



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS DIÉSTERES DE LUTEÍNA
EN MEDIOS CON BAJO CONTENIDO DE AGUA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN INGENIERÍA
INGENIERÍA QUÍMICA – REACTORES Y CATÁLISIS**

PRESENTA:

I.Q. JUAN MAURICIO MORA PALE

TUTOR:

DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA.

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: Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Secretario: Dr. Alberto Tecante Coronel

1^{er} Vocal: Dr. Mariano García Garibay

2^{do} Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa

3^{er} Vocal: Dra. Rosario Muñoz Clares

1^{er} Suplente: Dr. Ángel Piñeiro Guillén

2^{do} Suplente: Dra. Adela Rodríguez Romero

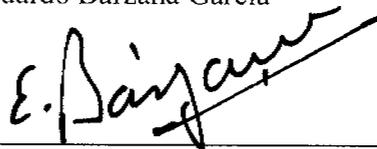
Lugar donde se desarrolló la tesis:

Laboratorio 314 del Conjunto "E" de la Facultad de Química,

U.N.A.M., Ciudad Universitaria, México D.F.

TUTOR DE TESIS

Dr. Eduardo Bárzana García

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Bárzana García', written over a horizontal line.

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al CONACyT por el apoyo financiero asignado a éste trabajo (proyecto 38583-B) y por la beca otorgada durante la estancia dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería.
- A la M en C Sandra Pérez por su apoyo técnico y de investigación durante el inicio de este proyecto.
- A los miembros del jurado asignado por su atenta revisión al trabajo de tesis
- A la Dra. Rosario Muñoz y al Dr. Jorge Aburto que acompañaron el desarrollo de este proyecto como miembros del Comité Tutorial.
- Al Dr. Jonathan S. Dordick del Rensselaer Polytechnic Institute, Troy NY, por su contribución a este proyecto.
- A mi familia.
- Y muy particularmente a Eduardo por haberme invitado a trabajar en su laboratorio pero sobretodo por la amistad e interés en esta etapa de formación académica.

INDICE

Resumen.....	I
Abstract.....	II

Capítulo 1- Introducción

1.1 Luteína: Generalidades.....	1
1.2 Lipasas: Reacciones en medios no convencionales.....	5
1.3 Actividad del agua (a_w).....	8
1.4 Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> y lipasa de <i>Mucor miehei</i>	9
1.5 Fluidos Supercríticos: Propiedades y ventajas.....	13
1.6 Justificación.....	15

Capítulo 2- Hipótesis y Objetivo general17

Capítulo 3- Metodología y Materiales

Descripción de Materiales y Equipos.....	18
Metodología: Hidratación de Biocatalizadores.....	19
Metodología: Reacciones en CO ₂ Supercrítico.....	20
Metodología: Reacciones en Hexano.....	23
Metodología: Reacciones de esterificación del ácido láurico con 1- propanol.....	23
Metodología: Cromatografía de Líquidos.....	24

Capítulo 4- Resultados y discusión

4.1 Perfiles de velocidad inicial de reacción en función de la a_{wi} de los biocatalizadores.....	26
4.2 Consumo de agua calculada a partir de la estequiometría de la reacción.....	29
4.3 Efecto de la adsorción de carotenoides sobre la superficie de los biocatalizadores.....	34

4.4 Esterificación de luteína con ácido palmítico.....	37
4.5 Obtención de las curvas de saturación a distintos a_{wi} para ambas lipasas.....	39
4.6 Reacciones de hidrólisis de los diésteres de luteína en CO ₂ -SC.....	45
4.7 Recomendaciones para trabajos futuros.....	49
Capítulo 5- Conclusiones.....	50
ANEXO I. REFERENCIAS CONSULTADAS.....	52
ANEXO II. ARTÍCULO.....	59

RESUMEN

La hidrólisis enzimática de una mezcla de diésteres de luteína proveniente de la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*) fue llevada a cabo en hexano y CO₂ supercrítico (CO₂-SC) usando dos lipasas comerciales: la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) y la lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM). Ambas lipasas mostraron una dependencia inesperada de la velocidad de reacción respecto a la actividad de agua inicial del biocatalizador (a_{wi}) en hexano, mostrando las mayores velocidades de hidrólisis a los menores valores de a_{wi} . Se propone que el incremento en el a_w del catalizador genera una ineficiente partición de los altamente hidrofóbicos diésteres de luteína con el biocatalizador. El papel que juega el agua en este sistema no ha sido reportado para otras reacciones hidrolíticas en medios con bajo contenido de agua. Los cálculos de agua disponible (a una $a_{wi} = 0.13$) basadas en isotermas de adsorción reportadas, titulaciones por Karl-Fisher y conversión de sustrato indicaron que el alcance de la reacción no está limitado por la cantidad de agua disponible. El catalizador que tiene más capacidad de adsorber agua (Lipozyme RM IM) fue el que produjo mayores cantidades de luteína. Otro resultado inesperado y dependiente de la a_{wi} del biocatalizador fue la aparición de curvas de saturación sigmoidales, lo cual demuestra que la aparición de este tipo de curvas no es exclusiva de enzimas oligoméricas. La sigmoidicidad en este sistema puede ser el resultado de una posible formación de interacciones entre moléculas de diésteres que generen un fenómeno de cooperatividad por sustrato; la formación de estas interacciones debe ser sujeto de estudio en trabajos posteriores. Como una nueva propuesta para llevar a cabo esta reacción, se hicieron estudios en CO₂-SC, ya que este tipo de medio representa una oportunidad de mejorar la velocidad del proceso debido a la eficiencia en los mecanismos de transferencia de masa en este tipo de medios y a su vez hacerlo más atractivo desde un punto de vista ambiental. Los resultados demostraron un incremento considerable en la velocidad respecto a los experimentos hechos en hexano, ya que en 24 horas se alcanzan conversiones similares a las obtenidas durante 100 horas en hexano.

ABSTRACT

The enzymatic hydrolysis of a mixture of lutein diesters from Marigold flower (*Tagetes erecta*) was performed both in organic solvents and supercritical CO₂ (SC-CO₂) using two commercial lipases: lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435) and the lipase from *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM). Both lipases showed an unexpected dependence of initial reaction rate with the initial water activity (a_{wi}) in hexane, with the highest rates of hydrolysis taking place at the lowest a_{wi} of the biocatalyst particles. The same result was observed using *isooctane*, toluene, or SC-CO₂. It is proposed that an increase in a_{wi} generates a hydrophilic microenvironment that prevents efficient partitioning of the highly hydrophobic lutein diesters to the enzyme. The critical role of water in this system has not been reported for other hydrolytic reactions in low water media. Calculations of water available for hydrolysis from isotherm analysis, Karl Fischer titrations, and substrate conversion at $a_{wi} = 0.13$ indicate that the extent of reaction is not limited by the amount of available water. Accordingly, the enzyme that holds the largest amount of water after prehydration at the same a_{wi} (0.13) will yield the greatest substrate conversion and concentration of the free lutein product. Another unexpected result and dependent with a_{wi} is the apparition of sigmoidal curves in the saturation graphs of initial rate as a function of initial lutein diesters concentration, which demonstrates that this kind of shapes are not exclusively of oligomeric enzymes. Sigmoidal curves could be the result of molecular lutein diester's interactions that generates positive substrate cooperativity; the formation of such interactions should be a subject for future works. The highest conversion occurred in SC-CO₂, which opens up new opportunities to develop a combined extraction-reaction process for the environmentally-benign synthesis of lutein, an important nutraceutical compound.

CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

1.1. Luteína: Generalidades

A partir de la década pasada, un grupo de compuestos conocidos como carotenoides han despertado el interés de los investigadores debido a sus propiedades benéficas para la salud humana [1]. Los carotenos son los pigmentos naturales más abundantes en la naturaleza después de la clorofila, encontrándose distribuidos en plantas, animales, frutas y verduras.

Los efectos benéficos en el consumo de carotenoides han sido ampliamente documentados en la literatura [2, 3] y el esfuerzo de los investigadores se ha centrado en el efecto que tienen este tipo de compuestos, cuando son incluidos en la dieta, sobre enfermedades crónicas (por ejemplo: enfermedades cardiovasculares y cierto tipo de cánceres). Se han identificado más de 600 tipos de carotenoides de los cuales alrededor de 50 están presentes en nuestra dieta diaria y algunos de estos compuestos son precursores de la vitamina A, lo cual les da una plusvalía en poblaciones con deficiencias en vitamina A. Entre los carotenoides más importantes que se han encontrado en el cuerpo humano están el α -caroteno, el β - caroteno, el licopeno, la luteína y la zeaxantina. Entre éstos, la luteína y la zeaxantina (Fig. 1-1) han despertado un interés especial ya que son los únicos dos carotenoides que se localizan en la mácula del ojo humano (la cual, es la región del ojo responsable de la precisión de la vista). La presencia de ambos compuestos está relacionada con un significativo decremento en la degeneración de la mácula a causa de la edad, la cual es una enfermedad que genera ceguera irreversible en personas mayores.

-
1. Iannone A., Rota C., Bergamini S., Tomasi A. and Canfield L. (1998) **Antioxidant Activity of Carotenoids: An Electro – Spin Resonance Study on β - Carotene and Lutein Interaction with Free Radicals Generated in a Chemical System.** J. Biochem. Mol. Toxicol., 12, 299- 304.
 2. Nishino H. (1997) **Cancer Prevention by Natural Carotenoids.** J. Cell. Biochem. Supp., 27, 86- 91.
 3. Sharoni Y., Danilenko M. and Levy J. (2000) **Molecular Mechanisms for the Anticancer Activity of the Carotenoid Lycopene.** Drug Dev. Res., 50, 448- 456.

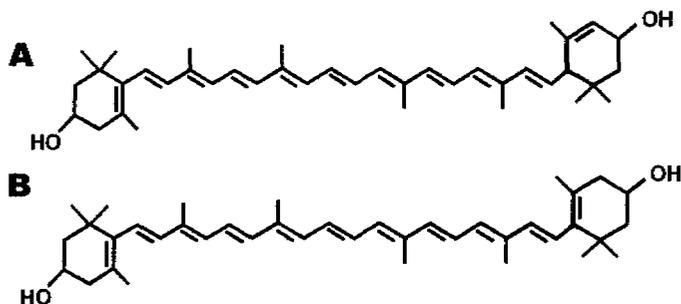


Figura. 1-1. (A) *trans*- luteína y (B) *trans*- zeaxanthina

Estudios en humanos han demostrado que la suplementación en la dieta, en particular con luteína, da como resultados un incremento de pigmento en la región de la mácula y una mejora en la visión en pacientes con degeneración macular y con otras enfermedades oculares (cataratas, por ejemplo) [4, 5, 6]. La luteína también es de utilidad para la protección de la piel contra los rayos UV. La principal fuente natural para obtener luteína es la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) [7], y es extraída de la flor como una mezcla de ésteres de luteína esterificada con ácidos grasos de cadena media, C₁₂-C₁₈ (Fig. 1-2).

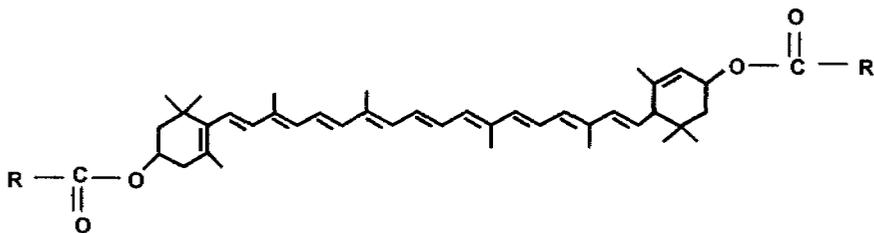


Figura. 1-2. *trans*- diésteres de luteína

4. Alves - Rodrigues A. and Shao A. (2004) **The science behind lutein**. *Toxicol. Lett.*, 150, 57- 83.
5. Bone R. A., Landrum J. T. and Tarsis S. L. (1985) **Preliminary identification of the human macular pigment**. *Vision Res.*, 25, 1531-1535.
6. Landrum J. and Bone R. (2001) **Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment**. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385 (1), 28- 40.
7. Tyczkowski J. and Hamilton P. (1991) **Research Note: Preparation of Purified Lutein and its Diesters from Extracts of Marigold (*Tagetes erecta*)**. *Poultry Sci.*, 70, 651- 654

La naturaleza de los ácidos grasos en los ésteres de luteína varía dependiendo del tipo de flor y de otros factores tales como el clima, la localización geográfica y las prácticas agrícolas. La Tabla 1-1 muestra el contenido promedio de ácidos grasos reportados como xantofilas en la flor de cempasúchil; claramente los ácidos grasos más abundantes son el palmítico y el mirístico.

Tabla 1-1. Contenido de ácidos grasos en xantofilas de la flor de Cempasúchil (*Tagetes erecta*)

ÁCIDOS GRASOS	COMPOSICIÓN (%)
Saturados:	
Ácido Palmítico	44.5
Ácido Mirístico	23.0
Ácido Araquídico	12.0
Ácido Esteárico	11.0
Ácido Láurico	2.0
No Saturados:	
Ácido Linoleico	3.0
Ácido Oleico	2.0
Ácido Linolénico	1.0
Otros ácidos	1.5

Durante muchos años, los extractos obtenidos de la flor fueron usados como suplementos en la alimentación de pollos, con la finalidad de conferirle un color aceptable a la piel y a la yema de huevo. Sin embargo, desde que los beneficios de la luteína han sido documentados para el consumo humano, la ruptura de los enlaces éster para la obtención de luteína es de gran interés, ya que en esta forma es más fácilmente asimilable por el organismo humano para ser transportada al ojo.

Los enlaces éster de los extractos pueden romperse mediante el ataque nucleofílico de una base para producir luteína en su forma "libre". La obtención industrial de luteína incluye el

uso de disolventes orgánicos convencionales (hexano, permitido por la Food and Drug Administration, FDA). El proceso consta de cuatro etapas básicas:

- ✚ Extracción de los diésteres de luteína de las hojas secas y molidas con hexano (denominada harina de flor de cempasúchil).
- ✚ Separación del bagazo agotado y evaporación del disolvente para obtener una oleorresina rica en diésteres de luteína.
- ✚ Saponificación para hidrolizar los enlaces éster.
- ✚ Formulación de productos para consumo animal o separación/purificación para consumo humano.

El proceso industrial presenta desventajas desde una perspectiva del aprovechamiento de la materia prima y desde un punto de vista ambiental. Primero, el proceso tiene una etapa de evaporación del disolvente por medio de energía térmica, lo cual tiene como consecuencia que se lleven a cabo reacciones de degradación de los carotenoides que se ven reflejadas en pérdidas de coloración. Desde el punto de vista ambiental, las desventajas radican en el uso de sustancias abrasivas (sustancias alcalinas) y en el uso de disolventes orgánicos (hexano) que generan compuestos orgánicos volátiles al ambiente. Además, la tendencia en las normas para productos orientados al consumo humano apunta hacia la eliminación de posibles trazas de compuestos orgánicos.

Actualmente la luteína es considerada un nutraceutico, lo cual es un incentivo para desarrollar alternativas en los procesos de extracción que sean atractivas desde el punto de vista económico, funcional y ambiental. Una primera contribución de este proyecto sería sustituir la etapa de la saponificación cáustica por una hidrólisis enzimática (Fig. 1-3) que se lleve a cabo en el mismo disolvente orgánico en el cual se lleva a cabo la extracción industrial. Otra contribución importante sería sustituir el uso de disolventes orgánicos tradicionales por opciones menos indeseables para la salud y el ambiente, como las que ofrecen, por ejemplo, el dióxido de carbono en estado supercrítico (CO₂-SC).

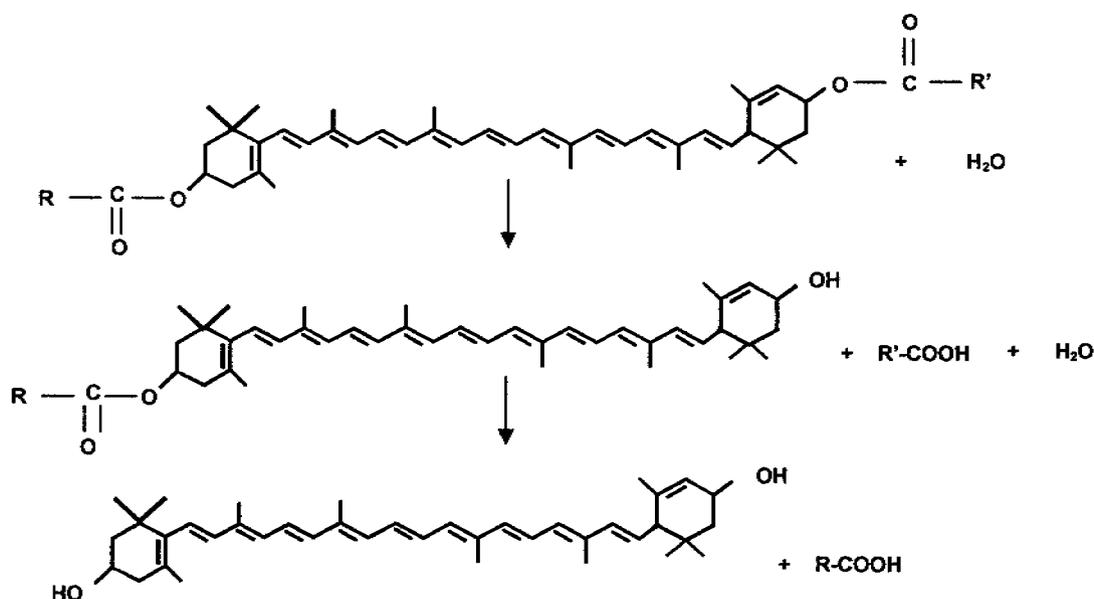


Figura. 1-3. Esquema propuesto para la reacción de hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína catalizada por enzimas.

1.2. Lipasas: Reacciones en medios no convencionales

A partir de la mitad de la década de los 80, se abrió paso a una de las ramas de la catálisis enzimática que se ha explotado en procesos diversos: la catálisis enzimática en medios con bajo contenido de agua como los medios orgánicos [8-10]. Este enfoque ha permitido llevar a cabo la síntesis de productos de alto valor agregado, a partir de sustratos parcialmente solubles o insolubles en agua, tomando ventaja de la selectividad que tienen las enzimas para reconocer ciertos grupos funcionales.

8. Klibanov A. (1986) **Enzymes that work in organic solvents**. Chem. Technol., 354- 358.
9. Dordick J. S. (1988) **Biocatalysis in nonaqueous media**. Appl. Biochem. Biotechnol. **19**, 1, 103-112
10. Dordick J. S. (1989) **Enzymatic catalysis in monophasic organic-solvents**. Enzyme Microb. Technol. **11**, 4, 194-211.

Para conferir una mayor estabilidad a las enzimas y una distribución más conveniente en el medio de reacción, éstas se han soportado en materiales sólidos que además permiten una fácil recuperación y pueden ser reutilizadas como catalizadores comerciales [11, 12]. Distintos tipos de enzimas han sido evaluadas en medios orgánicos, pero sin duda las lipasas han sido las más usadas en disolventes no convencionales. Las lipasas representan una alternativa interesante para llevar a cabo la reacción de obtención de luteína, ya que son capaces de reconocer un gran número de compuestos esterificados y de mantener una alta actividad catalítica en medios con bajo contenido de agua. Este planteamiento se basa en un gran número de estudios en medios no convencionales en los que se han empleado lipasas. [11, 13].

Todas las enzimas necesitan una cierta cantidad de agua para mantener su flexibilidad molecular y conservar la facilidad de acceso del sustrato a su sitio activo para la catálisis. En el caso de las reacciones catalizadas por lipasas en medios no acuosos, el papel que tiene el agua depende del tipo de reacción que se lleve a cabo; las lipasas son capaces de catalizar reacciones de esterificación, transesterificación, alcoholólisis, hidrólisis, acidólisis o aminólisis. Numerosos trabajos de investigación han reportado el efecto del agua en reacciones catalizadas por lipasas. El parámetro termodinámico conocido como actividad del agua (a_w) ha sido la forma más usada para controlar la cantidad de agua disponible en un determinado sistema [14-17].

-
11. Bell G., Halling J., Moore B., Partridge J. and Rees D. (1995) **Biocatalyst behavior in low - water systems**. Trends Biotechnol., 13, 468 - 473.
 12. Zaks A. and Klibanov A. (1988) **The effect of water on enzyme action in organic media**. J. Biol. Chem., 263, 8017 - 8021.
 13. Graber M., Bousquet- Douboch M., Lamare S., Legoy M. D. (2003) **Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a solid/ gas system: Effects of water in kinetic parameters**. Biochim. Biophys. Acta, 1648, 24- 32.
 14. Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Lipasas have similar water activity profiles in different reactions**. Biotech. Lett. 11(6), 537- 540.
 15. Ma L., Persson M. and Adlercreutz P. (2002) **Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful Transesterifications reactions**. Enzyme Microb. Technol., 31, 1024- 1029.
 16. Persson M., Wehtje E. and Adlercreutz P. (2002) **Factors governing the activity of lyophilized and immobilized lipase preparations in organic solvents**. Chembiochem, 3, 566 - 571.
 17. Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Water activity and substrate concentration effects on lipase activity**. Biotech. Bioeng., 55, (5) 798 - 806.

En el caso de las reacciones hidrolíticas, los perfiles de actividad catalítica en función del a_w son variados y dependen básicamente de 4 factores: la naturaleza de la lipasa, la naturaleza del soporte, el tipo de sustrato(s) y el tipo de disolvente. De manera común se encuentran 2 diferentes perfiles para reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas: el primero de ellos muestra curvas de actividad catalítica que aumentan en función del a_w (por ejemplo, la lipasa de *Pseudomonas sp.*); otras lipasas muestran curvas de actividad con forma de campana [18]. Lo anterior obedece a una cierta lógica: las reacciones de hidrólisis se favorecen cuando la cantidad de agua disponible es alta. Por el lado contrario, en reacciones de esterificación (las cuales liberan agua) se suelen usar membranas o adsorbentes para eliminar el agua y evitar, precisamente, que existan las condiciones para la hidrólisis de los ésteres formados [19, 20].

Otros factores importantes en las reacciones enzimáticas en medios no convencionales son el disolvente y el soporte del biocatalizador ya que afectan la partición de los sustratos [22], los productos y el agua. Kaur y col. [21] encontraron que el uso de diferentes disolventes orgánicos afecta los coeficientes de difusión en una reacción de transesterificación. Otros estudios han demostrado que la selectividad de una enzima puede ser modificada al emplear disolventes orgánicos con diferente coeficiente de partición hidrofóbico ($\log P$) y que los disolventes con alta hidrofiliidad tienden a presentar efectos inhibitorios ya que secuestran el agua que proporciona la flexibilidad necesaria a la enzima para mantener su actividad catalítica.

-
18. Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Lipasas have similar water activity profiles in different reactions.** Biotechnol. Lett., 11(6), 537- 540.
 19. Humeau C., Girardin M., Rovel B. and Miclo A. (1998) **Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbil palmitate.** J. Biotechnol., 63, 1– 8.
 20. Valivety R., Halling P. and Macrae A. (1992) **Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents.** Biochim. Biophys. Acta, 1118, 218 – 222.
 21. Kaur J., Wehtje E., Adlercreutz P. Chand S. & Mattiasson B. (1997) **Water transfer kinetics in a water activity control system designed for biocatalysis in organic media.** Enzyme Microb. Technol., 21, 496 – 501.
 22. Adlercreutz, P. 1992. **On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity.** In: Biocatalysis in Non-Conventional Media (J. Tramper, M.H. Vermúe, H. H. Beffink, U. von Stockar, eds) Elsevier, Amsterdam, p. 55.

En el mercado hay una gran disponibilidad de lipasas, ya sean inmovilizadas en materiales sólidos o en forma libre y han sido ampliamente evaluadas lo cual es fácilmente comprobable por la gran cantidad de artículos disponibles en la literatura. De entre el amplio conjunto de lipasas, sobresale la lipasa B de *Candida antarctica* y su forma comercial (Novozym 435). Esta última ha sido usada en numerosas reacciones en medios no convencionales (hexano, tolueno, ciclohexano, fluidos supercríticos) y ha demostrado una alta estabilidad catalítica que permite su uso por largos periodos.

Desde el punto de vista de la catálisis, la lipasa B de *C. antarctica* resulta atractiva ya que, a diferencia de otras lipasas, no requiere de activación interfacial para que la tapa de su estructura permita el acceso de los sustratos hacia el sitio catalítico. El resto de las lipasas necesitan de una interfase hidrofóbica para que su tapa se abra y permita el acceso de los sustratos hacia el sitio catalítico.

1.3. Actividad del agua (a_w)

La actividad acuosa es derivada de los principios fundamentales de la termodinámica y de la fisicoquímica. Como un principio termodinámico, existen requerimientos en la definición de actividad del agua que deben conocerse, los cuales son:

- ↓ Para agua pura, el valor de la actividad del agua es 1 ($a_w = 1$) y es el estado estándar.
- ↓ El sistema está en equilibrio.
- ↓ La temperatura está definida.

En el equilibrio:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln\left(\frac{f}{f_0}\right) \quad (1)$$

μ = potencial químico del sistema
 μ_0 = potencial químico del material puro a la temperatura, T .
 R = constante universal de los gases.
 T = temperatura (K).
 f = fugacidad de un compuesto.
 f_0 = fugacidad del material puro.

La actividad de las especies se define como $a = f/f_0$; cuando hacemos referencia al agua, la actividad del agua es:

$$a_w = \frac{f}{f_0} \quad (2)$$

Para propósitos prácticos, bajo condiciones de idealidad, la fugacidad se aproxima estrechamente a la presión de vapor ($f \approx p$) tal que:

$$a_w = \frac{f}{f_0} \approx \frac{p}{p_0} \quad (3)$$

El equilibrio entre las fases implica que el potencial químico es el mismo en todas las fases, lo cual permite determinar mediante la fase vapor del sistema, el valor de la actividad del agua de la muestra.

1.4. Lipasa B de *Candida antarctica* y lipasa de *Mucor miehei*

Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

La cepa de *Candida antarctica* es capaz de producir dos distintas lipasas denominadas como A y B. La lipasa A (45 kDa, P.I. de 7.5) no es específica, es dependiente del calcio y es de alta termoestabilidad. La lipasa B es independiente del calcio y es menos termoestable; tiene un peso molecular de 33 kDa y un P.I. de 6.0. [23]

23. Uppenberg J., Hansen M., Patkar S. and Jones T. (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. Structure, 2, 293-308

La lipasa B ha mostrado gran actividad catalítica para una gran variedad de ésteres, amidas y tioles [24]; no requiere de una activación interfacial a pesar de que su estructura tiene una tapa anfifílica que cubre su sitio activo. Su cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es aproximadamente de 30 x 40 x 50 Å; su sitio catalítico está formado por la triada de Ser – His – Asp lo cual la hace similar a las serino proteasas.

El mecanismo de acilación-desacilación del glicérido se muestra en la Fig. 1-4. En la etapa de la acilación se forma un complejo covalente enzima-acilo por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo sobre el carbono carbonilo del sustrato (la serina se convierte en un nucleófilo fuerte debido a la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico). Posteriormente, el anillo imidazol de la histidina se protona y se carga positivamente, estabilizado por la carga negativa de los ácidos aspártico y glutámico del sitio activo. En seguida se forma un intermediario tetraédrico estabilizado por los dos enlaces de hidrógeno formados con residuos oxianiónicos estabilizantes; es entonces cuando un rompimiento en el enlace carbono-oxígeno causa el desplazamiento del alcohol.

Durante la reacción, el acilglicerol es asociado con la triada catalítica a través de enlaces covalentes. El hidrógeno de la histidina enlaza a la serina y al oxígeno del grupo alcohol saliente. A continuación, el ataque nucleofílico del agua o el alcohol causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono del carbonilo produciendo el intermediario tetraédrico, el cual se colapsa desprendiendo el acilglicerol alterado y regenerando a la serina [25, 26]

-
24. Anderson E., Karin M. and Oie K. (2000) **One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic solvents.** *Biocatal. Biotransf.*, 16, 180-204.
 25. Reyes H. and Hill C. (1994) **Kinetic modeling of interesterification reactions by immobilized lipase.** *Biotechnol Bioeng.*, 43, 171-182.
 26. Marangoni A. and Rousseau D. (1995) **Engineering triacylglycerols: The role of interesterification.** *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 329-335

La lipasa B ha mostrado gran actividad catalítica para una gran variedad de ésteres, amida y tioles [24]; no requiere de una activación interfacial a pesar de que su estructura tiene una tapa anfifílica que cubre su sitio activo. Su cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos y su tamaño es aproximadamente de 30 x 40 x 50 Å; su sitio catalítico esta formado por la triada de Ser – His – Asp lo cual la hace similar a las serino proteasas.

El mecanismo de acilación-desacilación del glicérido se muestra en la Fig. 1-4. En la etapa de la acilación se forma un complejo covalente enzima-acilo por el ataque nucleofílico de la serina del sitio activo sobre el carbono carbonilo del sustrato (la serina se convierte en un nucleófilo fuerte debido a la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico). Posteriormente, el anillo imidazol de la histidina se trotona y se carga positivamente, estabilizado por la carga negativa de los ácidos aspártico y glutámico del sitio activo. En seguida se forma un intermediario tetraédrico estabilizado por los dos enlaces de hidrógeno formados con residuos oxianiónicos estabilizantes; es entonces cuando un rompimiento en el enlace carbono-oxígeno causa el desplazamiento del alcohol.

Durante la reacción, el acilglicerol es asociado con la triada catalítica a través de enlaces covalentes. El hidrógeno de la histidina enlaza a la serina y al oxígeno del grupo alcohol saliente. A continuación, el ataque nucleofílico del agua o el alcohol causa la adición de un grupo hidroxilo al carbono del carbonilo produciendo el intermediario tetraédrico, el cual se colapsa desprendiendo el acilglicerol alterado y regenerando a la serina [25, 26]

-
24. Anderson E., Karin M. and Ole K. (2000) **One biocatalyst-many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic solvents.** *Biocatal. Biotransf.*, 16, 180-204.
 25. Reyes H. and Hill C. (1994) **Kinetic modeling of interesterification reactions by immobilized lipase.** *Biotechnol Bioeng.*, 43, 171-182.
 26. Marangoni A. and Rousseau D. (1995) **Engineering triacylglycerols: The role of interesterification.** *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 329-335

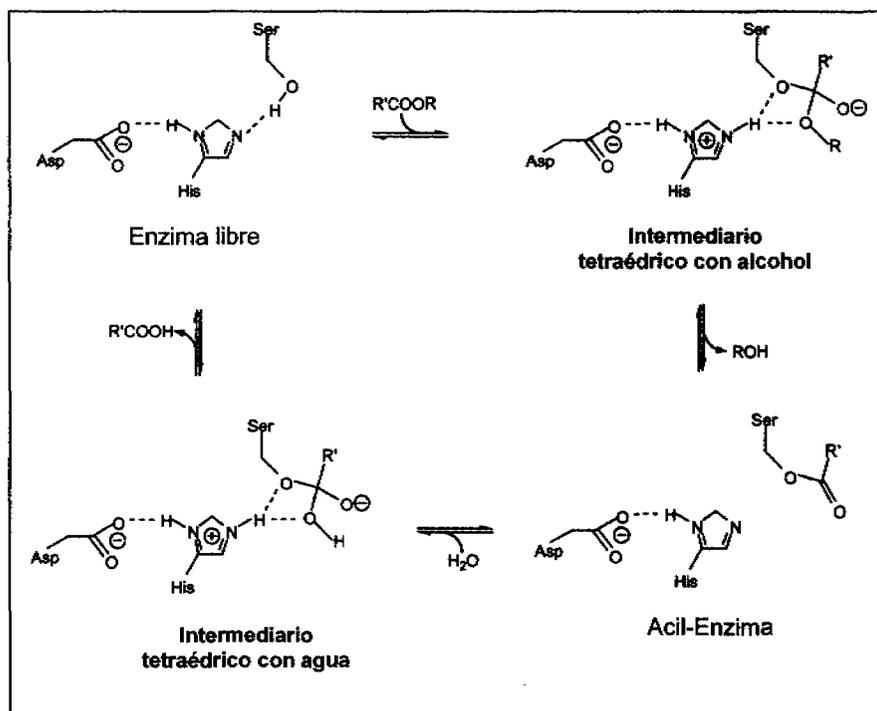


Figura 1-4. Mecanismo de acilación-desacilación para una lipasa con una triada catalítica Ser-His-Asp

Lipasa de *Mucor miehei*

La lipasa de *Mucor miehei* está clasificada como una triacil-glicerol hidrolasa (carboxil esterasa), su sitio activo está constituido por la misma triada de la lipasa B de *Candida antarctica*, por lo cual su mecanismo catalítico es el mismo. Su peso molecular es de alrededor de 30 kDa y sus dimensiones son aproximadamente de 72 x 75 x 55 Å. A diferencia de la lipasa B de *Candida antarctica*, la lipasa de *Mucor miehei* presenta activación interfacial [27] para que la tapa que cubre su sitio activo permita el acceso de sustratos hacia el sitio catalítico (Fig. 1-5).

27. Schmid R. and Verger R. (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37, 1608-1633.

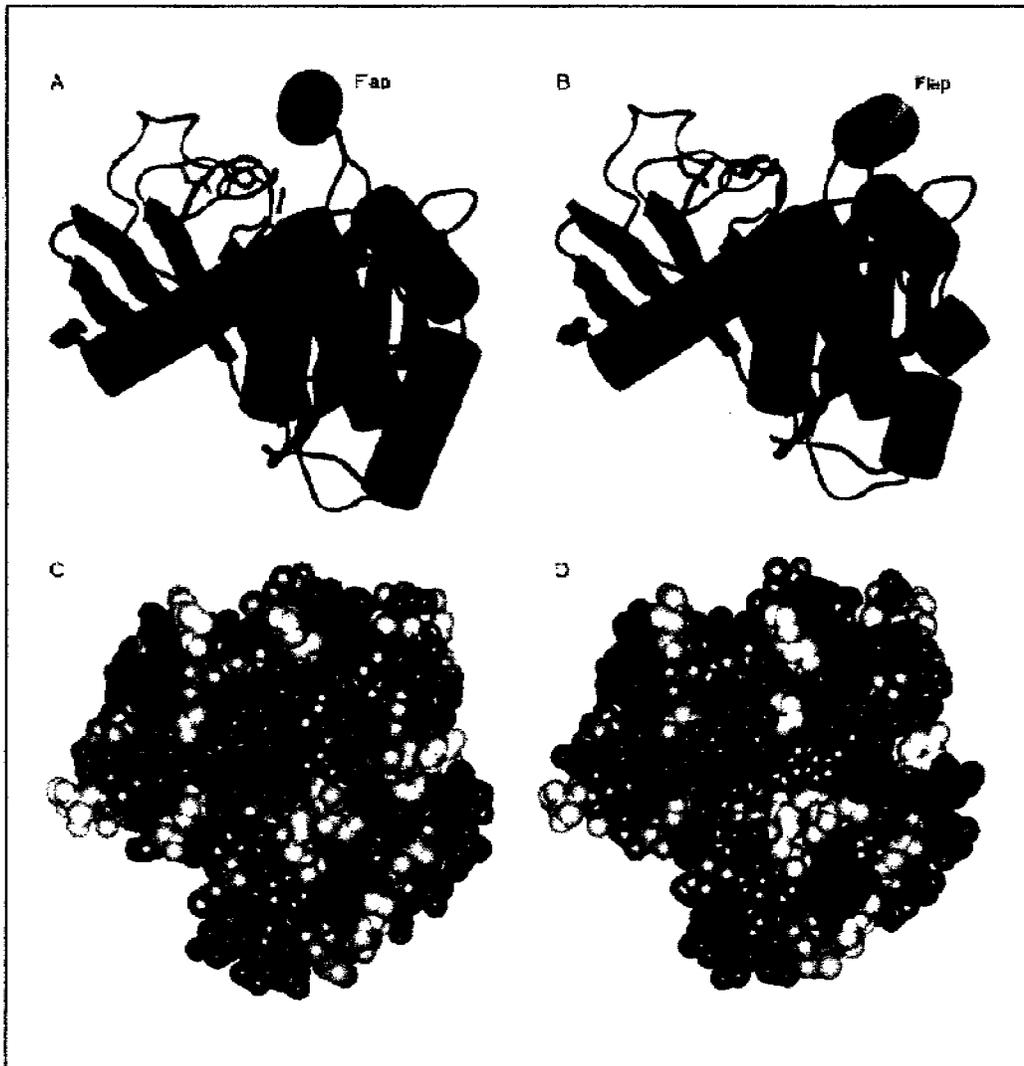


Figura 1-5. Estructura de la lipasa de *Mucor miehei* en su forma cerrada (A, C) y en su forma abierta (B, D). El sitio catalítico está representado en color amarillo.

1.5. Fluidos supercríticos: propiedades y ventajas

A partir de la década pasada, los fluidos supercríticos han emergido como una opción interesante para llevar a cabo biotransformaciones [28]. Los fluidos supercríticos han sido estudiados como opciones en procesos de extracción; sin embargo, una vez demostrada la estabilidad de las enzimas en medios no convencionales, los fluidos supercríticos han sido evaluados como disolventes en reacciones enzimáticas en los cuales las enzimas (principalmente las lipasas) han demostrado ser estables [29- 31]. Un fluido en estado supercrítico es aquél que se encuentra por encima de su punto crítico (Fig. 1-6) en el cual concurren propiedades tanto de líquido como de gas, lo cual no permite distinguir entre una fase u otra.

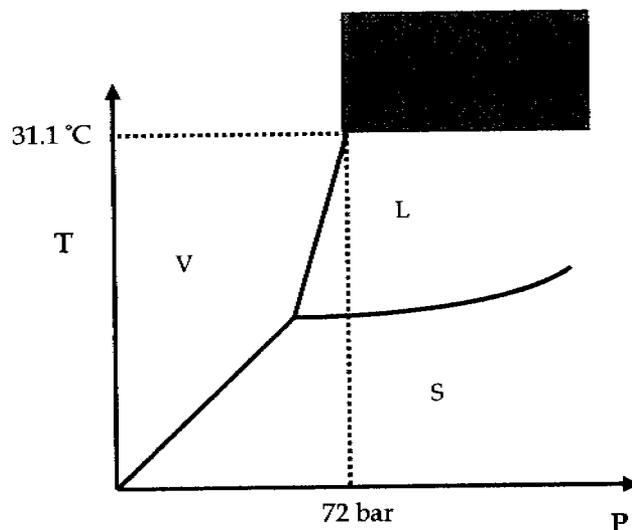


Figura. 1-6. Diagrama esquemático T vs. P. Los valores de 72 bar y 31.1 °C representan el punto crítico del CO₂.

28. Mesiano A., Beckman E. and Russell A. (1999) **Supercritical Biocatalysis**. Chem. Rev., 99, 623-633.
29. Kamat S., Iwaskewycz B., Beckman E. and Russell A. (1993) **Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: Tuning enzyme activity by changing pressure**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2940 – 2944.
30. Krishna S. H. (2002) **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media**. Biotechnol. Adv., 20, 239 – 267.
31. Conceicao M., Ruivo R., Maia C., Freire L., Correa de Sampaio T. and Barreiros S. (1998) **Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects**. Enzyme Microb. Technol., 22, 494 – 499.

Los fluidos supercríticos tienen la ventaja de que sus propiedades disolventes pueden ser ajustadas mediante dos variables controlables: la presión y la temperatura [32]. Las características que presenta un fluido supercrítico son:

- ✚ Densidad similar a la de un líquido (tomando como referencia al agua).
- ✚ Viscosidad y tensión superficial semejante a la de un gas.
- ✚ Difusividades similares a la de un gas.

Debido a que las propiedades de un fluido supercrítico pueden ser alteradas controlando la presión y la temperatura, pueden implementarse procesos en los cuales se lleven a cabo extracciones y reacciones químicas simultáneamente y, sobre todo, la separación de los productos del disolvente es muy sencilla ya que basta con llevar al fluido fuera de la región supercrítica para alcanzar una rápida pérdida de solubilidad de dichos productos.

Varias sustancias en estado supercrítico se han empleado como disolventes para reacciones catalizadas por enzimas (metano, nitrógeno, etano, CO₂, agua) [29]. De entre ellas el dióxido de carbono ha sido el disolvente más usado para tales fines, lo cual no significa que en otros fluidos no se hayan reportado mejores actividades enzimáticas, por las siguientes razones:

32. Sihvonen M. Järvenpää E., Hietaniemi V. and Huopalahti R. (1999) **Advances in supercritical carbon dioxide technologies.** Trends Food Sci. Technol., 10, 217-222.

-
- ↓ Los requerimientos energéticos para alcanzar su punto crítico (31.1 °C y 72 bar; ver figura 1-5) son bajos.
 - ↓ Es una sustancia no tóxica y no es flamable.
 - ↓ Es una sustancia relativamente barata, comparada con otras que pueden usarse en estado supercrítico [33-36].

Por lo tanto, resulta atractiva la idea de desarrollar una alternativa para la obtención de luteína sustituyendo el uso de sustancias alcalinas por una hidrólisis enzimática (usando una lipasa) en el mismo disolvente (hexano) en que se lleva a cabo la extracción industrial y posteriormente llevar a cabo la misma reacción enzimática en CO₂ en estado supercrítico (CO₂-SC) para obtener datos cinéticos y comprobar si este tipo de medio ofrece cambios significativos respecto al hexano.

Justificación

Con base en el marco teórico descrito, están dadas las condiciones para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína y de esta manera sentar las bases de una alternativa para la obtención de luteína. La hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios no convencionales no ha sido reportada hasta ahora y obtener datos cinéticos ayudará a entender y explicar de manera más amplia los factores que controlan al proceso. En particular se hace énfasis en el papel del agua, teniendo en mente la naturaleza hidrofóbica de los diésteres de luteína. Aunque ya existen numerosos trabajos acerca del papel que juega el agua sobre las reacciones catalizadas por lipasas, se ha demostrado que las reacciones son afectadas, a causa del agua, por muy diversos factores, entre ellos la naturaleza de los sustratos.

-
33. Lanza M., Priamo W., Oliveira J., Dariva C. & Oliveira D. (2004) **The effect of temperature, pressure and exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO₂**. *Biotechnology of fuels and chemicals (25th symposium)*, Human press, App. Biochem. Biotechnol., Vol. 113 – 116, pp 181 – 187.
 34. Tsitsimpikou C., Stamatis H., Sereti V., Daflos H. & Kolisis F. (1998) **Acylation of glucose catalyzed by lipases in supercritical carbon dioxide**. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 71, 309 – 314.
 35. Turner C., Persson M., Mathiasson L., Adlercreutz P. & King J. (2001) **Lipase – catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat- soluble vitamin determination in milk powder and infant formula**. *Enzyme Microb. Technol.*, 29, 111 – 121.
 36. Gunnlaugsdottir H., Wannerberger K. and Silvik B. (1998) **Alcoholysis and glyceride synthesis with immobilized lipase on controlled – pore glass of varying hydrophobicity in supercritical carbon dioxide**. *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 360-367

Hasta ahora, las investigaciones enfocadas en entender el papel del a_w sobre la actividad catalítica son diversas y suele especularse al momento de explicar los fenómenos que intervienen y que explican la dependencia de la velocidad de la reacción en función del agua. A partir del 2003 se han hecho valiosas contribuciones alrededor del a_w en reacciones catalizadas por lipasas. Por ejemplo, se han establecido técnicas que aseguran un control preciso de a_w mediante el uso de membranas que son diseñadas para cada condición de la reacción. El uso de estas membranas fue evaluada para la reacción de esterificación de geraniol con ácido acético [37,38] en la cual existe la necesidad de eliminar el agua que produce una esterificación. Los resultados demuestran que su control en este tipo de sistemas necesita de un conocimiento más amplio sobre cada uno de los fenómenos que intervienen y que dependen en gran medida de las condiciones que se establecen (principalmente concentración de sustratos y de enzima).

La contribución de este trabajo no radica únicamente en demostrar la posibilidad de usar una vía biotecnológica para la obtención de un producto de interés por su valor nutracéutico, sino en profundizar más acerca del papel que desempeña el agua en sistemas catalíticos heterogéneos. Asimismo, resulta de interés explorar la posibilidad de llevar a cabo la reacción de hidrólisis de los diésteres de luteína en CO_2 en estado supercrítico y evaluar si existen ventajas en este tipo de medios que aceleren el proceso.

-
37. Kang I.J, Pfromm P.H. and Rczac M.E. (2004) **Membrane permeation based sensing for dissolved water in organic micro-aqueous media.** *J. Membrane Sci.*, 239, 213-217.
 38. Kang I.J, Pfromm P.H. and Rczac M.E. (2005) **Real Time Measurement and Control of Thermodynamic Water Activities for Enzymatic Catalysis in Hexane.** *J. Biotechnol.*, 119, 147-154

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES

Hipótesis

Es factible llevar a cabo la hidrólisis enzimática de diésteres de luteína con lipasas en un medio con bajo contenido de agua pero que garantice la suficiente cantidad de agua disponible para la reacción.

Objetivos generales

Sobre la base de que las lipasas son capaces de catalizar reacciones con compuestos esterificados y de ser catalíticamente activas en medios con bajos contenidos de agua, los objetivos de este proyecto son:

- ✚ Mediante un estudio cinético y preajustando la a_w de los biocatalizadores, determinar el papel que tiene el agua sobre la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en hexano para conocer bajo que niveles de hidratación del catalizador existe una mejor interacción entre la enzima y los sustratos.
- ✚ Realizar estudios preliminares en CO_2 -SC mediante la obtención de perfiles de concentración y que permitan tener una perspectiva inicial acerca de las posibles ventajas cinéticas que ofrece este tipo de medio.

Los estudios se realizaron usando dos lipasas comerciales soportadas en materiales sólidos: la lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) y la lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM).

CAPÍTULO 3- MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales

- ✚ Oleorresina; mezcla de diésteres de luteína extraídos de la flor de cempasúchil donada por Bioquimex (Querétaro, México): 80 % w/w de diésteres de luteína por gramo de oleorresina.
- ✚ Estándar de luteína (99%), Aldrich.
- ✚ Lipasas comerciales: Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435) y lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme RM 1M) donadas por Novo de México (Ciudad de México).
- ✚ Resina acrílica. Soporte para la formulación de Novozyme 435 (Lewatit VO OC 1600), Bayer Chemicals.
- ✚ Tamiz molecular, Linde (3 Å).
- ✚ Hexano y acetona J. T. Baker grado reactivo analítico.
- ✚ Metanol y acetato de etilo J. T. Baker grado HPLC.
- ✚ CO₂, marca Praxair grado industrial (99.9 % CO₂).
- ✚ Soluciones salinas sobresaturadas para la hidratación de los biocatalizadores.

Equipos

- ✚ Reactor Parr de alta presión con agitador magnético y control de temperatura.
- ✚ Bomba para CO₂ líquido con sistema de enfriamiento electrónico en el cabezal de la bomba.
- ✚ Matraces Erlenmeyer actínicos de 50 mL con tapón de rosca.
- ✚ HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) con inyector automático y bomba cuaternaria, Agilent Technologies (Palo Alto California, E. U.).
- ✚ Medidor de a_w marca Rotronic
- ✚ Espectrofotómetro UV/VIS marca Perkin Elmer.
- ✚ Incubadora Innova con control de temperatura (± 1 °C).
- ✚ Autoclave marca Hirayama.
- ✚ Desecadores de plástico con salida para vacío.

Metodología

Hidratación de los biocatalizadores

Previo a cada experimento, se ajustaron las actividades acuosas del biocatalizador con soluciones salinas sobresaturadas [39]. Los matraces para las reacciones con el biocatalizador se colocaron en desecadores a presión reducida durante 45 minutos (para acelerar el equilibrio entre la fase gas y la sólida), y almacenados durante 60 horas a 4 °C. Las mediciones se hicieron con un medidor de a_w a 20 °C. La Tabla 3-1 muestra los valores de actividad acuosa (a_w) que se alcanzan en el equilibrio utilizando soluciones salinas sobresaturadas de distinta naturaleza; los valores que se reportan en la tabla fueron determinados para una temperatura de 20 °C [39].

En los experimentos con hexano, el disolvente se desorbió con nitrógeno y se dejó en contacto con el tamiz molecular por 60 horas.

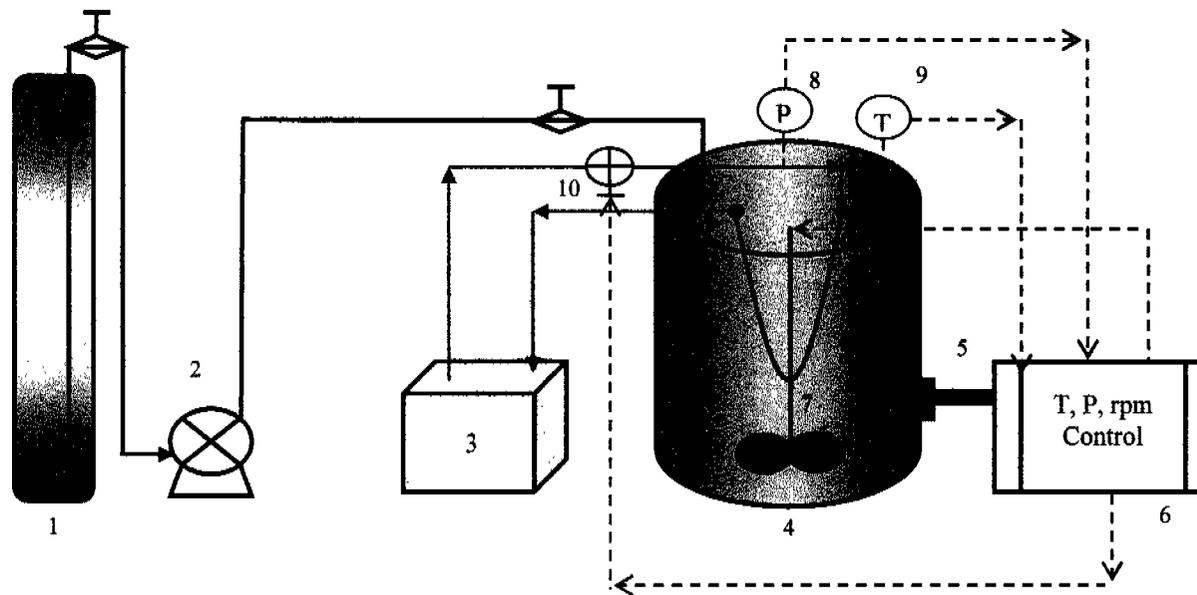
Tabla 3-1. Valores teóricos de a_w generadas por diferentes soluciones salinas sobresaturadas; T = 20 °C

Solución salina sobresaturada	a_w
Cloruro de Litio - LiCl	0.11
Acetato de Potasio - $KC_2H_3O_2$	0.23
Cloruro de Magnesio - $MgCl_2$	0.33
Carbonato de Potasio - KCO_3	0.45
Nitrato de Magnesio - $Mg(NO_3)_2$	0.54
Yoduro de Potasio - KI	0.67
Cloruro de Sodio - NaCl	0.75
Cloruro de Potasio - KCl	0.81
Nitrato de Potasio - KNO_3	0.95
Agua - H_2O	1

39. Greenspan, L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Nat. Bur. St. J. Res., 81A:89- 96.

Reacciones en CO₂ supercrítico

Las reacciones en el reactor de alta presión marca Parr, se llevaron a cabo pesando 0.04 g de oleoresina de diésteres de luteína en una bolsa de papel china, los cuales son extraídos por el CO₂-SC. En otra bolsa independiente, se pesaron 2 g de biocatalizador preajustados a una determinada a_w previo al montaje del reactor. Ambas bolsas se colgaron en el interior de la tapa del reactor. De esta manera el contacto entre sustrato y enzima sólo puede ocurrir a través de la fase supercrítica. El CO₂ es alimentado al reactor en estado líquido desde cilindros con tubo eductor mediante una bomba de pistón, equipada con un sistema de enfriamiento electrónico del cabezal, para garantizar el estado líquido del CO₂ hasta alcanzar la presión deseada (5000 psi). La temperatura del reactor es controlada mediante una resistencia eléctrica regulada por una válvula solenoide por la cual se hace pasar agua de enfriamiento. La toma de muestra se hizo desmontando el reactor, ya que resulta necesario recuperar el pigmento adsorbido al biocatalizador así como un riguroso lavado a la pared reactor. Para evitar la pérdida de materia por arrastre durante la despresurización del reactor es necesario precipitar los carotenoides llevando al CO₂ fuera de la región supercrítica. Esto se hizo sumergiendo el reactor en un baño de hielo hasta alcanzar una temperatura de alrededor de 4 °C. La Figura 3-1 muestra un diagrama del sistema de reacción con CO₂- SC.



- | | |
|--|----------------------------------|
| 1. Cilindro de CO ₂ líquido con tubo eductor. | 6. Panel de control del sistema. |
| 2. Bomba con sistema de enfriamiento en el cabezal. | 7. Agitador magnético. |
| 3. Baño de agua de enfriamiento con recirculación. | 8. Transductor de presión. |
| 4. Reactor para altas presiones. | 9. Transductor de temperatura. |
| 5. Resistencia eléctrica para calentamiento del reactor. | 10. Válvula solenoide. |

Figura 3- 1. Diagrama del sistema de reacción con CO₂- SC. El CO₂ se alimenta al reactor desde un cilindro (1) mediante una bomba con sistema de enfriamiento (2). El reactor es calentado mediante una resistencia eléctrica (5) desde el panel de control. Las lecturas de presión (8) y temperatura (9) aparecen en el panel de control (6) que a su vez controla la operación de la válvula solenoide (10) del sistema de enfriamiento del reactor (3), para mantener un control preciso de la temperatura. El control de la agitación (7) se regula desde el mismo panel.

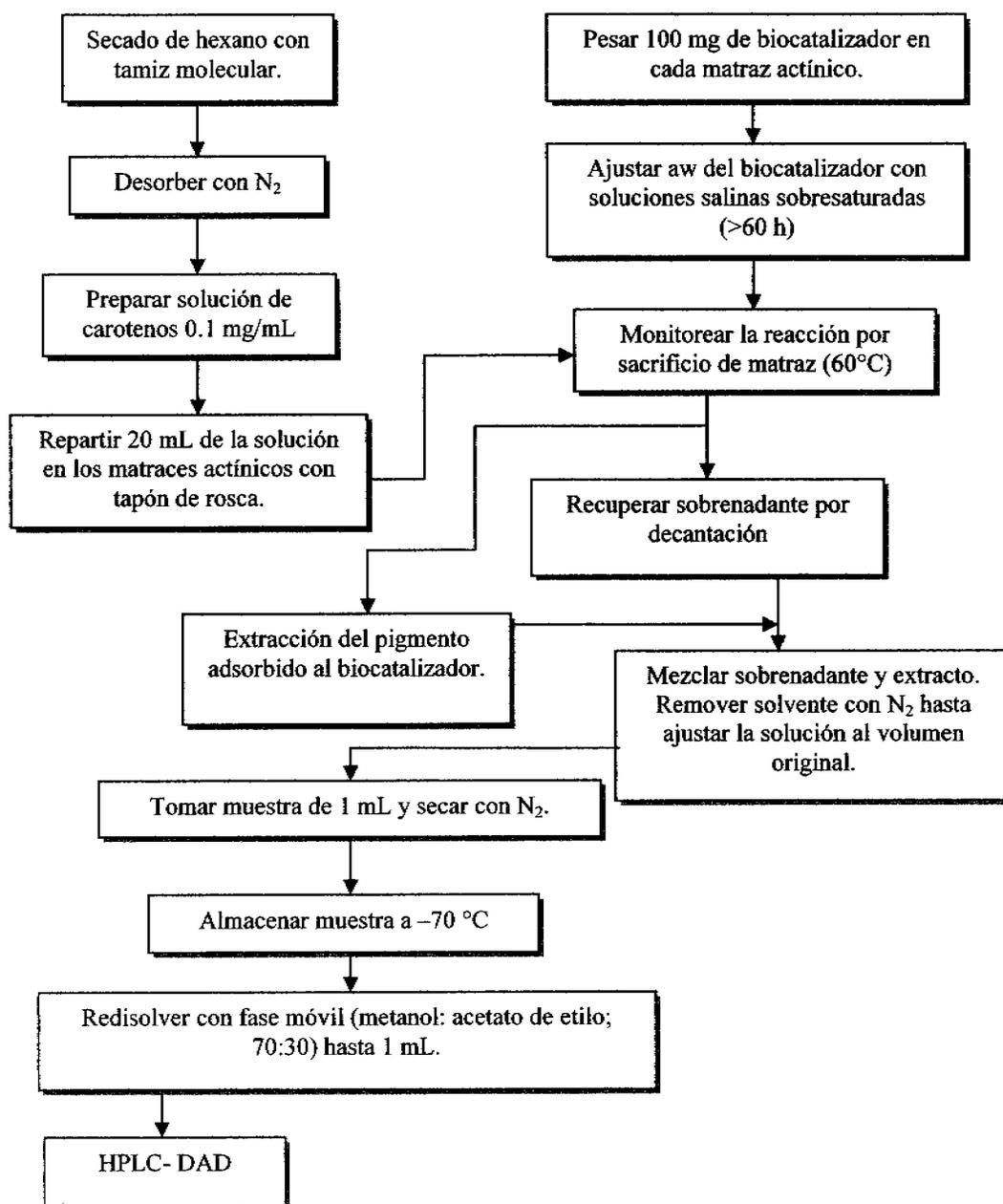


Figura 3-2. Diagrama de bloques. Metodología experimental para la reacción de hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en hexano.

Reacciones en hexano.

Las reacciones en hexano se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer actínicos de 50 mL con tapón de rosca en un volumen de trabajo de 20 mL, usando una concentración de biocatalizador de 5 mg/mL. Cada matraz utilizado debe corresponder a un tiempo de reacción en específico al cual se le debe recuperar el sobrenadante por decantación y posteriormente llevar a cabo extracciones consecutivas con hexano y acetona para recuperar el pigmento adsorbido al soporte. El volumen de la mezcla del sobrenadante y el pigmento extraído se ajustó al volumen original, se tomó una alícuota de 1mL, se evaporó el disolvente con nitrógeno y se redisolvió en una mezcla de metanol: acetato de etilo (70:30) para su análisis posterior por cromatografía de líquidos.

Reacciones de esterificación del ácido láurico con 1- propanol.

Con la finalidad de determinar la actividad residual (después de haber desactivado a la enzima térmicamente) del biocatalizador (en términos relativos) se empleó el método de esterificación del ácido láurico con 1- propanol (Fig. 3-3); dicho método es el propuesto por la compañía Novo Nordisk para determinar la actividad en lipasas. Se preparó una solución equimolar de ácido láurico y 1-propanol y se adicionó 0.1 g de lipasa comercial B de *C. antarctica* (Novozym 435). Esta reacción estándar se lleva a cabo a 50 °C y 130 rpm en una incubadora Innova (± 0.1 °C) de acuerdo con el siguiente esquema:



Figura 3-3. Esquema de la reacción de esterificación enzimática entre el ácido láurico y el 1- propanol.

Este método simple permite una evaluación cualitativa (las especies de esta reacción pueden cuantificarse, pero para fines de este proyecto el análisis cualitativo fue suficiente) basada en la observación de la mezcla de reacción; a temperatura ambiente el ácido láurico es sólido mientras que el producto de la reacción (laurato de *iso*-propilo) resulta en la

formación de un líquido. A manera de control para determinar que la reacción de desesterificación de los diésteres de luteína es enzimática, se llevó a cabo la desactivación térmica de Novozym 435 en un Autoclave marca Hirayama a 120 °C durante 1 hora. No se detectó actividad residual al emplear el método estándar indicado. Una vez comprobada la desactivación térmica de la lipasa, se preparó una solución de carotenos (de acuerdo con el método descrito para las reacciones en hexano) y se expuso al biocatalizador desactivado hasta obtener muestras para ser analizadas por medio de HPLC. No se observaron trazas de productos de la reacción indicando que la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína es dependiente de la actividad enzimática.

Cromatografía de líquidos

El análisis cuantitativo de las especies se hizo mediante cromatografía de líquidos (HPLC) con un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa *Waters X-terra* (RP₁₈ 5µm; 4.6 x 150 mm) empleando una precolumna (de la misma fase estacionaria) durante el análisis. La fase móvil (0.8 mL/min) fue isocrática y constituida por una mezcla de metanol: acetato de etilo (70:30); la detección se hizo a 446 nm, que es el máximo de absorbancia de la luteína, los monoésteres de luteína y los diésteres de luteína. Los perfiles espectrales de uv/vis para la luteína, los monoésteres de luteína y la mezcla de diésteres de luteína son exactamente iguales ya que su estructura molecular tiene el mismo grupo cromóforo; éste es el motivo por el cual la separación cromatográfica resulta indispensable para la cuantificación de la reacción. La Fig. 3-4 muestra dos cromatogramas de muestras obtenidas del medio de reacción. El primero corresponde a la mezcla de diésteres de luteína tal como la proporciona el proveedor (Fig. 3-4a) en la cual se detectan al menos seis diferentes tipos de diésteres de luteína. El segundo cromatograma (Fig. 3-4b) muestra la separación de una muestra en la cual aparecen los productos de la reacción; cada pico que representa a un carotenoide tiene el mismo perfil espectral (Fig. 3-4c). El uso del detector de arreglo de diodos (DAD) permite obtener el perfil espectral uv/vis de cada pico obtenido y de esta manera poder identificar las sustancias que intervienen en la reacción.

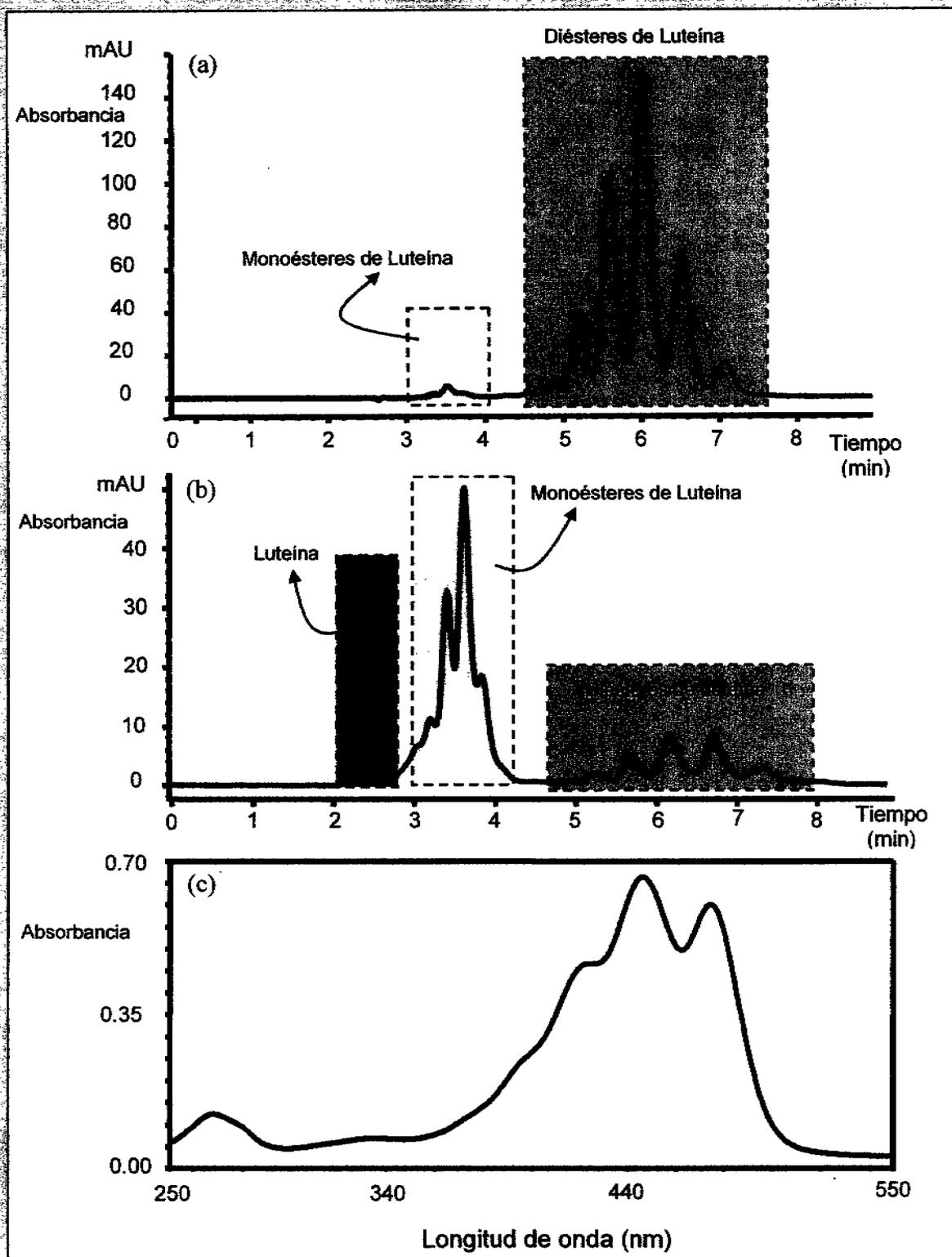


Figura 3-4. (a) Cromatograma de la oleorresina rica en diésteres de luteína, (b) Cromatograma obtenido de una muestra de reacción que muestra los picos de luteína, monoésteres y diésteres presentes y (c) Perfil espectral de los diésteres o de los monoésteres de luteína y la luteína

CAPÍTULO 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Perfiles de velocidad inicial de reacción en función del a_{wi} de los biocatalizadores

Probablemente la actividad del agua es la variable más importante en reacciones mediadas por lipasas en disolventes orgánicos. Sobre el papel del agua se han realizado un gran número de estudios para distintas reacciones que pueden ser catalizadas por lipasas y los resultados hasta ahora reportados son variados, básicamente por la gran cantidad de reacciones que pueden mediar este tipo de enzimas (esterificaciones, transesterificaciones, interesterificaciones, alcoholólisis, hidrólisis, aminólisis).

Haciendo énfasis en las reacciones de esterificación y en su reacción inversa (la hidrólisis), es común encontrar en la literatura que ambas reacciones se favorecen en condiciones opuestas de hidratación. Por ejemplo, en muchas reacciones de esterificación los investigadores diseñan membranas para remover el agua que se produce como subproducto y así evitar la reacción inversa, manteniendo un a_w constante en el sistema.

El primer estudio realizado en este trabajo fue para determinar la dependencia de la velocidad inicial de reacción en función de la actividad del agua inicial del biocatalizador (a_{wi}). Las reacciones se realizaron en hexano a 60°C empleando dos distintas lipasas comerciales: la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435) y la lipasa de *M. miehei* (Lipozyme RM 1M). Los resultados para ambas lipasas fueron inesperados (Fig. 4-1 y 4-2) ya que las mayores velocidades de reacción se observaron cuando los biocatalizadores fueron preajustados a a_{wi} muy bajos.

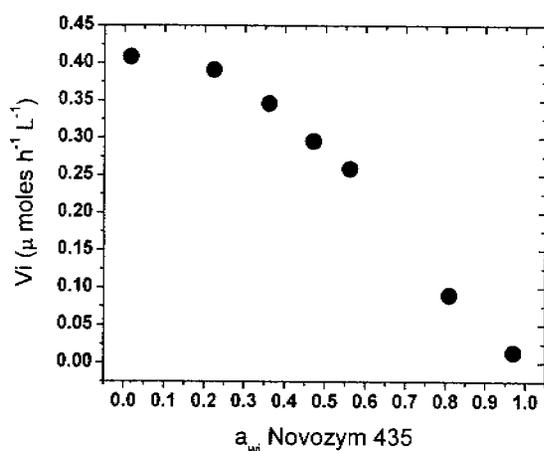


Figura 4-1. Curva de velocidad inicial vs. a_{wi} . Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435), Hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

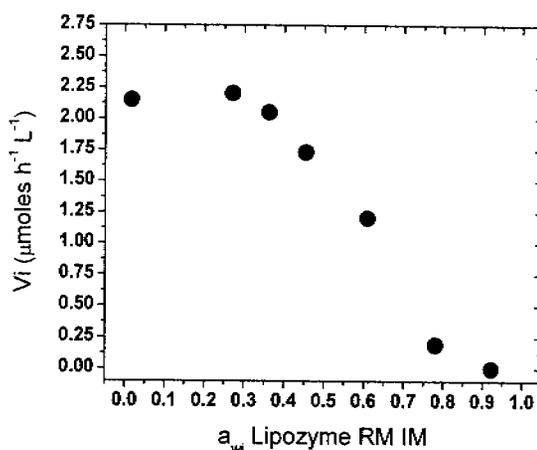


Figura 4-2. Curva de velocidad inicial vs. a_{wi} . Lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme RM IM), Hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

Este comportamiento inusual puede explicarse considerando la naturaleza hidrofóbica de los diésteres de luteína. Cuando las reacciones se llevan a cabo a altos valores de a_{wi} , el agua adsorbida en forma de multicapas alrededor del catalizador impide el acceso de los diésteres hacia los sitios catalíticos. A valores bajos de actividad acuosa, la primera capa de agua apenas se ha formado o incluso no ha alcanzado a completarse, lo cual implica que los sitios de adsorción del catalizador no están ocupados completamente por moléculas de agua y el acceso de los diésteres hacia el sitio activo de la enzima es más fácil. La fig. 4-3 ilustra el modelo que se plantea: en hexano, el agua tiene mayor afinidad a adsorberse sobre el biocatalizador sólido que a estar en disolución en el hexano. Por el lado de los diésteres de luteína, su partición entre la fase orgánica y la sólida dependerá en gran medida de la hidratación del biocatalizador. En otras palabras, si el microambiente alrededor de los biocatalizadores es hidrofílico, los diésteres se mantendrán en disolución en el hexano y pocas serán las moléculas que sean reconocidas por la enzima.

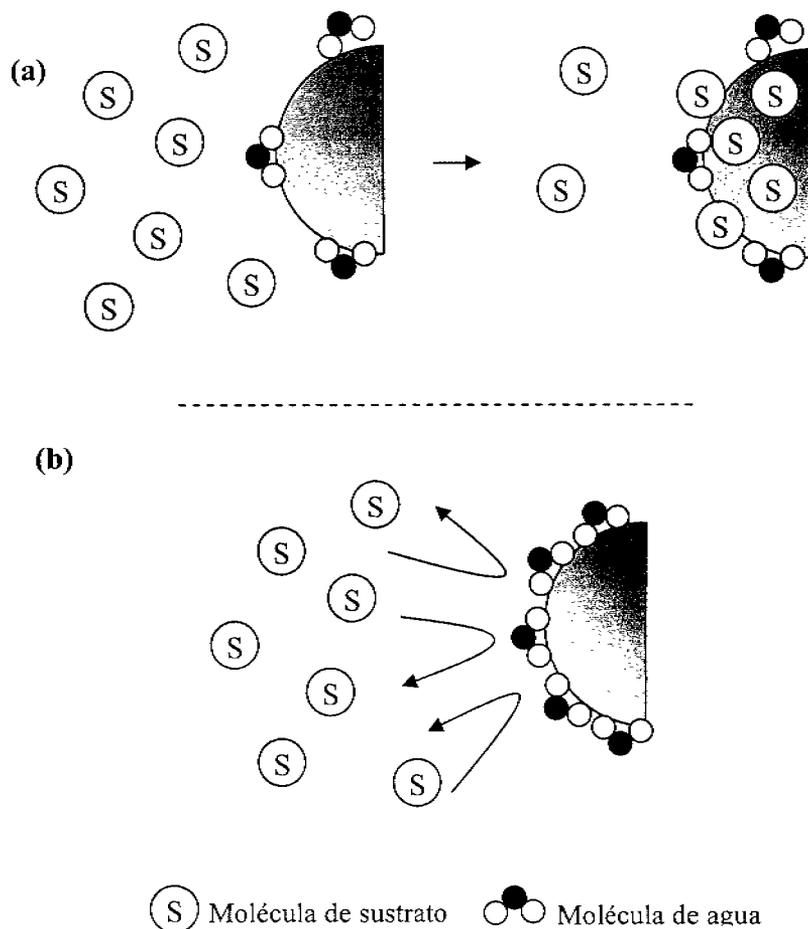


Figura 4-3. (a) A bajos valores de a_{wi} los diésteres pueden acceder a los sitios catalíticos debido a que el agua no bloquea completamente al sustrato. (b) A valores altos de a_{wi} la superficie se encuentra cubierta de agua e incluso pueden formarse multicapas alrededor del biocatalizador que bloquean el acceso de los diésteres de luteína hacia los sitios catalíticos.

Con la finalidad de comprobar que la reacción es enzimática y descartar que algún residuo del soporte del catalizador pueda llevar a cabo el ataque nucleofílico se realizaron diferentes controles. El primero de ellos consistió en desactivar un lote de biocatalizador térmicamente (a 120 °C en una autoclave durante 1 hora) y se determinó su actividad residual en la reacción de esterificación de ácido láurico e iso-propanol. Una vez comprobada la termoinactivación completa, se expuso al biocatalizador (del mismo lote desactivado) a una solución de diésteres de luteína. Para ninguna de las lipasas comerciales desactivadas se observaron rastros de formación de monoésteres de luteína y luteína. Un segundo control se llevó a cabo con el soporte de la lipasa B de *C. antarctica*; la resina

acrílica se expuso a una solución de diésteres de luteína bajo las condiciones de reacción (previamente se ajustó su a_w a un valor de 0.13). Nuevamente no se observó transformación de los diésteres de luteína hacia monoésteres de luteína y luteína. Estos controles demuestran que la reacción de hidrólisis de ésteres de luteína es dependiente de la actividad enzimática.

4.2. Consumo de agua calculada a partir de la estequiometría de la reacción

Una vez determinada la dependencia de la hidrólisis de los diésteres de luteína respecto al a_w , surgió la pregunta de si la reacción podía estar limitada por el contenido de agua. Todas las enzimas requieren de una cierta cantidad de agua para conservar su flexibilidad y mantener expuesto su sitio activo para los sustratos, de tal manera que se pudiera observar una disminución en la velocidad de reacción como resultado de una pérdida de actividad enzimática y/o por efecto de una disminución en el agua disponible para la hidrólisis. Mediante una isoterma de adsorción de agua reportada por Chamuleau y col. [40] para la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435), fue posible calcular que a bajas actividades acuosas existe la suficiente cantidad de agua para hidrolizar completamente a los diésteres de luteína. La figura 4-4 muestra a la isoterma reportada y la figura 4-5 el cálculo mediante el cual se determina que existe la suficiente cantidad de agua para alcanzar una hidrólisis completa de los diésteres a un a_w de 0.13 (marcado en la fig. 4-4).

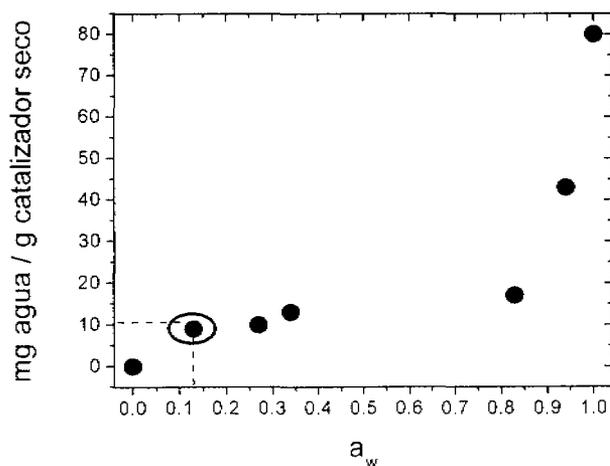


Figura 4-4. Isoterma de adsorción para Novozym 435 medida a 20 °C [40]

g de biocatalizador = 0.1 g ; Cantidad de biocatalizador usada en cada matraz

$$\text{Contenido de } H_2O = 11.00 \frac{\text{mg } H_2O}{\text{g biocatalizador}} ; \text{ medido a una } a_w = 0.13$$

(a) Cálculo de los mg de H_2O totales en 0.1 g de biocatalizador:

$$\text{mg } H_2O \text{ totales} = \left[11.00 \frac{\text{mg } H_2O}{\text{g biocatalizador}} \right] \cdot [0.1 \text{ g biocatalizador}] = 1.1 \text{ mg } H_2O$$

(b) Conversión de mg de H_2O a μg de H_2O :

$$\mu\text{g } H_2O \text{ totales} = 1.1 \text{ mg } H_2O \cdot \left[\frac{1000 \mu\text{g } H_2O}{1 \text{ mg } H_2O} \right] = 1100.0 \mu\text{g } H_2O$$

(c) Conversión de μg de H_2O a μmoles de H_2O :

$$\mu \text{ moles } H_2O \text{ totales} = 1100.0 \mu \text{ g } H_2O \cdot \left[\frac{1.0 \mu \text{ mol } H_2O}{18.0 \mu \text{ g } H_2O} \right] = 61.11 \mu \text{ moles } H_2O$$

$$\text{Volumen de reacción} = 20 \text{ mL} = 0.020 \text{ L} \quad \mu \text{ Molaridad} = \frac{\mu \text{ moles de soluto}}{\text{L de disolución}}$$

(a) Cálculo de μmoles totales de diésteres de luteína, para una concentración de diésteres de luteína de 80 μM :

$$\begin{aligned} \mu \text{ moles de diésteres de luteína} &= \left[80.0 \frac{\mu \text{ moles de diésteres}}{\text{L disolución}} \right] \cdot [0.020 \text{ L}] \\ &= 1.60 \mu \text{ moles de diésteres} \end{aligned}$$

Figura 4-5. Cálculo de μmoles de agua para un $a_w = 0.13$. Los resultados demuestran que hay 38 veces más agua para hidrolizar 1.6 μmoles de diésteres.

Este exceso de agua (calculado a partir de la isoterma), no significa que toda ella se encuentre disponible como sustrato de la reacción. Para determinar de manera más clara si a bajas actividades acuosas el agua es el reactivo limitante, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis a distintas concentraciones iniciales de diésteres de luteína y mediante la estequiometría de la reacción se calculó la cantidad de agua consumida. En la reacción se consumen 2 moles de agua por cada mol de luteína producida y por cada mol de monoéster de luteína se consume 1 mol de de agua.

Experimentos llevados a cabo usando los dos biocatalizadores comerciales mostraron que, independientemente de la concentración inicial de los diésteres de luteína, la reacción se detiene a partir de las 96 horas (en hexano, a 60°C y preajustando el a_w del biocatalizador a 0.13). La Fig. 4-6 muestra los perfiles de concentración para monoésteres de luteína y luteína, para una reacción catalizada con la lipasa de *M. miehei*. A partir de ambas gráficas se calculó la cantidad de agua consumida, con base en la estequiometría de la reacción.

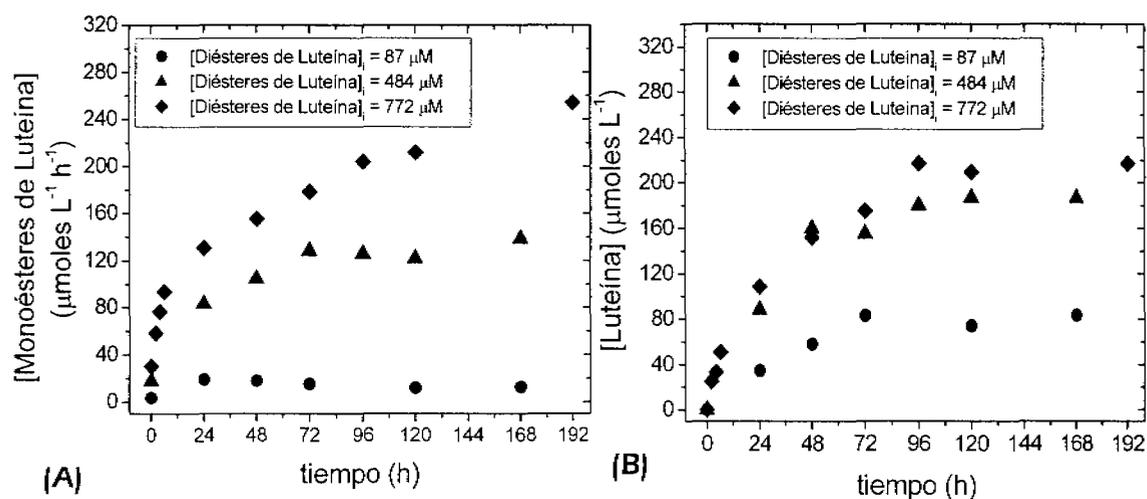


Figura 4-6. Perfiles de concentración de (A) monoésteres de luteína y de (B) luteína a distintas concentraciones iniciales de diésteres de luteína. Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.13$, Hexano, 60 °C

La Fig. 4-7 muestra el consumo de agua (medido en términos de cantidad de materia) para reacciones de hidrólisis llevadas a cabo en 3 diferentes concentraciones iniciales de diésteres de luteína (87 μM , 484 μM y 772 μM). Los consumos de agua en cada caso son diferentes pero, claramente, la reacción siempre se detiene, independientemente de la concentración inicial del sustrato.

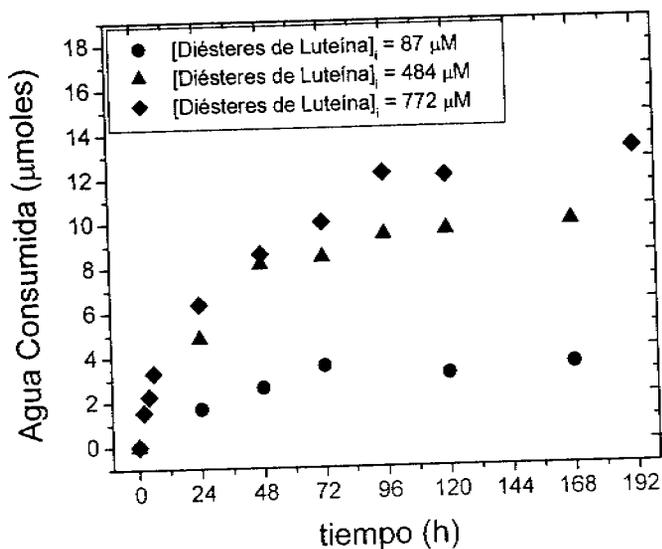


Figura 4-7. Perfiles del consumo de agua en la reacción de hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales de diésteres de luteína. Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.13$, Hexano, 60 °C.

Un estudio análogo se llevó a cabo con la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435). La Fig. 4-8 muestra los consumos de agua para 3 distintas concentraciones de diésteres de luteína (78.5 μM , 468 μM y 735 μM), observando un comportamiento similar al presentado por la lipasa de *Mucor miehei*, donde la reacción se detiene a partir de las 96 horas. Sin embargo, una diferencia significativa entre ambos biocatalizadores, es la magnitud del consumo de agua. Mediciones del agua total por titulaciones de Karl Fisher demostraron que el biocatalizador comercial Lipozyme RM IM, ajustado a una a_w de 0.13, adsorbe una mayor cantidad de agua (71 mg agua/g biocatalizador seco) que el biocatalizador Novozym 435 (35 mg agua/g biocatalizador seco). Estos datos nos permiten suponer que la mayor

obtención de productos es consecuencia del mayor contenido de agua de Lipozyme RM IM de acuerdo al principio de Le Chatellier.

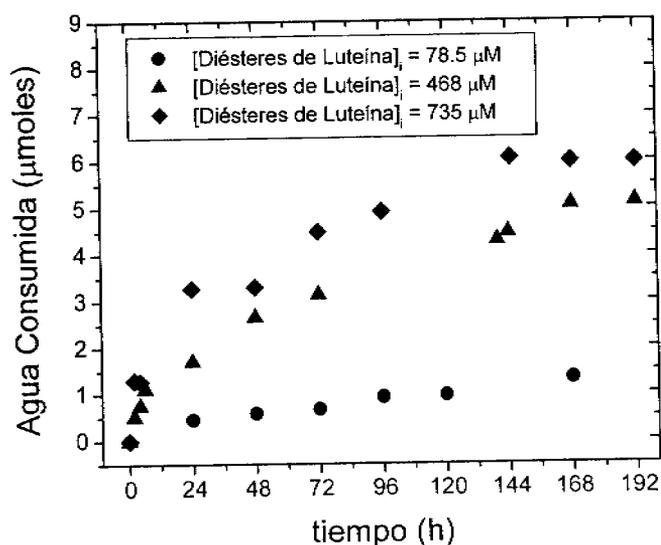


Figura 4-8. Perfiles del consumo de agua en la reacción de hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales de diésteres de luteína. Novozym 435, $a_{wi} = 0.13$, Hexano, 60 °C.

Las diferencias en el consumo de agua a las distintas concentraciones iniciales de diésteres de luteína demuestran que el agua no limita la reacción, a pesar de que en cada caso la reacción se detiene. Los consumos de agua de los dos biocatalizadores fueron distintos a pesar de haber sido ajustados a un mismo valor (~ 0.13) lo cual pudiese parecer contrario a la definición de a_w . Se ha mencionado en numerosos reportes [14-21] que la a_w es el parámetro que representa la cantidad de agua disponible en el sistema, independientemente de la capacidad de retención de agua que tenga un material sólido. Lo anterior es cierto ya que, en el equilibrio, la presión parcial del agua es la misma (Fig. 4-9) cuando 2 materiales son expuestos a una misma atmósfera generada por una solución salina sobresaturada.

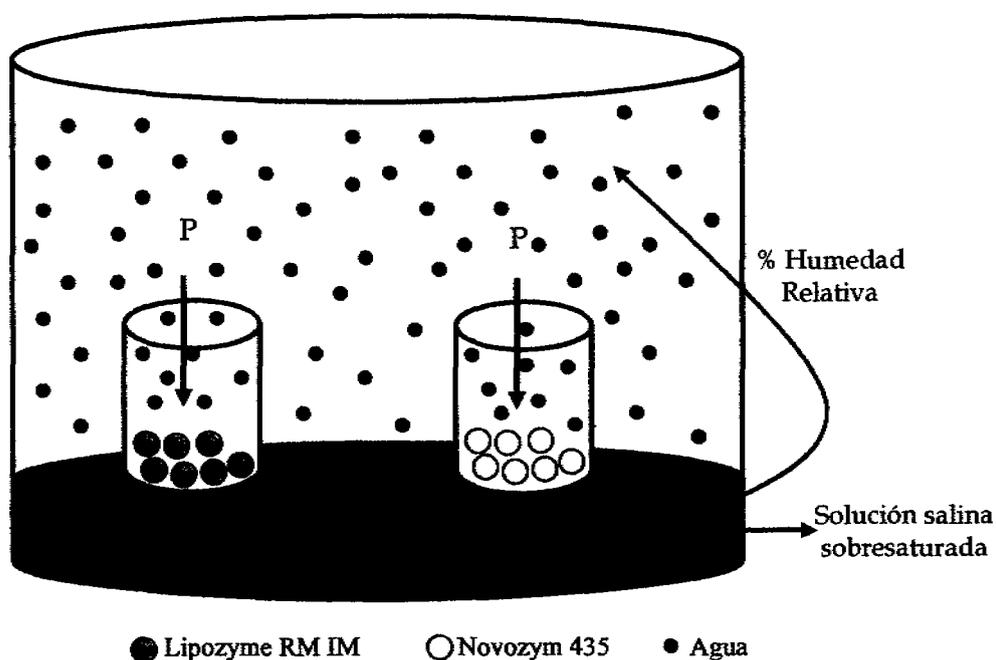


Figura 4-9. Pre-ajuste de la actividad acuosa de los biocatalizadores. La solución salina sobresaturada genera una cierta humedad relativa. Las moléculas de agua que pasan a la fase vapor se adsorben sobre los biocatalizadores y en el equilibrio la presión parcial del agua es la misma en ambos materiales.

Sin embargo, a pesar de que al inicio de la reacción la “disponibilidad” de agua sea la misma para ambos biocatalizadores (ya que fueron ajustados al mismo valor de a_w), la reacción va a ocurrir en función de la cantidad de agua total en el sistema, según lo demanda la enzima para su trabajo hidrolítico.

4.3. Efecto de la adsorción de carotenoides sobre la superficie de los biocatalizadores

Uno de los fenómenos interesantes de esta reacción hidrolítica es la adsorción de carotenoides (principalmente luteína y monoésteres de luteína) sobre el biocatalizador (Fig. 4-10). Tal como está descrito en la metodología, es necesario realizar lavados a los biocatalizadores para recuperar el material adsorbido para así cuantificar todos los componentes de la reacción.

Una posibilidad que pudiese explicar el por qué las reacciones se detienen es que la acumulación de pigmento alrededor del biocatalizador bloqueé el acceso de sustrato hacia

la enzima, en un efecto de tipo “inhibición por producto”. La Fig. 4-10 esquematiza este fenómeno. Al cuantificar por HPLC los carotenoides adsorbidos al soporte se determinó que el 50% de los carotenoides adsorbidos corresponde a la luteína (el compuesto de menor hidrofobicidad) mientras que los diésteres de luteína son los compuestos que se adsorben en menor proporción (compuestos de mayor hidrofobicidad). Esto refleja un efecto selectivo del soporte en términos de adsorción de los carotenos involucrados.

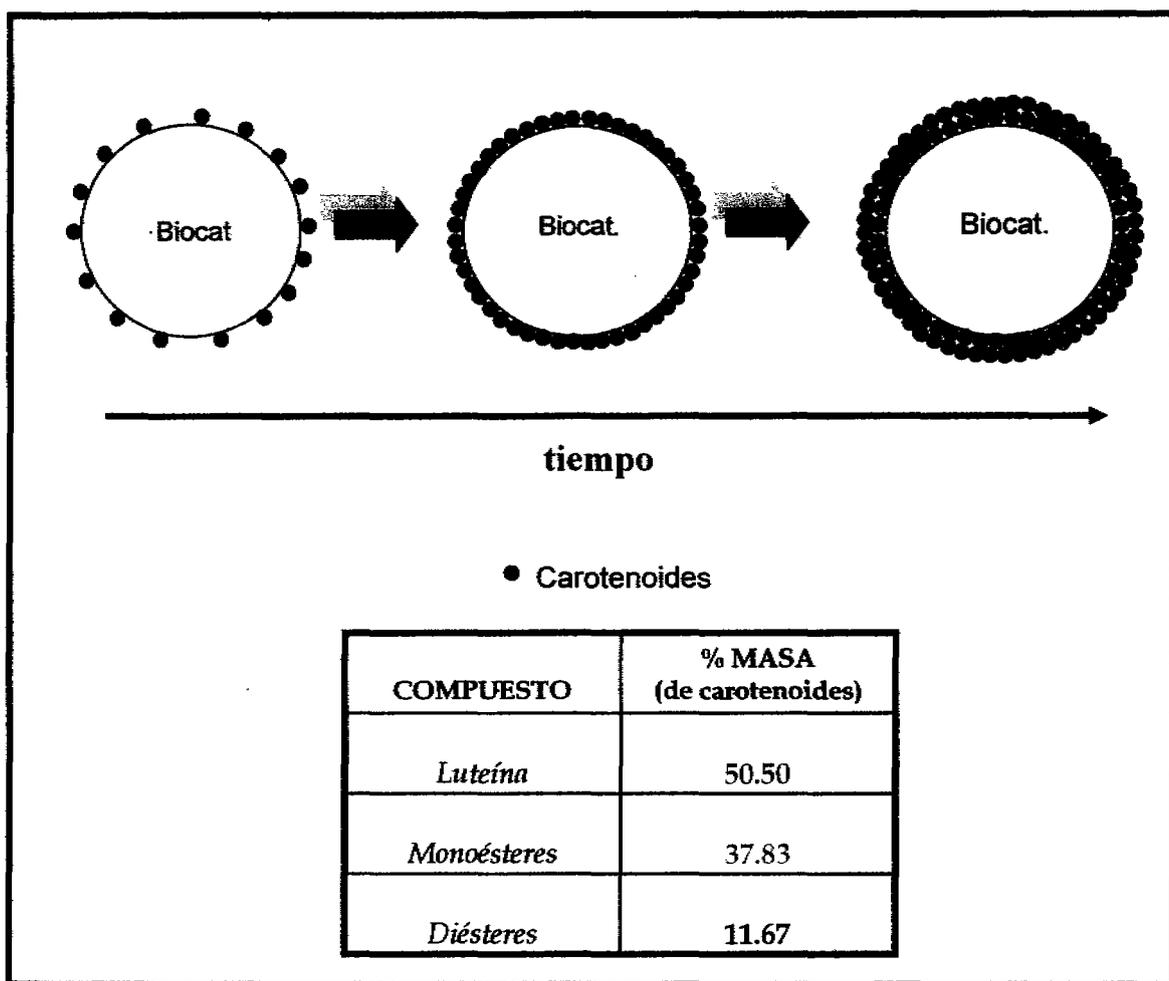


Figura 4-10. Adsorción de carotenoides sobre los biocatalizadores. A medida que avanza la reacción se adsorben preferentemente los productos luteína y monoésteres de luteína.

Para determinar experimentalmente si existe un efecto inhibitorio sobre la reacción por parte de los productos adsorbidos, se realizaron los experimentos siguientes:

1. Durante 168 horas se expuso a Novozym 435 a una solución de diésteres de luteína (480 μM) bajo condiciones de reacción.
2. Se recuperó el biocatalizador con el pigmento adsorbido, se eliminó el disolvente adherido y se reajustó nuevamente al a_{wi} inicial.
3. El biocatalizador con pigmento adsorbido se sometió nuevamente a una solución fresca de diésteres de luteína (480 μM) para llevar a cabo una nueva reacción de hidrólisis.
4. Se compararon los perfiles de concentración.

La Fig. 4-11 compara los perfiles de concentración para Novozym 435 ($a_{wi}= 0.13$) con y sin carotenoides pre-adsorbidos. Los resultados obtenidos muestran que la actividad del biocatalizador no se altera por efecto del material que queda depositado sobre el material sólido, ya que los avances temporales de la reacción son prácticamente un duplicado, cancelando la posibilidad de un efecto inhibitorio. Por otro lado, este experimento sirvió para demostrar que los biocatalizadores son estables y no pierden actividad catalítica al ser reutilizados, a pesar de ser sometidos a periodos de más de 168 horas en hexano a 60 °C.

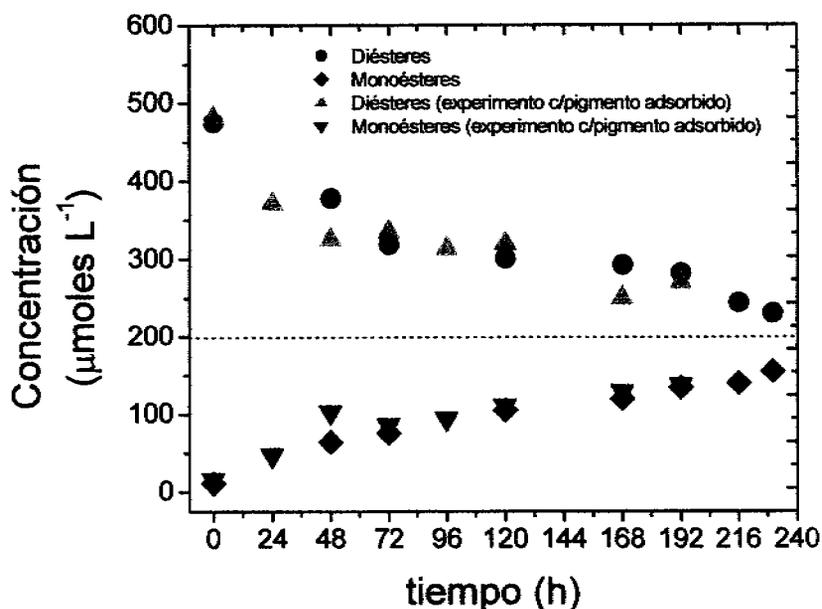


Figura 4-11. Perfiles de concentración de diésteres y monoésteres de luteína usando al biocatalizador con carotenoides adsorbidos y con biocatalizador sin pigmento adsorbido. Novozym 435, Hexano, 60 °C, $a_{wi} = 0.13$

4.4. Esterificación de luteína con ácido palmítico

Los resultados hasta ahora obtenidos han demostrado que la reacción no está limitada por la cantidad de agua ni por un efecto inhibitorio por lo cual restaba determinar si la reacción se detiene debido a que se ha alcanzado el equilibrio químico. En los antecedentes de esta tesis se hizo mención acerca de que las lipasas son capaces de catalizar la reacción inversa de la hidrólisis (la esterificación) bajo condiciones de baja humedad principalmente. En nuestro caso particular es importante tener en mente que al inicio de la reacción, la única reacción que puede llevarse cabo enzimáticamente es la hidrólisis de los diésteres de luteína, y no existen otras especies que puedan llevar a cabo las reacciones reversibles. En el sistema existen las condiciones (en teoría) necesarias para que se puedan llevar a cabo reacciones de esterificación enzimáticas a medida que la reacción procede. Esto es, un menor a_w debido a que el agua se consume, y una alta concentración de ácidos grasos, monoésteres de luteína y luteína.

Bajo esta hipótesis, se usó un estándar de luteína (99%) y ácido palmítico (el de mayor abundancia en la forma esterificada de la mezcla de diésteres de luteína) con el objetivo de

simular tales condiciones y obtener evidencia experimental sobre la reacción de síntesis de ésteres. La hipótesis es que si la hidrólisis de los diésteres de luteína alcanza el equilibrio, se puede llegar a éste también desde el lado de la síntesis. La reacción se llevó a cabo en hexano a 60 °C hasta 254 horas usando la lipasa B de *C. antarctica* a una $a_{wi} = 0.13$; los resultados obtenidos demuestran que la reacción de esterificación puede llevarse a cabo, lo cual es un claro indicativo de que la reacción no puede alcanzar rendimientos de luteína de 100% en un sistema tipo “batch”. La Fig. 4-12a muestra el perfil de elución del estándar de luteína obtenido por cromatografía de líquidos para demostrar que el estándar no contiene impurezas del tipo carotenoide. La reacción prosiguió hasta 240 horas (Fig. 4-12b) resultando en una gran acumulación de palmitato de luteína y la aparición de dipalmitato de luteína.

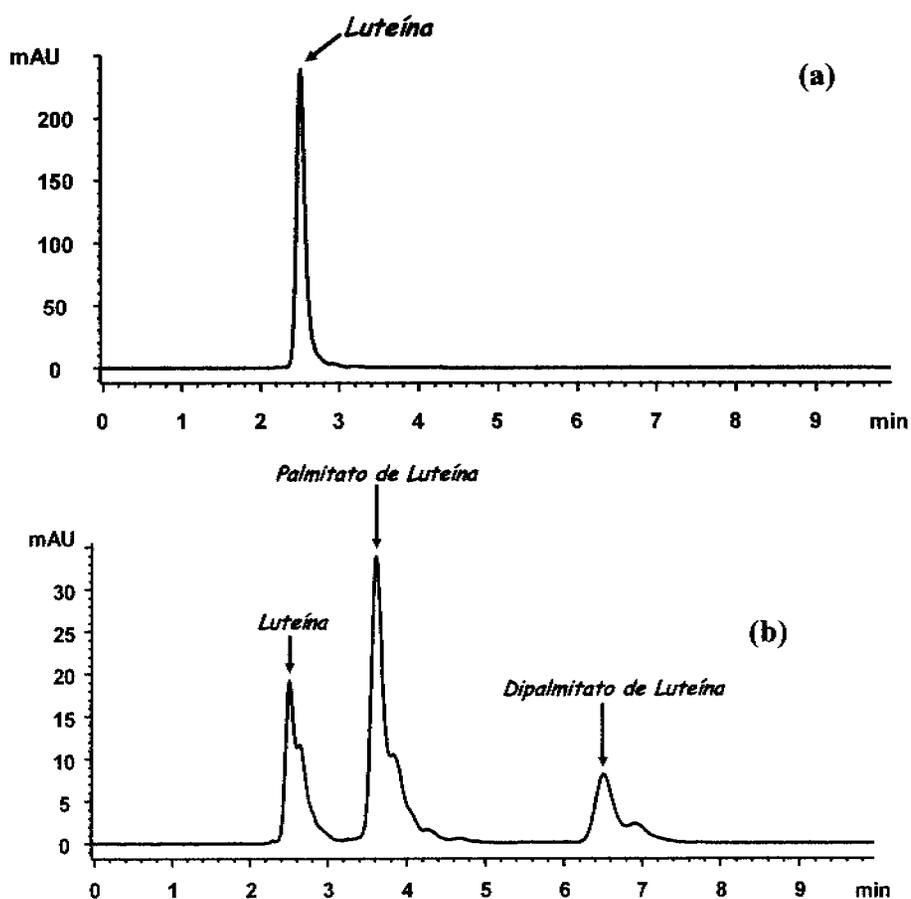


Figura 4-12. Cromatogramas obtenidos por HPLC. (a) Cromatograma del estándar de luteína, (b) Cromatograma de una muestra de la reacción de esterificación de la luteína con ácido palmítico. Novozym 435, $a_{wi} = 0.13$, hexano, 60 °C

Los perfiles de concentración de la reacción de esterificación de la luteína (Fig. 4-13) confirman que la reacción está controlada por el equilibrio químico. El experimento se monitoreó durante más de 240 horas, observando que alrededor de 150 horas ya no hubo cambios aparentes en la concentración de las especies.

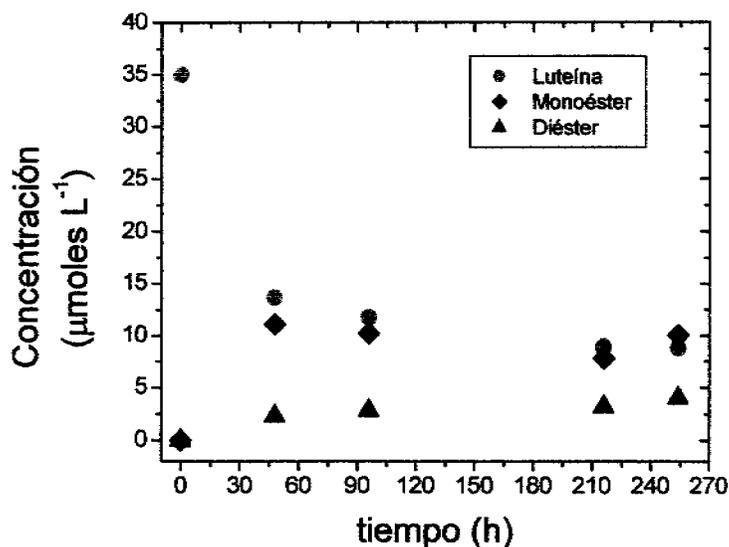


Figura 4-13. Perfiles de concentración de la reacción de esterificación de la luteína con ácido palmítico. Novozym 435, $a_{wi} = 0.13$, Hexano, 60 °C

4.5. Obtención de las curvas de saturación a distintos a_{wi} para ambas lipasas

Hasta este punto se ha demostrado que una reacción hidrolítica mediada por lipasas en hexano es: (a) favorecida para valores muy bajos de a_w (el agua no actúa como reactivo limitante ya que el equilibrio químico controla la reacción), (b) los biocatalizadores pueden ser usados en hexano a 60 °C por más de 160 horas sin tener evidencia de una pérdida de actividad catalítica, y (c) el fenómeno de adsorción por parte de la luteína y los monoésteres de luteína no tiene algún efecto inhibitorio sobre la reacción. Para altos valores de a_w se demostró que la reacción disminuye drásticamente su velocidad y se planteó que el agua alrededor de los biocatalizadores actúa como un bloqueador e impide que los diésteres alcancen los sitios catalíticos.

Con la finalidad de obtener información acerca de la interacción entre los diésteres de luteína y la enzima, se llevaron a cabo experimentos a diferentes a_{wi} y diferentes concentraciones iniciales de diésteres de luteína para construir las curvas de saturación de la enzima. Los experimentos fueron hechos usando ambos biocatalizadores comerciales en hexano, y los resultados nuevamente fueron inesperados debido a la aparición de curvas de saturación de tipo sigmoideal, que se alejan del clásico modelo de saturación hiperbólico. Las Figs. 4-14 a 4-16 muestran este comportamiento para la reacción catalizada con Novozym 435; los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación cinética de Hill (Ec. 4) y los valores constantes obtenidos del ajuste deben considerarse como aparentes, ya que debe tomarse en cuenta que no se ha determinado cuál es la etapa limitante de esta reacción, que al ser una catálisis heterogénea involucra un conjunto de mecanismos que no han sido objeto de un estudio detallado. A pesar de que las lipasas son enzimas monoméricas, la ecuación de Hill puede ser útil como una aproximación que englobe todos los factores de interacción entre el catalizador y el sustrato.

$$v_i = \frac{V_{\max}^{ap} [S]^n}{(S_{0.5})_{ap}^n + [S]^n} \quad (4)$$

v_i = velocidad inicial ($\mu\text{moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

V_{\max}^{ap} = velocidad máxima aparente ($\mu\text{moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

$[S]$ = Concentración de sustrato ($\mu\text{moles L}^{-1}$)

$(S_{0.5})_{ap}$ = Concentración de sustrato a la cual se alcanza $\frac{1}{2}$ de V_{\max}^{ap} ($\mu\text{moles L}^{-1}$)

n = número de Hill

La forma sigmoideal de las curvas es más evidente a medida que se incrementa el a_{wi} del biocatalizador (Fig. 4-14 a 4-16). Las velocidades máximas aparentes (V_{\max}^{ap}) disminuyen en función del a_{wi} y nunca alcanzan la misma magnitud a pesar del incremento en la concentración inicial de diésteres de luteína. Por otro lado, los valores de la constante $(S_{0.5})_{ap}$, definida en la Ec. 4, disminuyen en función del a_{wi} usando Novozym 435 (Tabla 4-1) lo cual indica una mayor afinidad del catalizador por el sustrato cuando su superficie se encuentra más hidratada. En este caso particular, los datos experimentales son interesantes ya que el resultado esperado sería una menor afinidad del catalizador en su conjunto hacia

los diésteres; al parecer, la disminución de la velocidad a valores altos de a_{wi} es a causa de que la cantidad de sitios catalíticos efectivos disminuye debido a que el agua alrededor de la enzima genera un problema de partición (lo cual representa un posibilidad que justifique la disminución de V_{max}^{ap}), sin embargo la interacción entre el catalizador y el sustrato parece ser más eficiente.

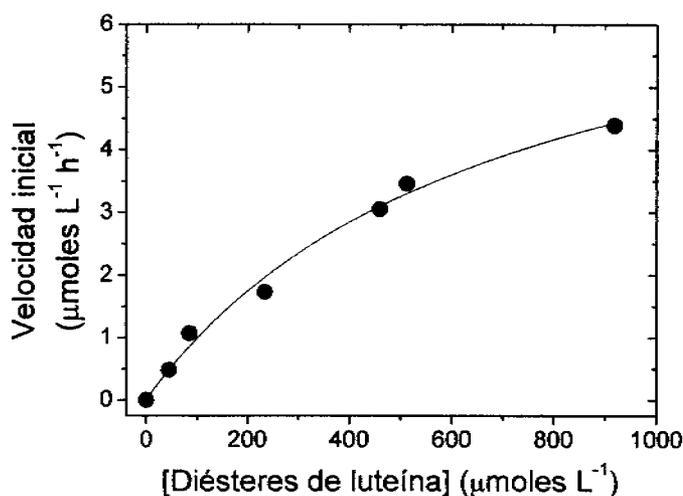


Figura 4-14. Curva de velocidades iniciales de consumo de diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales. Novozym 435, $a_{wi}=0.13$, hexano, 60 °C, 130 rpm, [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

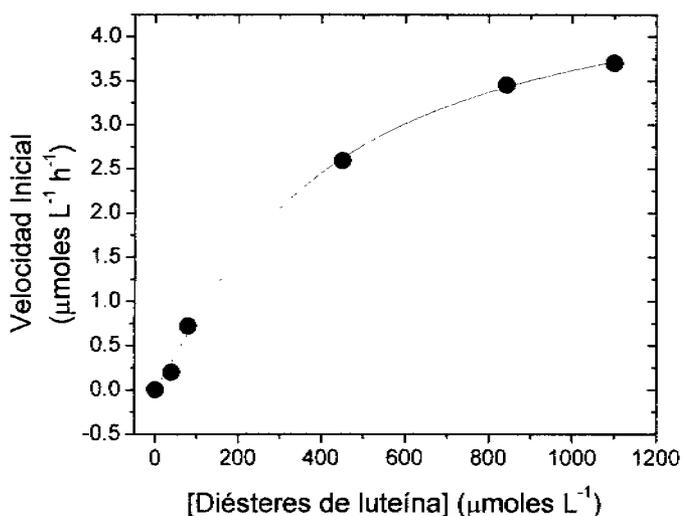


Figura 4-15. Curva de velocidades iniciales de consumo de diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales. Novozym 435, $a_{wi}=0.32$, hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

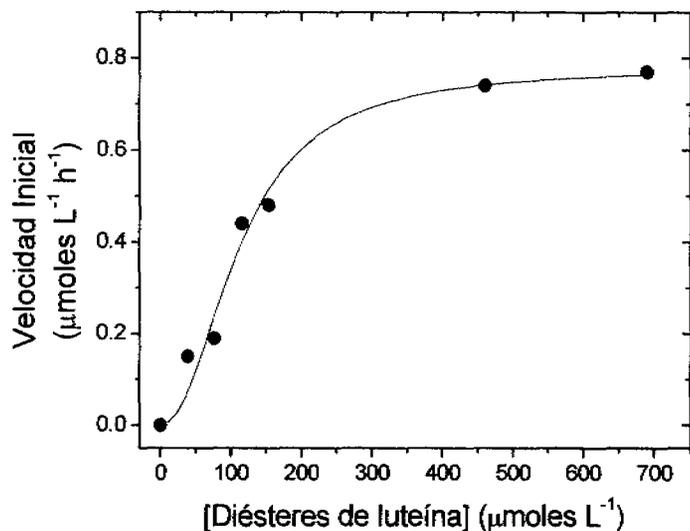


Figura 4-16. Curva de velocidades iniciales de consumo de diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales. Novozym 435, $a_{wi}=0.84$, hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

Tabla 4-1. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de datos experimentales con la ecuación de Hill a distintos a_{wi} . Novozym 435, T = 60 °C.

	$a_{wi} = 0.13$	$a_{wi} = 0.32$	$a_{wi} = 0.84$
V_{max}^{ap} ($\mu\text{moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	7.74 ± 0.91	4.77 ± 0.40	0.78 ± 0.04
$(S_{0.5})_{ap}$ ($\mu\text{moles L}^{-1}$)	690.14 ± 146.87	380.71 ± 71.2	112.70 ± 10.08
n	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.1

Para las reacciones catalizadas con la lipasa de *M. miehei* la sigmoideidad de las curvas de saturación es evidente desde valores bajos de a_{wi} (Figuras 4-17 y 4-18) y a diferencia de Novozym 435 los valores de la constante $(S_{0.5})_{ap}$ incrementan en función del a_{wi} y en este caso la afinidad del catalizador es afectada de manera negativa por su hidratación (Tabla 4-2).

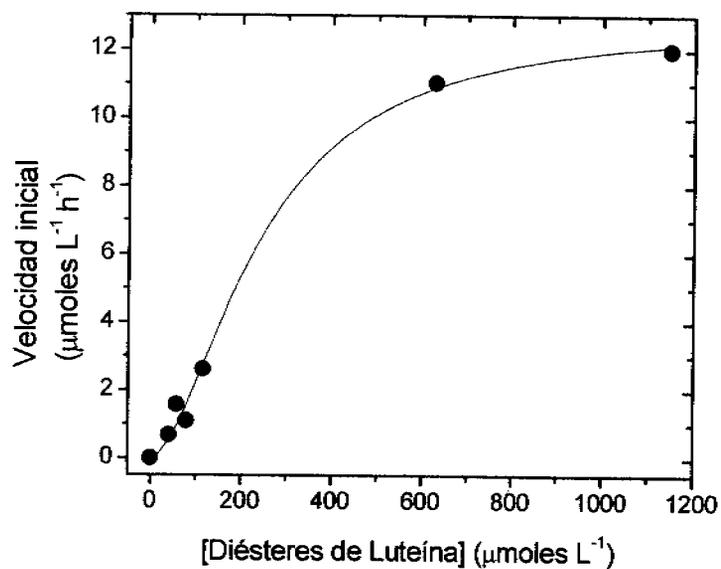


Fig. 4-17. Curva de velocidades iniciales de consumo de diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales. Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.13$, hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

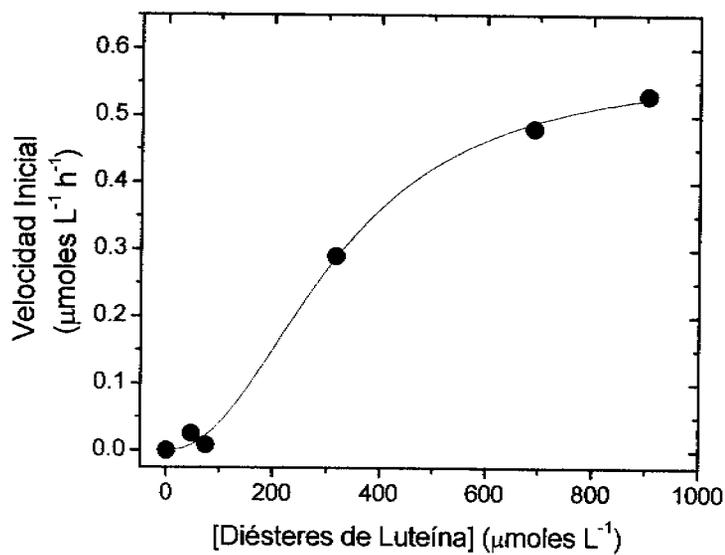


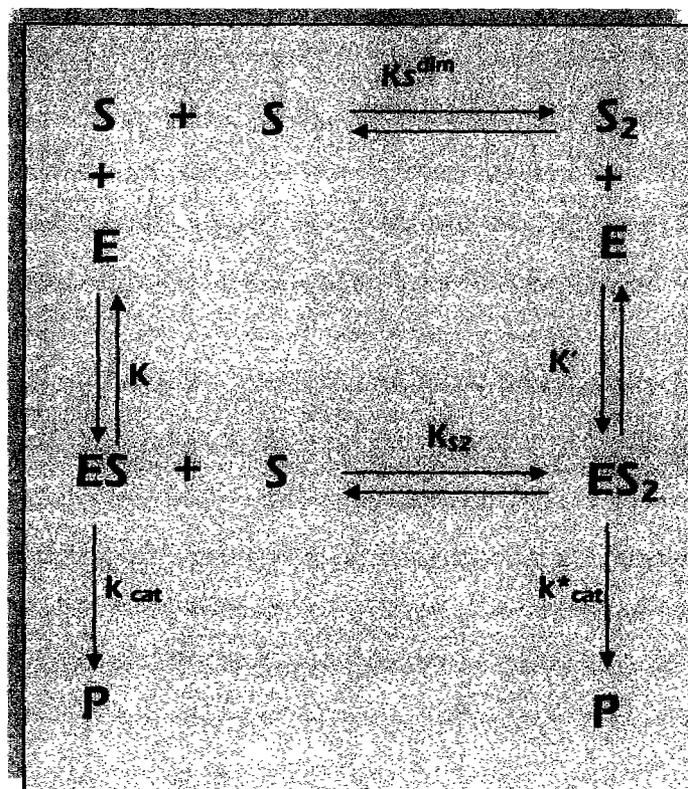
Figura 4-18. Curva de velocidades iniciales de consumo de diésteres de luteína a distintas concentraciones iniciales. Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.90$, hexano, 60 °C, 130 rpm. [Biocatalizador] = 5 mg/mL.

Tabla 4-2. Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste de datos experimentales con la ecuación de Hill a distintos a_{wi} . Lipozyme RM IM, T = 60 °C.

	$a_{wi} = 0.13$	$a_{wi} = 0.90$
V_{max}^{ap} ($\mu\text{moles L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	12.86 ± 0.90	0.58 ± 0.04
$(S_{0.5})_{ap}$ ($\mu\text{moles L}^{-1}$)	241.85 ± 46.47	317.51 ± 31.58
n	1.78 ± 0.28	2.22 ± 0.50

Las curvas sigmoidales representan una forma inusual de saturación para una lipasa. Por lo general este tipo de curvas de saturación son comunes para enzimas oligoméricas (con más de un sitio catalítico) pero en este caso, las lipasas son monoméricas y de acuerdo a los valores de la constante de Hill ($n > 1$) se observa un fenómeno de cooperatividad positiva por sustrato. Sin embargo, la aparición de curvas sigmoidales no es exclusiva de las enzimas oligoméricas. Torres y Aburto [41] sugieren que la enzima monomérica Cloroperoxidasa (CPO) presenta curvas sigmoidales a causa de la formación de dímeros de sustrato (formados por interacciones de moléculas no polares) los cuales pueden ser reconocidos por la enzima. La presencia de dímeros en un sistema de reacción implica que la enzima puede reconocer simultáneamente 2 formas del mismo sustrato (Fig. 4-19).

41. Torres E. and Aburto J. (2005) Chloroperoxidase – catalyzed oxidation of 4,6 – dimethyldibenzothiophene as dimer complexes: Evidence for kinetic cooperativity. Arch. Biochem. Biophys, 437, 224-232.



Evidentemente adoptar este mecanismo a la hidrólisis de los diésteres de luteína requiere de mayor experimentación para sustentarlo. Una primera etapa sería obtener evidencia de la presencia de dímeros en el medio de reacción y en una segunda etapa desarrollar una metodología experimental que demuestre el reconocimiento de los biocatalizadores por la forma monomérica y dimerica del sustrato. En el caso de la reacción de hidrólisis de los diésteres de luteína sería interesante estudiar esta posibilidad, la cual proporcionaría más elementos que ayuden a explicar la sigmoidicidad de las curvas de saturación. Es importante resaltar que en la revisión bibliográfica realizada en este proyecto no se encontraron estudios acerca de curvas de saturación sigmoidales para lipasas lo cual abre una nueva área de estudio para esta reacción en particular.

4.6. Reacciones de hidrólisis de los diésteres de luteína en CO₂-SC

Uno de los criterios en la selección de un disolvente puede ser la facilidad para ser separado del producto. En este aspecto, los fluidos supercríticos surgen como una alternativa interesante. Como se mencionó en la introducción, está demostrado que las lipasas son capaces de trabajar en medios supercríticos. En el caso particular de la hidrólisis de los diésteres de luteína, el uso de fluidos supercríticos (en particular el CO₂) como medio de reacción es también atractivo porque la separación del disolvente es eficiente y el CO₂ no es una sustancia tóxica.

En catálisis, los fluidos supercríticos no sólo han sido usados para eliminar la etapa de separación del disolvente sino que resultan atractivos para aquellos procesos con limitaciones de transferencia de masa. Debido a que los fluidos supercríticos comparten tanto propiedades de los líquidos como de los gases, la partición de sustratos dentro del sistema permite un acceso más eficiente de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima.

Se hicieron estudios de la reacción de hidrólisis de los diésteres de luteína en CO₂-SC usando la lipasa de *M. miehei*. Los perfiles de concentración (Fig. 4-20) en este sistema demuestran nuevamente que la reacción se detiene, seguramente por el alcance del equilibrio. Al comparar la evolución de la reacción con la observada para hexano se aprecia una considerable mejoría en la velocidad del proceso, ya que en 24 horas se alcanzan conversiones (X_{DE}) similares a las que se alcanzan en aproximadamente 100 horas en hexano (Fig. 4-21).

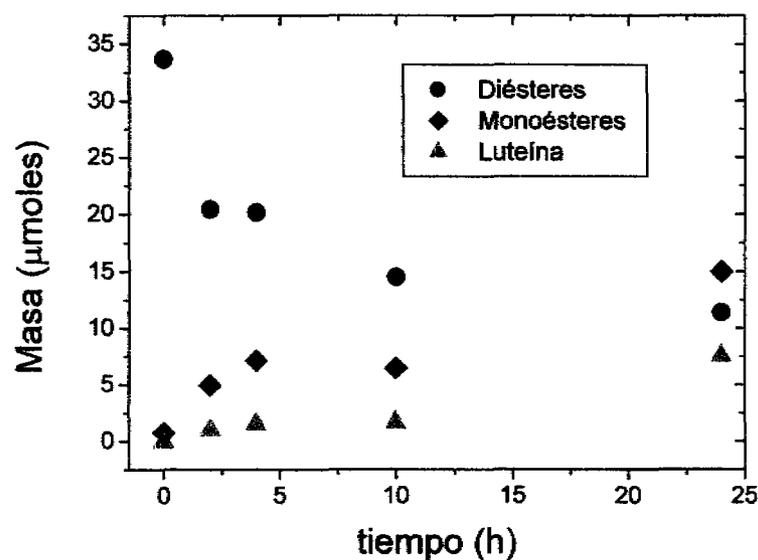


Figura 4-20. Perfiles de consumo de diésteres de luteína y perfiles de monoésteres de luteína y luteína en $\text{CO}_2\text{-SC}$. Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.22$, 55°C

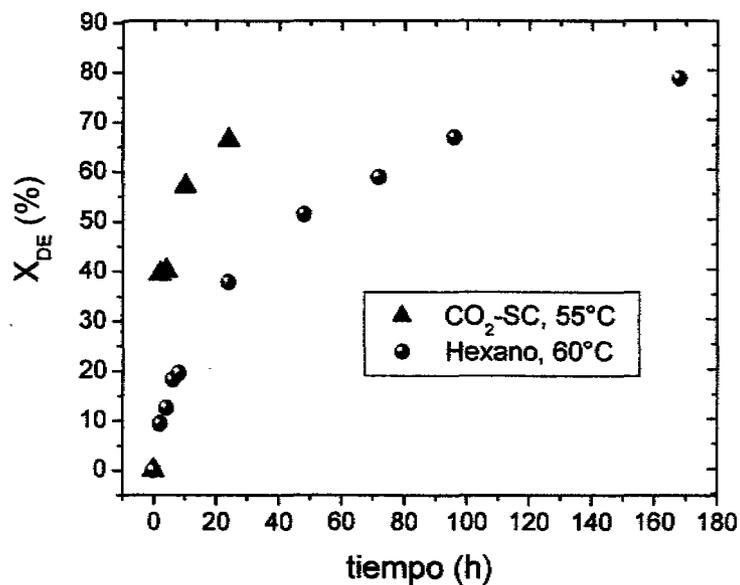


Figura 4-21. Conversiones de diésteres de luteína en hexano (60°C) y $\text{CO}_2\text{-SC}$ (55°C). Lipozyme RM IM, $a_{wi} = 0.22$.

El uso de $\text{CO}_2 - \text{SC}$ como medio de reacción demostró una considerable mejoría en la velocidad del proceso, a pesar de haber disminuido en 5°C la temperatura respecto los experimentos en hexano. Este cambio obedeció a que la densidad del CO_2 , y con ello su

capacidad solvatante, disminuye a los 60 °C. Una posible explicación a este cambio tan considerable en la reacción puede estar ligada a las propiedades disolventes del CO₂ – SC.

Es probable que el CO₂-SC desorba agua del biocatalizador debido a su menor hidrofobicidad y su alta difusividad comparada con el hexano, reduciendo el efecto negativo del agua adsorbida sobre la reacción y permitiendo un acceso más expedito hacia los sitios activos del biocatalizador. Esta remoción, sin embargo, no disminuye de manera drástica el agua disponible para la hidrólisis. Es importante hacer notar que las reacciones en CO₂-SC ocurren a través de un paso preliminar de disolución de los diésteres, previo a la reacción enzimática, según se observa en el siguiente esquema (Fig. 4-22).

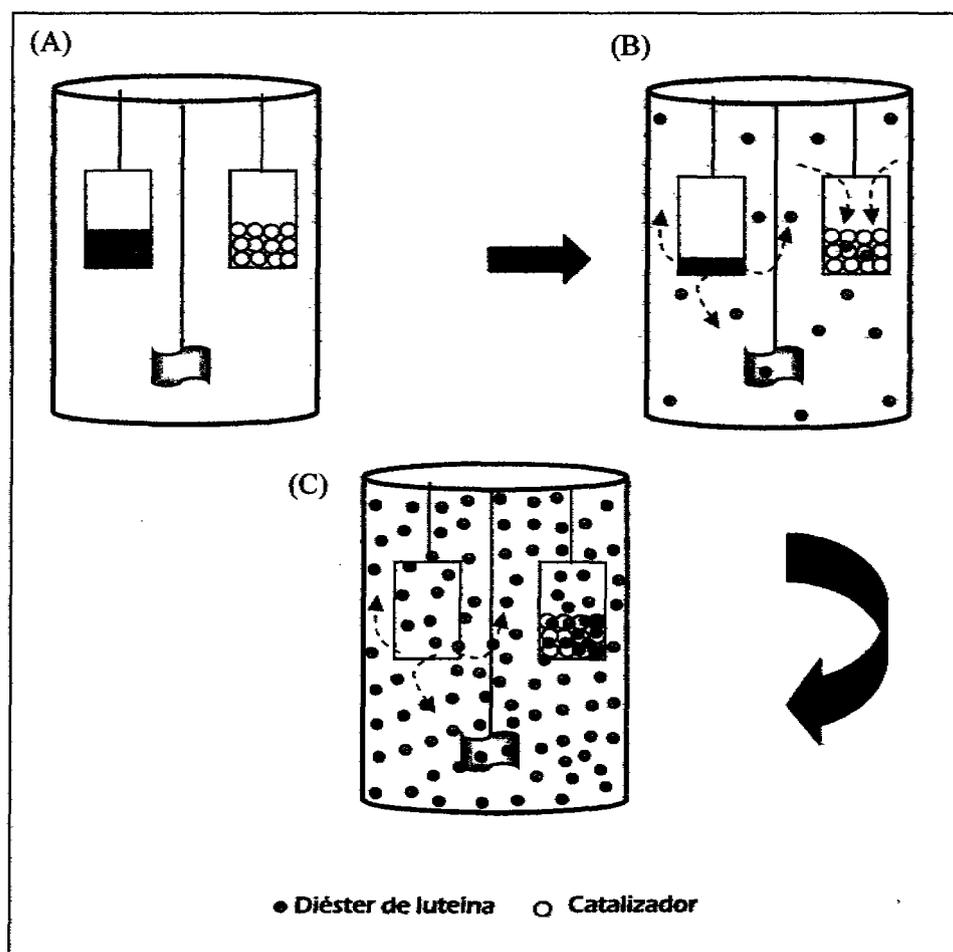


Figura. 4-22. Esquema del sistema de reacción en medio supercrítico. (A) El biocatalizador y los diésteres de luteína son colocados de manera independiente en bolsas porosas. (B) Una vez alcanzado el estado supercrítico, el CO₂ comienza a extraer a los diésteres de la bolsa, los cuales una vez disueltos están disponibles para ser reconocidos por la enzima. (C) Los diésteres son extraídos completamente y se encuentran en mayor disponibilidad para la enzima.

Como se describió en la metodología de este trabajo, los diésteres y el biocatalizador son colocados independientemente en bolsas porosas antes del inicio de la reacción de tal manera que el CO₂ debe extraer los diésteres para que puedan estar en contacto con la enzima (Fig. 4-22A). Una vez que el CO₂ alcanza las condiciones de temperatura y presión por encima del punto crítico, los diésteres comienzan a ser extraídos y de manera simultánea el biocatalizador comienza la hidrólisis (Fig. 4-22B); lo anterior significa que durante los primeros minutos de la reacción el biocatalizador no tiene disponibles a todos los diésteres (hasta que son completamente disueltos, Fig. 4-22C) pero a pesar de ello, los mecanismos de transferencia pueden ser tan eficientes que la enzima es capaz de llevar a cabo la hidrólisis a bajas concentraciones.

El uso de fluidos supercríticos (como el CO₂) abre un campo de estudio interesante para el estudio de los mecanismos que intervienen en la mejora de los procesos enzimáticos. Tener evidencia experimental de que la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína puede realizarse en CO₂-SC lleva a este estudio a una nueva y atractiva etapa desde varios puntos de vista:

- Primero: desde un punto de vista cinético, es importante obtener evidencia experimental para determinar bajo qué mecanismos el CO₂-SC favorece la formación de productos.
- Segundo: el uso de un disolvente no tóxico para llevar a cabo la hidrólisis enzimática puede ofrecer un producto de mayor valor agregado y en sintonía con las nuevas tendencias en productos para consumo humano.
- Tercero: la separación del producto es sencilla al disminuir la temperatura y llevar al CO₂ por debajo de su punto crítico; la dependencia de las propiedades disolventes del CO₂ como una función de la temperatura y de la presión ofrece la posibilidad que una misma sustancia se pueda comportar como un conjunto de diferentes disolventes.

4.7. Recomendaciones para trabajos futuros

Las bases que se han sentado en este trabajo permiten profundizar y explorar en áreas que sin duda ampliarían la caracterización de este sistema de reacción. A continuación, se proponen algunas ideas que pueden ser sujetas a estudio en el futuro:

1) Realizar inmobilizaciones para alguna de las lipasas evaluadas en distintos materiales y evaluar el efecto de los soportes de naturaleza y propiedades diferentes sobre la reacción.

2) Profundizar respecto a las curvas de saturación de tipo sigmoideal. Un punto de inicio sería determinar si los diésteres de luteína son capaces de dimerizarse y de ser reconocidos por los catalizadores. Una técnica interesante para este propósito sería la fluorometría la cual fue útil para Aburto y Torres al momento de demostrar la presencia de dímeros.

3) Para tener plena certeza de que la reacción de hidrólisis de los diésteres de luteína alcanza el equilibrio, es recomendable llevar a cabo los controles necesarios para comprobarlo. Para ello basta con romper el equilibrio y provocar que el equilibrio se desplace hacia los reactivos o hacia los productos (adicionando más diésteres de luteína o algún ácido graso por ejemplo)

4) Es necesario obtener más información de los medios supercríticos. Por mencionar algunos ejemplos: conocer la cinética de extracción de los diésteres, comprobar si las curvas de saturación en este tipo de medio permanecen sigmoideales.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES

- ✚ Se demostró la factibilidad de llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína en medios con bajo contenido de agua (hexano y CO₂-SC) usando 2 lipasas comerciales: la lipasa B de *C. antarctica* (Novozym 435) y la lipasa de *M. miehei* (Lipozyme RM IM). En ambos casos, el agua (medida como a_w) demostró ser un factor crítico sobre la actividad de las enzimas obteniéndose las mayores velocidades de reacción a los valores más bajos de a_w ; además, la capacidad de adsorber agua de los biocatalizadores (a valores iguales de a_w) influye sobre la magnitud de las concentraciones en el equilibrio.
- ✚ La naturaleza del sustrato tiene una gran influencia sobre la actividad de la lipasa, pero principalmente sobre los niveles de hidratación que requiere, lo cual explica el comportamiento anómalo para la reacción de hidrólisis estudiada.
- ✚ Se observó un fenómeno de cooperatividad positiva por sustrato influenciado por la hidratación del catalizador; esto representa uno de los pocos estudios con lipasas en los cuales se ha hecho referencia a las curvas de saturación de tipo sigmoideal.
- ✚ El CO₂-SC es un medio atractivo para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los diésteres de luteína. Con ambas lipasas comerciales se observó una reducción considerable en el tiempo de reacción. Es probable que el medio supercrítico reduzca el efecto inhibitorio del agua y las limitaciones de transporte de los diésteres hacia los sitios activos de los biocatalizadores. Los resultados preliminares obtenidos en CO₂-SC justifican el extender el estudio hacia el uso de medios cuyas propiedades disolventes pueden ser manipuladas fácilmente.

ANEXO I - REFERENCIAS CONSULTADAS.

A continuación se hace un listado de referencias que puedan ser útiles para el lector y que fueron consultadas a lo largo de este trabajo de investigación.

Referencias sobre carotenos:

- ❖ Alves - Rodrigues A. and Shao A. (2004) **The Science Behind Lutein**. *Toxicol. Lett.*, 150, 57-83.
- ❖ Amar I., Aserin A. and Garti N. (2003) **Solubilization patterns of Lutein and Lutein Esters in Food Grade Nonionic Microemulsions**. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4775-4781.
- ❖ Baysal T., Ersus S. and Starmans D. A. J. (2000) **Supercritical CO₂ Extraction of β - Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste**. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5507-5511.
- ❖ Bone R. A., Landrum J. T. and Tarsis S. L. (1985) **Preliminary identification of the human macular pigment**. *Vision Res.*, 25, 1531-1535.
- ❖ Breithaupt D., Bamedi A. and Wirt U. (2002) **Carotenol fatty acid esters: easy for digestive enzymes?** *Comparative Biochem. Physiology part B*, 132, 721-728.
- ❖ Breithaupt D., Bamedi A. and Wirt U. (2002) **Differentiation between Lutein Monoesters Regioisomers and Detection of Lutein Diesters from Marigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Several Fruits by Liquid Chromatography- Mass Spectrometry**. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 66-70.
- ❖ Datchler M., Kohler K. and Albert K. (1998) **Reversed- phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C₃₀ bonded phase**. *J. Chromatogr. B*, 720, 211- 216.
- ❖ Delgado-Vargas F. and Paredes-López O. (1997) **Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*)**. *Food Chem.*, 58 (3), 255-258.
- ❖ Delgado-Vargas F. and Paredes-López O. (1997) **Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles**. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1097-1102.
- ❖ Gau W., Ploschke H-J. and Wünsche C. (1983) **Mass Spectrometric Identification of Xanthophyll Fatty Acid Esters from Marigold Flowers (*Tagetes erecta*) Obtained by High-Performance Liquid Chromatography and Craig- Counter Distribution**. *J. Chromatogr.*, 262, 277-284.
- ❖ Hadden W. L., Watkins R. H., Levy L. W., Regalado E., Rivadeneira D. M., van Breemen R. B. and Schwartz S. J. (1999) **Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement**. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4189- 4194.
- ❖ Humphries J. and Khachik F. (2003) **Distribution of lutein, zeaxanthin and related geometrical isomers in Fruit, Vegetables, Wheat and pasta Products**. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1322-1327.

- ❖ Iannone A., Rota C., Bergamini S., Tomasi A. and Canfield L. (1998) **Antioxidant Activity of Carotenoids: An Electro – Spin Resonance Study on β - Carotene and Lutein Interaction with Free Radicals Generated in a Chemical System.** J. Biochem. Molec. Toxicol., 12, 299- 304.
- ❖ Khachik F., Steck A. and Pfander H. (1999) **Isolation and Structural Elucidation of [13Z, 13'Z, 3R, 3R', 6'R]- Lutein from Marigold Flowers, Kale and Human Plasma.** J. Agric. Food Chem., 47, 455-461.
- ❖ Khachik F., Beecher G. R. and Lusby W. R. (1988) **Separation and Identification of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters in some Squash Products by Liquid Chromatography. 2. Isolation and Characterization of Carotenoids and Related Esters.** J. Agric. Food Chem., 36, 938-946.
- ❖ Landrum J. and Bone R. (2001) **Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment.** Arch. of Biochem. Biophys., 385 (1), 28- 40.
- ❖ Li Hua-Bin, Yiang Y. and Chen F. (2002) **Isolation and Purification of Lutein from the Microalga *Chlorella vulgaris* by Extraction after Saponification.** J. Agric. Food Chem., 50, 1070-1072.
- ❖ Martínez Peña M., Cortés Cuevas A. and Ávila González E. (2004) **Evaluation of three pigments levels of marigold petals (*Tagetes erecta*) on skin pigmentation of broiler chicken.** Téc. Pec. Méx., 42 (1), 105- 111.
- ❖ Marty C. and Berset C. (1990) **Factors Affecting the Thermal Degradation of all- trans- β - Carotene.** J. Agric. Food Chem., 38, 1063-1067.
- ❖ Minguez- Mosquera A. I. and Pérez-Gálvez A. (1998) **Study of Lability and Kinetics of the Main Carotenoid Pigments of Red Pepper in the De-esterification Reaction.** J. Agric. Food Chem., 46, 566-569.
- ❖ Naranjo-Modad S., López-Munguía A., Vilarem G., Gaset A. and Bárzana E. (2000) **Solubility of Purified Lutein Diesters Obtained from *Tagetes erecta* in Supercritical CO₂ and the Effect of Solvent Modifiers.** J. Agric. Food Chem., 48, 5640-5642.
- ❖ Nishino H. (1997) **Cancer Prevention by Natural Carotenoids.** J. Cell. Biochem. Supp., 27, 86- 91.
- ❖ Pérez-Gálvez A., Jarén-Galán M., Minguez-Mosquera I. (2000) **Effect of High Temperature Degradative Processes on Ketocarotenoids Present in Paprika Oleoresins.** J. Agric. Food Chem., 48, 2966-2971.
- ❖ Sharoni Y., Danilenko M. and Levy J. (2000) **Molecular Mechanisms for the Anticancer Activity of the Carotenoid Lycopene.** Drug Dev. Res., 50, 448- 456.
- ❖ Subagio A. and Morita N. (2001) **No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein.** Food Res. Int., 34, 315- 320.
- ❖ Tyczkowski J. and Hamilton P. (1991) **Research Note: Preparation of Purified Lutein and Its Diesters from Extracts of Marigold (*Tagetes erecta*).** Poultry Sci., 70, 651- 654.
- ❖ Yuan Jiang-Ping and Chen Feng (1999) **Isomerization of trans- Astaxanthin to cis- Isomers in Organic Solvents.** J. Agric. Food Chem., 47, 3656-3560.

-
- ❖ Yuan Jiang-Ping and Chen Feng (1999) **Hydrolysis Kinetics of Astaxanthin Esters and Stability of Astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during Saponification.** *J. Agric. Food Chem.*, 47, 31-35.

Referencias sobre enzimología en medios no acuosos.

- ❖ Adlercreutz, P. 1992. **On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity.** In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (J. Tramper, M.H. Vermúe, H. H. Beftink, U. von Stockar, eds) Elsevier, Amsterdam, p. 55.
- ❖ Arroyo M., Sánchez-Montero J. M. and Sinisterra J. V. (1998) **Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media.** *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 3-12.
- ❖ Bell G., Halling J., Moore B., Partridge J. and Rees D. (1995) **Biocatalyst behavior in low-water systems.** *Trends Biotechnol.*, 13, 468 - 473.
- ❖ Camacho Páez B., Robles Medina A., Camacho Rubio F., González Moreno P. and Molina Grima E. (2003) **Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents.** *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 845-853.
- ❖ Carrea G. and Riva S. (2000) **Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2226-2254.
- ❖ Chamouveau F., Coulon D, Girardin M. & Ghouil M. (2001) **Influence of water activity and water content on sugar esters lipase catalyzed synthesis in organic media.** *J. Mol. Catal.*, 11, 949- 954.
- ❖ Damodaran S. (1998) **Water activity at interfaces and its role in regulation of interfacial enzymes: a hypothesis.** *Colloids Surf. B*, 11, 231-237.
- ❖ Decagny B., Roblot C., Ergon F., Sarazin C., Barbotin J. and Séguin J. (1998) **¹H- NMR on line monitoring of water activity during lipase catalyzed esterification.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1387, 129-135.
- ❖ De la Casa R. M., Sánchez-Montero J. M. and J. V. Sinisterra (1999) **Modification of hydrophilicity/ hydrophobicity of the microenvironment of lipase of *Candida rugosa* by dextrans.** *Biotechnol. Lett.*, 21, 123-128.
- ❖ Dordick J. S. (1988) **Biocatalysis in nonaqueous media.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 19, 1, 103-112
- ❖ Dordick J. S. (1989) **Enzymatic catalysis in monophasic organic-solvents.** *Enzyme Microb. Technol.* 11, 4, 194-211.
- ❖ Fureby A. M., Tian L., Adlercreutz P. and Mattiasson B. (1997) **Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides.** *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 198-206.
- ❖ Graber M., Bousquet- Douboch M., Lamare S., Legoy M. D. (2003) **Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a solid/ gas system: Effects of water in kinetic parameters.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1648, 24- 32.

-
- ❖ Guisan J. M., Sabuquillo P., Fernández-La Fuente R., Fernández- Lorente G., Mateo C., Halling P. J., Kennedy D., Miyata E. and Re D. (2001) **Preparation of new lipases derivatives with high activity- stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine.** *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 11, 817-824.
 - ❖ Humeau C., Girardin M., Rovel B. and Miclo A. (1998) **Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbil palmitate.** *J. Biotechnol.*, 63, 1– 8.
 - ❖ Kang I.J, Pfromm P.H. and Rzczac M.E. (2004) **Membrane permeation based sensing for dissolved water in organic micro-aqueous media.** *J. Membrane Sci.*, 239, 213-217.
 - ❖ Kang I.J, Pfromm P.H. and Rzczac M.E. (2005) **Real Time Measurement and Control of Thermodynamic Water Activities for Enzymatic Catalysis in Hexane.** *J. Biotechnol.*, 119, 147-154
 - ❖ Karra-Chaabouni M., Pulvin S., Thomas D., Touraud D. and Kunz W. (2002) **Role of water activity on the synthesis of geranyl butyrate by a *Mucor miehei* esterase in a solvent free system.** *Biotechnol. Lett.*, 24, 1951-1955.
 - ❖ Kaur J., Wehtje E., Adlercreutz P. Chand S. & Mattiasson B. (1997) **Water transfer kinetics in a water activity control system designed for biocatalysis in organic media.** *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 496 – 501.
 - ❖ Klibanov A. (1986) **Enzymes that work in organic solvents.** *Chem. Tech.*, 354- 358.
 - ❖ Klibanov A. M. (1997) **Why are enzymes less active in organic solvents than in water?** *Trends Biotechnol.*, 15, 97-101.
 - ❖ Lee Chen-Hsien and Parkin K. L. (2001) **Effect of Water Activity and Immobilization on Fatty Acid Selectivity for Esterification Reactions Mediated by Lipases.** *Biotech. Bioeng.*, 75 (2), 219- 227.
 - ❖ Lee Moo-Yeal and Dordick J. S. (2002) **Enzyme activation for nonaqueous media.** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13, 376-384.
 - ❖ Lue B., Karboune S., Yeboah F. and Kermasha S. (2005) **Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 462-468.
 - ❖ Ma L., Persson M. and Adlercreutz P. (2002) **Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful Transesterifications reactions.** *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 1024- 1029.
 - ❖ Pencreac'h G. and Baratti J. C. (2001) **Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations.** *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 473- 479.
 - ❖ Pepin P. and Lortie R. (1999) **Influence of Water Activity on the Enantioselective Esterification of (R, S) - Ibuprofen by *Candida antarctica* Lipase B in Solventless Media.** *Biotech. Bioeng.*, 63 (4), 502-505.

-
- ❖ Persson M., Wehtje E. and Adlercreutz P. (2002) **Factors governing the activity of lyophilized and immobilized lipase preparations in organic solvents.** *Chembiochem*, 3, 566 - 571.
 - ❖ Persson M., Costes D., Wehtje E. and Adlercreutz P. (2002) **Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity.** *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 916-923.
 - ❖ Persson M., Wehtje E. and Adlercreutz P. (2000) **Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum.** *Biotechnol. Lett.*, 22, 1571-1575.
 - ❖ Persson M., Mladenoska I. Wehtje E. and Adlercreutz P. (2002) **Preparation of lipases for use in organic solvents.** *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 833-841.
 - ❖ Torres E. and Aburto J. (2005) **Chloroperoxidase – catalyzed oxidation of 4,6 – dimethyldibenzothiophene as dimer complexes: Evidence for kinetic cooperativity.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 437, 224-232.
 - ❖ Valivety R., Halling P. and Macrae A. (1992) **Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1118, 218 – 222.
 - ❖ Valivety R., Halling P. and Macrae A. (1992) ***Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001.** *FEBS*, 301 (3), 258-260.
 - ❖ Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Lipases have similar water activity profiles in different reactions.** *Biotechnol. Lett.* 11(6), 537- 540.
 - ❖ Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Water activity and substrate concentration effects on lipase activity.** *Biotechnol. Bioeng.*, 55, (5) 798 - 806.
 - ❖ Wehtje E. and Adlercreutz P. (1997) **Lipases have similar water activity profiles in different reactions.** *Biotechnol. Lett.*, 11(6), 537- 540.
 - ❖ Wehtje E., Kaur J., Adlercreutz P., Chand S. and Mattiasson B. (1997) **Water activity control in enzymatic esterification processes.** *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 502-510.
 - ❖ Zaks A. and Klibanov A. (1988) **The effect of water on enzyme action in organic media.** *J. Biol. Chem.*, 263, 8017 – 8021.

Referencias sobre fluidos supercríticos.

- ❖ Conceicao M., Ruivo R., Maia C., Freire L., Correa de Sampaio T. and Barreiros S. (1998) **Novozym 435 activity in compressed gases. Water activity and temperature effects.** *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 494 – 499.
- ❖ Gamlieli- Bonshtein I., Korin E. and Cohen S. (2002) **Selective separation *cis-trans* geometrical isomers of β - carotene via CO₂ Supercritical Fluid Extraction.** *Biotechnol. Bioeng.*, 80 (2), 169-174.
- ❖ Gunnaugsdottir H., Wannerberger K. and Silvik B. (1998) **Alcoholysis and gliceride synthesis with immobilized lipase on controlled – pore glass of varying hydrophobicity in supercritical carbon dioxide.** *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 360-367.
- ❖ Hakoda M., Shiragami N., Enomoto A. and Nakamura K. (2003) **Measurements of hydrodynamic diameter of AOT reverse micelles containing lipase in supercritical ethane and its enzymatic reaction.** *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 25, 243-247.
- ❖ Heo J., Kim S. Y., Kim H. and Yoo K. (2000) **Enzymatic preparation of a carbohydrate ester of medium-chain fatty acid in supercritical carbon dioxide.** *Biotechnol. Lett.*, 22, 995-998.
- ❖ Ikushima Y. (1997) **Supercritical fluids: an interesting medium for chemical and biochemical processes.** *Adv. Colloid Interface Sci.*, 71-72, 259-280.
- ❖ Kamat S., Iwaskewycz B., Beckman E. and Russell A. (1993) **Biocatalytic synthesis of acrylates in supercritical fluids: Tuning enzyme activity by changing pressure.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2940 – 2944.
- ❖ Krishna S. H. (2002) **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media.** *Biotechnol. Adv.*, 20, 239 – 267.
- ❖ Lanza M., Priamo W., Oliveira J., Dariva C. & Oliveira D. (2004) **The effect of temperature, pressure and exposure time, and depressurization rate on lipase activity in SCCO₂.** *Biotechnology of fuels and chemicals (25th symposium)*, Human press, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 113 – 116, pp 181 – 187.
- ❖ Marty A., Dossat V. and Condoret J. (1997) **Continuous Operation of Lipase -Catalyzed Reactions in Non aqueous Solvents: Influence of the Production of Hydrophilic Compounds.** *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (2), 232-237.
- ❖ Mesiano A., Beckman E. and Russell A. (1999) **Supercritical Biocatalysis.** *Chem. Rev.*, 99, 623-633.
- ❖ Sarkari M., Knutson B. L. and Chen C. (1999) **Enzymatic Catalysis in Cosolvent Modified Pressurized Organic Solvents.** *Biotechnol. Bioeng.*, 65 (3), 258-264.
- ❖ Sihvonen M., Järvenpää E., Hiataaniemi V. and Huopalahti R. (1999) **Advances in supercritical carbon dioxide technologies.** *Trends Food Sci. Technol.*, 10, 217-222.
- ❖ Sovová H. and Zarevúcka M. (2003) **Lipase-catalysed hydrolysis of blackcurrant oil in supercritical carbon dioxide.** *Chem. Eng. Sci.*, 58, 2339-2350.
- ❖ Srivastava S. and Madras G. (2001) **Hydrolysis of p-nitrophenyl laurate in supercritical carbon dioxide: comparison of two different enzymes.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76, 890-892.

-
- ❖ **Tsitsimpikou C., Stamatis H., Sereti V., Daflos H. & Kolisis F. (1998) Acylation of glucose catalyzed by lipases in supercritical carbon dioxide. J. Chem. Technol. Biotechnol., 71, 309 – 314.**
 - ❖ **Turner C., Persson M., Mathiasson L., Adlercreutz P. & King J. (2001) Lipase – catalyzed reactions in organic and supercritical solvents: application to fat- soluble vitamin determination in milk powder and infant formula. Enzyme Microb. Technol., 29, 111 – 121.**
 - ❖ **Turner C., Whitehand L. C., Nguyen T. and McKeon T. (2004) Optimization of a Supercritical Extraction/ Reaction Methodology of Castor Oil Using Experimental Design. J. Agric. Food Chem., 52, 26-32.**