naturalmente (Britton, 1995).

Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos (tabla 1), mientras que aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (tabla 2).

Carotenoides totales = Carotenos + Xantofilas

Los carotenoides, ya sean carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos como el fitoflueno, monocíclicos o bicíclicos (tabla 1). La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, el monocíclico γ -caroteno tiene un anillo β mientras los bicíclicos β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y astaxantina tienen dos de estos anillos. Los bicíclicos α -caroteno y luteína tienen cada uno un anillo β y un anillo ϵ .

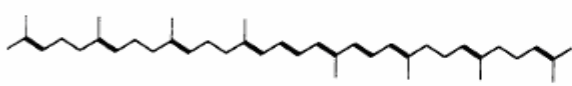
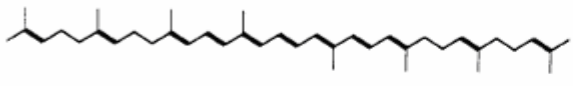
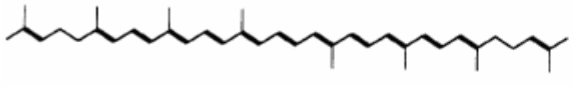
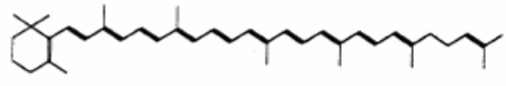
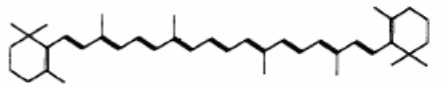
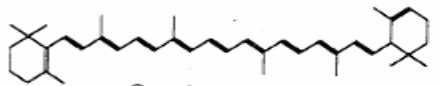
Estructura	Características
 <p data-bbox="341 819 454 850">Fitoflueno</p>	acíclico, incoloro
 <p data-bbox="341 976 470 1008">ξ-Caroteno</p>	acíclico, amarillo suave
 <p data-bbox="341 1144 454 1176">Licopeno</p>	acíclico, rojo
 <p data-bbox="341 1333 479 1365">γ-Caroteno</p>	monocíclico (1 anillo β); rojo-naranja
 <p data-bbox="332 1501 470 1533">β-Caroteno</p>	bicíclico (2 anillos β); naranja
 <p data-bbox="316 1669 462 1701">α-Caroteno</p>	bicíclico (1 anillo β , 1 anillo γ), amarillo

Tabla 1. Estructura y características básicas de los carotenos comunes en los alimentos (Rodríguez, 1997)

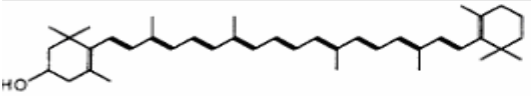
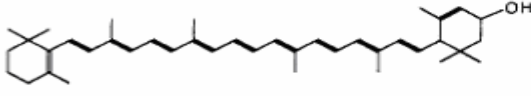
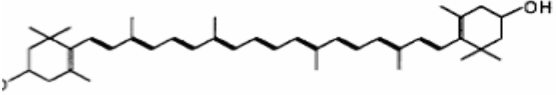
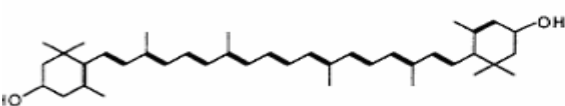
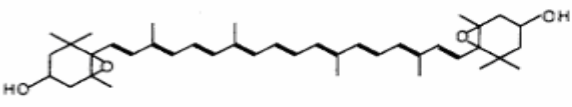
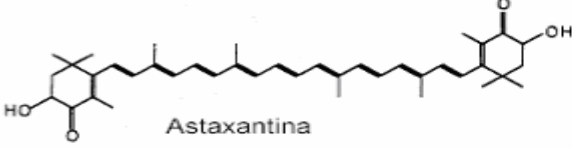
Estructura	Características	Función de Oxígeno
 <p>β-Criptoxantina</p>	bicíclica (2 anillos β) naranja	1 grupo hidroxí
 <p>α-Criptoxantina</p>	bicíclica (1 anillo β , 1 anillo ϵ), amarillo	1 grupo hidroxí
 <p>Zeaxantina</p>	bicíclica (2 anillos β), amarillo-naranja	2 grupos hidroxí
 <p>Luteína</p>	bicíclica (1 anillo β 1 anillo ϵ), amarilla	2 grupos hidroxí
 <p>Violaxantina</p>	bicíclica, amarillo	2 grupos hidroxí 2 grupos epoxi
 <p>Astaxantina</p>	bicíclica (2 anillos β), rojo	2 grupos hidroxí 2 grupos ceto

Tabla 2. Estructura y características básicas de las xantofilas en los alimentos (Rodríguez, 1997)

3.1.3. Propiedades físicas y químicas importantes de los carotenoides

La figura 4 ilustra importantes propiedades físicas y químicas de los carotenoides (Rodríguez, 1997). El rasgo estructural distintivo de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados. Esta parte de la molécula conocida como el cromóforo, es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia su gran capacidad de coloración (Davis, 1976).

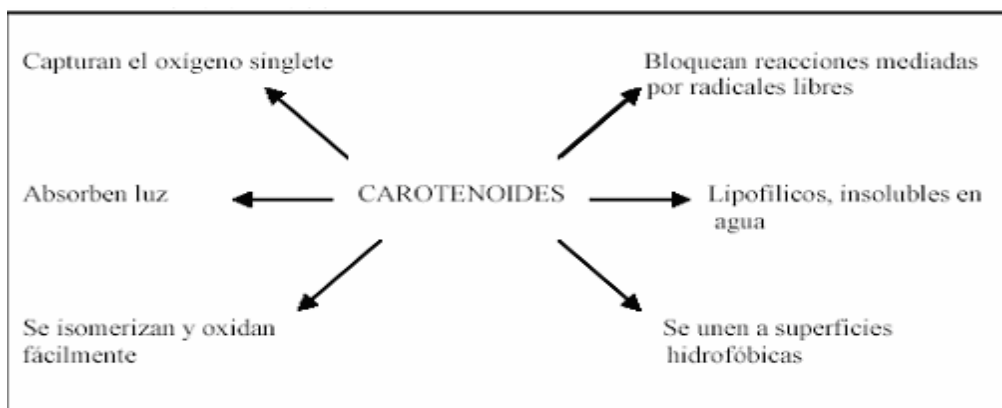


Figura 1. Propiedades físicas y químicas de los carotenoides (Rodríguez, 1997)

Los carotenoides son sustancias lipofílicas no solubles en agua. Los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano. Las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol.

3.1.4. Xantofilas en la flor de cempasúchil

Las xantofilas se encuentran tanto en las partes verdes de las plantas como en los frutos y las flores. Generalmente en la naturaleza se encuentran como mezclas de diferentes proporciones de carotenoides. Desde el punto de vista industrial, la flor de cempasúchil tiene la ventaja de que la mezcla de xantofilas obtenida a partir de sus flores es extremadamente alta en sólo un componente (aprox. 80 %), que es la luteína en forma diesterificada por ácidos de cadena larga tipo palmítico (Philip, 1975) (figura 5).

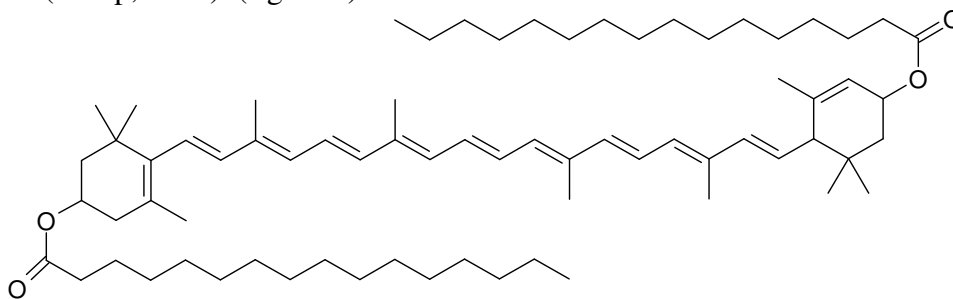


Figura 2. Luteína en su forma diesterificada (éster di-palmítico de luteína)

3.2. Lipasas

3.2.1. Generalidades de las lipasas

Las lipasas son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los acil-glicéridos. Su reacción es reversible, por lo que pueden efectuarse alternativamente reacciones de hidrólisis o de síntesis en función del potencial químico de las especies presentes. Algunas de las reacciones que catalizan las lipasas son: hidrólisis, esterificación e interesterificación de grasas y otros lípidos. Las lipasas tienden a ser mucho más específicas que los catalizadores químicos, pueden reaccionar

específicamente con cierto grupo funcional del sustrato, pueden presentar estereoespecificidad, y como resultado, se pueden obtener productos de alta pureza, minimizando las reacciones secundarias. Otra de las ventajas que ofrecen las lipasas son sus condiciones suaves de reacción, con las cuales hay una reducción en el consumo de energía y un menor daño térmico a los sustratos y productos (Han, 1986b; Han, 1989; Murkerjee, 1990).

A partir de la década de los 80 las reacciones catalizadas por lipasas fueron propuestas para la preparación de una amplia variedad de productos específicos de alto valor comercial, los cuales no pueden ser preparados convenientemente por síntesis química (Han, 1986a; Han, 1986b; Han, 1989; Klivanov, 1989; Murkerjee, 1990; Halling, 1994). Por ejemplo, los ácidos grasos polinsaturados que pueden ser utilizados como productos dietéticos, son preparados bajo condiciones suaves de hidrólisis de aceites marinos o de ciertas plantas con lipasas no específicas (Murkerjee, 1990). Un ejemplo de estos son los ácidos grasos ω -3.

3.2.2. Reacciones catalizadas por lipasas

a) Reacción de hidrólisis

Las reacciones de hidrólisis de ésteres producen alcoholes y ácidos grasos libres (figura 6).

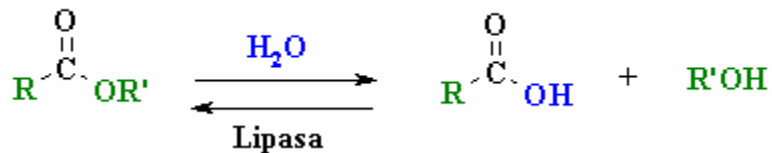


Figura 3. Reacción de hidrólisis y esterificación con una lipasa

En los procesos químicos, las grasas son hidrolizadas a temperaturas de 250°C y presiones de 60 bars. Bajo estas condiciones los ácidos grasos poli-insaturados se descomponen y dan productos indeseables como cetonas y compuestos hidrocarbonados.

Las reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas pueden llevarse a cabo en disolventes con muy poca cantidad de agua o en sistemas bifásicos a condiciones suaves de reacción. En este tipo de sistemas la reacción ocurre usualmente en la interfase (Han, 1986a; Han, 1986b; Han, 1989; Klivanov, 1989; Halling, 1994).

b) Reacción de esterificación

La reacción reversa de la hidrólisis es la reacción de esterificación, donde se obtienen ésteres de alcoholes y ácidos grasos (figura 6). En este tipo de reacciones se pueden utilizar lipasas en medios orgánicos, donde la actividad de agua juega un papel muy importante (Klivanov, 1989; Gorman, 1992; Koskinen, 1996). La esterificación o transesterificación al igual que la hidrólisis se pueden llevar a cabo en un sistema bifásico utilizando reactores de membrana o micelas inversas. La transesterificación catalizada por lipasas se ha usado ampliamente para la preparación de ésteres de cadena corta, cadena mediana como el etil propionato, isobutilacetato,

isoamilacetato y ésteres de alcoholes con terpenos como el mentol y el geraniol los cuales son usados como saborizantes en la industria alimentaría (Murkerjee, 1990).

c) Reacción de interesterificación

Existen dos tipos de reacciones de interesterificación: la acidólisis (figura 7) y la alcoholisis (figura 8). En la primera se sustituye un ácido graso no deseable en la molécula por otro, y en el segundo caso se sustituye un alcohol por otro para formar un nuevo éster.

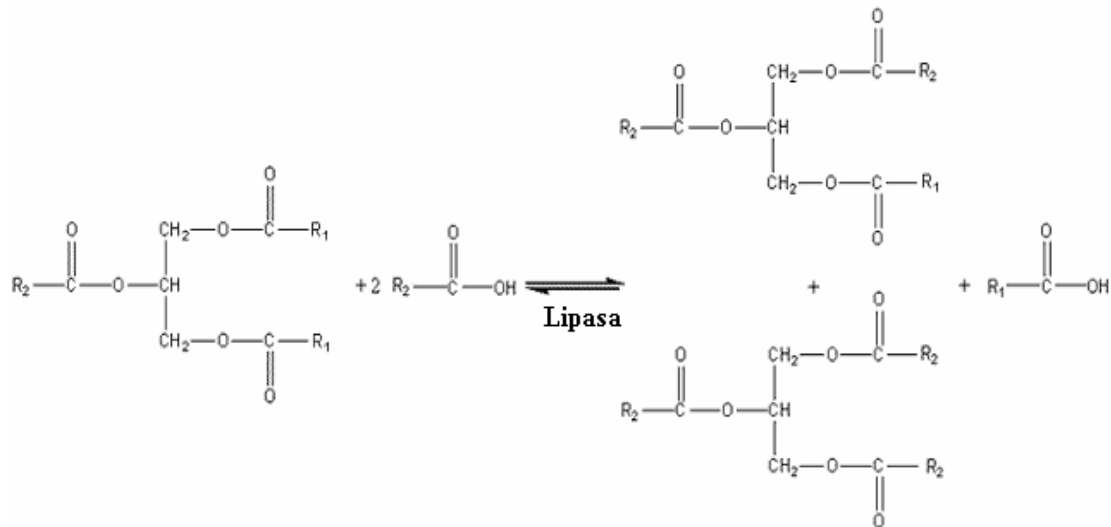


Figura 4. Reacción de acidólisis enzimática

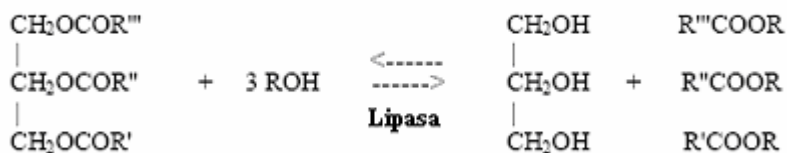


Figura 5. Reacción de alcoholólisis enzimática

La reacción de alcoholólisis ha tomado gran importancia actualmente, debido que a partir de ella se puede producir biodiesel (Briggs, 2004; Danielo, 2005). El biodiesel es un combustible menos contaminante de origen vegetal que se puede mezclar con el diesel de petróleo, facilitando su implementación en el mercado. En Europa ha tenido un gran desarrollo en países como Francia o Alemania. Actualmente todos los combustibles diesel de Francia para transporte contienen un 5 % de biodiesel. En Estados Unidos se está impulsando enormemente el uso de diesel para el transporte con un contenido del 2% de biodiesel. Una nueva tendencia en Japón y Estados Unidos es la obtención de biodiesel a partir de un cierto tipo de algas, las cuales tienen un alto contenido

de ácidos grasos (hasta 50%), además de poder crecer a velocidades extremadamente rápidas a bajo costo (Briggs, 2004).

3.2.3. Características del biocatalizador Lipozyme TL IM

El biocatalizador Lipozyme TL IM fue seleccionado por representar un nuevo producto comercial de la compañía Novo Nordisk (Dinamarca) y porque presenta una alta actividad hidrolítica.

Ficha técnica:

Nombre comercial: Lipozyme TL IM

Fabricante: Novo Nordisk (Dinamarca)

Clase de enzima: Lipasa

Color: De marrón claro a blanco.

Forma física: Granulado inmovilizado

Densidad aproximada (g/ml) : 1.0

Organismo de producción: *Aspergillus oryzae*

Organismo fuente: *Thermomyces lanuginosus*

Producido mediante fermentación sumergida de un microorganismo genéticamente modificado.

La proteína enzimática, la cual no está genéticamente modificada, se separa del organismo de producción y se purifica.

Temperatura máxima recomendada de uso: 70 °C

	Limite Mínimo	Limite Máximo
Unidades de interesterificación (IUN/g)	250	-
Pérdida durante el secado a 105°C (%)	8.0	
Fracción de tamizado en malla 16 (%)	3.0	
Fracción de tamizado en malla 48 (%)	20	
Cuenta total en placa (/g)		50000
Bacterias coliformes (/g)	-	30
<i>E.coli</i> enteropatógeno (/25g)		Ninguno detectado
Salmonella (/25g)		Ninguno detectado

Tabla 3. Especificaciones de Lipozyme TL IM

Lipozyme TL IM es una enzima útil para catálisis de esterificación e interesterificación.

La enzima inmovilizada está específicamente diseñada para reactores de lecho empacado. Como soporte se emplean gránulos porosos de silicatos, que da como resultado un biocatalizador eficiente y económico. Esta enzima inmovilizada se recomienda utilizar en sistemas con bajo contenido de agua ya que el agua provoca que el biocatalizador pierda resistencia mecánica.

Para obtener los gránulos, la enzima y un aglutinante líquido se aplican por atomización a un soporte de silicatos cuyo tamaño de partícula es inferior a 100 μm . Durante la granulación, las partículas de silicatos se aglomeran en grandes partículas porosas en cuya superficie la enzima está distribuida uniformemente. El diámetro medio de las partículas es de aproximadamente 600 μm

3.2.4. Generalidades del uso de lipasas en medios no convencionales

En la década de los 60 apareció una publicación muy innovadora acerca de una reacción catalizada enzimáticamente en una fase orgánica (Dastoli, 1967). Sin embargo el mundo no estaba listo para asimilar y sacarle provecho a este descubrimiento, y no fue sino hasta los años ochenta que este tipo de reacciones empezaron a estudiarse con mayor intensidad (Han, 1986a; Han, 1986b; Han, 1989; Klivanov, 1989; Murkerjee, 1990; Halling, 1994). Se descubrió que las enzimas pueden presentar actividad catalítica en sistemas muy alejados de ser simples soluciones diluidas, pudiendo ser la fracción mayoritaria una fase orgánica, una fase gaseosa o un fluido a alta presión. A todos estos sistemas se les dio el nombre de medios no convencionales. La ventaja del uso de este tipo de medios radica en que numerosos compuestos orgánicos de alto valor agregado son poco solubles en medios acuosos.

3.2.5. Factores determinantes de la actividad enzimática en medios no convencionales

El agua:

La estructura terciaria de las enzimas depende en grande parte de las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de la enzima y el agua. Es decir que la enzima se pliega de tal forma que sus residuos no polares se encuentren hacia adentro de la enzima, en un microambiente hidrofóbico, y los residuos polares se encuentren hacia fuera en contacto con moléculas de agua. Por lo tanto el agua es necesaria para la adquisición y el mantenimiento del sitio activo de la enzima, y aunque se encuentre en un disolvente orgánico, teóricamente sólo haría falta una monocapa de moléculas de agua alrededor de la enzima para que adquiriera su estructura tridimensional adecuada (Klivanov, 1989).

Cuando las reacciones son llevadas a cabo en medios orgánicos, el agua se distribuye entre las diferentes fases presentes. Algunas moléculas de agua se unen de forma no covalente a la enzima, jugando un papel muy importante en la actividad catalítica, otras moléculas de agua se encuentran disueltas en el disolvente o adheridas a los soportes o sustancias que puedan tener la capacidad de adsorber agua. La mejor manera para caracterizar el grado de hidratación del biocatalizador en un medio orgánico es el uso del parámetro termodinámico conocido como actividad de agua (a_w). Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor del agua de la solución (P) y la presión de vapor del agua pura a esas condiciones (P_0)

$$a_w = \frac{P}{P_o}$$

El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible para efectuar una reacción. Por ejemplo comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de cloruro de sodio, donde una parte importante de las moléculas de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua será menor que en la primera.

En el caso de las lipasas, usualmente se ha encontrado que a bajos valores de a_w el equilibrio termodinámico se desplaza hacia reacciones de síntesis, mientras que para favorecer las reacciones de hidrólisis se necesitan valores altos de a_w (Halling, 1994). Se sabe que a a_w bajos, de 0.2-0.3, las enzimas pueden tener actividad, gracias a que se forma una monocapa de agua alrededor de éstas (Klibanov, 1989).

Disolvente:

El disolvente es un factor muy importante en la enzimología no acuosa debido a que afecta la actividad y estabilidad de la enzima además de poder alterar su especificidad.

Las enzimas y los disolventes compiten por el agua, por lo que los disolventes que sean de naturaleza hidrofílica serán capaces de secuestrar moléculas de agua que se encuentren unidas a la enzima, impidiendo una hidratación suficiente de la proteína y produciendo una disminución de su actividad (Gorman, 1992). El despojo del agua de la enzima por el disolvente está relacionado con la polaridad del disolvente. Por ejemplo el metanol resorbe alrededor del 60 % del contenido de agua unida a la enzima y el hexano solamente el 0.5 % (Gorman, 1992; Koskinen, 1996). Las moléculas de disolvente también pueden penetrar dentro del sitio activo de la enzima, disminuyendo la polaridad local del sitio activo, lo que puede tener como consecuencia una repulsión electrostática entre la enzima y el sustrato.

3.3. Estado del arte de la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína

Ávila (2000) demostró que la lipasa de *Candida cylindracea* en forma inmovilizada tiene la capacidad de hidrolizar pigmentos de la flor de cempasúchil a 37°C tanto en una fase acuosa, como en hexano a un a_w de 0.97. Sus resultados evidenciaron que el desempeño de la lipasa de *C. cylindracea* disminuye drásticamente en la fase orgánica respecto al desempeño obtenido en la fase acuosa, obteniendo un rendimiento de luteína del 28 % en fase acuosa a las 72 horas y de 2.6 % en fase orgánica a las 144 horas. La autora atribuyó esta baja de rendimiento a la falta de estabilidad de la enzima en el hexano.

López (2002) demostró que la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en la forma comercial de Novozym 435 tiene la capacidad de producir luteína libre a partir de la hidrólisis de DL en hexano a 60°C. La autora efectuó diversos experimentos a diferentes actividades acuosas, evidenciando que la reacción se ve favorecida a bajas actividades acuosas. Estos resultados son bastante inusuales para reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas. Diversas publicaciones en

la literatura coinciden en que las reacciones de hidrólisis con lipasas en medios no convencionales son favorecidas a altos valores de a_w , mientras que las de esterificación lo son a bajos valores de a_w (Han, 1986; Klivanov, 1989; Murkerjee, 1990; Halling, 1994; Koskinen, 1996). Este fenómeno comúnmente observado es congruente con los principios de la cinética y de equilibrio químico, debido a que el agua es un sustrato de la reacción, por lo tanto teóricamente se espera que a mayor cantidad de sustrato la reacción proceda a mayor velocidad y el equilibrio químico se desplace hacia la formación de luteína. López (2002) propuso la hipótesis de que el agua puede formar una capa alrededor de la enzima impidiendo que el sustrato tenga contacto con esta última, provocando que la hidrólisis no sea favorecida a altos valores de a_w .

Mediante un simulador comercial, Trujillo (2005) comparó tanto las variables técnicas como económicas entre el proceso industrial de producción de luteína con el proceso alternativo utilizando Novozym 435 en isoctano para hidrolizar DL. Sus resultados demostraron que el proceso enzimático aún no era factible económicamente debido al alto precio del biocatalizador y sobre todo a la baja velocidad de reacción. Sin embargo, el autor hizo énfasis en el gran potencial del proceso enzimático debido a que es menos contaminante, permite trabajar en condiciones donde la pérdida de materia prima sea baja, además de tener la ventaja de poder producir luteína para consumo humano, la cual se vende a un precio mucho mayor que la luteína producida para consumo animal por el proceso de saponificación. El autor indicó que la etapa limitante en el proceso enzimático es la reacción de hidrólisis, recomendando el uso de biocatalizadores más económicos que minimicen el tiempo de reacción. Trujillo consideró en sus datos de entrada para el proceso enzimático rendimientos de producción de luteína del 50 % en un lapso de reacción de 30 horas a 60°C.

Posteriores estudios se centraron en buscar las mejores condiciones de reacción para la hidrólisis enzimática de DL en disolventes orgánicos. González (2006) evaluó la reacción de hidrólisis de DL utilizando a Novozym 435 y Lipozyme RM IM en diferentes disolventes en función del a_w . Estos disolventes se pueden clasificar en función de su coeficiente de partición en el sistema n-octanol/agua (LogP), el cual es un indicativo de la polaridad del disolvente (tabla 4).

Disolvente	T.eb. (°C)	Solubilidad de la luteína (mg L ⁻¹)	Log P
Acetonitrilo	82	100	-0.33
Acetato de etilo	77	800	0.068
Tolueno	110	---	2.5
Ciclohexano	81	50	3.2
Hexano	69	20	3.5
Isoctano	99	---	4.5
Octano	126	---	4.5
Decano	174	---	5.6
Dodecano	216	---	6.6

Tabla 4. Propiedades de disolventes (González, 2006)

Sus resultados demostraron la ausencia de reacción en disolventes con valores bajos de $\log P$, como en el acetonitrilo, acetato de etilo o el tolueno. González atribuyó esta falta de actividad a que estos disolventes son capaces de secuestrar agua ligada a la enzima que es vital para su actividad catalítica. En cuanto a los demás disolventes, sus resultados demostraron que la actividad catalítica tanto de Novozym 435 como de Lipozyme RM IM fue optimizada en isooctano a bajos valores de a_w . Sin embargo la autora concluyó que las diferencias observadas de actividad entre los distintos disolventes no pueden ser explicadas únicamente por los valores de $\log P$, variables como los momentos dipolares o la solubilización del sustrato pueden tener una gran influencia en la reacción. La autora resaltó la importancia que tiene la estructura molecular del disolvente en la reacción, al obtener grandes diferencias en la actividad catalítica de ambos biocatalizadores en hexano y ciclohexano, los cuales tienen un valor de $\log P$ muy similar. Estos resultados evidenciaron la complejidad de las interacciones y de los efectos que tiene el disolvente en la hidrólisis enzimática de DL en medios orgánicos. González demostró que la velocidad inicial de hidrólisis de DL en isooctano a bajos valores de a_w utilizando Lipozyme RM IM es 14 veces mayor que al utilizar la misma cantidad de biocatalizador de Novozym 435. La autora demostró que se pueden llegar a tener conversiones de DL a luteína libre mayores del 80 % al utilizar Lipozyme RM IM en isooctano a 60°C a bajos valores de a_w . Estos resultados son mejores que los estimados por Trujillo (2005) para efectuar su comparación de procesos de producción de luteína a través de un simulador comercial, sin embargo, aún con las mejoras encontradas por González (2006), el tiempo de reacción y el costo del biocatalizador siguen siendo elevados. No obstante, los resultados de la autora demostraron que la reacción de hidrólisis de DL por lipasas inmovilizadas puede ser ampliamente optimizada.

Morán (2006) estudió la adsorción tanto de DL como de luteína libre en el soporte sin enzima del biocatalizador de Novozym 435 (denominado Lewatit) y en alumina en función del a_w . Sus resultados demostraron que la luteína libre presenta una mayor afinidad por el soporte Lewatit que el diéster de luteína. En cuanto al fenómeno de adsorción, la autora concluyó que el a_w no tenía un efecto considerable en la cantidad de material adsorbido tanto de luteína libre como de DL en Lewatit, sin embargo el a_w sí tuvo un efecto considerable en las cinéticas de adsorción en el soporte de alumina tanto para la luteína libre como para los DL, siendo favorecida la velocidad de adsorción a bajas actividades acuosas. Los experimentos de cinéticas de adsorción de colorante en función del a_w realizados por la autora utilizando el soporte Lewatit, abarcaron tiempos de muestreo de hasta 120 horas, con intervalos de muestreo de entre 12 y 24 horas, observando que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos a distintos valores de a_w . Sin embargo, la autora observó que la mayor cantidad tanto de luteína como de DL fue adsorbida en tiempos muy cortos (orden de magnitud de minutos) y que posteriormente sólo se observó una ligera variación en los resultados de adsorción. Por lo tanto los experimentos de Morán demostraron que existe una cantidad de colorante adsorbido en Lewatit que provoca que se llegue a un equilibrio entre el fenómeno de adsorción y desorción, y que la actividad acuosa no produce una modificación considerable de este equilibrio, sin embargo sus experimentos no demostraron que la actividad acuosa no tenga un efecto en la velocidad de adsorción y desorción, debido a que este fenómeno sólo hubiera podido ser estudiado si se hubieran efectuado cinéticas de adsorción en tiempos relativamente cortos. Las cinéticas de adsorción de luteína y DL en el soporte de alumina efectuadas por la autora sí incluyeron muestreos en tiempos cortos, evidenciando que la velocidad de adsorción es afectada por el a_w , siendo favorecida a

actividades acuosas bajas. Los resultados de Morán son muy importantes debido a que si el comportamiento de adsorción en función del a_w que presentó el soporte de alumina para los DL en hexano también estuviese presente en Lewatit y otros soportes de biocatalizadores utilizados para la hidrólisis de DL, el fenómeno de adsorción podría ser la clave para explicar los inusuales perfiles de velocidades de hidrólisis de DL en función del a_w reportados (López, 2002; González, 2006; Mora, 2007).

Mora (2007) obtuvo perfiles detallados de velocidades iniciales de hidrólisis de DL en hexano con respecto a la actividad acuosa inicial para los biocatalizadores Novozym 435 y Lipozyme RM IM. Sus resultados (Figura 9) evidenciaron el mismo comportamiento encontrado por otros autores acerca de la dependencia de la velocidad de hidrólisis de DL en hexano respecto a la actividad acuosa. (López, 2002; González, 2006).

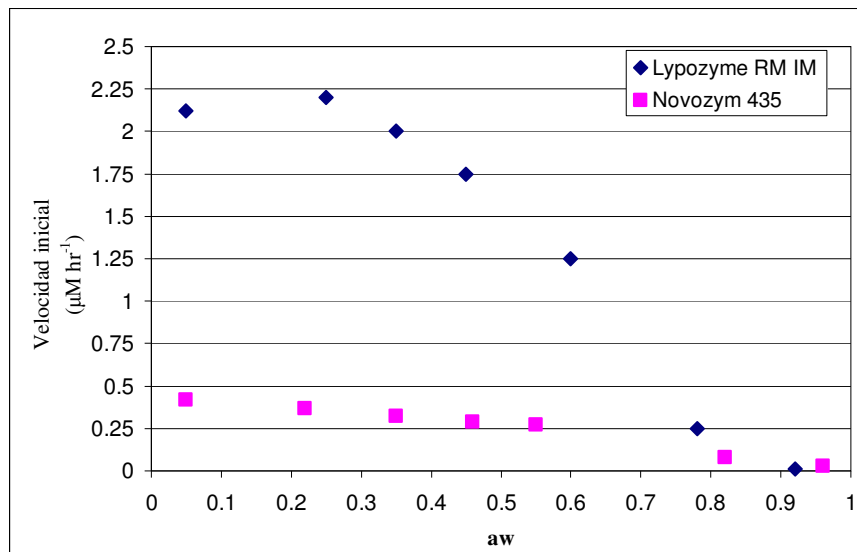


Figura 6. Curva de velocidad inicial vs. actividad acuosa inicial del biocatalizador (Mora, 2007)

Lipozyme RM 1M y Novozym 435 , Hexano ; 60 ° C 130 rpm ;

[Sustrato] = 1

mg/ml ; [Biocatalizador = 5 mg / ml]

El autor adoptó la hipótesis de López (2002) acerca de la formación de una capa de agua alrededor de la enzima que impide que el sustrato tenga contacto con esta última, y la desarrolló aún más enfatizando el efecto de la alta naturaleza hidrofóbica de los DL y la formación de múltiples capas de agua, no sólo alrededor de la enzima sino del biocatalizador completo. El autor planteó que cuando las reacciones se efectúan a altos valores de a_w , el agua tiene mayor afinidad a adsorberse sobre el biocatalizador que a estar en solución en la fase orgánica, lo que da como resultado la formación de múltiples capas de agua alrededor del soporte del catalizador, estas capas provocan fuertes interacciones hidrofóbicas con el sustrato impidiéndole el contacto con los sitios catalíticos. En el caso contrario, Mora propuso que a valores bajos de actividad acuosa, la primera capa de agua apenas se ha formado en la superficie del soporte o incluso no ha alcanzado a completarse, lo cual implica que las interacciones hidrofóbicas sean menores,

permitiéndole al sustrato interactuar más fácilmente con los sitios activos. Esta propuesta se ve ilustrada en la figura 10.

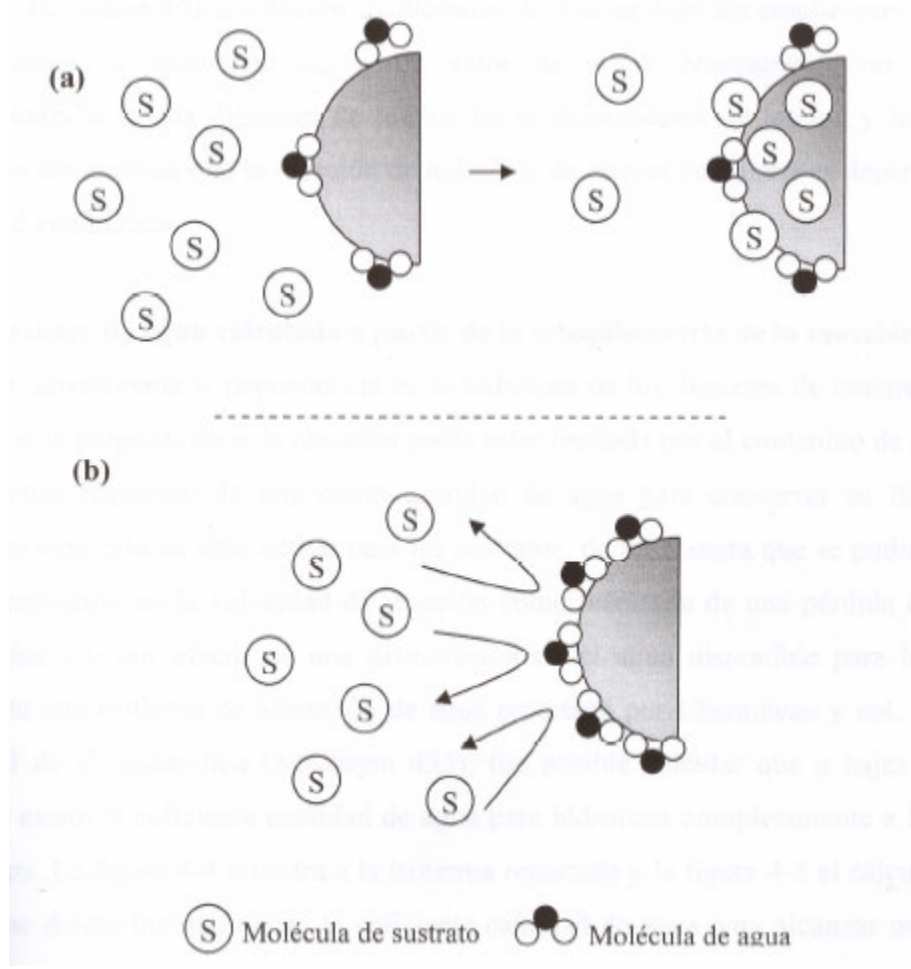


Figura 7 . Diagrama del efecto del a_w en la adsorción de DL (Mora, 2007)

(a) A bajos valores de a_w , los diésteres pueden acceder a los sitios catalíticos debido a la poca presencia de moléculas de agua con interacciones hidrofóbicas con el sustrato. (b) A valores altos de a_w , la superficie se encuentra cubierta de moléculas de agua e incluso se pueden formar múltiples capas de agua alrededor del biocatalizador, lo que tendrá como resultado que las interacciones hidrofóbicas sean mayores, impidiendo el contacto de los DL con los sitios activos.

En otros experimentos, el autor demostró mediante una isoterma de adsorción de agua de Novozym 435 reportada en la literatura (Chamuleau, 2001) que aún a valores bajos de actividades acuosas como de 0.13, existe la suficiente cantidad de agua disponible para hidrolizar todos los diésteres, descartando la posibilidad de que el agua sea un reactivo limitante. Sin embargo, como el mismo autor lo indica, no toda el agua está disponible para reaccionar. Ciertas enzimas pueden retener de una forma relativamente fuerte una gran cantidad de agua para mantener su estructura tridimensional, lo que indica que existe la posibilidad de que el agua total disponible no sea suficiente para hidrolizar todos los diésteres presentes o que la cantidad sea

relativamente pequeña y provoque que se llegue al equilibrio químico a bajas conversiones del sustrato.

Mora obtuvo cinéticas de hidrólisis de DL en hexano a 60° C utilizando un a_w de 0.13 tanto para Novozym 435 como Lipozyme RM IM. A partir de estos datos construyó las gráficas de consumo de agua respecto al tiempo que se muestran a continuación (Figura 11 y 12) :

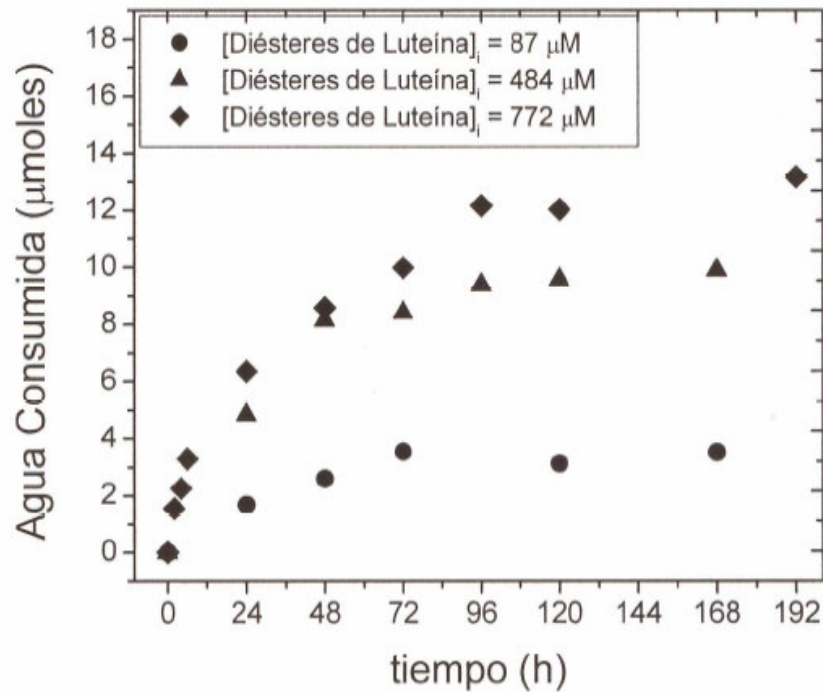


Figura 8. Perfiles del consumo de agua en la reacción de hidrólisis enzimática de los DL a distintas concentraciones iniciales de sustrato. Lipozyme RM IM, a_w :0.13 ; Hexano; 60 °C ; [Sustrato] = 0.1mg/ml [Biocatalizador] 5mg /ml [

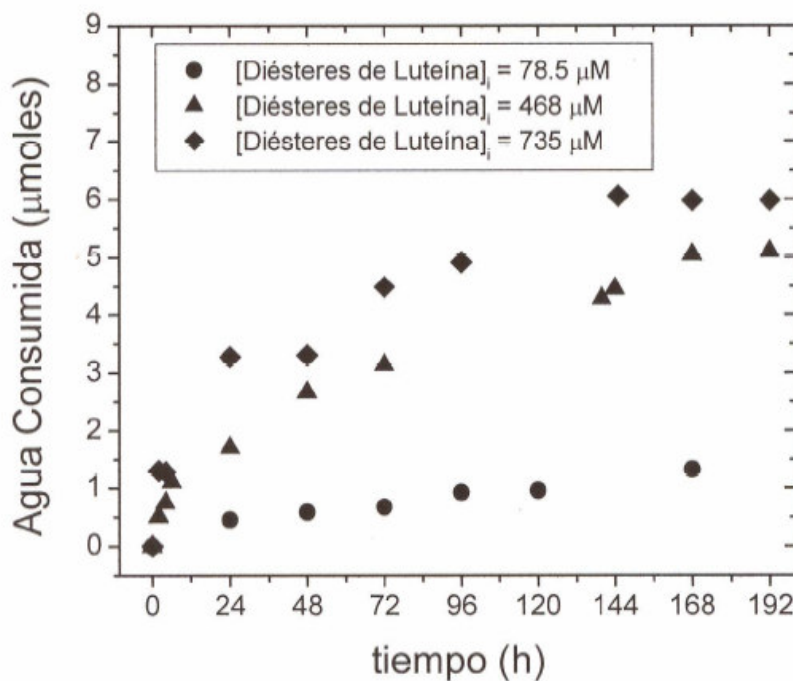


Figura 9.Perfiles del consumo de agua en la reacción de hidrólisis enzimática de los DL a distintas concentraciones iniciales de sustrato. Novozym 435, a_w :0.13 ; Hexano; 60 °C ; [Sustrato] = 0.1mg/ml [Biocatalizador] 5mg /ml [

El autor observó que independientemente de la concentración inicial de DL, la reacción se detuvo siempre aproximadamente a partir de las 96 horas. Mora consideró que una posible causa del cese de reacción después de 96 horas podía ser que el producto adsorbido o atrapado dentro del biocatalizador tuviera un efecto inhibitorio en la reacción, como lo habían planteado previamente otros autores (Morán, 2005). Sin embargo sus experimentos con biocatalizadores usados demostraron que la cantidad de material adsorbido en el soporte no tiene un efecto considerable sobre la actividad catalítica.

Mora (2007) obtuvo curvas de saturación en hexano (tipo Michaelis Menten) para la hidrólisis de DL a distintas actividades acuosas iniciales para Lipozyme RM IM y Novozym 435. Sus resultados fueron muy interesantes, evidenciando que a altos valores de actividades acuosas, las curvas de saturación adquirieron un comportamiento sigmoidal. Las curvas sigmoidales son comunes para enzimas oligoméricas, sin embargo, se sabe que las lipasas son enzimas monoméricas, lo cual hizo que estos resultados sigmoidales fueran muy inusuales para esta clase de enzimas. Otros estudios (Torres, 2005) han demostrado que la aparición de curvas sigmoidales no es exclusiva de las enzimas oligoméricas, obteniendo curvas de saturación sigmoidales para la enzima monomérica cloroperoxidasa, sugiriendo que este comportamiento se debe a la formación de dímeros de sustrato los cuales pueden ser reconocidos y transformados por la enzima con mayor eficiencia. Mora adoptó la hipótesis de Torres (2007) para la hidrólisis de DL en hexano, suponiendo la formación de dímeros tanto de DL y/o de monoésteres. El

autor propuso que la lipasa de *Candida antarctica* es capaz de reconocer y hidrolizar a ambas formas de sustrato, siendo más eficiente la hidrólisis del sustrato en forma de dímero. Por lo tanto a bajas concentraciones de sustrato, la formación de dímeros no se ve promovida y las velocidades de reacción observadas son bajas, mientras que a altas concentraciones de sustrato, la formación de dímeros se ve favorecida, y por lo tanto la velocidad de hidrólisis aumenta rápidamente y causa el efecto tipo sigmoideal de la curva de saturación.

El autor también efectuó reacciones de hidrólisis en CO₂ supercrítico utilizando el biocatalizador Lipozyme RM IM. Sus resultados demostraron que la reacción sigue siendo favorecida a bajos valores de a_w , además de mostrar un considerable aumento en el rendimiento respecto a las reacciones efectuadas en hexano. El autor atribuyó este aumento a la menor hidrofobicidad del CO₂ supercrítico respecto al hexano, lo que le permitiría al CO₂ resorber agua de la superficie del biocatalizador, facilitándole el acceso del sustrato a los sitios activos.

CAPITULO IV

4. Materiales y métodos

4.1. Sustrato

Se trabajó con un extracto purificado de harina de flor de Cempasúchil, el cual fue proporcionado por Bioquimex Reka (Querétaro, México). Esta oleoresina esta constituida aproximadamente por un 85 % de diésteres de luteína, y 15 % de otros constituyentes mayoritariamente triacilglicéridos.

La luteína libre se obtuvo en la forma impura comercial distribuida por GNC (Estados Unidos) para fines nutracéuticos.

4.2. Enzima

La lipasas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Candida antártica* inmovilizadas (Lipozyme TL IM y Novozym 435 respectivamente) fueron donadas por la compañía Novo-México.

4.3. Disolventes y otros

-Isoctano grado reactivo analítico de Baker, 1-butanol, y acetato de vinilo grado reactivo analítico, adquiridos de Sigma-USA.

-Acetona, metano, etanol, y acetato de etilo grado reactivo HPLC, se adquirieron de Baker-México.

-Otros reactivos se adquirieron de casas conocidas y fueron de la mayor pureza disponible.

4.4. Equipos

-Cromatógrafo HPLC con detector de arreglo de diodos, marca Hewlett Packard serie 1100.

-Incubadora Innova 4330, New Brunswick Scientific

-Balanza analítica OHAUS modelo AP2105

-Congelador Revco modelo ULT390 marca Legaci

-Medidor de a_w , marca Rotronic

-Baño metabólico controlado Heto, modelo Cb-13-25E

-Agitadores magnéticos tipo thermolyne stir plate

-Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II equipado con un detector de ionización de flama (DIF) y una columna HP-20M

-Reactor de CO₂ supercrítico Filher S.A de C.V.

- Bateria de digestión y destilación Kjeldahl .

-Equipo para la determinación de área superficial BET (adsorción-desorción de nitrógeno) , marca Quantachrome Nova 4000 ubicado en el laboratorio 6617 del Instituto Mexicano del Petróleo.

4.5. Métodos

4.5.1 Reacción de referencia

La reacción de referencia tuvo como propósito evaluar la actividad catalítica específica del biocatalizador, en una reacción sencilla y reproducible que nos sirvió como control para poder comparar las actividades de biocatalizadores usados (necesario para poder calcular el tiempo de vida media del biocatalizador), así como para conocer si la cinética de reacción presentaba un comportamiento tipo Michaelis- Menten.

Esta reacción fue previamente establecida en el grupo de investigación y se basa en la transesterificación del acetato de vinilo con 1-butanol indicada en la figura 13 (Trujillo, 2005).

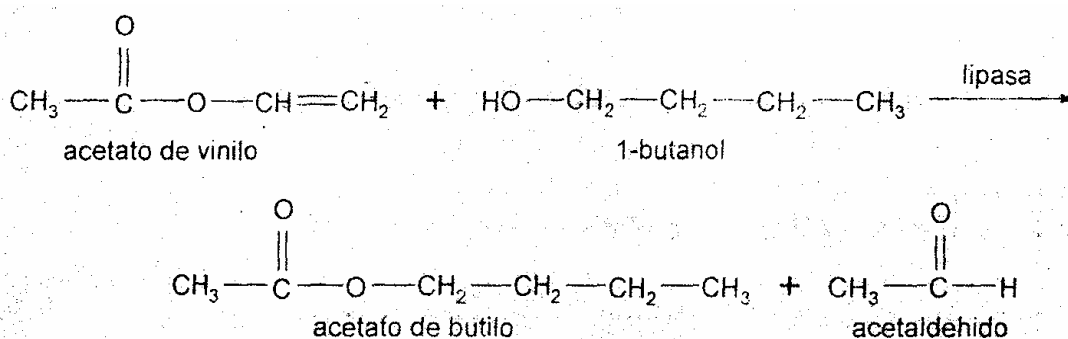


Figura 1. Reacción de referencia

Se midieron velocidades iniciales a diferentes concentraciones iniciales de sustrato para construir la gráfica de Michaelis-Menten.

A continuación se ejemplifica la metodología experimental utilizada para una concentración inicial de acetato de vinilo de 206 mM.

En un matraz aforado se agregaron 0.5 ml de acetato de vinilo (206 mM) y 0.3 ml de 1-butanol (147 mM) y se llevaron al aforo en un matraz de 25 ml con hexano. De este matraz, el contenido se vertió en dos matraces Erlenmeyer con rosca en cantidades iguales con el fin de tener un control. En uno de los dos matraces se agregaron 0.05 g de biocatalizador, con lo que se inició la reacción. La reacción se llevó a cabo a 45°C y a 210 rpm durante 10 minutos. Los intervalos de muestreo fueron de 2 minutos, en los cuales se tomaron muestras de 0.5 ml, las cuales se guardaron en refrigeración para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II equipado con un detector de ionización de flama y una columna HP-20M (C20M) 25 m×0.32mm×0.3µm de espesor de película. La columna fue mantenida a 35°C por tres minutos con una rampa de 10°C/minuto hasta 85°C. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 110°C y de 140°C respectivamente. El nitrógeno fue el gas acarreador a un flujo de 27.3 ml/min. Se

inyectó 1 μ L de cada una de las muestras y cada uno de los compuestos fue determinado en una curva estándar de área vs. concentración.

4.5.2. Determinación de la proteína total por mg de biocatalizador

Con el fin de poder expresar la actividad catalítica específica, y de esta forma poder comparar el desempeño de ambas enzimas, se determinó la cantidad de proteína presente en el biocatalizador. El método que se empleó fue el de Kjeldhal para nitrógeno total. Este método se aplicó para los biocatalizadores Lipozyme TL IM y Novozym 435. Para determinar el porcentaje de proteína, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% = (mlHCl_{muestra} - mlHCl_{Blanco}) \times \frac{0.1meqHCl}{ml} \times \frac{1meqN}{1meqHCl} \times \frac{0.014gN}{meqN} \times \frac{6.25gprot^*}{1gN} \times \frac{100}{0.1gmuestra}$$

* El factor de estimación de proteína utilizado fue de 6.25, lo que significa que suponemos que hay 6.25 g de proteína por g de nitrógeno.

4.5.3. Determinación de la estabilidad de Lipozyme TL IM

La estabilidad de un biocatalizador es muy importante para fines industriales. Los biocatalizadores son caros y mientras menos sea necesario sustituir al viejo biocatalizador, más viable económicamente será el bioproceso.

Para medir la estabilidad, se dejó al biocatalizador reaccionando con luteína en isoctano a una concentración 300 μ M a diferentes tiempos de exposición, los cuales fueron de 0, 1, 3, y 10 días. Posteriormente, se retiró el biocatalizador de la mezcla reaccionante, se lavó con acetona para remover compuestos adsorbidos, y se le midió su actividad en la reacción de referencia. Al graficar el logaritmo natural de las actividades respecto al tiempo, los datos presentaron una tendencia lineal de los cuales se calculó su pendiente (k) ajustando los datos un modelo lineal. Se procedió a calcular al vida media del biocatalizador con siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

4.5.4. Hidrólisis de DL en isoctano

González (2006) demostró que la hidrólisis de DL utilizando Novozym 435 y Lipozyme RM IM procede adecuadamente al utilizar como disolvente al isoctano. En base a estos resultados, se escogió como disolvente orgánico al isoctano (2,2,3 terbutil-pentano) para realizar la hidrólisis.

Los valores de a_w del biocatalizador fueron ajustados llevando al equilibrio de adsorción con soluciones salinas sobresaturadas. Se dejó al biocatalizador durante 64 horas en un desecador preevacuado a 5°C y expuesto a la presión parcial del agua generada por la solución salina. Antes de utilizar el biocatalizador se verificó el grado de hidratación con un sensor de humedad relativa. Los valores de a_w medidos para diferentes soluciones salinas saturadas se muestran en la tabla 5.

Sal	Actividad de agua (a_w)
LiCl	0.13
MgCl ₂	0.36
K ₂ CO ₃	0.47
Mg(NO ₃) ₂	0.56
NaCl	0.78
NH ₄ (SO ₄) ₂	0.81
K ₂ SO ₄	0.95

Tabla 1. Actividad del agua medida para distintas soluciones salinas (Greenspan, 1977)

Se ha demostrado que la reacción de hidrólisis de los DL es altamente dependiente de la actividad acuosa inicial del biocatalizador y las velocidades más altas son observadas a los menores valores de actividad acuosa (López, 2002; González, 2005; Mora, 2007).

En base a estos resultados, se decidió trabajar con un a_w de 0.13. Se realizó un experimento a un a_w de 0.4 y uno de 0.95 para asegurarse que el biocatalizador Lipozyme TL IM presentará el mismo comportamiento que Novozym 435 y Lipozyme RM IM.

Se siguió la metodología experimental propuesta por Mora (2007) para la hidrólisis enzimática de DL. Se eligió esta metodología debido a que las variables de reacción escogidas por el autor demostraron ser las adecuadas para obtener velocidades iniciales con reproducibilidad, además de permitirnos comparar sus resultados con los obtenidos en el presente estudio.

La metodología experimental fue la siguiente:

- 1) En un matraz aforado de 150 ml, se pesó la cantidad necesaria de sustrato y se llevó al aforo con isoctano anhídrido, obteniendo así la concentración inicial deseada.
- 2) Del matraz aforado se tomaron 20 ml que se añadieron a diferentes matraces con tapa de rosca de 50 ml, previamente cubiertos con papel aluminio (para evitar degradación del colorante por exposición a la luz)
- 3) Se agregaron 50 mg de biocatalizador (a los cuales se les ajustó el a_w previamente). Se taparon y se colocaron en la incubadora a 60°C y 130 rpm.
- 4) Cada 20 minutos las muestras fueron removidas y la fase líquida y el biocatalizador se separaron por decantación. El colorante adsorbido en el soporte de Lipozyme TL IM se recuperó lavando al biocatalizador 4 veces con 1 ml de acetona durante 5 minutos. Finalmente se juntaron la fase líquida previamente separada con la acetona de lavado, y se llevaron al aforo con isoctano en un matraz de 25 ml.
- 5) Se tomó un ml de cada muestra y se llevó a sequedad con N₂, después fueron redisueltas en 1 ml de una mezcla metanol/acetato de etilo 70:30 para su posterior análisis por HPLC.

Para cuantificar el progreso de la reacción se llevó a cabo el análisis por cromatografía de líquidos en fase reversa no acuosa. Se empleó una columna de RP₁₈ X-terra (150 ×4.6 D.I., mm; 5 µm) y una pre-columna con la misma fase. Como fase móvil se usó una mezcla metanol/acetato de etilo 70:30 (0.8 ml/min), se utilizó una bomba cuaternaria e inyección automática (10 µL). La detección se llevó a cabo con detector de arreglo de diodos ($\lambda = 446.8\text{-}510.8\text{nm}$).

4.5.5. Reacción en CO₂ supercrítico

La reacción se llevó a cabo en CO₂ supercrítico, a una presión de 5000 psi, una temperatura de 60°C, un a_w de 0.13, un volumen de reacción de 100 ml y una concentración inicial de 0.5mg/ml de DL. La duración de la reacción fue de 4 horas, utilizando 2.5 gramos de Lipozyme TL IM por litro de volumen de reacción. Para efectos comparativos, se efectuó la misma reacción en isoctano a las mismas condiciones y a un volumen de reacción de 20 ml.

4.5.6. Adsorción de DL y de luteína libre

Para obtener luteína libre con la mayor pureza posible, se efectuó un tratamiento especial a las cápsulas de luteína (forma comercial distribuida por GNC). La metodología del tratamiento fue la siguiente:

1. El contenido de 5 cápsulas se depositó en un matraz de 200 ml.
2. El contenido de las cápsulas esta compuesto de unos pequeños gránulos anaranjados mezclados con restos de hojas. Los restos de hojas relativamente grandes fueron separados manualmente.
3. Se depositaron los gránulos (con mínimos restos de hojas) en un matraz de 50 ml.
4. Experimentos (información no reportada) hechos por cromatografía de líquidos de alta resolución demostraron que la mezcla contiene impurezas (residuos de aceite, grasas u otros compuestos) en concentraciones detectables que podrían influir en la calidad del experimento. Otros análisis (información no reportada) concluyeron que estas impurezas son mucho más solubles en hexano que la luteína, indicando que se pueden separar por extracción. Por lo tanto se adicionaron 10 ml de hexano, se agitó durante 5 minutos y se eliminó por decantación la fase líquida. Una gran cantidad de luteína se perdió disuelta en el hexano, pero los gránulos que no se solubilizaron demostraron tener una alta concentración de luteína.
5. Para separar a la luteína de los pequeños residuos de hojas, se agregaron 40 ml de acetona a los gránulos que no se disolvieron en hexano, se agitó durante 10 minutos, se separó la acetona con la luteína disuelta por decantación y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso.
6. La luteína libre obtenida se almacenó en el congelador Revco a -70°C en un matraz de 50 ml, envuelto en papel de aluminio y sellado con parafina (el tiempo de almacenamiento no fue mayor de 24 h).

Para cuantificar la cantidad de colorante adsorbido en el biocatalizador en función del a_w del biocatalizador, se siguió la siguiente metodología:

- 1) En un matraz aforado de 200 ml, se pesó la cantidad de DL o luteína libre necesaria y se llevó al aforo con isoctano.
- 2) Del matraz aforado se tomaron 20 ml que se añadieron a diferentes matraces con tapa de rosca de 50 ml, previamente cubiertos con papel aluminio.
- 3) Se desactivó el biocatalizador en autoclave durante 1 hora a 121°C.
- 4) Se ajustó el a_w del biocatalizador desactivado ya sea a 0.95 o 0.13.
- 5) Se agregaron 50 mg de biocatalizador desactivado en cada matraz, se taparon y se incubaron a 60°C y 130 rpm.
- 6) En los minutos 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 120 las muestras se separaron por decantación en la fase líquida y sólida (soporte de biocatalizador).
- 7) El soporte con colorante adsorbido fue lavado con 2 ml de acetona 5 veces; el último lavado se efectuó a 50°C.
- 8) Se tomó un ml de acetona con colorante de cada muestra y se llevó a sequedad con nitrógeno gaseoso; después fue redisuelta en 1 ml de una mezcla metanol/acetato de etilo 70:30 para ser analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Tanto para luteína como para DL, los experimentos se efectuaron a un a_w de 0.13 utilizando isoctano anhídrido y a un a_w de 0.95 utilizando isoctano saturado con agua.

4.5.7. Determinación del área superficial BET

Se midió el área superficial BET de los biocatalizadores Novozym 435 así como Lipozyme TL IM en el laboratorio 6617 del Instituto Mexicano del Petróleo, utilizando el equipo Quantachrome Nova 4000 automated gas sorption system.

Los parámetros de reducción del modelo fueron los siguientes:

Transpiración termal: encendida

Diámetro efectivo de la molécula (adsorbato) : 4 Å

Diámetro interno efectivo de la celda: 1 mm

Constante de interacción (K) : 2.96 nm³ kJ mol⁻¹

Los parámetros del adsorbato fueron los siguientes:

Compuesto: nitrógeno

Temperatura del adsorbato : 77.35 K

Peso molecular: 28.0135 g mol⁻¹

Área seccional: 16.2 Å² / molécula

Densidad estado líquido: 0.813 g cm⁻³

Temperatura crítica: 126 K

Presión crítica: 33.5 atm

Diámetro promedio: 0.3 nm

Polarización: 1.46 cm³ por molécula ×10⁻²⁵

Susceptibilidad magnética: 2 cm³ por molécula ×10⁻³⁰

Densidad molecular: 6.7 moléculas cm⁻² ×10¹³

Tensión superficial: 8.85 erg cm⁻²

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

- Área superficial BET
- Diámetro promedio de poro
- Volumen total de poro

CAPITULO V

5. Resultados

5.1. Determinación del porcentaje de proteína del biocatalizador

Utilizando el método de Kjeldhal , se obtuvieron los siguientes resultados :

	Lipozyme TL IM	Novozym 435
% de proteína	7.87	4.37

Tabla 1. Porcentaje de proteína en Lipozyme TL IM y Novozym 435

5.2. Reacción de referencia

Se obtuvo la curva patrón de acetato de butilo para el cromatógrafo de gases la cual se muestra en la figura 14:

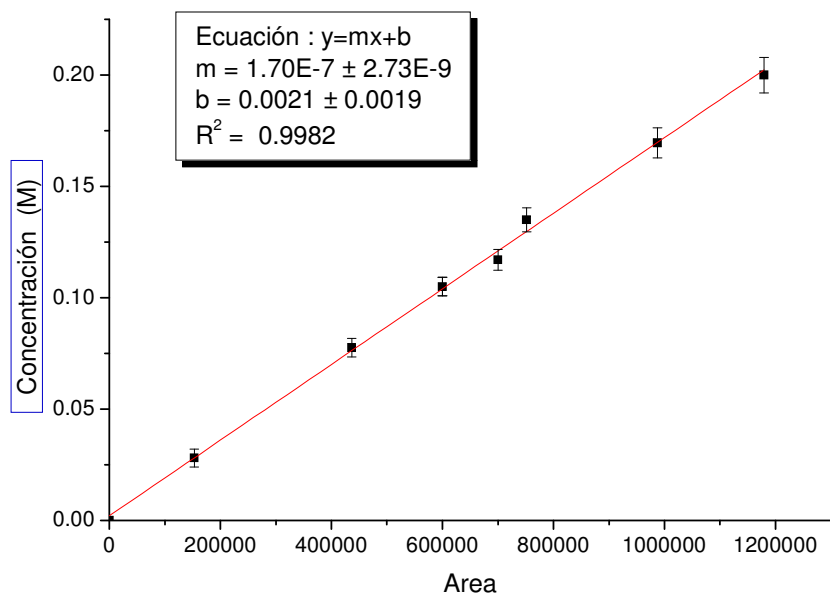


Figura 1 . Curva patrón de acetato de butilo. Cromatógrafo de gases

Se obtuvieron velocidades iniciales de formación de acetato de butilo respecto al tiempo (Figura 15).

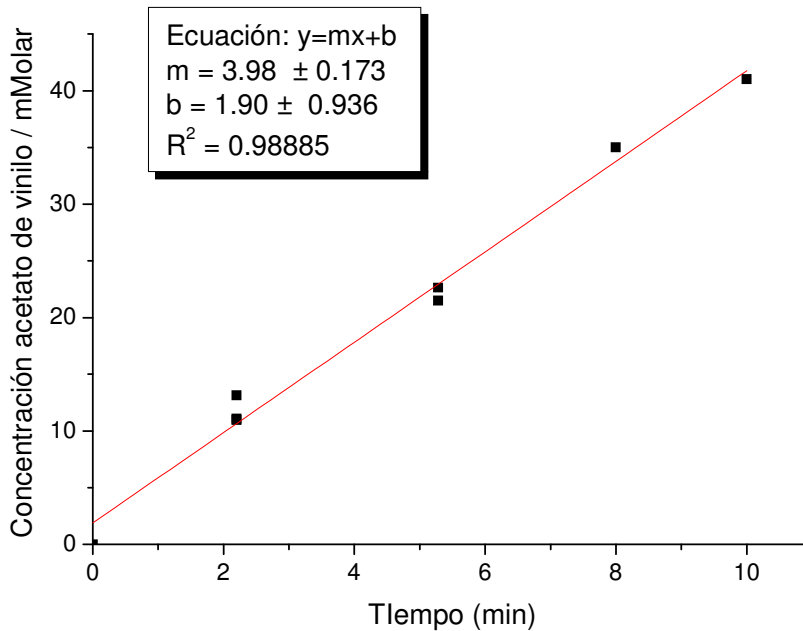


Figura 2. Concentración de acetato de butilo vs. tiempo de reacción.

Hexano, $a_w = 0.4$; 45°C, 210 rpm;

inicial de 206 mM de acetato de vinilo y 147 mM de 1-butanol

Lipozyme TL IM;

Concentración

A partir de la cantidad de biocatalizador utilizada, el volumen de reacción y el porcentaje de proteína presente en el biocatalizador, se calculó la actividad catalítica específica (act) que fue de:

$$\text{act} = 3.98 \text{ mMol/min} \times 1000 \mu\text{mol/1 mmol} \times 0.0125 \text{ L} / (50 \text{ mg} \times 0.0787)$$

$$\text{act} = 12.64 \pm 1.26 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ (actividad por mg de proteína)}$$

En la figura 16 se presenta la funcionalidad de la concentración inicial de sustrato (acetato de vinilo) con la actividad específica obteniendo una curva con forma de hipérbola tipo Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos aparentes se obtuvieron efectuando un ajuste no lineal del modelo de Michaelis-Menten a los datos experimentales.

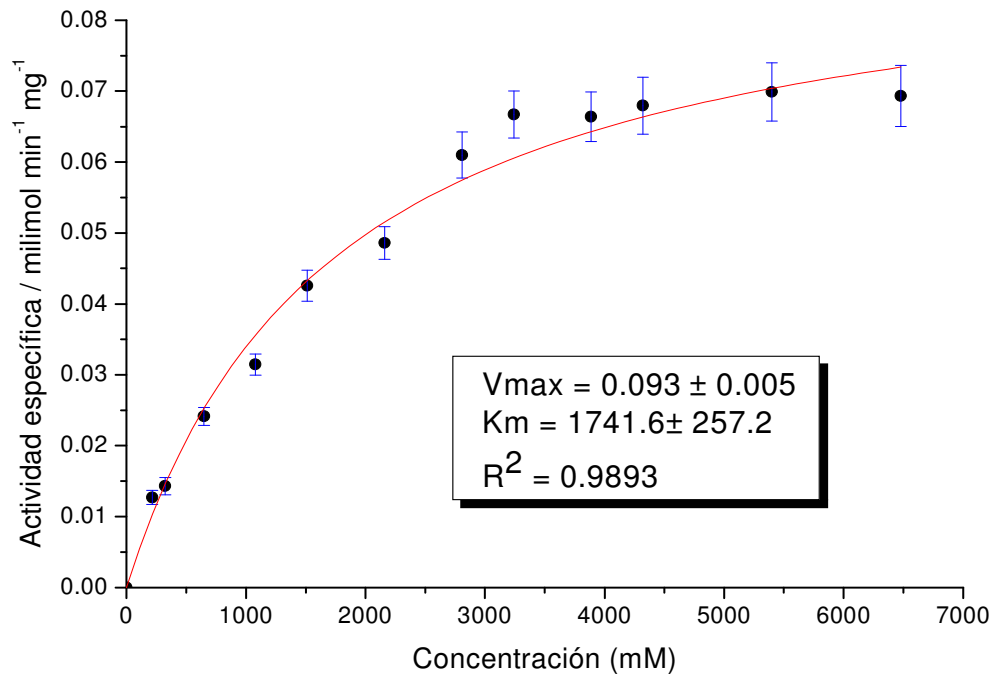


Figura 3. Curvas de velocidades iniciales a distintas concentraciones iniciales de acetato de vinilo Lipozyme TL IM ; Hexano, $a_w = 0.4$; 60°C, 210 rpm

Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos por Trujillo (2005) al utilizar Novozym 435 para la misma reacción en la figura 17.

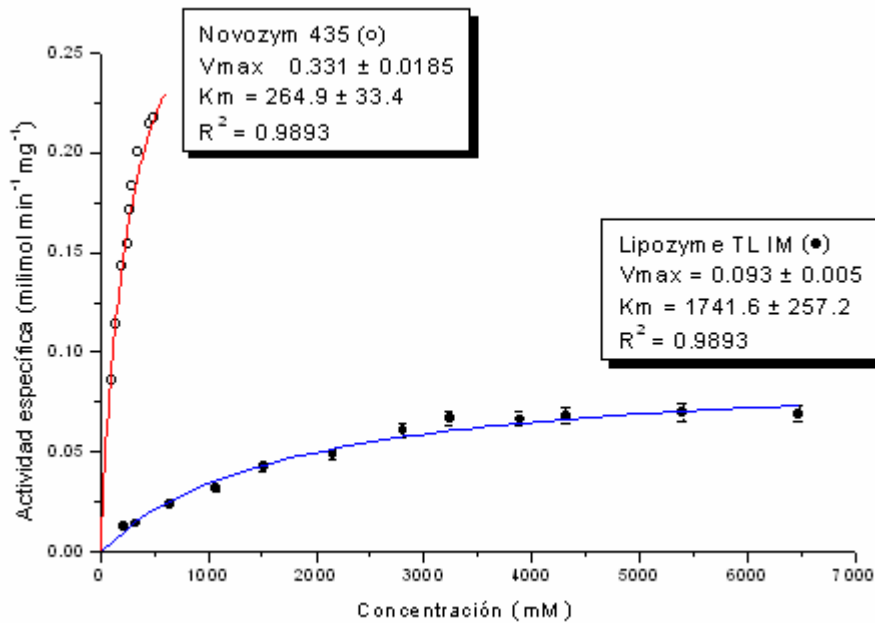


Figura 4. Curvas de velocidades iniciales a distintas concentraciones iniciales de acetato de vinilo Lipozyme TL IM y Novozym 435; Hexano, $a_w=0.4$; 60°C, 210 rpm

En la tabla 7 se muestran los parámetros cinéticos aparentes obtenidos en este estudio y los calculados para Novozym 435 a partir de los datos de la literatura (Mora, 2007):

	kM_{ap} (mM)	Actividad catalítica específica máxima ($\text{milimol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Eficiencia catalítica ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Lipozyme TL IM	1741.6 ± 257.2	0.093 ± 0.005	$4.27 \times 10^{-3} \pm 4.3 \times 10^{-4}$
Novozym 435 (Mora, 2008)	264.9 ± 33.4	0.331 ± 0.0185	$1.00 \times 10^{-1} \pm 1.1 \times 10^{-2}$

Tabla 2. Parámetros cinéticos aparentes de la reacción de referencia para Novozym 435 y lipozyme TL IM

5.3. Estabilidad de Lipozyme TL IM

Los resultados de actividad residual se ilustran en la figura 18:

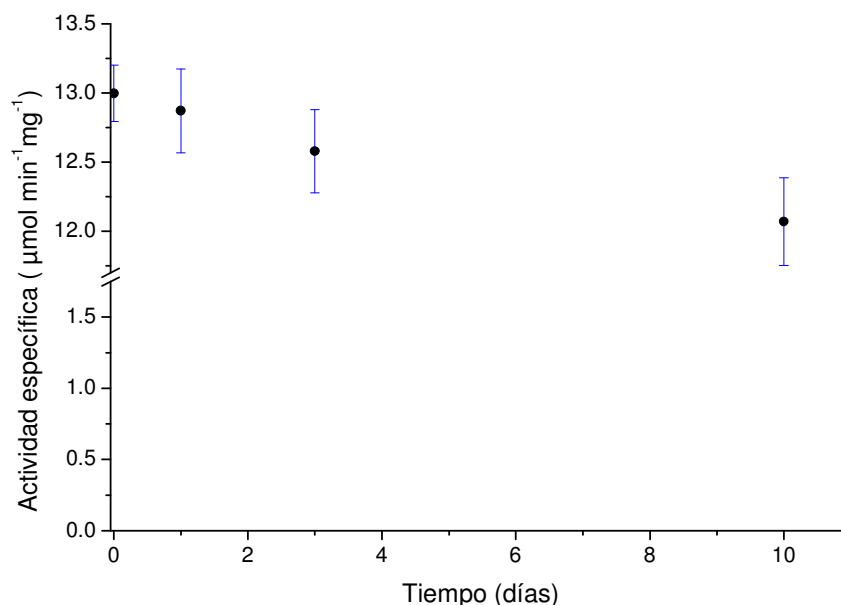


Figura 5. Actividad catalítica específica residual vs. Tiempo ; Reacción de referencia Lipozyme TL IM, $a_w=0.4$; 60°C, 210 rpm

Graficando el logaritmo natural de la actividad vs. el tiempo obtenemos la siguiente gráfica:

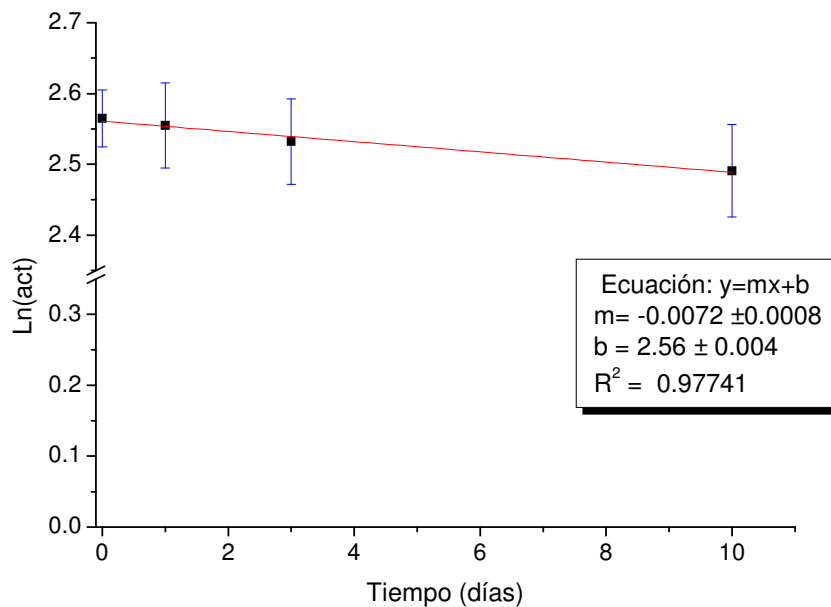


Figura 6. Logaritmo natural de la actividad catalítica específica vs. tiempo
Lipozyme TL IM, $a_w = 0.4$; 60°C, 210 rpm

Por lo tanto la vida media del biocatalizador es :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} = \frac{0.693}{0.0072} = 96.25 \pm 10 \text{ días}$$

5.4. Hidrólisis de diésteres de luteína en isoctano

La curva patrón de DL obtenida por HPLC se muestra en la figura 20 .

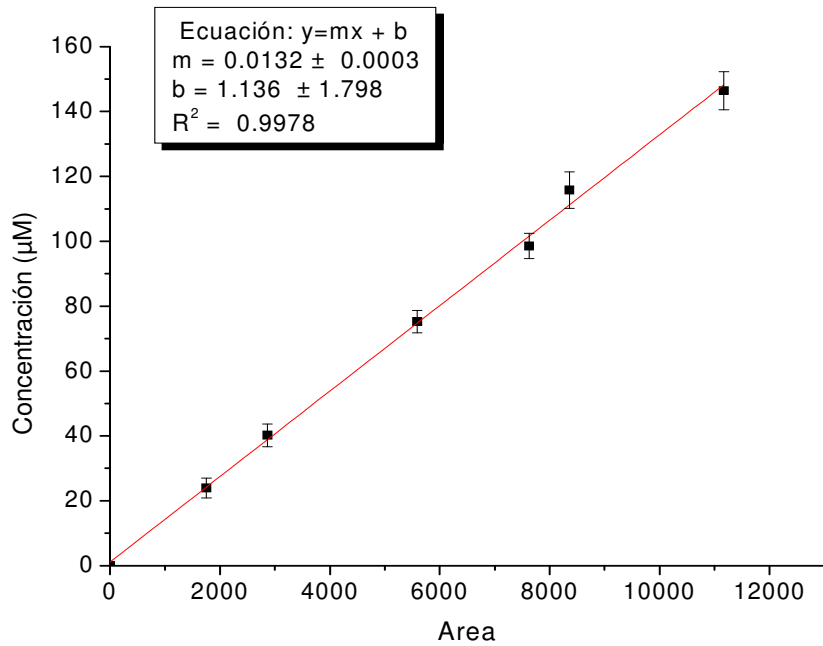


Figura 7. Curva patrón de DL por HPLC

La reacción de hidrólisis de DL se llevó a cabo a distintos valores de a_w (0.13, 0.44 y 0.95) y a una concentración inicial de DL de 375 µM (figura 21).

Modelo: $y = mx + b$	
$a_w = 0.95$	$m = -1.83 \pm 0.61$
	$b = 373.2 \pm 0.7$
	$R^2 = 0.72283$
$a_w = 0.44$	$m = -4.55 \pm 0.90$
	$b = 372.29 \pm 0.82$
	$R^2 = 0.89383$
$a_w = 0.13$	$m = -13.51 \pm 1.14$
	$b = 372.64 \pm 1.46$
	$R^2 = 0.97905$

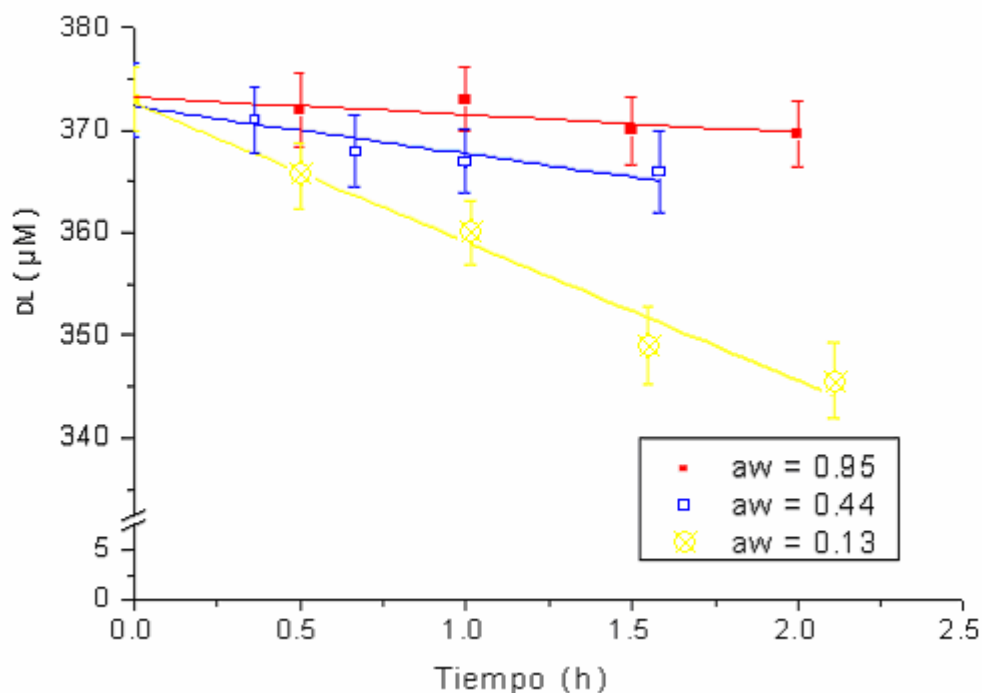


Figura 8. Concentración de DL vs. tiempo a diferentes a_w

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; Concentración inicial de sustrato de 375μM

Considerando que se utilizaron 50 mg de biocatalizador, las velocidades iniciales por mg de biocatalizador para cada a_w fueron las siguientes:

Actividad acuosa inicial	Velocidad inicial ($\mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
0.13	0.27 ± 0.028
0.44	0.091 ± 0.018
0.95	0.037 ± 0.012

Tabla 3. Velocidades iniciales por mg de biocatalizador para distintas actividades acuosas

Lipozyme TL IM, $a_w = 0.13$, Isoctano, 60°C; 130 rpm

La velocidad inicial de hidrólisis de DL en isoctano utilizando Lipozyme TL IM fue mayor a valores de a_w bajos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la literatura. (López, 2002; González, 2006; Mora, 2007). Todos los siguientes experimentos de hidrólisis de DL se efectuaron a un a_w de 0.13.

Posteriormente se efectuaron un total de 11 experimentos a distintas concentraciones iniciales de sustrato para obtener curvas de velocidad inicial de hidrólisis de DL a un a_w de 0.13. A

continuación se presentan las cinéticas obtenidas para una concentración inicial de DL de 36 127, 195, 760 y 1026 μM (figuras 22 a 26) :

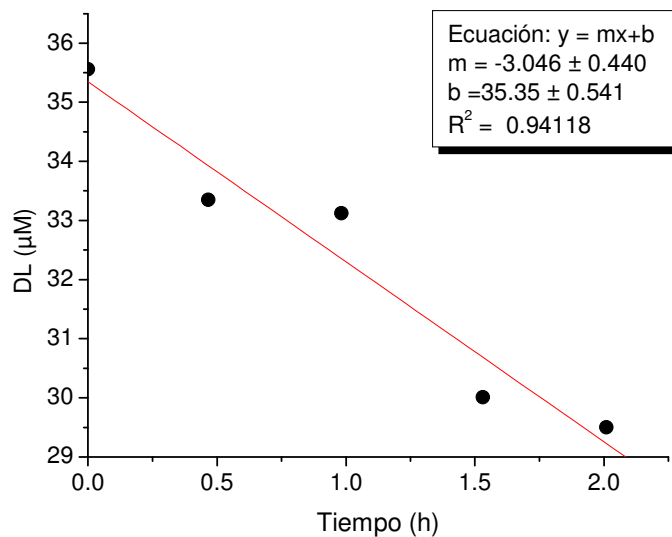


Figura 9. Concentración de DL vs. tiempo

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; $a_w = 0.13$; Concentración inicial de DL = 35.5 μM

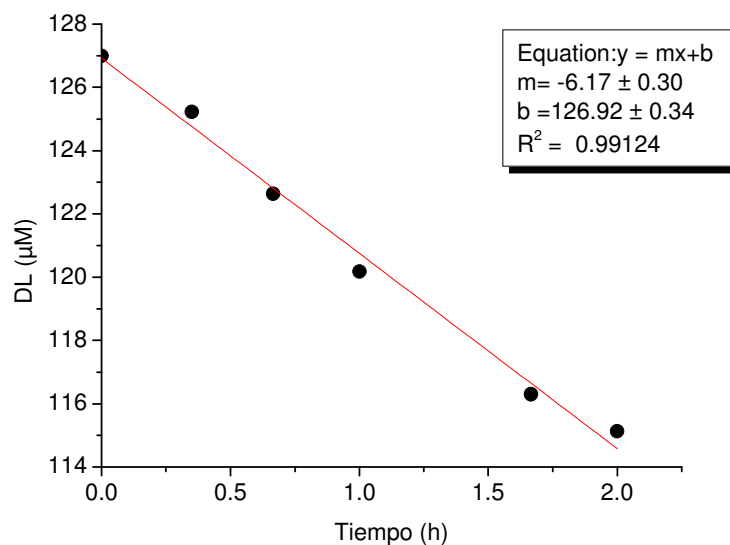


Figura 10. Concentración de DL vs. tiempo

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; $a_w = 0.13$; Concentración inicial de DL = 127 μM

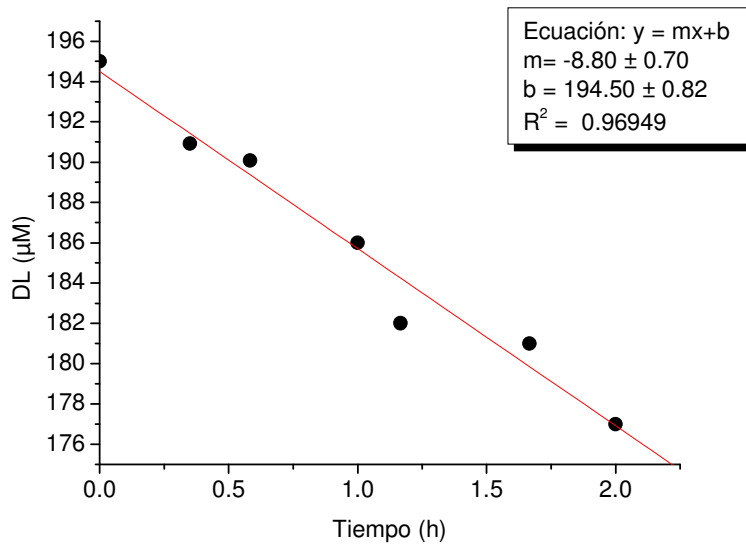


Figura 11. Concentración de DL vs. tiempo

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; $a_w = 0.13$; Concentración inicial de DL = 195 μM

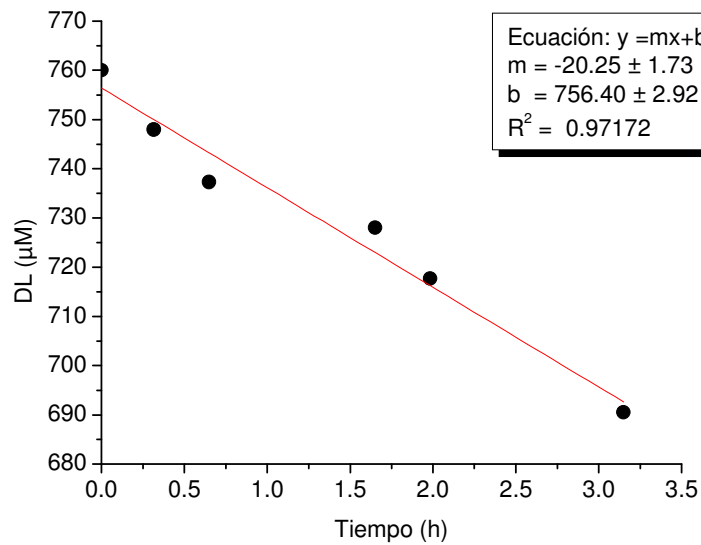


Figura 12. Concentración de DL vs. tiempo

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; $a_w = 0.13$; Concentración inicial de DL = 760 μM

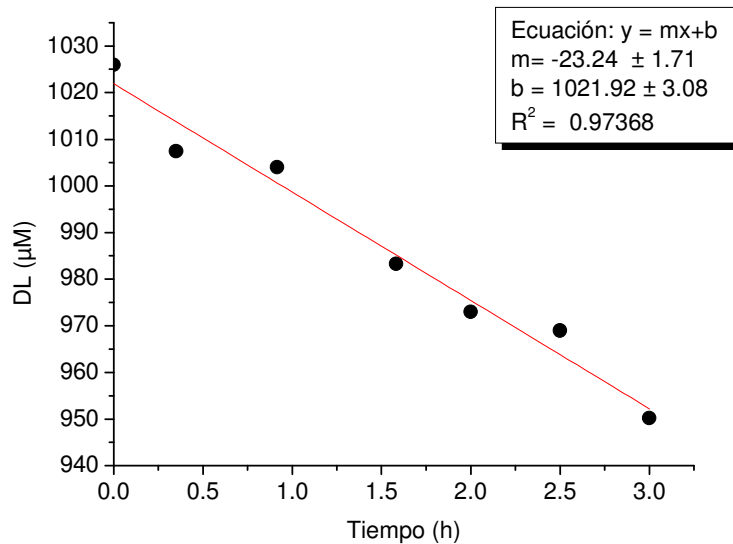


Figura 13. Concentración de DL vs. tiempo

Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; $a_w = 0.13$; Concentración inicial de DL = 1026 μM

También se obtuvieron cinéticas como las ilustradas en las figuras 22 a 26 para concentraciones iniciales de DL de 16, 26, 220, 529, 931, 1181 μM .

A partir de los 11 resultados de velocidades iniciales obtenidos como se ejemplificó en las figuras 22 a 26, se calcularon sus respectivas actividades catalíticas iniciales específicas aparentes, las cuales se definen como la cantidad de moles de sustrato que reaccionan por unidad de tiempo por mg. de enzima.

La metodología de cálculo que se siguió para obtener la actividad catalítica específica inicial aparente para el experimento efectuado a un a_w de 0.13 ilustrado en la figura 21 fue la siguiente:

Pendiente = velocidad inicial = $13.51 \mu\text{M hr}^{-1}$

El volumen de reacción fue de 20 ml, y se utilizaron 50 mg de biocatalizador.

El porcentaje de proteína para Lipozyme TL IM fue de 7.87 % (tabla 6) por lo tanto los mg de proteína fueron iguales a :

$$\text{mg proteína} = 50\text{mg} \times 0.07875 = 3.94\text{mg}$$

Por lo tanto la actividad inicial específica aparente es:

$$\text{Act} = 13.51 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L hr}} \times 20\text{ml} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} \times \frac{1}{3.94\text{mg}} = 0.0686 \mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$$

Al graficar las 11 actividades iniciales específicas aparentes respecto a la concentración inicial de sustrato se obtuvo una gráfica tipo Michaelis-Menten que se muestra a continuación:

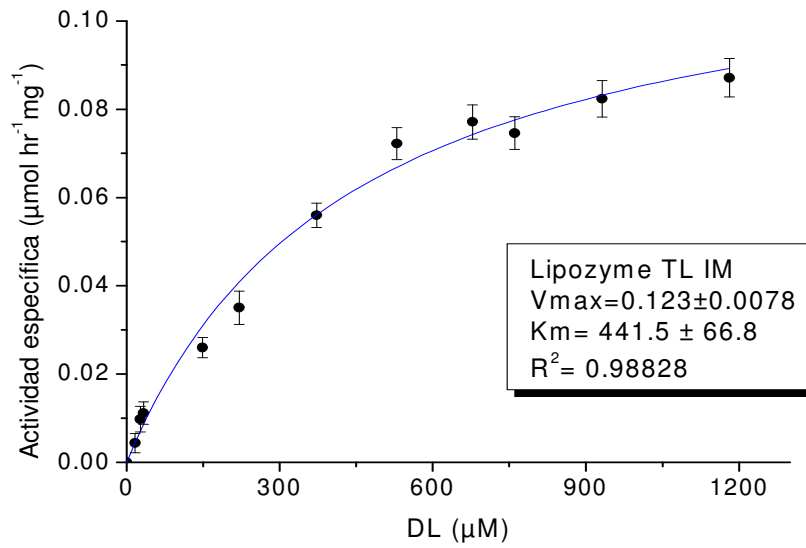


Figura 14. Curva de actividades específicas iniciales basadas en mg de proteína a distintas concentraciones iniciales de DL.

Lipozyme TL IM, aw =0.13, Isoctano, 60°C; 130 rpm

La gráfica obtenida se comparó con la gráfica de saturación calculada a partir de los datos reportados en la literatura para Novozym 435 en hexano a las mismas condiciones que en este trabajo (Mora, 2007) (Figura 28).

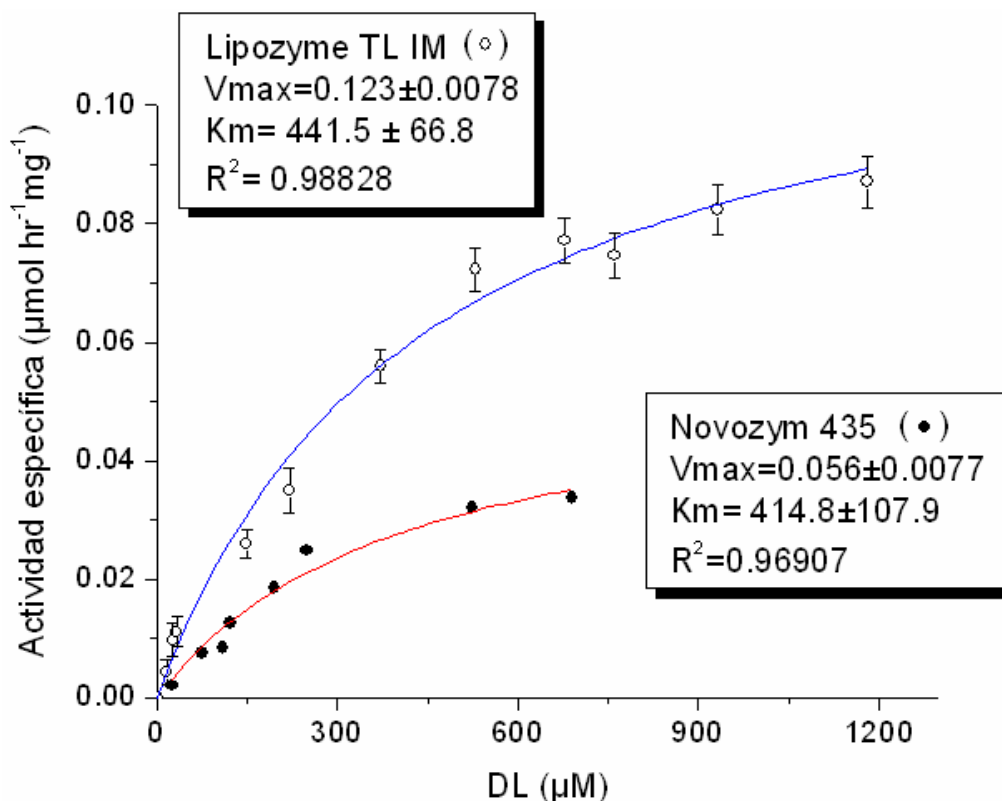


Figura 15. Curva de actividades específicas iniciales a distintas concentraciones iniciales de DL. Lipozyme TL IM, $a_w=0.13$, Isoctano, 60°C; 130 rpm.

Novozyme 435; $a_w=0.13$; Hexano, 60°C; 130 rpm

	kM_{ap} (μM)	Actividad catalítica específica máxima (μmol hr ⁻¹ mg ⁻¹)	Eficiencia catalítica (hr ⁻¹ mg ⁻¹)
Lipozyme TL IM	441.5 ± 66.8	0.123 ± 0.0078	$2.79 \times 10^{-4} \pm 4.6 \times 10^{-5}$
Novozym 435	414.8 ± 107.9	0.056 ± 0.0077	$1.35 \times 10^{-4} \pm 3.95 \times 10^{-5}$

Tabla 4. Parámetros cinéticos aparentes para la hidrólisis de DL

Lipozyme TL IM, $a_w=0.13$, Isoctano, 60°C; 130 rpm.

Novozyme 435; $a_w=0.13$; Hexano, 60°C; 130 rpm

5.5. Reacción de hidrólisis de luteína en CO₂ supercrítico

La reacción se llevó a cabo en CO₂ supercrítico, a una presión de 5000 psi, una temperatura de 60°C, un a_w de 0.13, un volumen de reacción de 100 ml y una concentración inicial de 0.5 mg/ml de DL. La duración de la reacción fue de 4 horas, utilizando 2.5 gramos de Lipozyme TL IM por litro de volumen de reacción. Para efectos comparativos, se llevó a cabo la misma reacción en

isooctano a las mismas condiciones y a un volumen de reacción de 20 ml. El resultado de conversión total de DL en CO₂ supercrítico fue el siguiente:

Disolvente	Conversión total de DL (%)
CO ₂ supercrítico	12
Isooctano	11.7

Tabla 5. Porcentaje de conversión de DL; 60°C ; a_w 0.13; Lipozyme TL IM, tiempo de reacción de 4 horas, [Sustrato]= 0.5mg/ml, [biocatalizador] =2.5mg/ml

5.6. Adsorción de DL y de luteína libre en Lipozyme TL IM

5.6.1. Adsorción de DL en Lipozyme TL IM

Los perfiles de adsorción de DL por mg de biocatalizador fueron los siguientes:

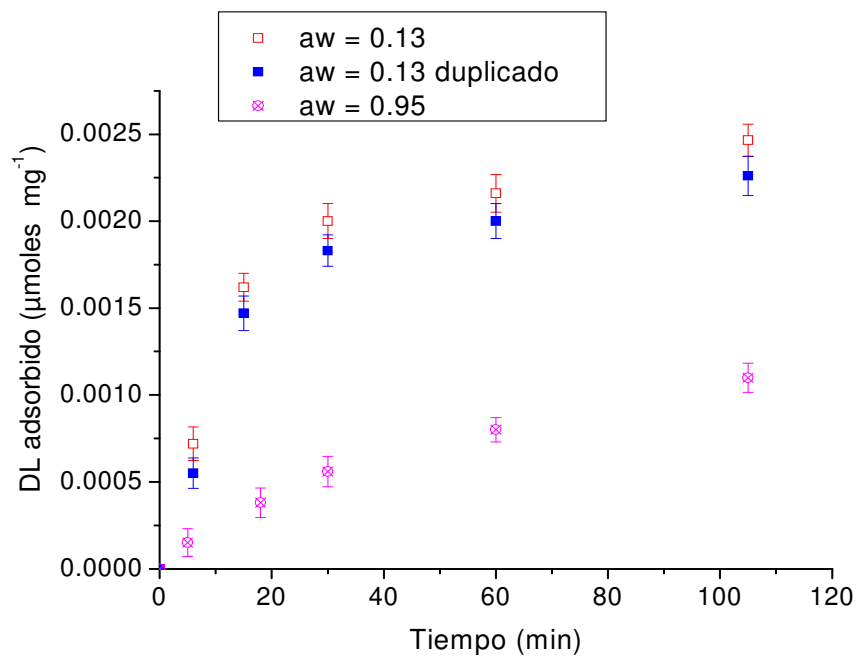


Figura 16. Perfiles de adsorción de DL por mg de biocatalizador a diferentes a_w Lipozyme TL IM; Isooctano, 60°C; 130 rpm ; Concentración 395 μM

Para calcular las velocidades iniciales de adsorción, se graficó solamente los datos que presentaron tendencia lineal respecto al tiempo, obteniendo la gráfica 30.

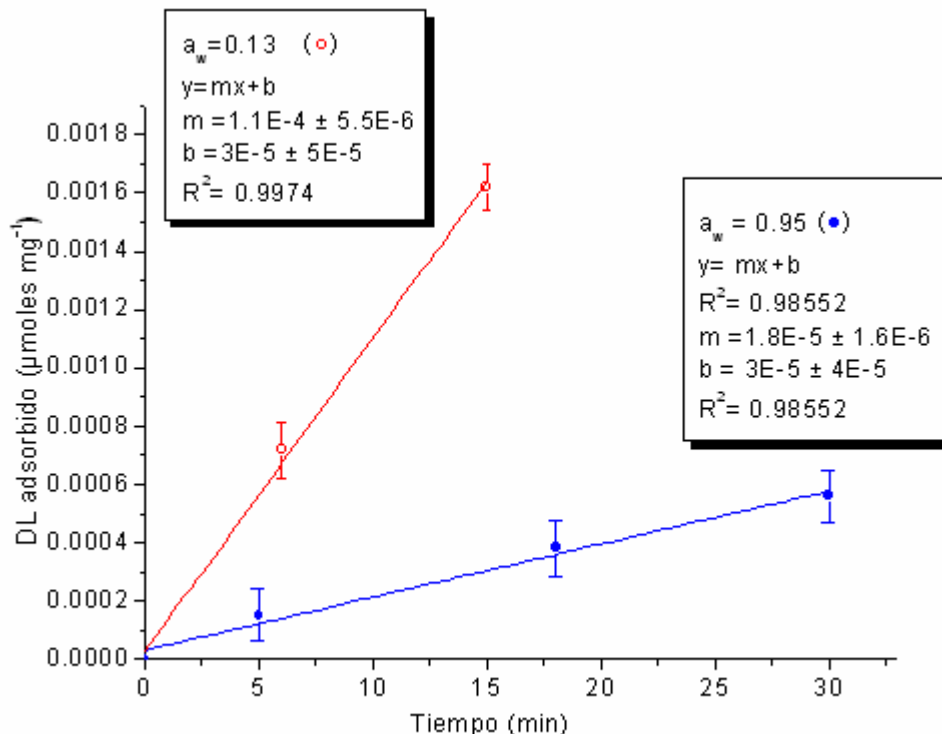


Figura 17. Perfiles de adsorción inicial de DL por mg de biocatalizador a diferentes a_w ; Lipozyme TL IM; Isoctano, 60°C; 130 rpm; Concentración 395 μM

Tomando en cuenta que el volumen de reacción fue de 20 ml, la velocidad inicial de adsorción de DL por mg de biocatalizador a un a_w de 0.13 en isoctano, utilizando una concentración inicial de sustrato de 395 μM fue :

$$\frac{0.000107 \frac{\mu\text{moles diester}}{\text{mg biocat. min}}}{20\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{1\text{L}} \times \frac{60\text{min}}{1\text{hr}} = 0.31 \mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$$

Aplicando el mismo cálculo para el experimento hecho a un a_w de 0.95, se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales de adsorción respecto al a_w :

a_w	Velocidad inicial de adsorción (duplicado A) ($\mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
0.13	0.31 ± 0.0165
0.95	0.042 ± 0.0048

Tabla 6. Velocidades iniciales de adsorción de DL a diferentes a_w .
Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; Concentración 395 μM

5.6.2. Adsorción de luteína libre en Lipozyme TL IM

Los perfiles de adsorción de luteína libre fueron los siguientes:

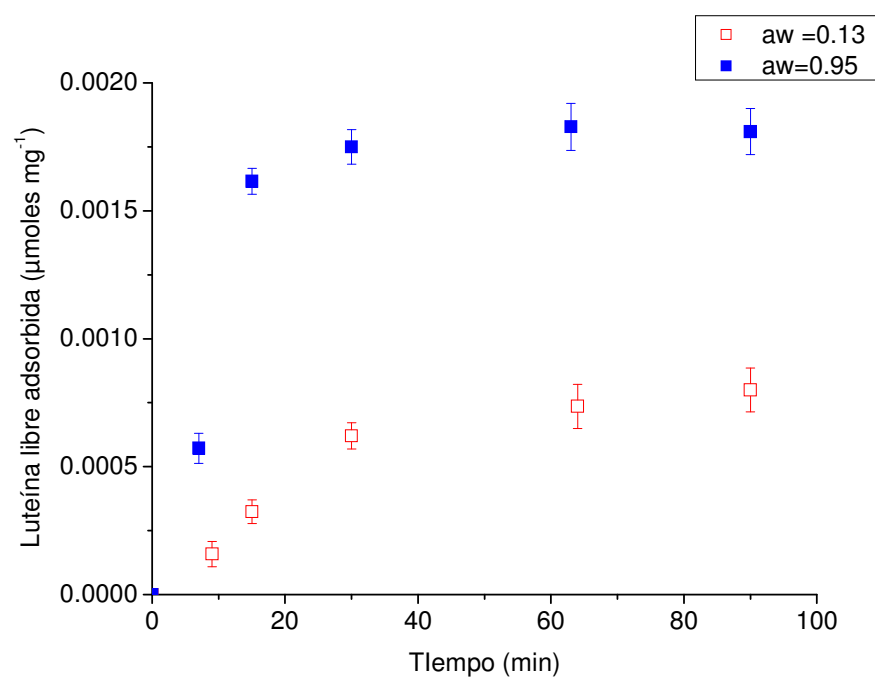


Figura 18. Perfiles de adsorción de luteína libre por mg. de biocatalizador a diferentes a_w .
Lipozyme TL IM; Isoctano, 60°C; 130 rpm; Concentración 32 μM

Para calcular las velocidades iniciales de adsorción de luteína libre, se graficaron solamente los datos que presentaron tendencia lineal respecto al tiempo (figura 32).

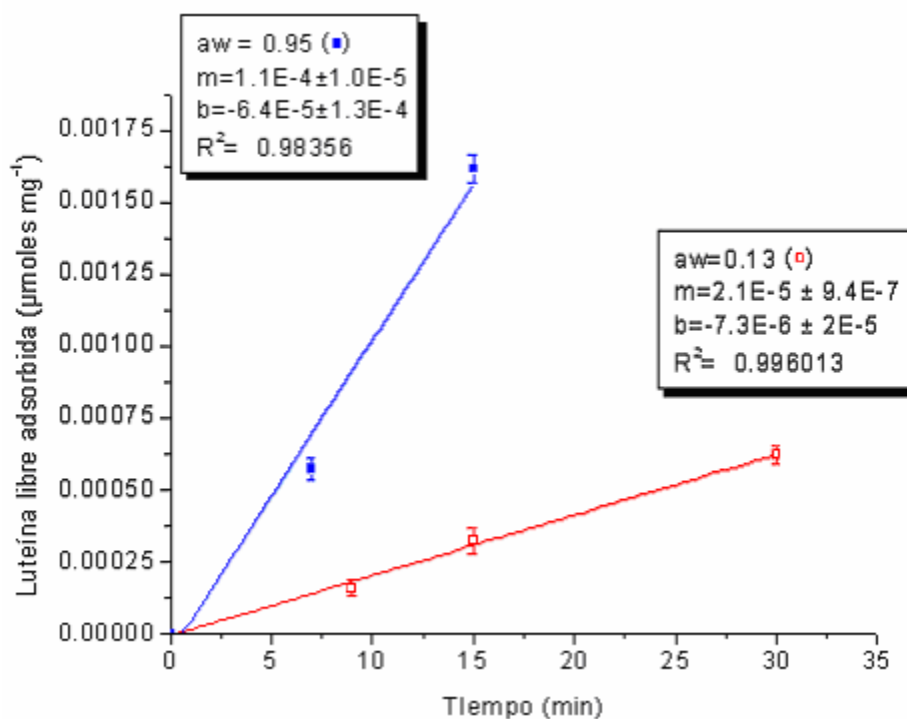


Figura 19. Perfiles de adsorción inicial de luteína libre por mg. de biocatalizador a diferentes a_w Lipozyme TL IM; Isoctano, 60°C; 130 rpm; Concentración 32 μ M

Efectuando el mismo procedimiento de cálculo que en el inciso 5.6.1. , se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales de adsorción de luteína libre:

a_w	Velocidad inicial de adsorción de luteína ($\mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
0.13	0.063
0.95	0.324

Tabla 7. Velocidades iniciales de adsorción de luteína libre a diferentes a_w Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm; Concentración 32 μ M

5.7. Área superficial BET de Lipozyme TL IM

Se obtuvieron isothermas de adsorción de BET (Brunauer, Emmett and Teller) tanto para Lipozyme TL IM como para Novozym 435 (figuras 33 y 34)

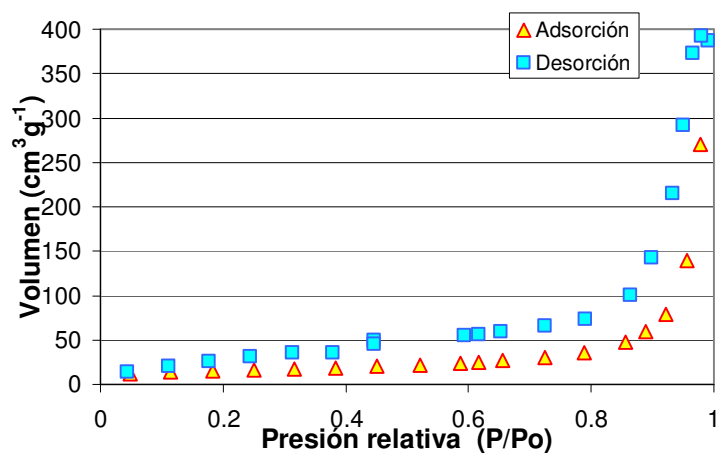


Figura 20. Isoterma de adsorción-desorción de BET para Lipozyme TL IM

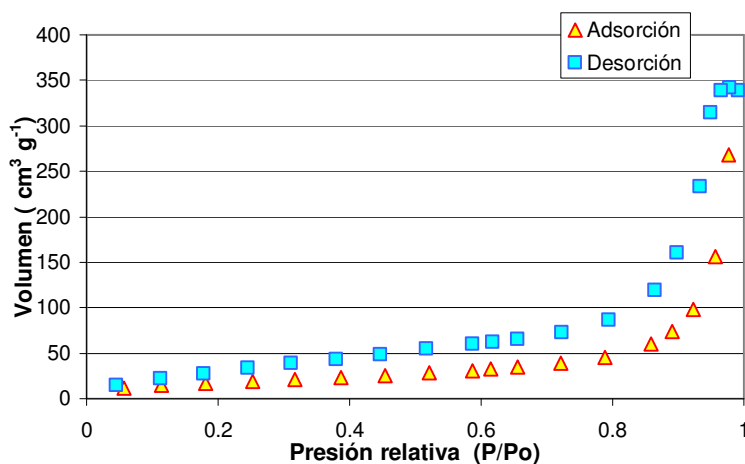


Figura 21. Isoterma de adsorción-desorción de BET para Novozym 435

Los resultados de área superficial, volumen de poro y tamaño de poro obtenidos para ambos biocatalizadores se presentan en la tabla 13:

	Lipozyme TL IM	Novozym 435
Area superficial BET ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	53.17	64.86
Volumen total de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0.594	0.52
Diámetro promedio de poros (Å)	447.5	320.8

Tabla 8. Resultados de superficie total, volumen total de poro y diámetro promedio de poro Lipozyme TL IM y Novozym 435

5.8. Micrografías electrónicas de Lipozyme TL IM y Novozym 435

Las micrografías electrónicas mostradas a continuación fueron obtenidas amablemente por el personal del laboratorio de Microscopía Electrónica USAI de la Facultad de Química.

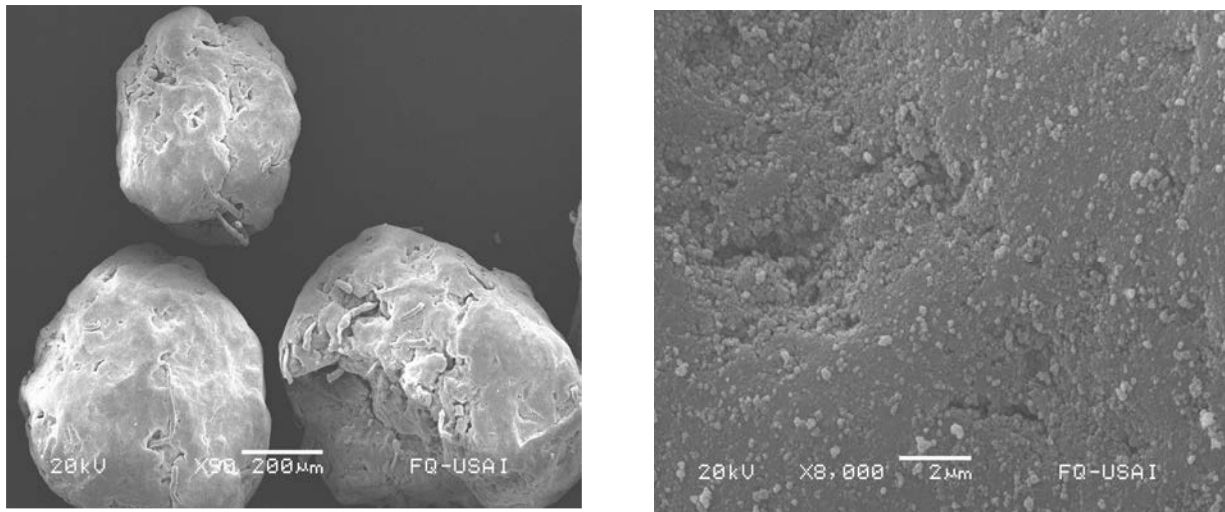


Figura 22. Micrografías electrónicas de Lipozyme TL IM

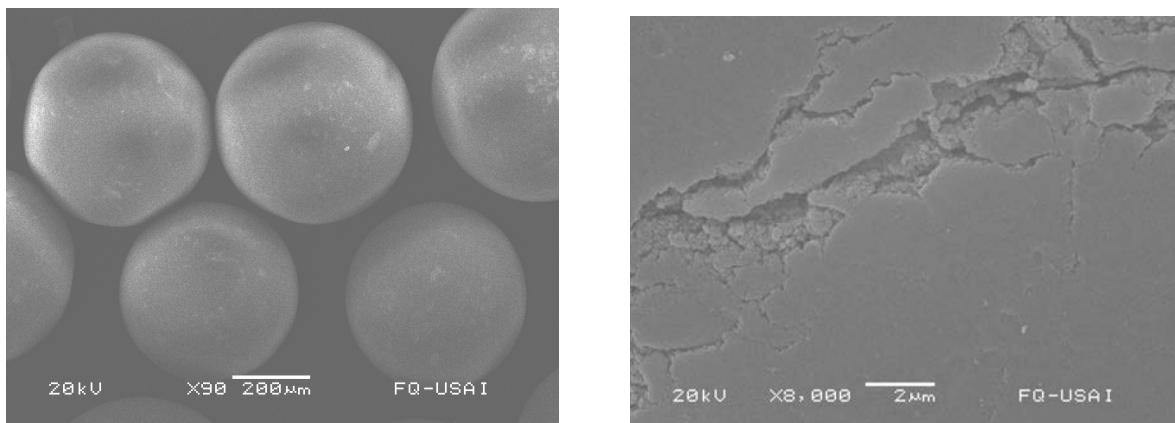


Figura 23. Micrografías electrónicas de Novozym 435

CAPITULO VI

6. Análisis de resultados

6.1. Gráfica de referencia

En las figura 16 y 17, en la reacción transesterificación de acetato de vinilo con 1-butanol, se observó que Lipozyme TL IM presentó un comportamiento tipo Michaelis-Menten, y que su eficiencia catalítica fue un orden de magnitud menor que la reportada en la literatura para Novozym 435 (Trujillo, 2005). Se cumplieron los objetivos de esta reacción de comprobar si se observaba un comportamiento tipo Michaelis-Menten al utilizar el biocatalizador de Lipozyme TL IM, así como servir como referencia para calcular la vida media del biocatalizador. Es importante resaltar que Lipozyme TL IM presentó una menor eficiencia catalítica que Novozym 435 para la reacción de referencia, y sin embargo presentó una mayor eficiencia catalítica que Novozym 435 para la hidrólisis de DL. Aunque las enzimas contenidas en Lipozyme TL IM y Novozym 435 son ambas lipasas y relativamente muy similares, su especificidad, sus condiciones óptimas de reacción, y otras variables que las afectan pueden ser muy diferentes, dando como resultado un mejor desempeño que la otra para algunas reacciones.

6.2. Vida media de Lipozyme TL IM

La vida media de Lipozyme TL IM fue de 96.25 días, lo que indica que este biocatalizador es muy estable a 60°C en disolventes orgánicos. En la bibliografía se encontró que la vida media de Lipozyme TL IM varía enormemente debido a las diferentes condiciones de reacción que cada autor utilizó. Berben y sus colaboradores (Berben, 2000) llegaron a utilizar a Lipozyme TL IM en reactores en lote a temperaturas de hasta 90°C para la interesterificación de aceite de soya y de coco, y en 50 horas de reacción no detectaron desactivación alguna del biocatalizador. En otro estudio (Awang, 2005) se encontró que Lipozyme TL IM mantiene un 70 % de su actividad catalítica a 50°C después de 8 ciclos de 3 horas de duración para la esterificación del ácido 9,10-dihidroxiesteárico y 1-octanol en hexano. Awang atribuyó la desactivación de Lipozyme TL IM a la presencia de agua adsorbida en el biocatalizador durante el proceso, la cual se produjo como un subproducto de la reacción.

6.3. Efecto de la actividad acuosa en las velocidades iniciales de reacción

La velocidad inicial de reacción de hidrólisis de DL obtenida a un a_w de 0.13 fue aproximadamente un orden de magnitud mayor que la obtenida a un a_w de 0.95 (figura 21 y tabla 8). Comportamientos y ordenes de magnitud de diferencia similares fueron obtenidos por otros autores para la hidrólisis de DL en medios orgánicos utilizando lipasas inmovilizadas (López, 2002; González, 2006; Mora, 2007). Por lo tanto estos resultados confirman que la hidrólisis de DL en disolventes orgánicos, utilizando lipasas inmovilizadas, es favorecida a bajos valores de a_w .

Es importante comentar que a partir de la isoterma de adsorción de agua para Novozym 435 reportada en la literatura (Chamouleau, 2001), Mora (2007) calculó que hay aproximadamente 60 μ moles de agua adsorbidas en 100 mg de biocatalizador a un a_w de 0.13, concluyendo que esta cantidad de agua es suficiente para hidrolizar todos los DL presentes en 20 ml de una solución 80 μ M. Al hacer los cálculos pertinentes se encuentra que hay aproximadamente 20 veces más agua que la necesaria para completar totalmente la reacción de hidrólisis en dicha solución. Sin embargo, hay que considerar que en este trabajo se utilizaron solamente 50 mg de biocatalizador, y se trabajaron con concentraciones mayores de DL (hasta 1200 μ M). Tomando en cuenta que las áreas superficiales de ambos biocatalizadores son similares (tabla 13), y para efectos prácticos suponiendo que la cantidad de agua adsorbida en Lipozyme TL IM fuese la misma que para Novozym 435 a un a_w de 0.13, sólo habría 30 μ moles de agua total adsorbida en el biocatalizador. Para una solución de 20 ml con concentración 880 μ M de DL (concentración de saturación de Lipozyme TL IM), se necesitarían 32 μ moles de agua para hidrolizar todos los diésteres presentes en la solución y considerando que no toda el agua está disponible para la reacción, es evidente que para el caso anteriormente mencionado, el agua actuaría como reactivo limitante si se quisiesen hidrolizar el 100 % de los DL.

6.4. Parámetros cinéticos

El parámetro cinético de actividad específica aparente máxima obtenido para Lipozyme TL IM fue 2.2 veces mayor que el obtenido a partir de los resultados reportados para Novozym 435 (Mora, 2007), mientras que su constante de Michaelis-Menten fue ligeramente mayor que la calculada para Novozym 435, lo que dio como resultado que la eficiencia catalítica de Lipozyme TL IM fuese 2.07 veces mayor que la de Novozym 435 (Figura 27 y tabla 9).

Es importante destacar que en este trabajo se utilizó como disolvente al isooctano, debido a que se ha demostrado que la velocidad de hidrólisis enzimática de DL procede adecuadamente al utilizar este disolvente (González, 2006). Sin embargo no se encontraron en la literatura valores de parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la hidrólisis de DL en isooctano para ningún otro biocatalizador, por lo tanto se decidió comparar nuestros parámetros cinéticos con los calculados a partir de los datos obtenidos por Mora (2007) para la hidrólisis enzimática de DL en hexano utilizando Novozym 435. Como se ha demostrado (González, 2006), el disolvente tiene un efecto muy importante y complejo en la reacción de hidrólisis de DL. Resultados de la literatura muestran que a un a_w de 0.13, una concentración inicial de sustrato de 0.1 mg/ml y una temperatura de 60°C, la velocidad inicial de hidrólisis de DL utilizando Novozym 435 en isooctano fue aproximadamente 2 veces mayor que en hexano (González, 2006), lo que indica que los parámetros cinéticos de Novozym 435 para la hidrólisis de DL en isooctano pueden ser considerablemente mejores que los obtenidos a partir de los datos de Novozym 435 en hexano. Resultados de la literatura indican que las velocidades de hidrólisis de DL en isooctano a una concentración de sustrato de 0.1 mg/ml y a valores de a_w similares a 0.13 para Lipozyme RM IM y Novozym 435 son de 16.8 y 1.2 μ M hr^{-1} respectivamente (González, 2006). A partir de estos resultados, y considerando que la autora utilizó una concentración de biocatalizador de 0.5 mg/ml, se calcularon las velocidades iniciales de hidrólisis por mg de biocatalizador, siendo estos valores iguales a 0.168 y 0.012 μ M hr^{-1} respectivamente. En este estudio se encontró

que para una concentración similar a 0.1 mg/ml de sustrato, la velocidad inicial de hidrólisis de DL por mg de biocatalizador utilizando Lipozyme TL IM fue de $0.125 \mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$, este valor es un orden de magnitud mayor que el valor de Novozym 435, y es aproximadamente 25 % menor que el obtenido para Lipozyme RM IM.

No hay que perder de vista que el precio de Lipozyme TL IM es mucho menor que el de Novozym 435. En la siguiente tabla se muestran los precios de ambos biocatalizadores los cuales fueron proporcionados amablemente por Novo-México (2005)

Biocatalizador	Precio (dólares kg^{-1})	Precio (¢ Dll mg^{-1})
Lipozyme TL IM	545.5	0.0545
Novozym 435	1090.9	0.1090

Tabla 1. Precio de de los biocatalizadores Lipozyme TL IM y Novozym 435.

Se observa que el precio de Lipozyme TL IM es casi la mitad del precio de Novozym 435, lo cual es una ganancia considerable. Una de las recomendaciones más importantes de estudios de factibilidad de la literatura para hacer viable económicamente al proceso enzimático de DL fue utilizar catalizadores más económicos (Trujillo, 2005), por lo tanto el bajo costo de Lipozyme TL IM es sin duda una gran ventaja.

6.5. Velocidades de adsorción de diésteres de luteína en función del a_w

En este estudio se demostró que la velocidad inicial de adsorción de DL a un valor de a_w de 0.13 es aproximadamente 7 veces mayor que la obtenida a un valor de a_w de 0.95. Estos resultados demuestran que el fenómeno de adsorción de DL en el soporte de Lipozyme TL IM es altamente favorecido a valores bajos de a_w . La alta naturaleza hidrofóbica de los DL puede ser la causa de porqué su adsorción no sea favorecida a altos valores de a_w .

En la figura 29 se observó que se llegaron a valores muy cercanos al equilibrio de adsorción-desorción de DL en tiempos relativamente cortos, de aproximadamente 10 minutos para un a_w de 0.13 y de 20 minutos para un a_w de 0.95. Estas observaciones concuerdan con las reportadas en la literatura para el fenómeno de adsorción de DL en el soporte de Novozym 435 (Morán, 2005). Sin embargo, los estudios de adsorción de DL en el soporte de Novozym 435 por parte de Morán abarcaron tiempos de muestreo relativamente largos (orden de horas) y esa fue la causa por la que no lograron detectar la dependencia de la velocidad inicial de adsorción con el a_w del biocatalizador. Es importante destacar que algunos autores elaboraron cinéticas de adsorción de DL y de luteína libre a partir del seguimiento de la disminución de la concentración de la solución en contacto con el soporte a estudiar (Morán, 2005). Esta metodología es eficaz cuando la cantidad de material adsorbido es relativamente grande para que el error experimental no anule los resultados. En el presente estudio, se observó en la figura 29 que a un tiempo de 105 minutos se habían adsorbido 0.0023 μmoles de sustrato por mg. de biocatalizador, lo que equivale a 0.12 μmoles al utilizar 50 mg de biocatalizador. Esta cantidad sólo representa el 1.5 % de la cantidad total de DL presentes en la solución, por lo tanto tomando en cuenta que un valor común del error experimental equivale al 5 % de la cantidad cuantificada, sería imposible utilizar la

metodología descrita anteriormente para construir cinéticas de adsorción de DL en el soporte de Lipozyme TL IM . Una aportación importante de este trabajo fue el diseño de una metodología experimental que permitió cuantificar de manera directa la cantidad de material adsorbido respecto al tiempo con gran exactitud y precisión para elaborar las cinéticas mostradas en las figuras 30 y 32.

En la tabla 15 y figura 37 se compararon las velocidades iniciales de adsorción con las velocidades iniciales de reacción de los DL.

a_w	Velocidades iniciales de reacción de hidrólisis de DL		Velocidades iniciales de adsorción de DL	
	Concentración inicial de sustrato (μM)	Velocidad inicial de reacción ($\mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	Concentración inicial de sustrato (Mm)	Velocidad inicial de adsorción ($\mu\text{M hr}^{-1}\text{mg}^{-1}$)
0.13	379	0.27 ± 0.028	395	0.31 ± 0.0165
0.95	373	0.037 ± 0.012	395	0.042 ± 0.0048

Tabla 2. Comparación de las velocidades iniciales de adsorción y de reacción Lipozyme TL IM; Isoctano; 60°C; 130 rpm

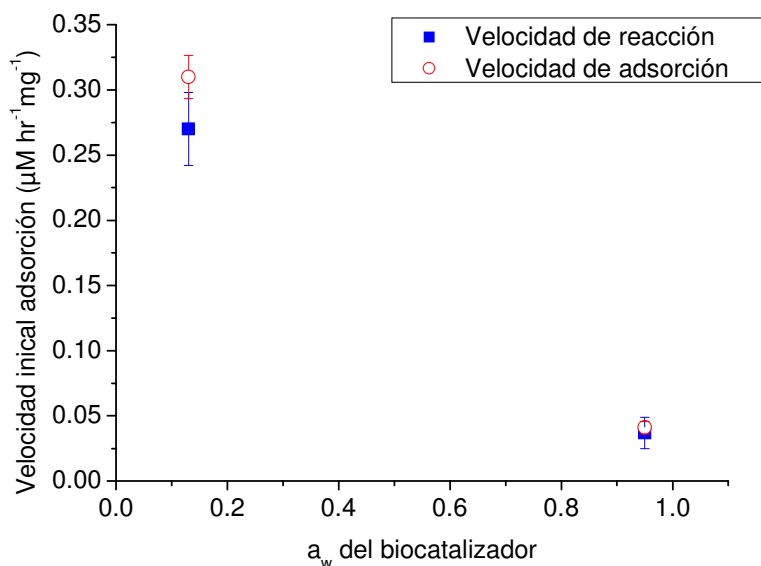


Figura 1. Comparación de las velocidades de adsorción y de reacción iniciales en función del a_w

Se observó que los valores numéricos de las velocidades iniciales de adsorción y de reacción son similares, lo cual indica que el fenómeno de adsorción del sustrato es la etapa limitante de la reacción para una concentración inicial de DL de aproximadamente 400 μM . Por lo tanto, a pesar

de que la reacción de hidrólisis sea favorecida termodinámicamente a a_w elevados, la velocidad global de reacción será mayor a valores bajos de a_w debido a que estos valores son los que promueven la velocidad de la etapa limitante. Estos resultados experimentales son los primeros en explicar la causa de que la reacción de hidrólisis enzimática de DL sea favorecida a bajos valores de a_w (López, 2002; González, 2006; Mora, 2007) además de ser congruentes con la hipótesis acerca del efecto hidrofóbico de las moléculas de agua adsorbidas en el soporte que dificulta el acceso del sustrato a los sitios catalíticos de la enzima (López, 2002; González, 2006; Mora, 2007).

Una de las estrategias para disminuir el problema de transferencia de masa como etapa limitante en una reacción es trabajar con concentraciones altas de sustrato. Se esperaría que al trabajar con concentraciones altas de DL a valores altos de a_w se obtuvieran velocidades similares a las obtenidas a valores bajos de a_w . Sin embargo, resultados en la literatura de gráficas de saturación tanto para Lipozyme RM IM como Novozym 435 en hexano (Mora, 2007), demostraron que las velocidades máximas alcanzadas a valores bajos de a_w nunca fueron alcanzadas a valores altos de a_w , indicando que los altos valores de a_w además de afectar la adsorción del sustrato, también pueden modificar las características de la enzima o como lo indica Mora (2007), pueden provocar la disminución de la cantidad de sitios catalíticos efectivos debido a que el agua alrededor de la enzima genera un problema de partición del sustrato en el biocatalizador. Otra posible causa podría ser que el agua ocupe un volumen importante en los poros más pequeños y profundos del biocatalizador, causando fuertes efectos hidrofóbicos impidiendo que el sustrato y hasta el solvente penetren en ellos. Resultados de la literatura demostraron que la cantidad de DL de una solución de hexano adsorbidos en alumina después de 6 horas de tiempo de exposición fue mucho mayor a a_w bajos que altos (Morán, 2005). Los resultados de la gráfica de la figura 25 indicaron que la cantidad de DL adsorbidos en Lipozyme TM IM fue más del doble a un a_w de 0.13 que a uno de 0.95 después de 105 minutos. Estos resultados evidencian que muchos sectores internos de los biocatalizadores pueden no estar ocupados por el sustrato, y sobre todo al inicio de la reacción, explicando el fenómeno de que las velocidades máximas iniciales encontradas a a_w bajos nunca sean alcanzadas a a_w altos.

6.6. Velocidades de adsorción de luteína libre en función del a_w

La velocidad de adsorción de luteína libre fue 5 veces mayor a altos valores de a_w que a bajos valores de a_w (tabla 12), lo que indica que existen interacciones importantes entre la luteína libre y las moléculas de agua. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura en cuanto a la adsorción de luteína en Lewatit y alumina en función del a_w del biocatalizador (Morán, 2005; Mora, 2007). En su estructura química, la luteína libre tiene dos grupos hidroxilo en lugar de dos ácidos grasos de entre 16-18 átomos de carbono presentes en los DL. Los grupos hidroxilo le permiten a la luteína libre tener más interacciones con el agua, probablemente formando puentes de hidrógeno, provocando que esta última tenga una mayor adsorción a altos valores de a_w . Por el contrario, la ausencia de los grupos hidroxilo y la presencia de los ácidos grasos en los DL les da una naturaleza altamente hidrofóbica, lo que impide que tengan una buena adsorción a altos valores de a_w .

Mora (2007) demostró a través del uso de biocatalizadores usados, que el material adsorbido en el soporte de Novozym 435 (mayoritariamente luteína) no tenía un efecto considerable en la reacción de hidrólisis de DL. Sin embargo, en sus experimentos, el autor reajustó el a_w de los

biocatalizadores después de cada reacción, por lo tanto sus resultados no excluyen la posibilidad de que el producto adsorbido tenga un efecto de secuestrar moléculas de agua, disminuyendo aún más la cantidad de agua disponible para la reacción.

6.7 Hidrólisis de DL en CO₂ supercrítico

El experimento en CO₂ supercrítico demostró que la enzima de *Thermomyces Lanuginosa* en forma inmovilizada tiene actividad catalítica para la hidrólisis de DL en este novedoso medio. El rendimiento obtenido en este trabajo fue similar al obtenido en isoctano (tabla 10). En consistencia con los solventes orgánicos, se ha encontrado que la hidrólisis de DL en CO₂ supercrítico utilizando lipasas inmovilizadas se ve favorecida a bajos a_w (Mora, 2007). Estos resultados y los rendimientos similares encontrados en este trabajo para CO₂ supercrítico y isoctano sugieren que el fenómeno de adsorción de sustratos influenciado por el contenido de agua también es la etapa limitante en la reacción de hidrólisis de DL en CO₂ supercrítico.

6.8. Área superficial y características morfológicas de los biocatalizadores

El área superficial encontrada para Lipozyme TL IM fue similar a la de Novozym 435, ambas fueron de aproximadamente 50 a 60 m² por gramo (tabla 13). Comparando con soportes como la alumina que tienen áreas superficiales de más de 1000 m² por gramo, el área superficial, tanto de Lipozyme TL IM como de Novozym 435 se puede considerar como relativamente baja. Esto explica la mayor capacidad de adsorción de DL y luteína libre por parte de la alumina respecto a Lewatit en los trabajos reportados en la literatura (Morán, 2005). Los datos fisicoquímicos obtenidos para Lipozyme TL IM obtenidos en este estudio concuerdan con los datos reportados en la ficha técnica proporcionada por Novo-México. Sin embargo el área superficial y el diámetro de poro reportados en la literatura para el soporte sin enzima de Novozym 435 (Lewatit) son de 130 m² g⁻¹ y 150 Å respectivamente (Christensen, 2003; Morán, 2007), mientras que en este estudio se encontraron valores de 65 m² g⁻¹ y 320 Å (tabla 13). El efecto de la enzima y los agentes inmovilizantes en el soporte pueden ser la causa de estas diferencias.

El área superficial, diámetro promedio de poro y volumen total de poro reportados para Lipozyme RM IM son de 104.7 m² g⁻¹, 260 Å y 0.68 cm³ g⁻¹ respectivamente (Camacho, 2003). Por lo tanto el fenómeno de adsorción de sustratos será favorecido en Lipozyme RM IM debido a que tiene un área superficial casi dos veces mayor que la de Lipozyme TL IM y Novozym 435.

En cuanto a las propiedades hidrofóbicas de los materiales, Lewatit esta hecho a base de una resina acrílica, lo cual le confiere una naturaleza hidrofóbica débil. El soporte de Lipozyme RM IM esta formado a base de una resina de intercambio aniónica, la cual le confiere una naturaleza altamente hidrofílica. Por su parte, Lipozyme TL IM esta formado a partir de gránulos de silicatos, los cuales también le confieren una naturaleza hidrofílica al biocatalizador, aunque en menor grado que Lipozyme RM IM. Como lo mencionamos en el punto 6.3, los resultados de Lipozyme RM IM fueron los que presentaron la mayor velocidad inicial en isoctano a bajas concentraciones de sustrato (González, 2005), seguidos por los Lipozyme TL IM obtenidos en este estudio y en último lugar los de Novozym 435 (González, 2005). Estos datos se correlacionan con la hidrofobicidad del soporte, donde Lipozyme RM IM tiene el soporte más hidrofílico, seguido por el de Lipozyme TL IM y al final el Novozym 435. Considerando el

hecho de que las velocidades iniciales anteriormente mencionadas fueron obtenidas a bajas concentraciones de sustrato, es muy probable que el fenómeno de adsorción también haya sido la etapa limitante en los experimentos efectuados por González (2006). Por lo tanto creemos que la hidrofobicidad del soporte del biocatalizador tiene una gran influencia en la velocidad de adsorción de los DL, siendo el fenómeno de adsorción de sustrato favorecido con soportes hidrofílicos. Diversos estudios concuerdan con que las interacciones hidrofóbicas pueden llegar a tener un alcance de entre 150 y 200 Å (Israelachvili, 1982, Meyer, 2006), por lo tanto este tipo de interacciones pueden tener un efecto considerable en la superficie de los biocatalizadores y sobre todo en los poros de estos últimos, donde los diámetros de poro promedio son de aproximadamente 300Å. Suponemos que el uso de un soporte que sea capaz de tener relativamente fuertes interacciones de atracción con las moléculas de agua (hidrofílico) será capaz de disminuir el efecto hidrofóbico de estas últimas con el solvente y con el sustrato, facilitando el fenómeno de adsorción de los DL y con ello la velocidad de reacción de hidrólisis.

Conclusiones

- Los porcentajes de proteína para los biocatalizadores Lipozyme TL IM y Novozym 435 fueron de 4.3 % y 7.9 % respectivamente.

-La reacción de hidrólisis de diésteres de luteína utilizando Lipozyme TL IM en isoctano se ve favorecida a bajas actividades acuosas.

-La eficiencia catalítica específica que presentó Lipozyme TL IM para la reacción de hidrólisis de los DL en isoctano fue aproximadamente 2 veces mayor que la calculada a partir de los datos reportados para Novozym 435 en hexano.

-La vida media de Lipozyme TL IM fue de 96 días para la reacción de hidrólisis de DL en isoctano a 60°C.

-El biocatalizador Lipozyme TL IM presentó actividad catalítica para la hidrólisis de DL en CO₂ supercrítico, obteniendo un rendimiento similar al que se obtuvo utilizando isoctano como disolvente.

-La velocidad de adsorción de DL en el soporte de Lipozyme TL IM fue mayor a actividades acuosas bajas.

-La velocidad de adsorción de luteína libre en el soporte de Lipozyme TL IM fue mayor a actividades acuosas altas.

-El valor numérico de la velocidad de adsorción inicial de DL en el soporte fue similar al valor numérico de la velocidad de reacción inicial tanto a un a_w de 0.13 como a uno de 0.95, lo que sugiere que la reacción de hidrólisis de DL catalizada por Lipozyme TL IM es limitada por el fenómeno de adsorción.

Bibliografía

- Amado I., Gómez N. (1988) Colorantes naturales en la industria alimenticia. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F.
- Avila D. (2000) Hidrólisis de ésteres de luteína. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Awang R., Basri M., Ahmad S., Abu S. (2005) *Thermomyces lanuginosus* lipase catalyzed esterification of 9, 10 Dihydroxystearic acid an monohydric alcohol. J. Oleo Sci. Vol 54, No. 5, 305-309.
- Bárzana E., Rubio D., Santamaría R., García-Correa O., García F., Ridaura Sanz V., López A. (2002) Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). J. Agric. Food Chem. 50:4491-4496.
- Berben P., Groen C., Cristensen M., Holm H. (2000) Interesterification with immobilized enzymes. SCI Lectures papers series 121-122
- Briggs M. (2004) [Widescale Biodiesel Production from Algae](http://www.unh.edu/p2/biodiesel/article_alge.html) . Published by the University of New Hampshire (US) Biodiesel Group. . Online article : http://www.unh.edu/p2/biodiesel/article_alge.html
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (1995) Carotenoids volumen 1: isolation and analysis. Editorial Birkhauser Verlag
- Camacho B., Robles A., Camacho F., González P., Molina E. (2003) Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. Enzym. Microb. Tech. 33 (2003) 845–85
- Cameron P., Davison B., Frymier P., Barton J. (2002) Direct transesterification of gases by dry immobilized lipase. Biotechnol. Bioeng. Vol. 78, No. 3
- Chamouleau F., Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (2001) Influence of water activity and water content on sugar esteres lipase catalyzed synthesis in organic media.” J. Mol. Cat. 11, 949-954.
- Christensen M., Andersen L., Husum T., Kirk O. (2003) Industrial lipase immobilization, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 .318–321.
- Danielo O. (2005) An algae based biodiesel . Biofutur No. 255
- Dastoli E., Price S. (1967) Catalysis by xanthine oxidase suspended in organic media. *Biochem. Biophys* 118:163-165
- Davis B. (1976) Carotenoids in chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol 2 TW Goodwin, Cap. 19 ,38-165
- De Castro H., De Oliveira P.; Pereira E. (1997) Evaluation of different approaches for lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate. *Biotechnol. Lett.* Vol 19. No 3
- Deshpande U., Salunkhe D., Deshpande S. (1996) Nutritional and health aspects of food antioxidants. Edit. D.L.Madhosvi and S.S, Deshpande and D.K Salunkhe. Editorial Marcel Dekker, 361-470
- Garcia M., López A., Bárzana E. (2000a) Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic β -glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 69(6):627-632.

- García M., López A., Bárzana E. (2000b) Effect β -galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase system. *Biotechnol. Bioeng.* 70(6):647-653
- González J. (2006) Evaluación de disolventes en la reacción enzimática de hidrólisis de esteres de luteína .Tesis de maestría, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Gorman L., Dorkick J. (1992) .Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 39:392-397
- Greenspan L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *J. of Research, National Bureau of Standards.* 81A :89-96
- Gunstone F. (1999) Enzymes as biocatalyst in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric.* 79 :1535-1549
- Halling P. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventional media: theory, tests, recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme. Microb. Technol.*, 16:178-206
- Hammond D., Karel M., Klibanov A., Krukoni V. (1985) Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11: 393-400.
- Han D., Rhee J. (1986a) Characteristic of lipase catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reverse micelles .*Biotechnol. Bioeng.* 28 : 1250-1255
- Han D., Rhee J. (1986b) Batchwise hydrolysis of olive oil by lipase in AOT-isooctane reverse micelles “*Biotechnol. Lett.* 7 :651-656
- Han. D., Rhee. J. (1989) Characteristic of immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. *Biotechnol. Bioeng.* 33 :1469-1476
- Israelachvili J., Pashley R. (1982) The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance . *Nature* 300, 341 – 342
- Khachik F., Beecher G., Smith J. (1995) Lutein, lycopene and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J.Cell.Biochem. Supplement* 22:236-246
- Klibanov A. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem.Sci.*,14,141-144
- Koskinen A., Klibanov A. (1996) .Enzymatic reactions in organic media. Yang, Z Russell A.;Cap 3 :43-65
- López M. (2002) Hidrólisis enzimática de diésteres de luteína con *Candida antarctica*. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- MacRae A. (1983) Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60:243-246
- Meyer E., Rosenberg K., Israelachvili J. (2006) Recent progress in understanding hydrophobic interactions . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(43): 15739–15746
- Mora M. (2007a) Hidrólisis enzimática de los DL en medios con bajo contenido de agua .Tesis de doctorado, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Mora M., Perez S., González J., Dordick J., Bárzana E. (2007b) The lipase-catalyzed hydrolysis of lutein diesters in non aqueous media is favored at extremely low water activities . *Biotechnol. Bioeng.*

- Morán S. (2005) Adsorción de luteína y diésteres sobre soportes de lipasas comerciales. Tesis de licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Murkerjee K. (1990) Lipase catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*. Vol .3, 227-294
- Naranjo S. (2000) Extracción de carotenoides y otros compuestos por medio de CO₂ en estado supercrítico a partir de *Tagetes erecta*. Tesis de Doctorado. UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Philip T., Berry J. (1975) A Process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals”*J.Food.Sci.* Vol. 40:163-164
- Rodríguez D. (1997) Carotenoids and Food Preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. John Snow, Inc/OMNI Project.
- Rubio H., Bárzana E., López A (1994) Procedimiento para la obtención de pigmentos liposolubles a partir de productos vegetales. Patente MEX 176018. Propietaria: UNAM.
- Torres E., Aburto J. (2005) Chloroperoxidase catalyzed oxidation of 4,6 dimethyldibenzothiophene as dimmer complexes : evidence for kinetic cooperativity . *Arch. Biochem. Biophys*, 437 ,224-232.
- Trujillo L. (2005) Procesos enzimáticos como alternativa a la extracción industrial de luteína de flor de cempasúchil (*tagetes erecta*) : un análisis comparativo basado en técnicas de simulación de procesos. Tesis de maestría, UNAM, Facultad de Química, México D.F.
- Wandrey C., Liese A., Kihumbu D. (2000) Industrial biocatalyst: past, present and future. *Organic. Proc. Res. Develop.* 4: 286-290.