



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INGENIERIA

FACULTAD DE QUIMICA

**DISEÑO DE UN REACTOR DE LECHO FIJO PARA
LA ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE
ALCOHOLES PESADOS CON ÁCIDO ACÉTICO.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERIA

INGENIERÍA QUÍMICA - BIOCATÁLISIS

P R E S E N T A :

I.Q.I. CARLOS JUVENCIO LÓPEZ JIMÉNEZ

TUTOR:

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA

2010





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: DRA. FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA AMELIA MA. GUADALUPE.

Secretario: DR. PEDRO ROQUERO TEJEDA.

Vocal: DRA. SHIRAI MATSUMOTO KEIKO.

1er. Suplente: DR. GIMENO SECO MIQUEL.

2do. Suplente: DR. REVAH MOISEEV SERGIO.

Lugar donde se realizó la tesis:

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
LABORATORIO 314 CONJUNTO E

TUTOR DE TESIS.

Dr. Eduardo Bárzana García.

***A QUIENES SIEMPRE HAN
ESTADO A MI LADO.***

AGRADECIMIENTOS

Si intentara agradecer a todas las personas que me han ayudado a lograr esta etapa de mi vida, seguramente duplicaría las hojas necesarias para imprimir este trabajo; dado que el espacio es limitado, agradeceré de forma expresa a las que mi mente en este momento me permite recordar, extendiéndoles un agradecimiento sincero a todas aquellas que no alcance a mencionar pero que seguramente han constituido pilares importantes para alcanzar esta meta.

A Irma y Carlos, *ustedes que han hecho todo a su alcance para ayudarme a lograr mis metas, con su amor, apoyo, comprensión y sobre todo, respeto de mis decisiones.*

A María, *tú que crees y confías en mí tanto como yo en ti, que me has impulsado siempre a seguir adelante, por tu amor incondicional que me ha acompañado durante estos felices años de mi vida.*

A mis hermanas, *Lupita, Leni, Cati, Ivonne y Astry, quienes me han ayudado a lo largo de mi vida a superar los obstáculos y me han compartido sus tesoros más preciados, sus hijos.*

A mis sobrinos, *Arlenita, Pepe, Dino, Yazí, Leo, Dayani, Rashid, Edi y Abraham porque son un gran motivo para seguir adelante, por permitirme acompañarles durante su crecimiento, por sus aventuras y travesuras que me alegran enormemente la vida, pero sobre todo por su cariño y confianza incondicional y sincera.*

A Filo, Oswaldo, Roque y Trini *quienes me han aceptado como parte de la familia y nos han apoyado en esta travesía.*

A Eduardo y Miquel, por permitirme formar parte de este trabajo, por guiarme durante la realización del mismo, pero sobre todo por brindarme su amistad.

Al Sr. Alfredo Buenfil, su esposa Doña Socorro y su familia por su confianza, apoyo y generosidad durante esta aventura.

A los investigadores miembros del jurado, por sus amables sugerencias y correcciones que han enriquecido este trabajo.

A Rosy, Marce y Rafa, porque me han impulsado a seguir en el camino del conocimiento.

A mis amigos, Santiago, Ricardo, Geovanny, Germán, Yazmín, Teddy, Alberto y María de la Cruz, Adriana, Miguel y Brenda, por su apoyo y amistad desde que forman parte de mi vida.

"Se agradece a CONACyT por la beca de maestría"

ÍNDICE

RESUMEN.	1
ABSTRACT.	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Ésteres.	5
2.1.1. Generalidades.	5
2.1.2. Acetato de octilo.	6
2.2. Lipasas	8
2.2.1. Generalidades.	8
2.2.2. Estructura de las lipasas.	9
2.2.3. <i>Candida antarctica</i> lipasa B	10
2.2.4. Inmovilización de lipasas	11
2.3. Reactores	12
2.3.1. Generalidades	12
2.3.2. Reactor de lecho empacado	13
2.4. Disolventes orgánicos como medios de reacción	15
2.5. Método estadístico Taguchi	18
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
3.1. Hipótesis	21
3.2. Objetivo general	21
3.3. Objetivos específicos	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. Materiales	22
4.2. Equipos	22
4.3. Pruebas preliminares en régimen por lotes.	23

4.4.	Sistema de reacción en lecho fijo.	24
4.4.1.	Desactivación de la enzima.	26
4.4.2.	Ciclos de actividad de la enzima.	26
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1.	Pruebas preliminares en régimen por lotes.	27
5.2.	Sistema de reacción en lecho fijo.	34
5.2.1.	Sistema de reacción con enzima desactivada.	43
5.2.2.	Ciclos de actividad del biocatalizador en el biorreactor.	44
6.	CONCLUSIONES	46
7.	RECOMENDACIONES	47
8.	REFERENCIAS	48
9.	APÉNDICE	52
	Establecimiento del protocolo de trabajo del cromatógrafo de gases.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema de la síntesis enzimática de acetato de octilo en hexano.	4
Figura 2.1. Esquema de reacción de esterificación.	5
Figura 2.2. Síntesis química común del acetato de octilo.	7
Figura 2.3. Función biológica de las lipasas: la hidrólisis de los triglicéridos.	8
Figura 2.4. Tríada catalítica característica de las lipasas.	10
Figura 2.5. Candida antarctica lipasa B	11
Figura 2.6. Árbol de decisión de reactores enzimáticos de acuerdo con el tipo de enzima a utilizar.	13
Figura 4.1. Diagrama del sistema de reacción.	25
Figura 5.1. Rendimiento de acetato de octilo a diferentes concentraciones de biocatalizador. [Reactivos] = 0.5 M, a 60 °C y 200 rpm.	28
Figura 5.2. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes cantidades de enzima. [Reactivos] = 0.5 M, a 60 °C y 200 rpm.	28
Figura 5.3. Rendimiento de acetato de octilo bajo diferentes temperaturas. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL y 200 rpm.	30
Figura 5.4. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes temperaturas. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL y 200 rpm.	30
Figura 5.5. Rendimiento de acetato de octilo con y sin tamiz molecular. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL, a 25 °C y 200 rpm.	32
Figura 5.6. Rendimiento de acetato de octilo (variando la concentración inicial de reactivos). Enzima = 20 mg/mL, a 25 °C y 200 rpm.	33
Figura 5.7. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes concentraciones iniciales de reactivos. Enzima = 20 mg/mL de solución, a 60 °C y 200 rpm.	33
Figura 5.8. Diagrama del efecto de los factores de control.	42
Figura 5.9. Rendimiento de acetato de octilo con enzima activa y desactivada. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 10 mg/mL, a 25 °C y flujo de 379 mL/min.	44
Figura 5.10. Rendimiento de acetato de octilo durante 4 ciclos de actividad útil de la enzima. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 10 mg/mL, a 25 °C y flujo de 379 mL/min, lavado con hexano entre ciclos.	45
Figura 9.1. Cromatograma típico obtenido durante el transcurso de una reacción.	53
Figura 9.2. Curva de calibración de la señal de acetato de octilo en el cromatógrafo de gases. [Acetato de octilo] = $4.51E-07(\text{Área}) - 9.37E-03$, $r=0.99$	54

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 2-1. Ejemplos de ésteres de diferentes largos de cadena y sus usos.</i>	5
<i>Tabla 2-2. Propiedades del acetato de octilo.</i>	6
<i>Tabla 2-3. Usos reportados (ppm): (FEMA, 1994).</i>	7
<i>Tabla 2-4. Síntesis química de acetato de octilo, Mohammadpoor- y col. (2001).</i>	7
<i>Tabla 2-5. Ejemplos de algunas de las lipasas más utilizadas en biotecnología.</i>	9
<i>Tabla 2-6. Reacciones de esterificación cuyo medio de reacción es hexano.⁹</i>	18
<i>Tabla 4-1. Diseño estadístico Taguchi L₉ utilizado.</i>	24
<i>Tabla 5-1. Resultados de productividad de las 9 reacciones por duplicado.</i>	35
<i>Tabla 5-2. Tiempo y rendimiento utilizados para el cálculo de la productividad.</i>	35
<i>Tabla 5-3. Productividad promedio y razón señal/ruido S/N, por experimento.</i>	36
<i>Tabla 5-4. Productividad y razón señal/ruido S/N promedios por nivel de cada factor.</i>	37
<i>Tabla 5-5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA).</i>	41
<i>Tabla 5-6. Niveles adecuados a utilizar en el reactor de lecho fijo de los factores estudiados.</i>	43
<i>Tabla 9-1. Tiempos de retención promedio de los compuestos en el cromatógrafo de gases.</i>	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ANL	Lipasa de <i>Aspergillus niger</i>
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
Asp	Aspártico
CAL SP382	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>
cm	Centímetros
F_i	Prueba F
g	Gramos
G.L.	Grados de libertad
Glu	Glutamato
h	Hora
His	Histidina
inm.	Inmovilizada
kDa	Kilodaltones
L	Litros
M	Concentración mol
M_o	Concentración molar inicial equimolar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MML,	Lipasa de <i>Mucor miehei</i>
MSD	Desviación media cuadrada (por sus siglas en inglés)
°C	Grados centígrados
PDB	<i>Protein data bank</i> (por sus siglas en inglés)
ppm	Partes por millón
RAL	Lipasa de <i>Rhizopus arrhizus</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDC_i	Suma del cuadrado de las diferencias
Ser	Serina
v/v	Volumen/volumen
V_i	Varianza de la fuente
μmol	Micromoles
ρ_i	Porcentaje de contribución de la fuente a la variación total
lb	Libras

RESUMEN.

Los ésteres orgánicos son usados industrialmente como aromas, saborizantes y componentes de la industria farmacéutica o detergentes de especialidad, entre otros. Los métodos más usados para su producción son la extracción de plantas, la biosíntesis fermentativa y la catálisis ácida, pero estos métodos exhiben altos costos y bajos rendimientos. La síntesis química no es favorecida, por problemas tales como baja selectividad, bajo rendimiento y toxicidad. El acetato de octilo es un éster importante en el área alimentaria, debido principalmente a su olor y sabor característico; también es ampliamente utilizado en otras industrias, por lo que es importante obtenerlo de manera que la toxicidad asociada sea mínima. De ahí la importancia de encontrar rutas alternativas para su producción, como la síntesis enzimática en medios no acuosos e hidrofóbicos debido a su baja solubilidad en agua. Trasladar las lipasas desde su medio natural acuoso hacia otros medios de reacción permite extender su poder catalítico y especificidad hacia reacciones reversas a la hidrólisis, como esterificaciones y transesterificaciones.

En esta tesis se llevó a cabo la esterificación enzimática de octanol con ácido acético para producir acetato de octilo, usando hexano como medio de reacción y en reactores de lote y de lecho fijo. Se estudió el efecto de tres factores (concentración inicial de reactivos, cantidad de biocatalizador y flujo de alimentación) sobre la productividad del reactor. En el caso del reactor de lecho fijo se evaluó el diseño estadístico Taguchi L_9 a partir de los datos experimentales. Se realizó un análisis de varianza y un diagrama del efecto de los factores de control para elegir los niveles adecuados de los factores estudiados, siendo éstos 0.5 M de concentración equimolar inicial de reactivos, 5 g de biocatalizador y 379 mL/min de flujo de alimentación, obteniéndose una productividad de 13.6 μmol de acetato de octilo por gramo de catalizador por litro de solución por hora. Asimismo, se determinó que los factores que más afectaron el proceso fueron, principalmente, la concentración inicial de reactivos y, en un segundo término, la cantidad de biocatalizador.

ABSTRACT.

Organic esters are used in industry as fragrances, food flavors and components of pharmaceuticals or special detergents, among others. The most commonly used methods to obtain these esters are extraction from plants, fermentative biosynthesis and acid catalysis. However, these methods exhibit high production costs and low yields. Chemical synthesis is not attractive since it presents low selectivity, low yields and toxicity. Octyl acetate is an important ester in the food industry and cosmetics due to its characteristic fragrance and flavor. Therefore, it is important to obtain this compound in a way as eco-friendly as possible with the lowest possible toxicity. According to that, it is important to find alternative routes for its production, such as the enzymatic synthesis. The use of lipases in non aqueous media allows the reverse reaction of esterification or transesterification.

The present thesis purpose is to report the enzymatic esterification of octyl alcohol with acetic acid for the production of octyl acetate in hexane as reaction medium in batch and in a packed bed reactor. The effect of three variables: initial concentration of substrates, amount of biocatalyst and flow rate, was studied over the reactor productivity. The experimental data in the case of the packed reactor were analyzed by a Taguchi L_9 statistical design. The analysis of variance and the effect of source variations were used to select the appropriate level, which is an equimolecular initial concentration of reagents of 0.5 M, an amount of biocatalyst of 5 g and a flow rate of 379 mL/min to give 13.6 μmol of octyl acetate per gram of catalyst per liter of solution per hour. The experimental evidences pointed out that the factors with the highest effect over the variance of the process were primarily the initial concentration of reagents and, secondly, the amount of added biocatalyst.

1.INTRODUCCIÓN

Trasladar las enzimas de su medio acuoso natural permite extender su poder catalítico y especificidad hacia la síntesis de nuevos sustratos usando medios orgánicos hidrofóbicos como disolventes. El sistema más intensivamente estudiado consiste de enzimas suspendidas en disolventes orgánicos hidrófobos con bajo o casi nulo contenido de agua (< 5% v/v).¹

En un disolvente orgánico, como es el hexano, las lipasas son capaces de llevar a cabo reacciones reversas a la hidrólisis, como esterificaciones y transesterificaciones. Los ésteres orgánicos son usados industrialmente como aromas, saborizantes y componente de productos farmacéuticos y detergentes de especialidad, entre otros. Los métodos más usados para su producción son la extracción a partir de plantas, su biosíntesis fermentativa y la catálisis ácida pero estos métodos exhiben altos costos y bajos rendimientos. La síntesis química no es favorecida, por problemas tales como baja selectividad, bajo rendimiento y toxicidad.²

El acetato de octilo es un éster importante en el área alimentaria, debido principalmente a su olor y sabor característico, y es de ocurrencia natural en infinidad de alimentos. Es ampliamente utilizado en esta y otras industrias, por lo que es importante obtenerlo de manera que la toxicidad asociada sea mínima.³

De ahí la importancia de encontrar rutas alternativas para su producción, como el empleo de biocatalizadores, que resulta atractiva por su alta selectividad y sus suaves condiciones de reacción.

El objetivo de este trabajo fue realizar la esterificación enzimática para producir acetato de octilo, a partir de octanol y ácido acético, en hexano como medio de reacción (ver Figura 1.1), con la ventaja sobre los métodos tradicionales de mejorar la productividad y reducir los problemas de toxicidad.

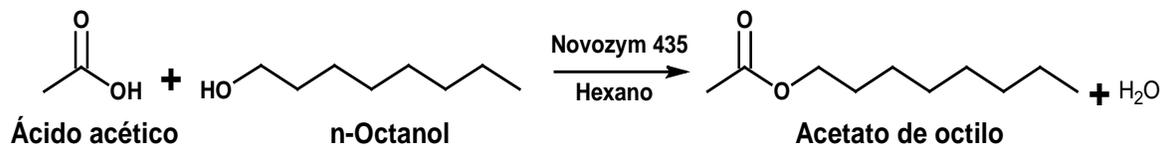


Figura 1.1. Esquema de la síntesis enzimática de acetato de octilo en hexano.

2. ANTECEDENTES

2.1. Ésteres.

2.1.1. Generalidades.

Los ésteres son moléculas orgánicas derivadas de ácidos carboxílicos en los que el grupo alcoxi (-OR) sustituye al grupo hidroxilo (-OH). Se forman por medio de la reacción de esterificación, en la que un ácido carboxílico reacciona con un alcohol para formar al éster y una molécula de agua (Figura 2.1).⁴

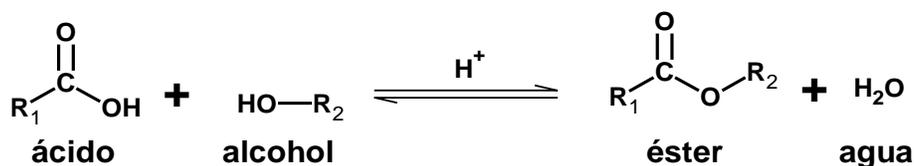
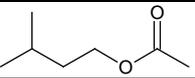
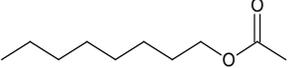
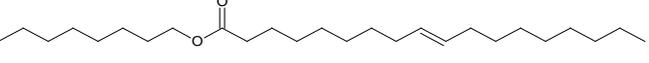


Figura 2.1. Esquema de reacción de esterificación.

Los ésteres son una de las clases más importantes de compuestos orgánicos a causa de su amplia variación en composición y propiedades, por lo que tienen aplicación como disolventes, plastificadores, lubricantes, perfumes y sabores en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, entre otras (Tabla 2-1).^{5,6,7}

Tabla 2-1. Ejemplos de ésteres de diferentes largos de cadena y sus usos.

Éster	Fórmula	Uso
Acetato de isoamilo		Sabor plátano ⁶
Acetato de octilo		Sabor naranja ³
Oleato de octilo		Emoliente, lubricante, entre otros. ⁸

La formación de agua representa un problema en las reacciones de esterificación, ya que desplaza el equilibrio de la reacción. Teniendo esto en cuenta, una forma de desplazar el equilibrio hacia los productos y favorecer la esterificación es remover el agua producida conforme la reacción progresa.⁹

Muchos métodos han sido propuestos con el fin de remover el agua. Entre ellos, la adición al sistema de reacción de tamiz molecular activado o una sal deshidratada, tal como sulfato de magnesio desecado. Otros métodos propuestos para la remoción del agua son: la pervaporación, la aspersion con aire y el enjuague con acetona.⁹

2.1.2. Acetato de octilo.

Particularmente, el acetato de octilo es un líquido incoloro, con un agradable olor frutal reminiscente a jazmín y neroli, y un sabor cítrico, cuyas propiedades se condensan en la Tabla 2-2.^{3,10,11}

Tabla 2-2. Propiedades del acetato de octilo.

Valor ácido	1.0 (máximo)	Punto de ebullición	208 °C
Apariencia	Líquido incoloro	Índice de refracción	1.418-1.421
Punto flash	86 °C	Peso molecular	172.27
Solubilidad	Soluble en alcohol y la mayoría de aceites y disolventes orgánicos; insoluble en agua.	Peso específico	0.865-0.868

Se encuentra naturalmente en los aceites esenciales del té verde, *Heracleum giganteum* L., cáscaras de naranja, limón, toronja, mandarina satsuma y pomelo; también se ha reportado su presencia en muchas variedades de albahaca, pan de trigo, queso cheddar, vino rojo, vinos espumosos y nectarina; su principal uso es como saborizante en muy bajas concentraciones, en muchos productos (Tabla 2-3).

Tabla 2-3. Usos reportados (ppm): (FEMA, 1994).

Categoría alimenticia	Usual	Máximo permitido
Productos de panadería	2.50	6.00
Lácteos congelados	0.40	0.87
Caramelos	2.10	4.70
Bebidas no alcohólicas	0.85	1.60

Su síntesis se realiza normalmente por medio de la acetilación química del octanol, usando catalizador ácido o metálico (ver Figura 2.2).^{4,12}

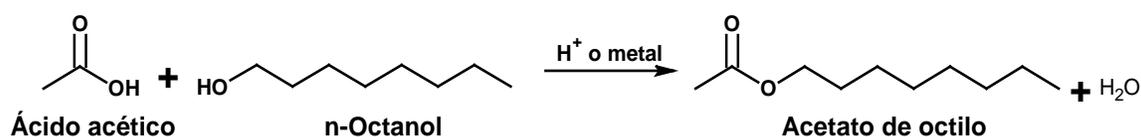


Figura 2.2. Síntesis química común del acetato de octilo.

Mohammadpoor-Baltork y col. (2001)¹² sintetizaron acetato de octilo utilizando sales metálicas derivadas del bismuto (BiCl_3 , Bi(TFA)_3 y Bi(OTf)_3), utilizando una concentración inicial de 0.3 M de octanol y 0.5 M de ácido acético en acetonitrilo como medio de reacción, a temperatura ambiente, agregando 1.2% de BiCl_3 , 1.1% de Bi(TFA)_3 o 0.25% de Bi(OTf)_3 , en cada caso. Sus resultados se condensan en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4. Síntesis química de acetato de octilo, Mohammadpoor- y col. (2001).

	Rendimiento de acetato de octilo (%)	Tiempo (min)
BiCl_3	97	45
Bi(TFA)_3	95	60
Bi(OTf)_3	98	5

Por otro lado, este compuesto ha sido producido también por biosíntesis directa (fermentaciones) o extraído de sus fuentes naturales, pero como se ha comentado con anterioridad en este escrito, este esquema de producción tiene como desventajas que el rendimiento de extracción es muy bajo y el producto natural llega a ser muy caro.^{2,13}

2.2. Lipasas

2.2.1. Generalidades.

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas EC 3.1.1.3) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza cuya función es catalizar la hidrólisis reversible de los triacilglicéridos para originar ácidos grasos y glicerol (Figura 2.3).¹⁴

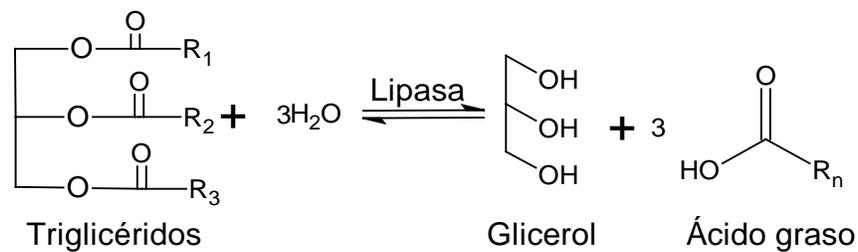


Figura 2.3. Función biológica de las lipasas: la hidrólisis de los triglicéridos.

Estas enzimas reciben especial atención gracias a sus numerosas aplicaciones, por poseer una gran estabilidad en disolventes orgánicos, no requerir co-factores, tener una amplia especificidad de sustrato y presentar una elevada enantioselectividad.

Las lipasas comerciales son de origen microbiano, principalmente de bacterias, hongos y levaduras.¹⁵ En la Tabla 2-5 se presentan algunas de las lipasas que se emplean con mayor frecuencia para fines biotecnológicos.

Tabla 2-5. Ejemplos de algunas de las lipasas más utilizadas en biotecnología.

Fuente	Peso (kDa)	Código en PDB	Especificidad	Laboratorio suministrador
<i>Rhizomocur miehei</i>	30	3TGL	<i>sn</i> -1,3	Amano, Novo Nordisk
<i>Geotrichum candidum</i>	60	1THG	<i>cis</i> - Δ^9	Sigma, Novo Nordisk
<i>Candida rugosa</i>	60	1CRL	No específica	Sigma, Amano, Fluka
<i>Pseudomonas glumae</i>	33	1TAH	No específica	Amano, Fluka
<i>Humicola lanuginosa</i>	30	1TIB	No específica	Amano, Novo Nordisk
<i>Burkholderia cepacia</i>	33	3LIP	No específica	Amano, Fluka
<i>Candida antarctica (B)</i>	60	1TCA	<i>sn</i> -1,3	Novo Nordisk, Fluka
<i>Rhizopus delemar</i>	41	1TIC	<i>sn</i> -1,3	Sigma, Roche, Fluka

2.2.2. Estructura de las lipasas.

Aunque existen diferencias en sus estructuras ya que poseen diferentes secuencias de aminoácidos y difieren en tamaño (22-60 KDa), todas las lipasas se pliegan de forma similar y poseen centros activos parecidos. Este plegamiento corresponde al modelo α/β y está compuesto por un “centro” de β hebras rodeado por α hélices típico de numerosas hidrolasas. El sitio activo está compuesto de una triada catalítica formada por Ser-His-Asp/Glu.^{15,16} El sitio catalítico de muchas lipasas no está expuesto a la superficie, sino que está metido en un túnel hidrofóbico protegido por residuos hidrofóbicos que actúan como una “tapa”. Esta tapa hidrofóbica cuando se pone en contacto con el disolvente se abre, generando una estructura catalíticamente activa y da acceso al sustrato. Las lipasas están activas solamente cuando se han adsorbido en una interfase agua/lípido en lo que se conoce como mecanismo de activación interfacial en las lipasas.¹⁶

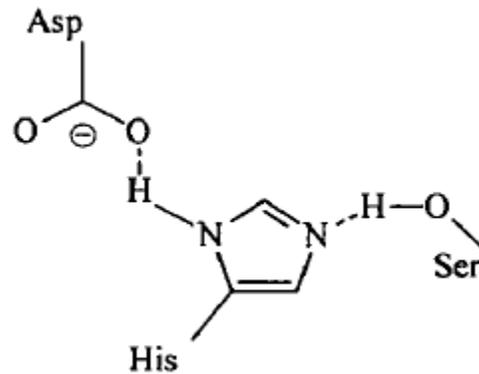


Figura 2.4. Tríada catalítica característica de las lipasas.

2.2.3. *Candida antarctica* lipasa B

Candida antarctica es una levadura que produce dos distintas lipasas denominadas A y B; la lipasa B fue la primera obtenida de la *Candida antarctica* y es la más utilizada ya que al contrario de la lipasa A es termoestable y presenta especificidad.¹⁷

Una forma comercial común de esta lipasa es Novozym® 435 de la compañía Novozymes (Dinamarca), la cual está inmovilizada en una resina acrílica macroporosa (Lewatit VPOC 1600, Lanxess, Alemania). La especificidad de la Novozym® 435 depende de los reactivos utilizados.¹⁸

Candida antarctica lipasa B es un catalizador muy eficaz por su amplia especificidad hacia el sustrato y ha demostrado una gran actividad catalítica para sintetizar una gran variedad de ésteres, amidas y tioles; su cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es aproximadamente de 30x40x50 Å. Su sitio catalítico está formado por la tríada catalítica antes descrita, la cual es responsable de la reacción.^{17,19}

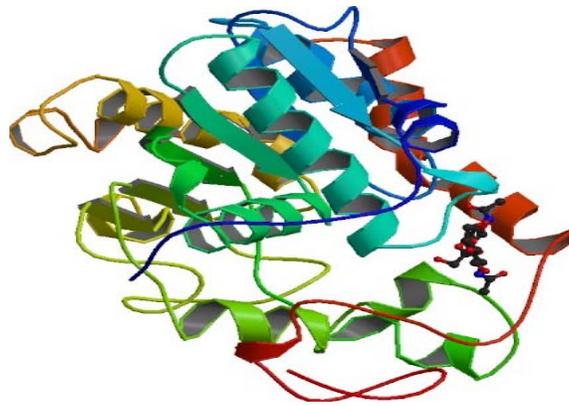


Figura 2.5. *Candida antarctica* lipasa B

2.2.4. Inmovilización de lipasas

Los liofilizados enzimáticos en polvo son convenientes para muchas aplicaciones catalíticas. Sin embargo, las partículas de enzima, al ser normalmente insolubles en los medios de reacción, algunas veces tienden a adherirse a las paredes del reactor especialmente cuando la enzima está hidratada. Estos problemas pueden ser reducidos por la inmovilización de la enzima en un soporte sólido.

Las ventajas de las enzimas inmovilizadas comparadas con las enzimas libres son varias; entre ellas se encuentran: su reuso, la separación facilitada de la enzima de los reactantes y de los productos y menores costos.²⁰

El material utilizado para la inmovilización de enzimas puede ser de dos tipos: hidrofílicos (celita, sílica gel, carbón activado y sefarosa) e hidrófobos (polietileno, poliestireno y acrílicos).

Para el caso de las lipasas, los materiales adecuados para la inmovilización son los hidrófobos, ya que los hidrofílicos provocan una alta pérdida de actividad debida a los cambios de conformación de la lipasa. Esto debido a que absorben la poca agua que hay en el sistema y que necesita la enzima para tener la

conformación adecuada para su actividad, así como también impide el acceso de sustratos hidrofóbicos.²¹

Al considerar un soporte para una enzima se deberá pensar en factores tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, agitación y el proceso de separación del sustrato del producto.

2.3. Reactores

2.3.1. Generalidades

Debido a la creciente aplicación de biorreactores en la industria, existen en una gran variedad de tamaños y formas de reactores enzimáticos.¹⁶

Un biorreactor en primera instancia tiene como objetivo minimizar el costo de fabricación de un producto de alta calidad; por ende, se busca también aumentar la rapidez de formación y calidad de un producto, mejorar la operación aséptica e innovar formas para eliminar los pasos limitantes especialmente de transferencia de calor y de masa, así como mejorar la subsecuente recuperación de producto.²²

Debido a que hay varios tipos de reactores enzimáticos, el uso de estos depende de cómo se encuentra la enzima libre o inmovilizada y el tipo de inmovilización de esta, lo cual determina la elección adecuada para un sistema de operación dado, esto se resume en la Figura 2.6.²²

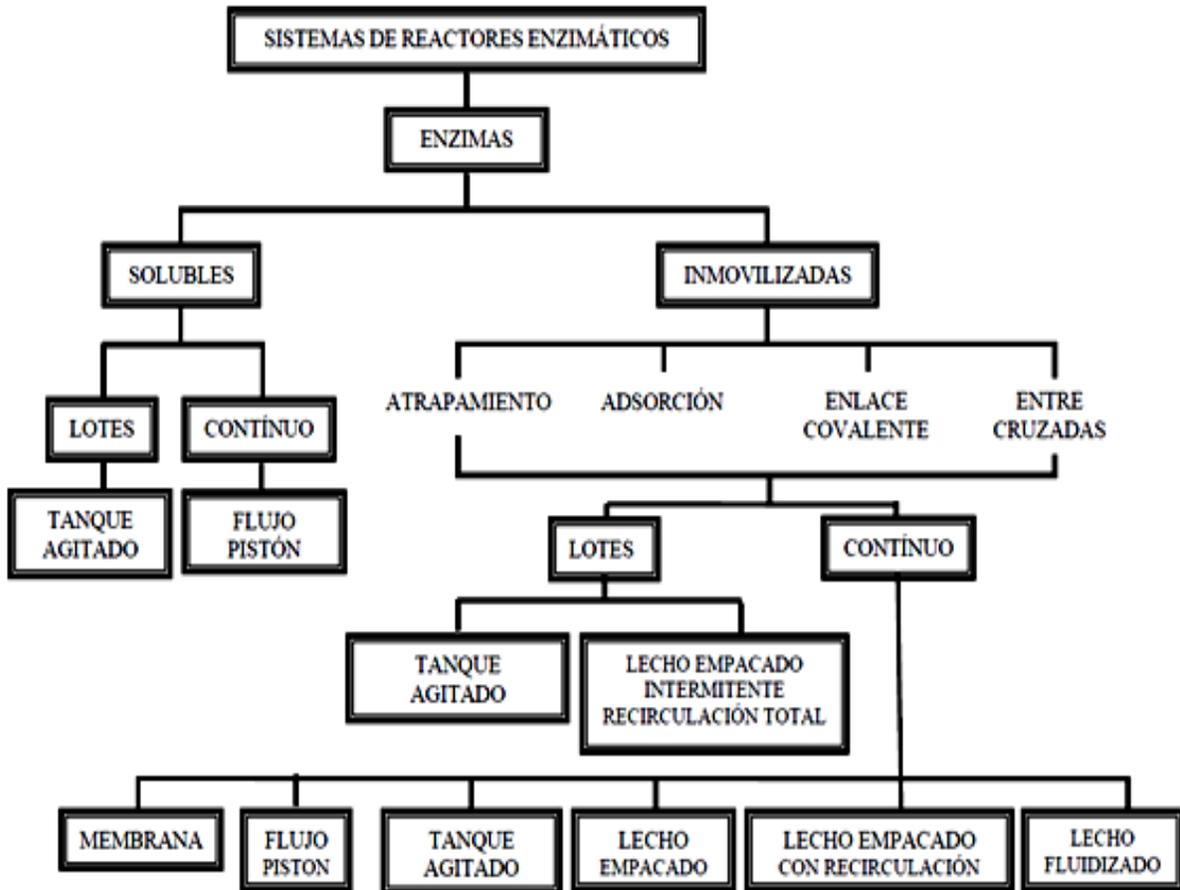


Figura 2.6. Árbol de decisión de reactores enzimáticos de acuerdo con el tipo de enzima a utilizar.

2.3.2. Reactor de lecho empacado

Por sus características, como su alta eficiencia, bajo costo, fácil construcción, operación y mantenimiento, los reactores de lecho fijo han sido tradicionalmente usados para reacciones catalíticas a gran escala en la industria química en general. Estos reactores son los más ampliamente usados para reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas.¹⁶

En este tipo de reactor, la enzima inmovilizada es usualmente empacada dentro de una tubería o columna enchaquetada para una operación isotérmica. Esto con el fin de proveer una mayor área de superficie por unidad de volumen de reacción.

En presencia de una fase, la dirección del flujo podría ser:

- Hacia arriba (evitando un exceso de acanalamiento).
- Hacia abajo (tomando ventaja de las fuerzas de gravedad).

En una situación bifásica:

- Las dos fases podrían ser bombeadas en direcciones opuestas (flujos contracorriente) con la más densa fluyendo hacia abajo.
- En la misma dirección (flujo paralelo).¹⁶

El reactor de lecho-fijo es uno de los más comúnmente empleados en la catálisis enzimática, ya que:

- Facilita el contacto y la subsecuente separación, así como la continua remoción de sustancias inhibitoras.
- Permite la reutilización de la enzima sin necesidad de separación previa. Las enzimas son a menudo usadas en forma inmovilizada en la industria ya que eso facilita su uso para ser operado en continuo y ofrecen la posibilidad de reutilizar la enzima repetidamente mientras esta permanezca activa.
- Permite manejar los sustratos de baja solubilidad mediante el uso de grandes volúmenes que contengan bajas concentraciones de sustrato.
- Conduce a una calidad más consistente de los productos y la mejora de la estabilidad de la enzima debido a la facilidad de automatización y control.
- Es adecuado a largo plazo y para la producción a escala industrial, de una manera diferente al reactor de tanque agitado, donde los gránulos enzimáticos serían susceptibles de romperse por causa del estrés mecánico.

- Logra reacciones libres de resistencia a la transferencia de masa y calor aumentando la velocidad en el lecho empacado de enzima.

Es más rentable que la operación por lotes. La relación entre el sustrato y la enzima es mucho menor en un reactor de lecho fijo que en los reactores convencionales por lotes, y esto resulta en un mayor rendimiento de la reacción. Un reactor de tanque agitado por lotes debe ser vaciado y rellenado al final del lote, lo que conduce a un tiempo de inactividad y pérdida de productividad y, además, está sujeto a sufrir variaciones de lote a lote. Así, en un reactor de lecho fijo, se obtiene producto más puro y más reproducible, así como una mayor productividad a partir de una cantidad fija de enzima comparado con lo logrado en el proceso por lotes.²³

Un flujo rápido alrededor del soporte del catalizador da una velocidad superficial alta, lo cual reduce la resistencia a la transferencia de masa externa, pero en contraparte, puede reducir la posibilidad de tiempo de contacto entre las moléculas de sustrato y el sitio activo de la enzima. La velocidad de flujo es usada para controlar predominantemente el grado de conversión en un reactor de flujo continuo.²¹

Varios trabajos de optimización de un reactor de lecho fijo han sido realizados, entre ellos Chang y col. (2007).²⁶ que estudiaron el efecto de tres factores (temperatura, flujo molar de alimentación y razón molar del sustrato) para la producción de laurato de hexilo, encontrando por su parte que el factor más importante fue el flujo (molar) de alimentación.

2.4. Disolventes orgánicos como medios de reacción

Aún cuando se ha reconocido que las enzimas tienen un enorme potencial como catalizadores, su aplicación industrial se restringe al considerar su uso sólo en su medio acuoso natural, especialmente en la hidrólisis de biopolímeros o producción de químicos de especialidad. Esta restricción se debe a muchos y muy

variados factores, entre los que se encuentran, la insolubilidad en agua de muchos compuestos, la ocurrencia de reacciones secundarias indeseadas, la degradación de reactivos orgánicos comunes, un equilibrio termodinámico desfavorable así como una recuperación compleja de los productos.²⁷

Existen numerosas aplicaciones de las lipasas en medios no acuosos. En 1966 se publicó el primer estudio de una reacción enzimática en medio orgánico, sin embargo, estos estudios han aumentado a partir de 1984 cuando Klibanov demostró que la actividad enzimática no está limitada a llevarse a cabo en medio acuoso.²⁸ Los factores que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas en disolventes orgánicos son el estado iónico de la enzima, inmovilización enzimática, hidratación del biocatalizador y del disolvente, contenido de agua en el sistema y transferencia de masa.²⁹

Un área de interés en la investigación en biotecnología es la biocatálisis en medios de reacción no convencionales, implicando sistemas de reacción con un contenido de agua reducido. Existen diversos medios de reacción no convencionales entre ellos los disolventes orgánicos (hexano, tolueno, ciclohexano) líquidos iónicos (sales orgánicas líquidas a temperatura ambiente) y los fluidos supercríticos como el CO₂. Sin embargo, los líquidos iónicos son excesivamente caros comparados a los disolventes orgánicos y también pueden ser tóxicos. Por otro lado, los fluidos comprimidos requieren de complejos equipos de alta presión que incrementan los costos de inversión y ponen en entredicho la viabilidad económica de los procesos.

Un factor muy importante en la enzimología en medios orgánicos es la cantidad de agua asociada con la enzima, ya que juega un papel importante en la actividad, estabilidad y especificidad. El control de la cantidad y la aplicación del agua son críticos para tener una aplicación exitosa en un sistema en un sistema catalítico no acuoso. El agua es necesaria para retener el estado conformacional tridimensional activo de la enzima y poder interactuar con el sustrato. El agua contribuye a la integridad estructural, a la polaridad del sitio activo y a la

estabilidad de la proteína. Ésta provee interacciones hidrofóbicas con los residuos polares en la molécula enzimática, la cual podría, de otro modo, interactuar con otra, creando una estructura conformacional incorrecta. El agua también puede limitar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos alrededor de la enzima. Generalmente los disolventes hidrofóbicos requieren una menor cantidad de agua (la retenida por la enzima) para la actividad enzimática. La cantidad necesaria de agua varía significativamente dependiendo del origen de la lipasa y del tipo de reacción.^{9,30}

Por otro lado, el disolvente y la enzima compiten por el agua; los disolventes de naturaleza hidrofílica son capaces de secuestrar moléculas de agua que se encuentran unidas a la enzima, impiden una hidratación suficiente de la proteína y propician una disminución de su actividad. El despojo del agua de la enzima está relacionado con la polaridad del disolvente; por ejemplo, el metanol puede desorber alrededor del 60% del contenido de agua unido a una enzima, mientras que el hexano sólo un 0.5%.²⁹

La utilización de disolvente orgánico en las reacciones enzimáticas proporciona ventajas puntuales que se enumeran a continuación.³¹

- El aumento de la solubilidad de los sustratos no polares.
- El equilibrio termodinámico se desplaza para favorecer más la síntesis que la hidrólisis.
- Supresión de las reacciones secundarias que dependen del agua (por ejemplo, la hidrólisis de anhídridos de ácido y halogenuros, polimerización de quinonas).
- La alteración de la especificidad del sustrato.
- Facilidad de recuperación de la enzima por filtración o centrifugación.
- La inmovilización puede alcanzarse mediante una simple adsorción sobre superficies no porosas ya que las enzimas se desorben difícilmente de estas superficies en medios no acuosos.

- A menudo mayor termoestabilidad.
- Eliminación de contaminación microbiana.
- Capacidad de las enzimas para ser utilizadas directamente en un proceso químico.

Uno de los disolventes más utilizado en la esterificación enzimática es el hexano debido principalmente a su alta hidrofobicidad y estabilidad de las enzimas. En la Tabla 2-6 se puede observar algunas reacciones de esterificación enzimáticas en las que se ha utilizado hexano como medio de reacción.

Tabla 2-6. Reacciones de esterificación cuyo medio de reacción es hexano.⁹

Enzima	Disolvente	Donador acilo	Alcohol
CAL SP382 inm.	Hexano	Ácido acético	Geraniol
RAL libre	Hexano	Ácido linoleico	Octanol
MML, CAL ANL inm	Hexano	Acético, butírico	Citronelol

2.5. Método estadístico Taguchi

El diseño de experimentos tiene su origen en Inglaterra en la década de 1920-1930, cuando Ronald A. Fisher lo aplicó en la agricultura y publicó su libro clásico, *Design of experiments*, en 1935. A partir de ese momento, muchos han sido los métodos diseñados y aplicados por estadistas de todo el mundo. Uno de estos métodos es el desarrollado entre 1950 y 1960 por el Dr. Genichi Taguchi, conocido como método Taguchi.³²

El método Taguchi tiene como objetivo encontrar un producto o proceso característico óptimo y robusto con una sensibilidad minimizada al ruido. Este método puede determinar el efecto de factores sobre las propiedades características y las condiciones óptimas de los factores; es un enfoque simple y sistemático para optimizar un diseño en rendimiento, calidad y costo.²⁵

El método Taguchi se basa en arreglos ortogonales cuya principal característica es que son diseños factoriales fraccionados, por lo que la cantidad de experimentos a realizar son menores, lo que conlleva un ahorro en tiempo, costo y complejidad en el manejo de datos. La elección de los factores y niveles a variar dependen del proceso, y a partir de esto se selecciona el arreglo ortogonal más adecuado.³²

El análisis estadístico se realiza utilizando un indicador estadístico llamado razón señal a ruido (S/N). Da una mayor información que el promedio (\bar{y}), ya que es una medida tanto de la ubicación como de la dispersión de los efectos medidos, por lo que puede considerarse que el método Taguchi puede determinar las condiciones experimentales teniendo la de menor variabilidad como condición óptima. Los términos “señal” y “ruido” representan los valores deseable e indeseable, respectivamente.^{25,32} Es calculado usando la fórmula:

$$S/N = -10 \log_{10}(MSD)$$

donde MSD significa desviación cuadrada media (por sus siglas en inglés) la cual es una medida de la dispersión de los datos y es calculada diferentemente de acuerdo al tipo de análisis estadístico que se quiera hacer, existiendo tres diferentes tipos. El primero es llamado “más pequeño es mejor” (tipo-S), donde los números más pequeños se asocian a los mejores resultados (por ejemplo, los contaminantes de un proceso); el segundo es llamado “más grande es mejor” (tipo-B), donde los mejores resultados se asocian a los números más grandes (por ejemplo, la resistencia de un metal); por último, existe el “nominal es mejor” (tipo-N), donde se busca la aproximación a un número dado (por ejemplo, el voltaje de salida de un capacitor).³²

MSD se calcula por medio de la fórmula:

para un diseño tipo-S:
$$MSD = \frac{Y_1^2 + Y_2^2 + \dots + Y_n^2}{n}$$

para un diseño tipo-B: $MSD = \frac{\frac{1}{Y_1^2} + \frac{1}{Y_2^2} + \dots + \frac{1}{Y_n^2}}{n}$

para un diseño tipo-N: $MSD = \frac{(Y_1 - Y_0)^2 + (Y_2 - Y_0)^2 + \dots + (Y_n - Y_0)^2}{n}$

donde Y_n = valor n,

Y_0 = valor al que se quiere aproximar, y

n = número de repeticiones

Después de calcular la razón señal/ruido S/N, se procede a realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una gráfica del efecto de los factores de control. Por medio de ellos, puede estimarse el efecto de un factor sobre las propiedades características y el experimento puede ser realizado con las réplicas mínimas usando un arreglo ortogonal. Su cálculo se detallará más adelante.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Mediante el uso de un diseño estadístico de Taguchi se puede determinar el efecto de los factores que controlan el rendimiento y la productividad de la esterificación enzimática de octanol con ácido acético, en un reactor de lecho fijo continuo con recirculación usando hexano como medio de reacción.

3.2. Objetivo general

Evaluar el comportamiento de un reactor de lecho fijo continuo con recirculación para la esterificación enzimática de octanol con ácido acético, mediante un diseño experimental usando un arreglo ortogonal de Taguchi a fin de maximizar la productividad del reactor.

3.3. Objetivos específicos

- ▲ Evaluar el efecto de la temperatura, cantidad de biocatalizador, concentración inicial de reactivos y cantidad de tamiz molecular sobre la reacción.
- ▲ Evaluar el efecto de los factores elegidos sobre la reacción llevada a cabo en un reactor de lecho fijo continuo con recirculación.
- ▲ Realizar un análisis estadístico por el método Taguchi para elegir la configuración del reactor que maximice la productividad de acetato de octilo.

4. METODOLOGÍA

4.1. Materiales

La enzima utilizada fue la Novozym® 435, que es la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa Lewatit® (BASF), amablemente donada por Novozymes® México, con una actividad específica de 7,000 PLU/g (μ moles de laurato de n-propilo producidos por minuto por gramo de catalizador empleado). Las sustancias químicas utilizadas: octanol (Sigma Aldrich), acetato de octilo (Sigma Aldrich) y ácido acético (J.T. Baker) fueron grado reactivo y el hexano (Química Barsa) fue grado industrial.

4.2. Equipos

En el sistema de reacción se utilizaron los equipos siguientes: bomba peristáltica modelo 7592-50 equipada con un controlador microprocesador modelo 7592-60 y tubo de viton modelo 6412-73, todo de la marca Masterflex (Cole Parmer Instruments Company, EU); agitador magnético marca Barnstead modelo Thermolyne Type 1000 (Thermo Scientific, EU); baño de recirculación Hetofrig Type CB 13-25E (Heto-Holten, Dinamarca); autoclave Hirayama modelo HA-300MII (Amerex Instruments, Inc., EU); incubadora agitadora refrigerada Innova 4330 (New Brunswick Scientific, EU).

Por otro lado, para las pruebas analíticas se utilizó un cromatógrafo de gases modelo GC 5890 Series II equipado con un inyector automático GC/SFC 7673 y una columna capilar ChromPack modelo CP-WAX 52 CB con una longitud de 30 metros (Varian, EU) y detector de flama (FID). Nitrógeno de ultra alta pureza (Praxair, México) se usó como gas acarreador.

4.3. Pruebas preliminares en régimen por lotes.

Con el fin de establecer las condiciones iniciales para llevar a cabo la reacción se realizaron experimentos previos por lotes.

Inicialmente se probó en reactores de lote el efecto de la cantidad de biocatalizador sobre la reacción. Para ello se evaluaron tres cantidades de enzima, 1, 5 y 20 mg/mL, a 60 °C y 200 rpm, usando una concentración inicial de reactivos de 0.5 M; 30 mL de esta solución se colocaron en matraces Erlenmeyer roscados de 100 mL. A continuación, se colocaron en la incubadora agitadora, usando un matraz por cada tiempo de muestreo.

Posteriormente se evaluó el efecto de la temperatura; para ello se prepararon en los matraces Erlenmeyer roscados 30 mL de solución equimolar de los reactivos, con 20 mg/mL de enzima, a 200 rpm en la incubadora agitadora, a tres diferentes temperaturas: 60, 30 y 25 °C.

Enseguida se probó el efecto de la adición de tamiz molecular a la reacción para absorber el agua generada. Este experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer roscados, a 25 °C y 200 rpm en la incubadora agitadora, con una concentración inicial de reactivos de 0.5 M, agregando 20 mg/mL de enzima y 75 mg/mL de tamiz molecular.

Finalmente se evaluó el efecto de variar la concentración inicial de reactivos. Se evaluaron tres diferentes concentraciones iniciales equimolares (0.75, 1.0 y 1.25 M) de reactivos, colocando 30 mL de solución en los matraces Erlenmeyer roscados. Estas reacciones se llevaron a cabo a 25 °C y 200 rpm, con 20mg/mL de enzima y sin tamiz.

El rendimiento de la reacción fue calculado mediante la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\mu\text{moles de acetato de octilo producidos}}{\mu\text{moles de octanol iniciales}} \times 100$$

4.4. Sistema de reacción en lecho fijo.

Se pudo concluir, después de analizar los datos obtenidos en los experimentos por lotes, que la cantidad de biocatalizador y la concentración inicial de reactivos fueron los principales factores que afectaron el rendimiento de la reacción (el tamiz molecular no tuvo un efecto positivo ni negativo, y la temperatura se decidió dejarla fija a 25 °C, puesto que el rendimiento fue adecuado aun a estas suaves condiciones de reacción). Enseguida, se decidió utilizar un diseño estadístico Taguchi L₉ variando tres factores (cantidad de biocatalizador, concentración equimolar inicial y flujo de alimentación) a tres niveles, como puede observarse en la Tabla 4-1 (la última columna de la Tabla 4-1 muestra la leyenda “vacía”; esto es debido a que en este diseño es posible variar hasta un cuarto factor; realizar el análisis estadístico a esta columna como si se tratara de un factor “desconocido” podría revelar la existencia de un factor no tomado en cuenta o de una interacción entre factores). Estos experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 4-1. Diseño estadístico Taguchi L₉ utilizado.

Experimento	Enzima (mg/mL)	[M _o]	Flujo (mL/min)	“vacía”
1	2.5	0.5	189	1
2	2.5	0.75	379	2
3	2.5	1.0	568	3
4	5	0.5	379	3
5	5	0.75	568	1
6	5	1.0	189	2
7	10	0.5	568	2
8	10	0.75	189	3
9	10	1.0	379	1

La productividad del reactor fue la variable a maximizar, calculándose mediante la fórmula:

$$Productividad = \frac{\mu\text{moles de acetato de octilo producidos}}{(\text{g de enzima})(\text{L de solución})(\text{h de reacción})}$$

Para llevar a cabo los experimentos, se prepararon las tres soluciones equimolares de octanol y ácido acético en hexano. Posteriormente, se tomaron 500 mL de la solución y se agregaron a un tanque de sustrato. La solución adicionada se acondicionó a la temperatura de 25 °C mediante agua de enfriamiento del baño de recirculación (que pasó a través de la chaqueta del tanque y de la columna). Al alcanzar dicha temperatura, la solución se hizo pasar (a la velocidad establecida en el diseño), en flujo ascendente, por la columna empacada de enzima y perlas de vidrio, separadas por una malla metálica (ver Figura 4.1). La columna fue de vidrio, enchaquetada, con un diámetro interno de 2 cm y altura de 20 cm. Durante el tiempo en que transcurrió la reacción, se tomaron muestras de 2 mL a diferentes intervalos de tiempo, que fueron analizadas en el cromatógrafo de gases para medir la variación en la concentración de los reactivos octanol y ácido acético y del producto acetato de octilo (de los tres químicos se realizaron curvas de calibración previas al análisis).

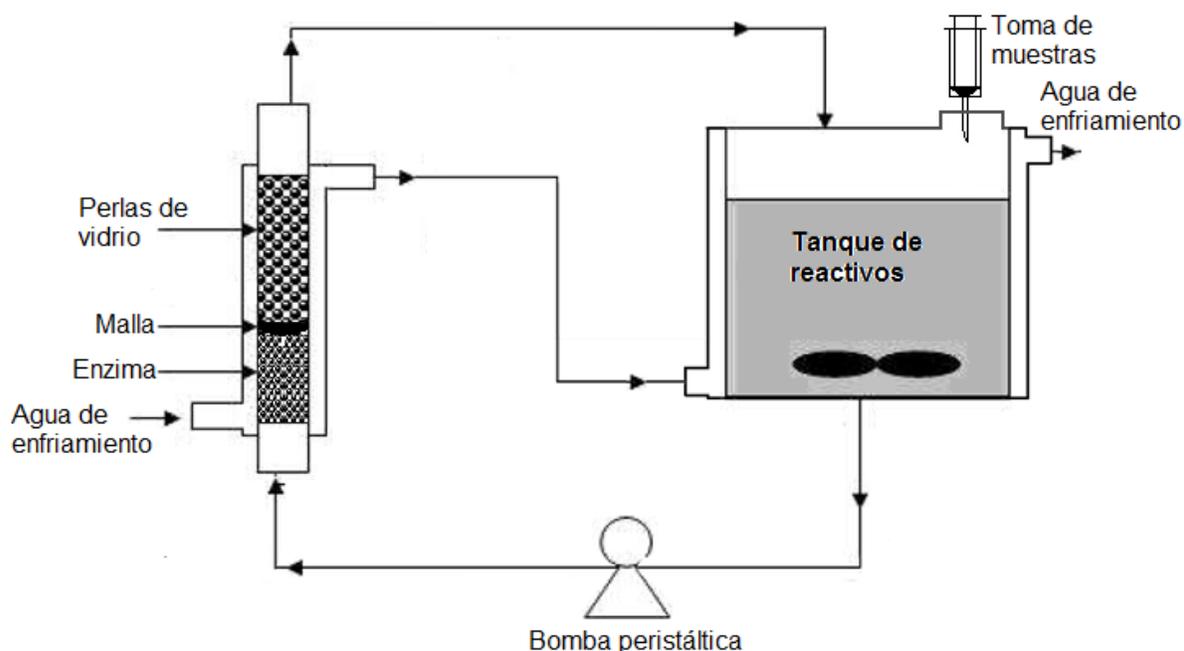


Figura 4.1. Diagrama del sistema de reacción.

4.4.1. Desactivación de la enzima.

Con el fin de verificar si la reacción podía llevarse a cabo sin catalizador enzimático, se procedió a desactivar térmicamente un lote de enzima en una autoclave marca Hirayama a 120 °C por 60 min. Se pesaron 5 g de este lote para empacar la columna y se llevó a cabo la reacción a 25 °C, con una concentración inicial de octanol y ácido acético de 0.5 M y un flujo de 379 mL/min.

4.4.2. Ciclos de actividad de la enzima.

Para evaluar los ciclos de actividad útil de la enzima, se empacaron 5 g de enzima en la columna, llevando a cabo la reacción a 25 °C y un flujo de 379 mL/min con una concentración inicial de reactivos de 0.5 M. Después de cada ciclo, la enzima fue lavada haciendo pasar un flujo de 379 mL/min de hexano durante 5 min. Posteriormente, la reacción se llevó a cabo nuevamente a las mismas condiciones.

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Pruebas preliminares en régimen por lotes.

El sistema de reacción primario se evaluó en régimen por lotes, para conocer el efecto de la cantidad de biocatalizador (1, 5 y 20 mg/mL) sobre la reacción, a 60 °C y 200 rpm, con una concentración inicial de reactivos de 0.5 M en hexano. Los resultados se muestran en la Figura 5.1 donde puede observarse que con la máxima cantidad de biocatalizador, la reacción se completa en 10 min con un rendimiento de aproximadamente 90%, mientras que con las otras dos concentraciones enzimáticas, la reacción transcurre más lentamente con un bajo rendimiento final de aproximadamente 30%, probablemente debido a un efecto inhibitorio del ácido acético, como ha sido reportado por Romero y col. (2007)⁶ (en la Figura 5.2 puede verse que, al inicio de la reacción, el comportamiento de la rapidez es linealmente dependiente con la cantidad de enzima). Esto debido probablemente a la disminución del pH del microambiente enzimático causado por la fuerte polaridad del ácido acético.

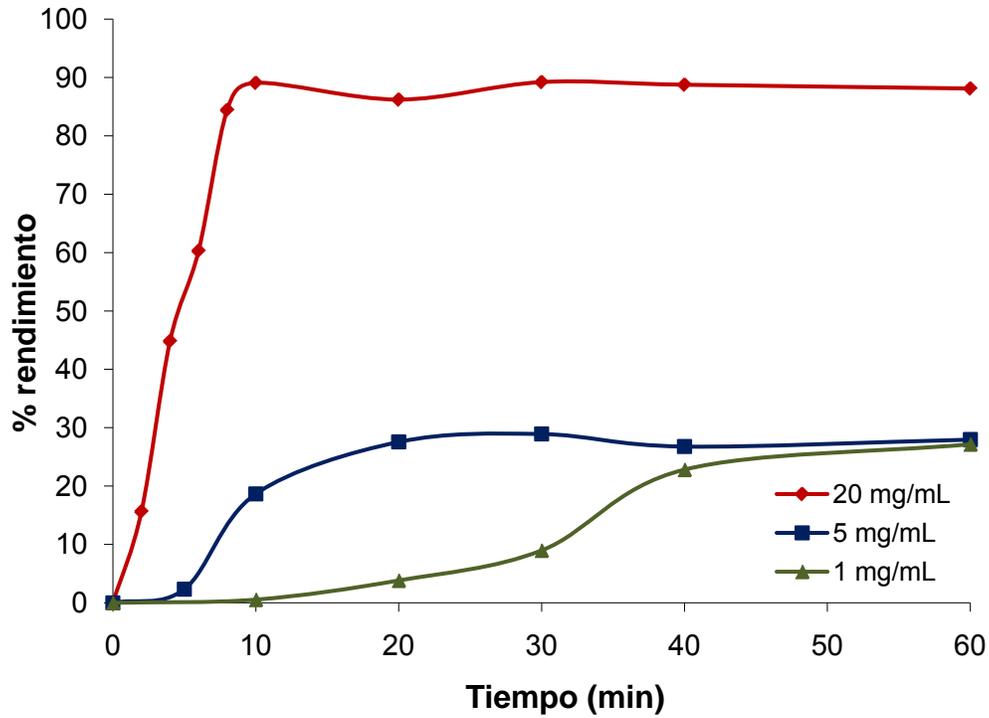


Figura 5.1. Rendimiento de acetato de octilo a diferentes concentraciones de biocatalizador. [Reactivos] = 0.5 M, a 60 °C y 200 rpm.

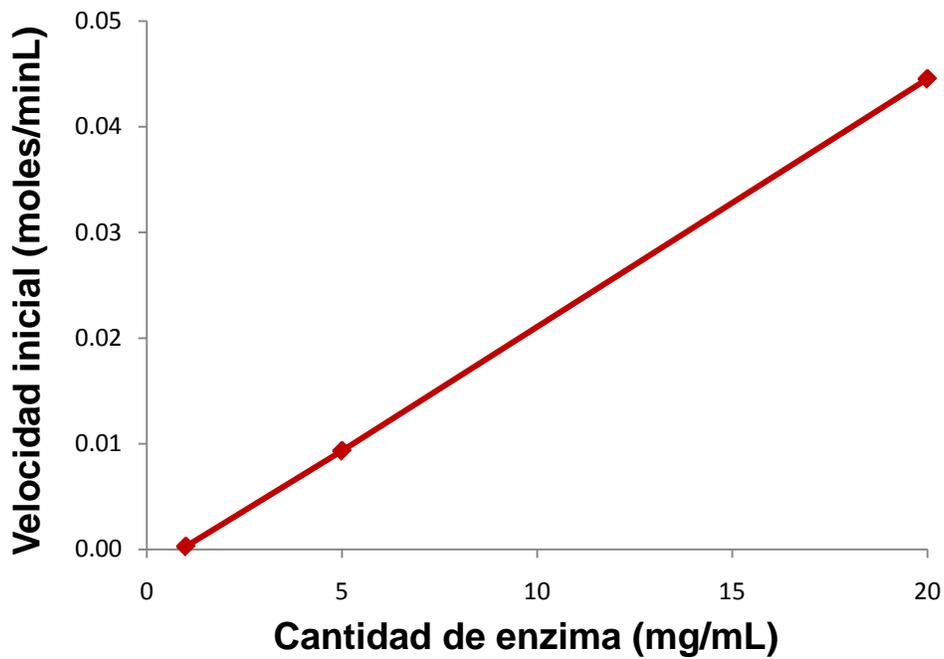


Figura 5.2. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes cantidades de enzima. [Reactivos] = 0.5 M, a 60 °C y 200 rpm.

Posteriormente se evaluó la cinética de la reacción a diferentes temperaturas (60, 30 y 25 °C). Estas reacciones se llevaron a cabo a 200 rpm, con una concentración inicial de reactivos de 0.5 M y una cantidad de biocatalizador de 20 mg/mL. El biocatalizador utilizado, Novozym 435, es tolerante al calor, pudiendo trabajar incluso a temperaturas de 100 °C. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre la reacción de esterificación es difícil de predecir, ya que afecta de dos formas: por un lado, tiene un efecto positivo aumentando la constante cinética, y por el otro, una elevada temperatura podría conducir a una pérdida de la estructura terciaria y por tanto a una inactivación de la enzima.⁶ En la Figura 5.3 se presentan los resultados a las diferentes temperaturas. Se concluye de los resultados experimentales que la reducción en la temperatura afectó la rapidez de reacción, pero no la conversión máxima (aproximadamente 90%), obteniéndose comportamientos muy similares a 25 y 30 °C, donde la conversión máxima es alcanzada en 20 minutos, el doble del tiempo necesario a 60 °C.

En la Figura 5.4 se muestra el perfil de rapidez inicial a las diferentes temperaturas. Se observa que en este intervalo la rapidez inicial se incrementa con el aumento de la temperatura, lo que indica que predomina el efecto positivo de la temperatura sobre la reacción.

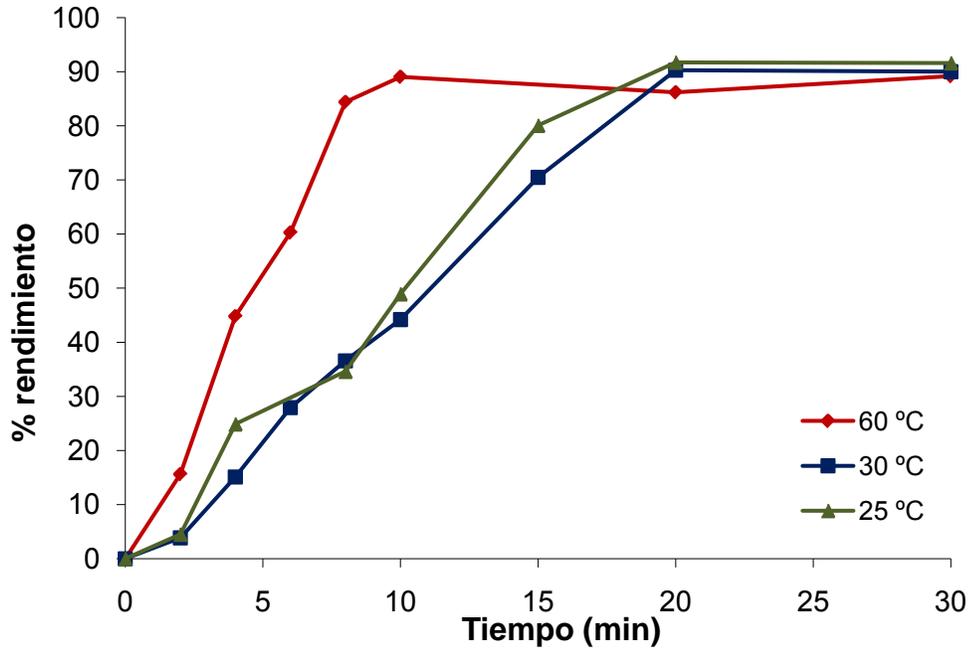


Figura 5.3. Rendimiento de acetato de octilo bajo diferentes temperaturas. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL y 200 rpm.

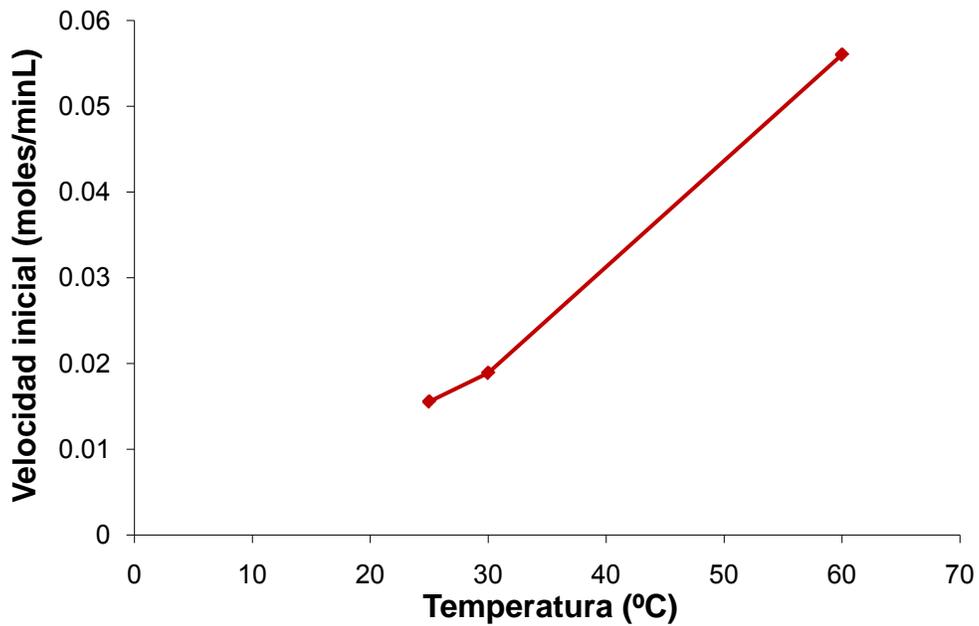


Figura 5.4. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes temperaturas. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL y 200 rpm.

Posteriormente se probó el efecto de la presencia de tamiz molecular en la reacción. De acuerdo a la capacidad de absorción máxima de agua del tamiz reportado por el fabricante y suponiendo que la reacción se complete al 100%, con una concentración inicial de reactivos de 0.5 M, la cantidad mínima teórica de tamiz a agregar es de 37.2 mg/mL de solución de reacción. Se decidió agregar el doble para contar con un margen adecuado. En la Figura 5.5 se muestra el rendimiento de acetato de octilo (la reacción se llevó a cabo a 25 °C, 200 rpm, enzima = 20 mg/mL), y puede observarse que la adición de tamiz no afectó significativamente ni la rapidez de reacción ni la conversión máxima. Un resultado similar ha sido reportado por Cortez y col. (1992), en un estudio en el que se trató de remover el agua en una reacción de esterificación en hexano biocatalizada por Lipozyme® IM, que es la lipasa de *Rygomucor miehei* soportada en una resina macroporosa sintética Duolite®, que es capaz de absorber agua.¹⁷ Esta reacción se estudió empleando tres métodos diferentes para la remoción de agua: aspersión con aire, enjuagado con acetona seguido de aspersión por aire y por último agregando tamiz molecular. Las tres estrategias resultaron en cantidades residuales de agua y tuvieron poco efecto sobre la conversión de la reacción.⁹ Por otro lado cabe mencionar que el soporte del biocatalizador Novozyme® 435 (Lewatit VPOC 1600, Lanxess) es una resina acrílica hidrofóbica que también es capaz de absorber o retener agua. Por ello, este resultado pudo deberse a que el agua formada durante la reacción fue readsorbida por la enzima, o bien por la formación de microambientes acuosos que se mantuvieron en equilibrio en la mezcla de reacción al tamente hidrofóbica (por ejemplo, capas de agua depositadas sobre las partículas de biocatalizador) como ha sido reportado por Mora (2007).¹⁷

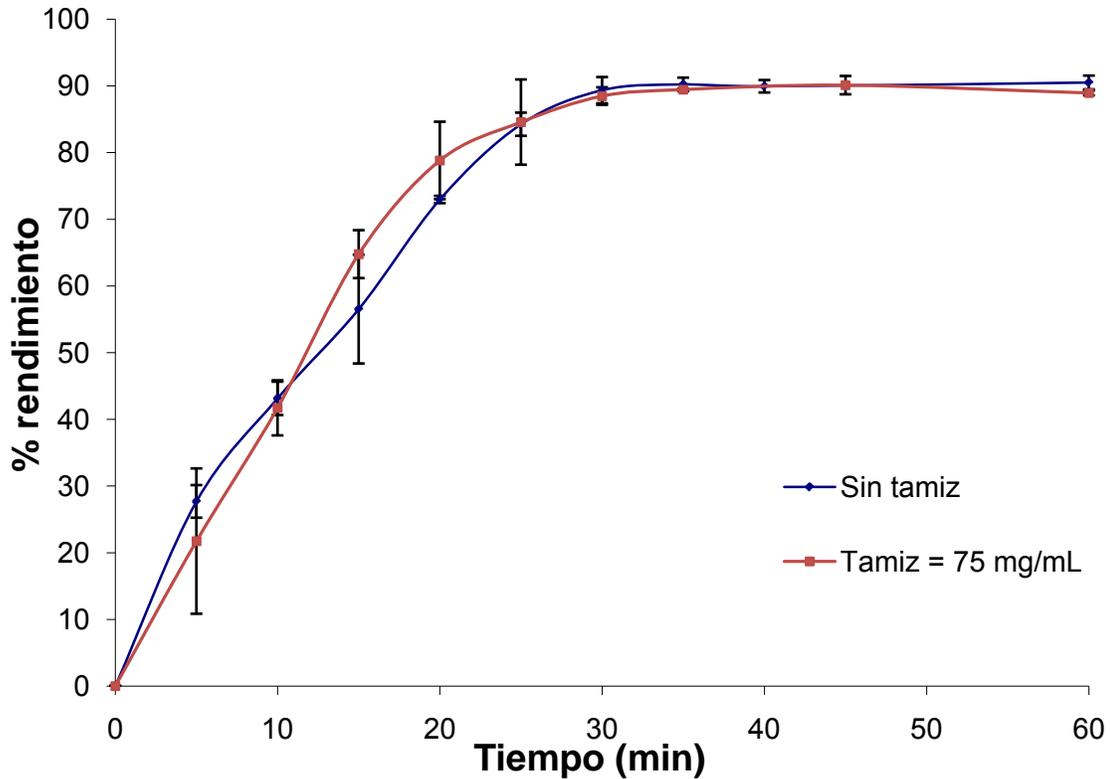


Figura 5.5. Rendimiento de acetato de octilo con y sin tamiz molecular. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 20 mg/mL, a 25 °C y 200 rpm.

A continuación se evaluó la reacción bajo mayores concentraciones equimolares iniciales de reactivos (0.75, 1.0 y 1.25 M), a 25 °C y 200 rpm, con 20 mg/mL de enzima y sin tamiz molecular. La Figura 5.6 muestra los resultados obtenidos. Puede verse que el incremento no tiene un efecto neto sobre la conversión máxima, que se mantiene en alrededor de 90% en cualquier caso. Sin embargo, el tiempo en el que se alcanza dicha conversión sí varía, prácticamente duplicándose para cada incremento de concentración inicial. En la Figura 5.7 se muestra el perfil de rapidez de reacción inicial a estas diferentes concentraciones iniciales de sustrato. A estas concentraciones iniciales, la rapidez de reacción aumenta linealmente, lo que indica, de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten, que a estas concentraciones no se han saturado los sitios activos del biocatalizador.

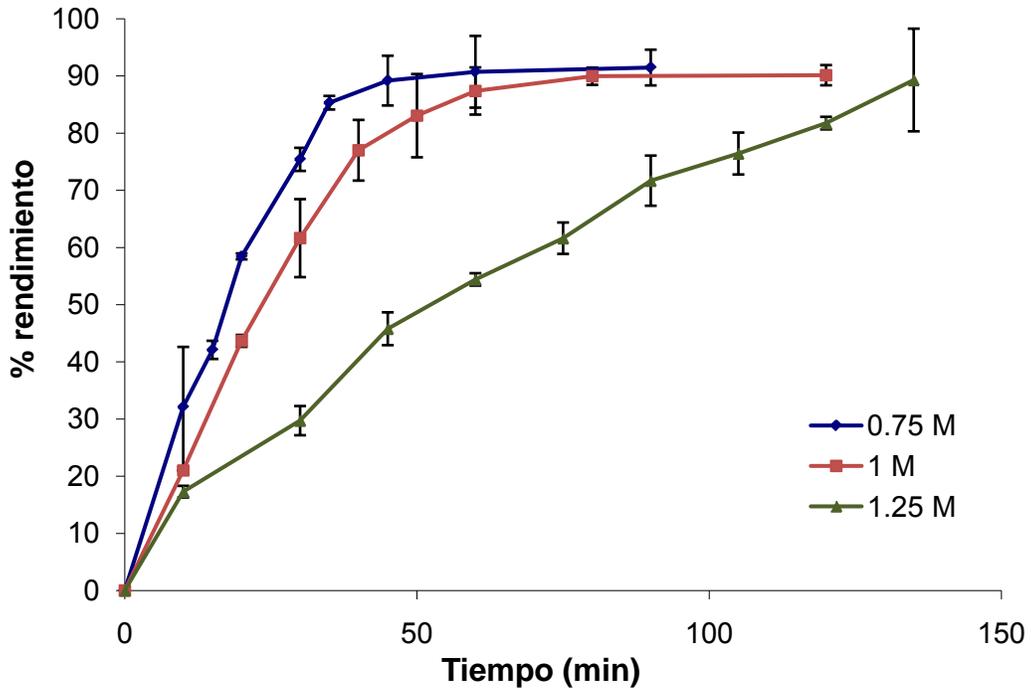


Figura 5.6. Rendimiento de acetato de octilo (variando la concentración inicial de reactivos).
Enzima = 20 mg/mL, a 25 °C y 200 rpm.

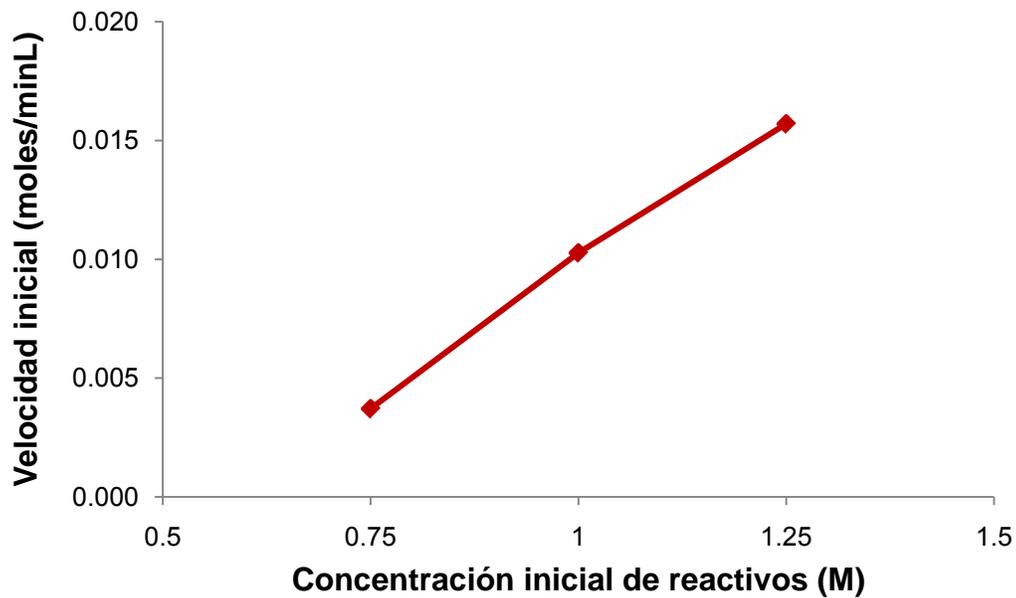


Figura 5.7. Perfil de rapidez de reacción inicial a diferentes concentraciones iniciales de reactivos. Enzima = 20 mg/mL de solución, a 60 °C y 200 rpm.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores en régimen por lotes, se concluyó que los factores principales que mostraron tener un efecto sobre el sistema de reacción fueron la cantidad de biocatalizador, la concentración inicial de reactivos y la temperatura. En el caso del tamiz, no se observó un efecto significativo sobre el desempeño de la reacción, por lo que no se utilizó en los experimentos posteriores.

Con esas consideraciones y dado que a una temperatura de 25 °C no hubo una disminución en el rendimiento máximo alcanzado, para realizar los experimentos posteriores en el reactor de lecho fijo, se decidió operarlos isotérmicamente a dicha temperatura. Adicionalmente, una temperatura baja conlleva un ahorro económico al reducirse los requerimientos de energía térmica.⁶ Asimismo, se decidió probar tres cantidades diferentes de enzima, 2.5, 5 y 10 mg/mL, con el fin de establecer si era factible utilizar una cantidad más baja que 20 mg/mL; adicionalmente, para estudiar el efecto de la concentración equimolar inicial de reactivos, se probaron tres niveles, 0.5, 0.75 y 1.0 M, ya que a concentraciones más altas se puede presentar un efecto inhibitorio de los reactivos sobre la enzima.

Por otro lado, por tratarse de un reactor de lecho fijo con recirculación, se decidió probar el efecto de la velocidad de flujo en el reactor, también a tres niveles, 189, 379 y 568 mL/min.

5.2. Sistema de reacción en lecho fijo.

Como se mencionó anteriormente, el diseño experimental para las pruebas en el reactor de lecho fijo fue un diseño Taguchi L_9 , variando la cantidad de biocatalizador, la concentración equimolar inicial de reactivos y el flujo de alimentación, cada uno a tres diferentes niveles. En la Tabla 5-1 se condensan los resultados de productividad obtenidos al realizar la serie de reacciones en la columna de lecho fijo usando el diseño experimental propuesto. Cabe mencionar que en un diseño estadístico factorial hubiera sido necesario realizar $3^3 = 27$

experimentos más sus réplicas, por lo que se hace obvio el ahorro económico y en tiempo al utilizar el diseño Taguchi.

Tabla 5-1. Resultados de productividad de las 9 reacciones por duplicado.

Exp.	Enzima (mg/mL)	[M] _o	Flujo (mL/min)	F4 (vacío)	Productividad ₁	Productividad ₂
1	2.5	0.50	189	1	10.50	10.23
2	2.5	0.75	379	2	5.61	5.66
3	2.5	1.00	568	3	4.03	4.03
4	5	0.50	379	3	8.63	8.36
5	5	0.75	568	1	5.19	5.23
6	5	1.00	189	2	3.48	3.60
7	10	0.50	568	2	14.66	14.60
8	10	0.75	189	3	5.72	5.71
9	10	1.00	379	1	5.55	5.51

El tiempo de reacción se definió como el tiempo en el cual el rendimiento de acetato de octilo de la siguiente muestra tuvo un aumento inferior al 4%. A ese tiempo fue calculada la productividad, puesto que se consideró que a lo largo de la reacción más allá de ese tiempo conduciría a un aumento mínimo de rendimiento de producto a costa de disminuir la productividad, además que se estaría por alcanzar el rendimiento máximo (ver Tabla 5-2).

Tabla 5-2. Tiempo y rendimiento utilizados para el cálculo de la productividad.

Experimento	Tiempo (h)	Rendimiento alcanzado (%)	Productividad (μmol/gLh)
1	7	90.7	10.5
2	18	84.5	5.6
3	35	88.1	4.0
4	4.5	95.8	8.6
5	10	86.8	5.2
6	20	88.5	3.5
7	1.3	90.9	13.4
8	4.5	85.7	5.7
9	6	82.9	5.5

A continuación, se calcularon la productividad promedio y el indicador S/N (MSD tipo-B, pues se busca maximizar la productividad) para cada experimento, por medio de las fórmulas:

$$\overline{Productividad} = \frac{(Productividad_1 + Productividad_2)}{2}$$

$$S/N = -10\log(MSD)$$

$$MSD (tipo - B) = \frac{\frac{1}{Productividad_1^2} + \frac{1}{Productividad_2^2}}{2},$$

Tabla 5-3. Productividad promedio y razón señal/ruido S/N, por experimento.

Exp.	Enzima (mg/mL)	[M _o]	Flujo (mL/min)	F4 (vacío)	Productividad (μmol/gLh)	$\overline{S/N}$
1	2.5	0.50	189	1	10.36	20.31
2	2.5	0.75	379	2	5.63	15.01
3	2.5	1.00	568	3	4.03	12.10
4	5	0.50	379	3	8.50	18.58
5	5	0.75	568	1	5.21	14.33
6	5	1.00	189	2	3.54	10.98
7	10	0.50	568	2	13.63	22.68
8	10	0.75	189	3	5.71	15.14
9	10	1.00	379	1	5.53	14.85
Promedio					7.02	16.07

A continuación se calcularon de nueva cuenta la productividad y la razón señal/ruido S/N promedios, pero en esta ocasión para cada nivel de cada factor, tomando la productividad y la razón señal/ruido obtenidos en el experimento en el que cada factor estuvo a ese nivel, esto es:

$$\overline{Productividad}_{i,j} = \frac{(X_{i,j})}{3}$$

$$X_{i,j} = Productividad_{1,i,j} + Productividad_{2,i,j} + Productividad_{3,i,j}$$

$$S/N_{i,j} = -10\log(MSD_{i,j})$$

$$MSD_{i,j} (tipo - B) = \frac{\frac{1}{(Productividad_{1i,j})^2} + \frac{1}{(Productividad_{2i,j})^2} + \frac{1}{(Productividad_{3i,j})^2}}{3},$$

donde $X_{i,j}$ = Productividad total del factor i en el nivel j

$i\{1,2,3,4\}$ = factor (cantidad de biocatalizador, concentración inicial, flujo)

$j\{1,2,3\}$ = nivel del factor i (tres niveles por factor)

Los resultados se condensan en la Tabla 5-4. Se calculó también para la columna vacía, ya que, como se mencionó anteriormente, esta columna podría revelar la existencia de un cuarto factor importante o la interacción entre dos factores.

Tabla 5-4. Productividad y razón señal/ruido S/N promedios por nivel de cada factor.

		$Productividad_{i,j}$ ($\mu\text{mol/gLh}$)	$\overline{S/N}_{i,j}$	$X_{i,j}$
i = 1	Enz₁	6.68	15.81	20.03
	Enz₂	5.75	14.63	17.25
	Enz₃	8.29	17.56	24.87
i = 2	[M_o]₁	10.83	20.52	32.49
	[M_o]₂	5.52	14.83	16.56
	[M_o]₃	4.37	12.64	13.10
i = 3	Flujo₁	6.54	15.48	19.62
	Flujo₂	6.55	16.15	19.66
	Flujo₃	7.62	16.37	22.87
i = 4	Vac₁	7.03	16.50	21.10
	Vac₂	7.60	16.23	22.80
	Vac₃	6.08	15.27	18.24

A continuación se realizó el análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés). Para ello, se calcularon los grados de libertad, la suma de la diferencia de los cuadrados, la reunión, la varianza de la fuente, la prueba F y el porcentaje de contribución de la fuente a la variación total. Su definición y cálculo se describen inmediatamente, y sus resultados se condensan en la Tabla 5-5.

- **Grados de libertad**

Para un experimento Taguchi, los grados de libertad (G.L.) de un factor se definen como el número de niveles del factor menos uno. Todos los factores en este experimento tuvieron dos grados de libertad.

- **Suma de cuadrados de la diferencia**

La suma de cuadrados de la diferencia se calculó con la fórmula:

$$SDC_{i,j} = (3) \sum_{j=1}^3 (S/N_{i,j} - \overline{S/N})^2, \quad i = \{1,2,3\}$$

donde: $S/N_{i,j}$ = Razón señal/ruido de cada factor i al nivel j

$\overline{S/N}$ = Razón señal/ruido promedio.

- **Reunir**

Este concepto puede ser explicado de la siguiente manera. Con el ANOVA se intenta determinar si los factores individuales de un experimento son significantes comparando su variación con la variación total de los datos del experimento. Para lograr esto, se necesita un buen estimado de la variación total, la cual es llamada variación del error.

Esta variación del error puede ser estimada de dos formas: la primera, es utilizando las columnas vacías, cuya variación debería ser aleatoria y casi igual a la variación total; la segunda, utilizar las columnas a las cuales se les hubo asignado factores sospechosos de ser significativos, pero que finalmente parecen no serlo. En general, si la fuente de variación de un factor es menor que la de una columna vacía o si es significativamente menor que la de algunas otras columnas con factores en ellas, puede ser considerada aleatoria y por tanto ser reunida con otros factores insignificantes o vacíos para proveer una base para estimar la variación aleatoria del experimento.

En este experimento puede verse que la fuente de variación del flujo es menor (7.96) que el de la columna vacía (10.33); por tanto a este factor es reunido. Su variación de fuente y grados de libertad se transfieren a la columna **G.L.** y **SDC_e** (grados de libertad del error y suma de cuadrados de la diferencia del error, respectivamente), al igual que los respectivos valores de la columna vacía.

- **Varianza de la fuente**

La varianza de la fuente (V_i) es la variación de la fuente corregida por los grados de libertad, de acuerdo a la fórmula:

$$V_i = \frac{DSC_i}{G.L._i}$$

También la varianza de la fuente del error (V_e) se calculó (mostrada en la columna respectiva), tomando en cuenta que la variación del error total (mostrada en la parte baja de la columna (V_e)) se calculó mediante la fórmula:

$$V_{\text{total}} = \frac{\sum S_e}{\sum G.L._e}$$

- **Prueba F**

La razón F de la fuente se calculó sólo para factores significativos y que no fueron reunidos (cantidad de biocatalizador y concentración inicial de reactivos), la cual fue una prueba estadística de significancia. Se calculó por la fórmula:

$$F_i = \frac{V_i}{V_{etotal}}$$

Las razones F de la fuente fueron mayores a 1.5, por lo tanto esos factores (cantidad de biocatalizador y concentración inicial de reactivos) fueron significativos.

- **Porcentaje de contribución de la fuente a la variación total**

El porcentaje de contribución de la fuente a la variación total (ρ) se calculó igualmente sólo para los factores no reunidos, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\rho_i = \left(\frac{SDC_i}{SDC_{total}} \right) (100)$$

Tabla 5-5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

Nivel del factor	Productividad ($\mu\text{mol/gLh}$)	S/N (dB)	X_{ij} ($\mu\text{mol/gLh}$)	G. L.	SDC_i	Reunir	G. L.	SDC_e	V_i	V_e	F_i	ρ_i (%)
Enz ₁	6.68	15.81	20.03	2	13.01	no			6.50		6.88	11.20
Enz ₂	5.75	14.63	17.25									
Enz ₃	8.29	17.56	24.87									
[M _o] ₁	10.83	20.52	32.49	2	99.32	no			49.66		52.49	85.54
[M _o] ₂	5.52	14.83	16.56									
[M _o] ₃	4.37	12.64	13.10									
Flujo ₁	6.54	15.48	19.62	2	1.31	si	2	1.31		0.65		
Flujo ₂	6.55	16.15	19.66									
Flujo ₃	7.62	16.37	22.87									
Vac ₁	7.03	16.50	21.10	2	2.47	si	2	2.47		1.24		
Vac ₂	7.60	16.23	22.80									
Vac ₃	6.08	15.27	18.24									
e total							4	3.78		0.95		
Total				8	116.11				14.51			
Promedio		16.00										

De acuerdo a los resultados condensados en la Tabla 5-5, el factor que tiene el mayor efecto sobre la variación total del experimento es la concentración inicial de reactivos ($\rho_{[M_o]} = 85.54\%$), seguido de la cantidad de biocatalizador ($\rho_{ENZ} = 11.2\%$).

Es decir, que al optimizar estos factores, manteniendo la concentración inicial de reactivos en 0.5 M y la cantidad de biocatalizador en 10 mg/mL es posible controlar más del 95% de la variación del proceso.

Enseguida, se realizó el diagrama del efecto de los factores de control (Figura 5.8), que es una representación gráfica de la razón señal/ruido S/N por nivel de factor. En esta gráfica una pendiente elevada indica un fuerte efecto del cambio de nivel del factor sobre el desempeño del sistema. Por el contrario, una pendiente pequeña (línea cercana a la horizontal), indica que el cambio de nivel del factor tiene un bajo o despreciable efecto sobre el sistema. Adicionalmente, un

valor de señal ruido S/N por sobre la media indica un efecto positivo, mientras que un valor por debajo de la media un efecto negativo.

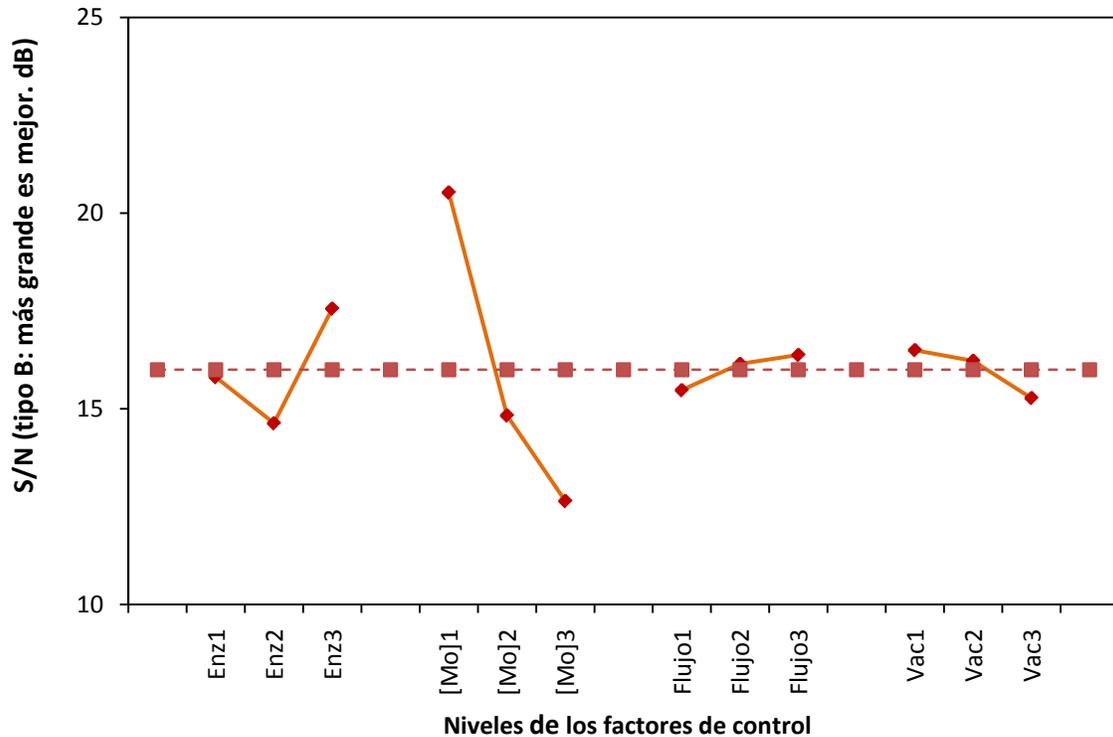


Figura 5.8. Diagrama del efecto de los factores de control.

Puede verse en la Figura 5.8 que los diferentes niveles de biocatalizador tienen efectos contrarios sobre la reacción. A los niveles 1 y 2 (2.5 y 5 mg/mL) la razón señal/ruido S/N del sistema está por debajo de la media, mientras que solamente al nivel 3 (10 mg/mL) dicha razón está sobre la media. Esto indica que es el nivel 3 el mejor nivel para fijar la cantidad de biocatalizador pues tiene un efecto positivo sobre la productividad, además de la pendiente al pasar del nivel 2 y 3 puede inferirse la mejora.

En el caso de la concentración inicial de reactivos, puede verse que el único nivel con una señal/ruido S/N por encima de la media es el 1 (0.5 M), y también se observa que al pasar a los siguientes niveles se da un descenso brusco de dicha razón, lo que indica un efecto muy negativo sobre la productividad; en este caso,

por tanto, el mejor nivel para fijar la concentración inicial de reactivos es el 1. Esto pudo deberse, como ha sido reportado por Romero y col. (2007),⁶ y comentado anteriormente, al pronunciado efecto de inactivación del ácido acético sobre la enzima aún a tan bajas concentraciones como 0.1 M. Por ello, el aumento en la concentración inicial del ácido acético de 0.5 a 0.75 y 1 M impactó de forma tan negativa sobre la razón señal/ruido y la productividad.

En el caso del flujo y del factor no usado (columna marcada como “vacía”), ambos tienen efectos muy similares, sin que se observen pendientes muy bruscas al cambiar de nivel. Esto es un indicativo del poco efecto de dicho factor así como de la inexistencia de algún factor no evaluado o interacción entre factores sobre la productividad; en el caso del flujo, éste puede fijarse tanto en el nivel 2 ó 3 que están ligeramente sobre la media.

La Tabla 5-6 muestra el nivel determinado como el más adecuado de cada factor que debe ser usado en el reactor de lecho fijo; dicha determinación se obtuvo tanto de los resultados del ANOVA como del diagrama del efecto de los factores de control.

Tabla 5-6. Niveles adecuados a utilizar en el reactor de lecho fijo de los factores estudiados.

Enzima (mg/mL)	[M_o]	Flujo (mL/min)
10	0.50	379

5.2.1. Sistema de reacción con enzima desactivada.

Como se mencionó anteriormente, se realizó una desactivación térmica a un lote de enzima con el fin de usarla en el lecho empacado y de esta manera comprobar si el catalizador enzimático era imprescindible para que se llevara a cabo la reacción. A lo largo de la reacción, las alícuotas analizadas no mostraron un incremento en la presencia del producto, acetato de octilo, como se puede observar en la Figura 5.9, aún después de 4 veces el tiempo de reacción requerido

para alcanzar el rendimiento máximo con la enzima activa, manteniendo constantes las otras condiciones; esto indica que la actividad enzimática es primordial para que la esterificación se lleve a cabo bajo las condiciones de operación de este trabajo.

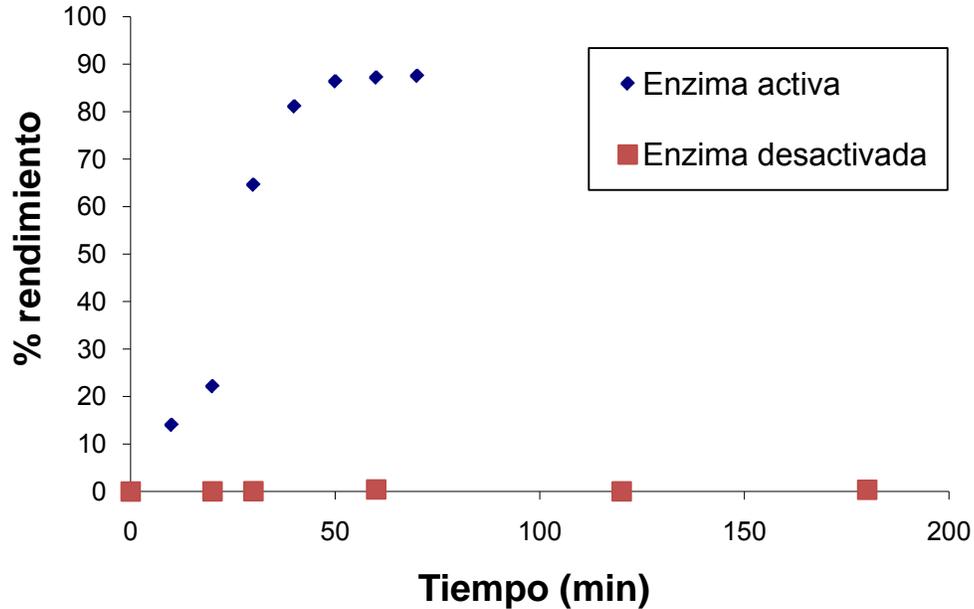


Figura 5.9. Rendimiento de acetato de octilo con enzima activa y desactivada. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 10 mg/mL, a 25 °C y flujo de 379 mL/min.

5.2.2. Ciclos de actividad del biocatalizador en el biorreactor.

Los ciclos de actividad útil de la enzima fueron probadas usando 10 mg /mL de enzima en la columna, llevando a cabo la reacción a 25 °C y un flujo de 379 mL/min con una concentración inicial equimolar de reactivos de 0.5 M. Después de cada ciclo, la enzima fue lavada haciendo pasar un flujo de 379 mL/min de hexano durante 5 min, para posteriormente llevar a cabo la reacción haciendo pasar la solución de reactivos a las mismas condiciones.

En la Figura 5.10 se muestran los resultados. Puede verse que el rendimiento de acetato de octilo se mantiene muy semejante durante tres ciclos de reacción, después de los cuales baja ligeramente debido a la disminución de

actividad de la enzima, probablemente provocada por el efecto inhibitorio del ácido acético o bien por deterioro mecánico de la misma. Esto es ligeramente inferior al resultado obtenido por Yadav y col. (2003)², quienes reportaron hasta un cuarto reuso; sin embargo, en ese trabajo fue utilizado acetato de vinilo en lugar de ácido acético, lo que evita o disminuye el efecto inhibitorio del ácido sobre la enzima, ya como ha sido demostrado en varios trabajos.⁶

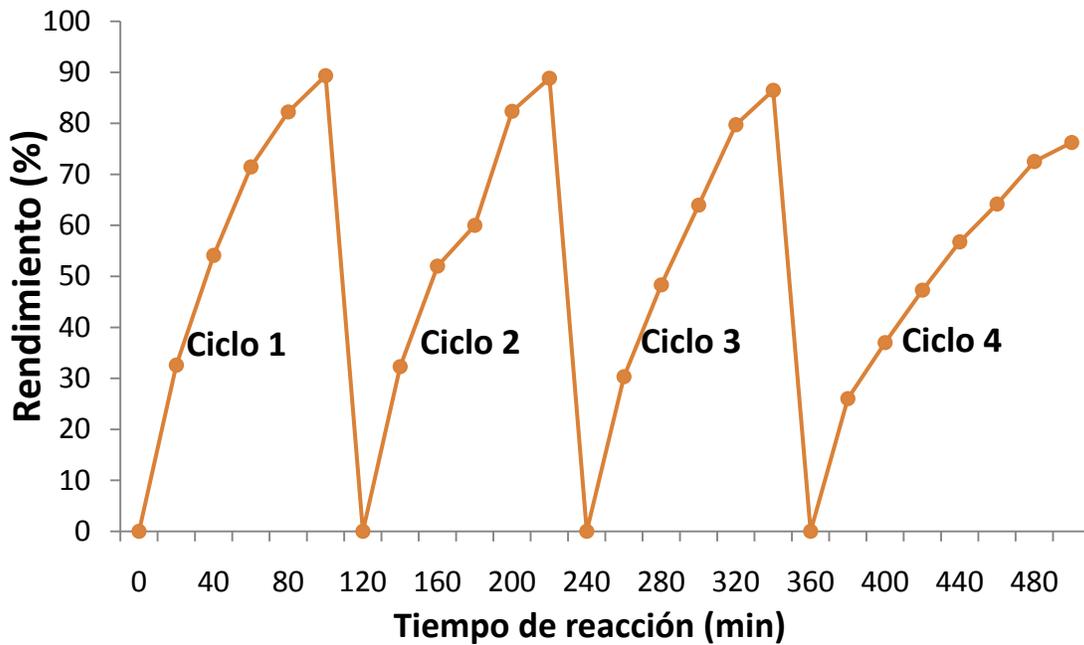


Figura 5.10. Rendimiento de acetato de octilo durante 4 ciclos de actividad útil de la enzima. [Reactivos] = 0.5 M, enzima = 10 mg/mL, a 25 °C y flujo de 379 mL/min, lavado con hexano entre ciclos.

6. CONCLUSIONES

El reactor de lecho fijo continuo con recirculación usado para la esterificación enzimática de octanol con ácido acético fue evaluado mediante un diseño experimental usando un arreglo ortogonal Taguchi L_9 , variando tres factores (cantidad de biocatalizador, concentración inicial de reactivos y flujo de alimentación) a tres diferentes niveles, encontrándose, a partir del ANOVA y el diagrama del efecto de los factores de control, que la combinación que permite la productividad más elevada es usar una concentración equimolar inicial de ácido acético y octanol de 0.5 M, una cantidad de biocatalizador de 10 mg/mL y un flujo de alimentación al biorreactor de 378 mL/min, a una temperatura de 25 °C.

La esterificación enzimática con Novozyme® 435 de octanol con ácido acético se llevó a cabo satisfactoriamente en un sistema diseñado a tal fin y basado en un reactor de lecho fijo en continuo con recirculación, utilizando hexano como medio de reacción.

A partir de experimentos por lotes, se determinó que la temperatura, la cantidad de biocatalizador, la concentración inicial de reactivos fueron los factores principales con un efecto sobre la reacción; sin embargo, el tamiz molecular no mostró ningún efecto sobre la reacción.

Por medio de la desactivación térmica de un lote de enzima previa a su uso, se determinó que, para que la reacción de esterificación de octanol y ácido acético se lleve a cabo, es necesaria la mediación de la enzima.

Se determinó que la enzima puede re-utilizarse sin pérdida considerable de su actividad catalítica hasta tres ciclos.

7.RECOMENDACIONES

Como recomendaciones, para trabajos futuros se presentan las siguientes ideas:

- Evaluar el desempeño de otras lipasas comercialmente disponibles en la reacción.
- Evaluar el uso de otros disolventes no polares, tal como heptano, isooctano, ciclohexano o tolueno, entre otros para evaluar el efecto de la naturaleza del disolvente sobre la reacción.
- Estudiar a detalle el posible efecto inactivador producido por el reactivo ácido acético.
- Estudiar y comparar otros medios de reacción con énfasis en los enmarcados dentro de la química verde o limpia, como los fluidos comprimidos o los líquidos iónicos.
- Realizar un estudio de prefactibilidad o plan de negocios para evaluar la viabilidad del proceso a escala comercial como alternativa a los ya existentes de producción del acetato de octilo.

8. REFERENCIAS

1. Hudson, E., Eppler, R. y Clark, D. (2005). Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Current opinion in Biotechnology*, 16(6):637-643.
2. Yadav, G. y Trivedi, A. (2003). Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7):783-789.
3. Burdock, G. (2004). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. 5ª edición, EU, CRC Press, 1439.
4. Wade, L. (2004). *Química Orgánica*. 5ª ed., EU, Pearson,
5. Rocha, J., Gil, M. y García, F. (1999). Optimisation of the enzymatic synthesis of n-octyl oleate with immobilised lipase in the absence of solvents. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(7):607-612.
6. Romero, M., Calvo, L. y Alba, C. (2007). A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *Journal of Biotechnology*, 127(2):269-277.
7. Bartling, K., Thompson, J., Pfromm, P., Czermak, P. y Rezac, M. (2001). Lipase-catalyzed synthesis of geranyl acetate in n-hexane with membrane-mediated water removal. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(6):676-681.
8. Laudani, C., Habulin, M., Primozie, M., Knez, Z., Porta., G. y Reverchon, E. (2006). Optimisation of n-octyl oleate enzymatic synthesis over *Rhizomucor miehei* lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 29(2):119-127.
9. Yahya, A., Anderson, W., y Moo-Young, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7-8):438-450.

10. Ash, M. y Ash, I. (1995). Handbook of food additives. 1ª edición, Inglaterra, Gower, 621.
11. Furia, T. (1980). Handbook of food additives. Vol. I, 2ª edición, EU, CRC Press, 294
12. Mohammadpoor-Baltork, I., Aliyan, H. y Khosropour, A. (2001) Bismuth(III) salts as convenient and efficient catalysts for the selective acetylation and benzoylation of alcohols and phenols. Tetrahedron, 57(27):5851-5854
13. Güvenç, A., Kapucu, N., Bayraktar, E. y Mehmetoglu, Ü. (2003). Optimization of the enzymatic production of isoamyl acetate with Novozym 435 from *Candida antarctica*. Chemical Engineering Communications, 190(5-8):948-961.
14. Arroyo, M. (2000). Síntesis enantioselectivas catalizadas por lipasas microbianas. Anales de la Real Sociedad Española de Química, 1:19-24.
15. Schmid, R. y Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. Angewandte Chemie International Edition, 37(12):1608-1633
16. Montenegro, H. (2007). Hidrólisis enzimática de diésteres de luteína en un reactor enzimático de lecho empacado empacado con recirculación. Tesis de Maestría en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F.
17. Mora, M. (2007). Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua. Tesis de Doctorado en Ingeniería, Facultad de Química, UNAM, D.F.
18. López, M. (2002). Hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína con *Candida antarctica*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D.F.
19. Gotor-Fernández, V., Busto, E. y Gotor, V. (2006). *Candida antarctica* lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. Advanced Synthesis and Catalysis, 348(7-8):797-812.

-
20. Porras, J. (2009). Síntesis enzimática de poli-L-láctido en líquidos iónicos. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D.F.
 21. Min Kuo, T. y Gardner H. (2002). Lipid biotechnology. 1a Ed., EU, Marcel Dekker Inc., 357-387pp.
 22. Cooney, C. (1983). Bioreactors: Design and Operation. Science, 219:728-733.
 23. Laudani, C., Habulin, M., Kneza, Z., Porta, G. y Reverchon, E. (2007). Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. Journal of Supercritical Fluids, 41(1):74-81.
 24. Vulfson, E., Halling, P. y Holland, H. (2001). Enzymes in Nonaqueous Solvents. 1a Ed., EU, Humana Press.
 25. Mousavi, S., Yaghmaei, S., Jafari, A., Vossoughi, M. y Ghobadi, Z. (2007). Optimization of ferrous biooxidation rate in a packed bed bioreactor using Taguchi approach. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 46(10):935-940
 26. Chang, S., Shaw, J., Yang, C. y Shieh, C. (2007). Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. Process Biochemistry, 42(9):1362-1366
 27. Gallardo, R., Rojas, A. y Valerio-Alfaro, G. (2004). Efecto del grupo protector en la especificidad de sustrato de la lipasa de *Candida antarctica* en la aminólisis de amino ésteres en disolvente orgánico. Revista de la Sociedad Química de México, 48(4):300-304.
 28. Koskinen, A. y Klivaniv, A. (1998). Enzymatic reactions in organic media. 1ª Ed., Reino Unido, Blackie Academic and Professional.
 29. Ávila, D. (2000). Hidrólisis enzimática de ésteres de luteína. Tesis de Licenciatura de Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, D.F.

30. Klibanov, A. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409:241-246.
31. Serdakowski, A. y Dordick, J. (2008). Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in biotechnology*, 26(1):48-54.
32. Lloyd, C. (1993). Reliability improvement with design of experiments. 1^a Ed. EU, Marcel Dekker, Inc.

9. APÉNDICE

Establecimiento del protocolo de trabajo del cromatógrafo de gases.

Las temperaturas de trabajo en el cromatógrafo de gases se muestran a continuación:

Temperatura del inyector: **250 °C**

Temperatura del detector (FID): **280 °C**

Temperatura del horno: **160 °C**

Tiempo de análisis: **8 minutos.**

Los tiempos de retención promedio de cada componente con este protocolo se muestran en la Tabla 9-1, mientras que en la Figura 9.1 se muestra un cromatograma típico obtenido durante el transcurso de las reacciones. Como puede observarse, los tiempos de retención de los compuestos están suficientemente separados entre ellos, lo que evita la existencia de traslapes. Además, con este protocolo el tiempo de análisis total no es largo (8 minutos), por lo que se minimiza el error por la pérdida por evaporación de los compuestos, ya que aún a intervalos de muestreo cortos, no transcurre mucho tiempo entre el momento del muestreo y su inyección y cuantificación en el cromatógrafo de gases.

Tabla 9-1. Tiempos de retención promedio de los compuestos en el cromatógrafo de gases.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Hexano	3.5
Ácido acético	4.8
Acetato de octilo	5.0
Octanol	5.5

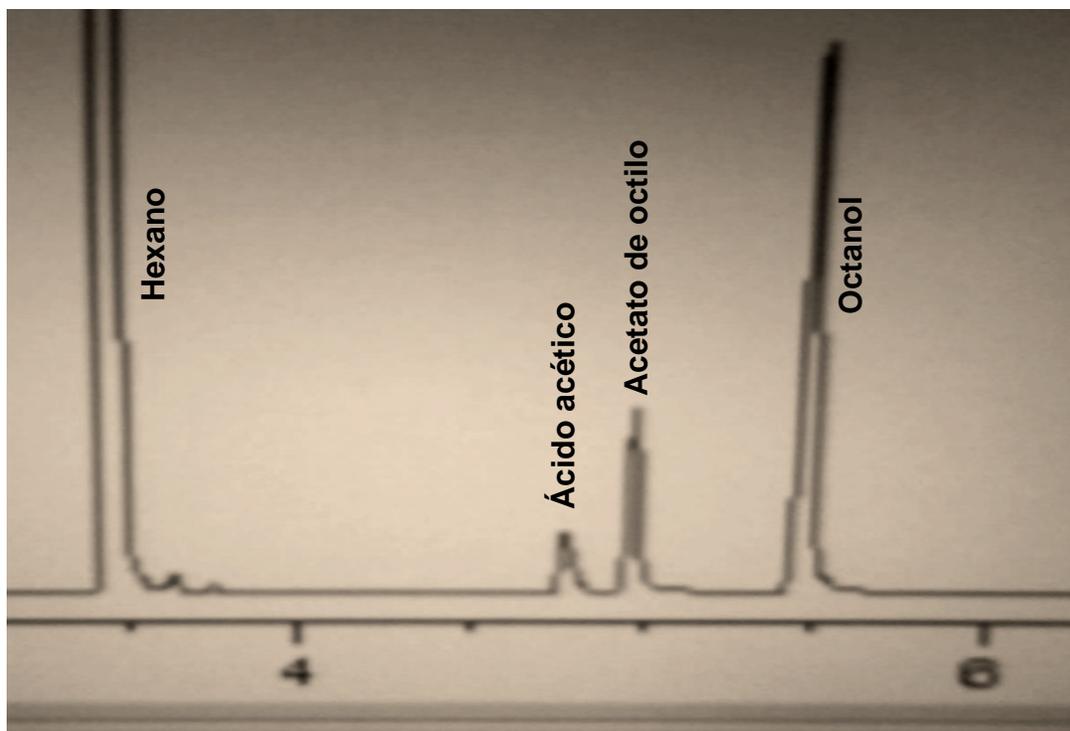


Figura 9.1. Cromatograma típico obtenido durante el transcurso de una reacción.

Posteriormente se realizaron las curvas de calibración de los tres componentes para poder realizar las cuantificaciones posteriores. La Figura 9.2 representa la curva de calibración obtenida para el acetato de octilo. Puede verse que en el intervalo de concentraciones probadas hay un ajuste lineal adecuado ($r = 0.99$), por lo que este método analítico puede considerarse confiable. Resultados similares se obtuvieron con las curvas de calibración de los otros compuestos (ácido acético y octanol).

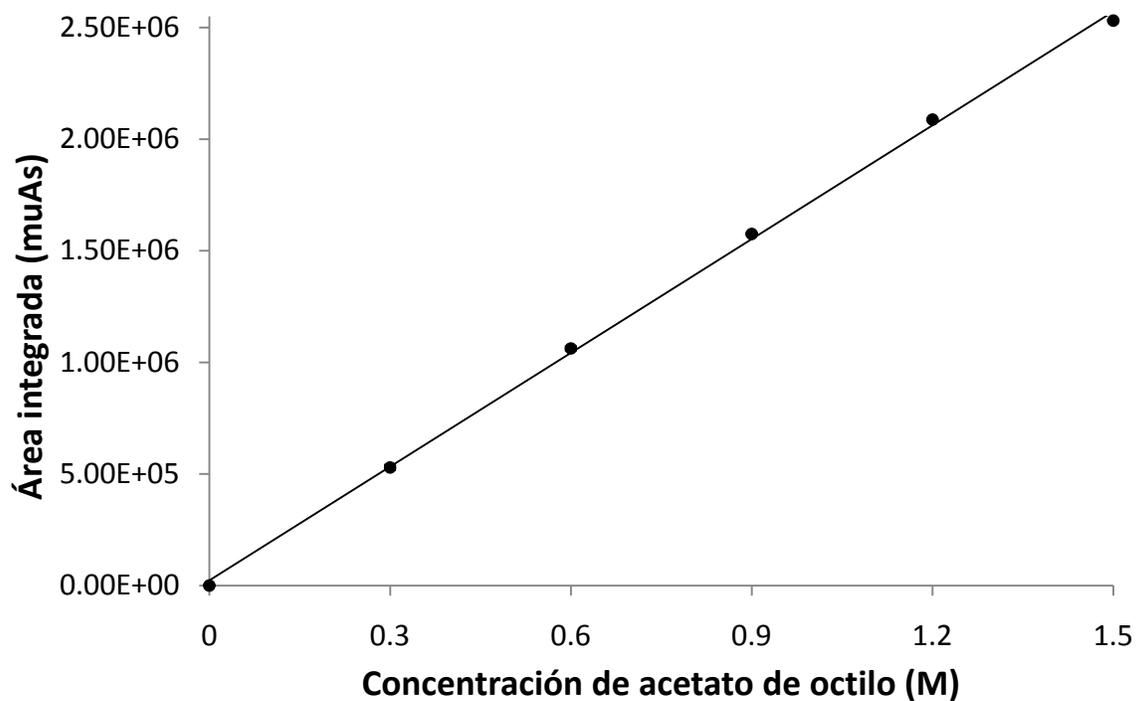


Figura 9.2. Curva de calibración de la señal de acetato de octilo en el cromatógrafo de gases. $[\text{Acetato de octilo}] = 4.51\text{E-}07(\text{Área}) - 9.37\text{E-}03$, $r=0.99$