

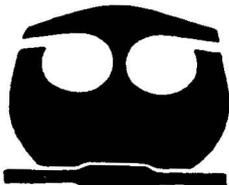


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

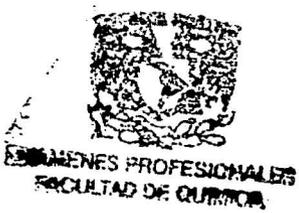
FACULTAD DE QUIMICA

HIDROLISIS ENZIMATICA DE DIESTERES DE LUTEINA CON *Candida antarctica*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARISELA LOPEZ VARGAS



MEXICO, D. F.



2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

**Presidente:** Eduardo Bárzana García

**Vocal:** Agustín López-Munguía Canales

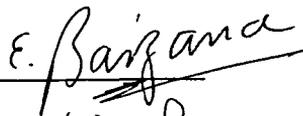
**Secretario:** Raúl Aguilar Caballero

**1er Suplente:** Marcos Francisco Báez Fernández

**2do Suplente:** Francisco Ruiz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema: Lab. 314 Conjunto "E". Facultad de Química,  
UNAM

Asesor del tema: Dr. Eduardo Bárzana García

Handwritten signature of E. Bárzana in cursive script, written over a horizontal line.

Sustentante: Marisela López Vargas

Handwritten signature of Marisela López Vargas in cursive script, written over a horizontal line.

## **AGRADECIMIENTOS**

Siempre pensé que escribir esto iba a ser una de las partes más difíciles de terminar la tesis, y creo que no me equivoqué, porque hay mucho que decir a demasiadas personas, para agradecer el que de una u otra forma me hayan ayudado, enseñado y acompañado en estos años de universidad. Así es que disculpen de antemano que esto sea más largo que un discurso en los Oscars! Ah! y también disculpen que no haya agregado los títulos a los nombres, cosa que no hice por demérito sino por atrevimiento a considerarlos cercanos.

A mi familia: Mis papás Marisela y Alberto, quienes siempre confiaron más que yo misma en mis capacidades. Gracias por todo el apoyo incondicional, el cariño, los consejos, enseñanzas, y la paciencia infinita que me han tenido. A mi hermano Luis Alberto, gracias por tu solidaridad, tu compañía de toda la vida, los consejos regañones y también los momentos muy divertidos, por tu ejemplo de empeño y disciplina y también por ser mi mejor amigo.

A Marcela: La mayor parte de la carrera fuimos (y todavía creo que lo somos) lo más parecido a la simbiosis que he conocido. Muchas gracias por todo tu apoyo, por tu solidaridad, por ser mi mejor amiga y haberlo demostrado en los momentos más difíciles que he vivido hasta ahora. También un especial agradecimiento a tu familia, sobre todo a tu mamá por todos los consejos y por abrirme las puertas de su casa.

A Juan Carlos: Por todo lo que hemos aprendido juntos, tu ayuda incondicional, el enorme ejemplo que me has dado, muchas gracias.

A Deber Universitario: Especialmente a Marcela (de nuevo), Alex, Karla, Nayelli, Alejandra, Emmanuel, Tomás, Moisés, Arturo, Ana, Enrique, Agustín, Miguel y Luis. No cabe duda que caminamos juntos un tramo lleno de baches, pero el haber aprendido lo que significa llevar la camiseta puma, lo valió todo.

A Eduardo Bárzana: Hay mucho que agradecer! Desde las primeras andanzas en tiempos del conflicto universitario, siempre me apoyaste y creíste en mi. Como maestro, como director de tesis y como amigo, no tengo palabras para terminar de agradecerte todo tu apoyo, tu enseñanza y tu confianza.

A Agustín López y Raúl Aguilar, por sus valiosas observaciones para la realización de esta tesis.

A Enrique Bazúa: Muchas gracias por toda su confianza, por todo lo que aprendí de usted en tiempos difíciles y por todos los consejos.

A Alejandro Iñiguez y a Federico Galdeano: Toda una historia de anécdotas ya, gracias por la ayuda, la amistad, y los buenos ratos que nos ha tocado vivir juntos.

A José Narro y a Roberto Zozaya por todos los consejos.

A mis maestros de la Facultad (a pesar de que no tuve el privilegio de ser alumna de algunos de ellos), por sus consejos, por la amistad, la solidaridad y las enseñanzas: Raúl Garza, Eduardo Marambio, José Manuel Méndez, León Coronado, Santiago Capella, Jorge Vázquez, Mayo Martínez, José Luis Mateos, Eduardo Rojo y de Regil, Guillermo González (q.e.p.d.), José Pedraza, Rebeca Ugalde, Guillermo Molina, Lucy Cornejo, Fernando Barragán, Francisco Rojo, Carlos Amador y muchos otros que no menciono pero tengo presentes.

A quienes siempre apoyaron de múltiples formas: Bety, Lucy, Maribel, Margarita, Pili (SENDEN) y Don Pedro.

A mis amigos de la Facultad: Marcela, Iván, Ivancito, Lalo, Diego, Francisco, Ruth, Lalo Valdés, Carlos, Chucho, Leonardo y Sofía.

A Sandra Pérez por su apoyo en el laboratorio.

A CONACYT por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Química: Me costó trabajo encariñarme con ella, pero finalmente sucedió, y ahora se que nunca la podré olvidar y espero siempre representarla dignamente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México: Después de todos estos años, de los muy buenos momentos y también de los muy amargos, estoy y siempre estaré eternamente agradecida por su generosidad. Estoy orgullosa de pertenecer a esta Universidad, ya en ella aprendí no sólo Química sino un montón de cosas que me llevo para el camino que estoy por empezar a recorrer.

## ÍNDICE

	página
<b>RESUMEN</b>	10
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1 Objetivo General	14
2.2 Objetivos Particulares	14
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>ANTECEDENTES</b>	15
3.1. Características generales de los carotenoides	15
3.1.2 Extracción y saponificación de los carotenoides	16
3.2. Características generales de la luteína	18
3.2.1 Otras características de la luteína	20
3.3 Generalidades sobre lipasas	20
3.3.1 Utilización de lipasas en medios orgánicos	22
3.3.2 Utilización de lipasas en extracción de colorantes	24

3.4 Generalidades de la lipasa de <i>Candida antarctica</i>	25
3.4.1 Algunas aplicaciones de la lipasa de <i>Candida antarctica</i>	28

## CAPÍTULO IV

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>30</b>
4.1 Materiales	30
4.2 Equipo y Materiales	30
4.3 Métodos	31
4.3.1 Espectroscopía	31
4.3.2 Cromatografía en capa fina	31
4.3.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	31
4.3.4 Ajuste del $A_w$ del biocatalizador con soluciones saturadas y liofilización del biocatalizador	34

## CAPÍTULO V

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
5.1 Reacción de alcoholísis	36
5.2 Reacción de hidrólisis	36
5.2.1 Adsorción del colorante en el soporte	39
5.2.2 Concentración del sustrato	42
5.2.3 Concentración del biocatalizador	44

5.2.4 Aw del biocatalizador	47
5.3 Degradación del colorante	49

## **CAPÍTULO VI**

6.1 Conclusiones	52
6.2 Bibliografía	54
6.3 Índice de Tablas y Figuras	57

## RESUMEN

Los colorantes tienen un amplio uso en la industria de los alimentos, y particularmente los carotenoides tienen una alta aceptación. Entre los colorantes utilizados en México, se encuentra la luteína, misma que se emplea en la industria avícola para proporcionar una coloración característica a la piel de pollos y a la yema del huevo. La luteína proviene de la flor de Cemapasúchil, misma que es una fuente de ésteres de luteína que deben ser hidrolizados para obtener el producto final.

El objetivo original del trabajo era llevar a cabo una reacción de alcoholólisis con el uso de un co-sustrato (metanol, propanol o etanol) para obtener luteína libre, con base en reacciones estudiadas previamente que permitieron realizar trans-esterificaciones con un alcohol (Maugdard et al, 2000). Sin embargo, la falta de reproducibilidad de los resultados llevaron a la conclusión de que la reacción que ocurría no era promovida por el alcohol sino por el agua presente. Consecuentemente, se abandonó esta parte de la investigación y se enfocó hacia la reacción de hidrólisis.

El objetivo principal fue entonces el obtener productos de la hidrólisis en hexano (principalmente luteína) por vía enzimática para eliminar el consumo de sosa durante la saponificación industrial.

El presente trabajo demuestra que la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* tiene la capacidad de llevar a cabo reacciones de hidrólisis en medio orgánico para dar luteína a partir de su diéster. Estas reacciones se efectuaron a 60°C y fueron monitoreadas por TLC y HPLC. El tiempo de reacción fue de 144 horas, detectándose la luteína a las 4 horas.

Debido a la alta temperatura de reacción y a su duración, también se dió un seguimiento de la degradación del colorante mediante espectrofotometría.

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

Los colorantes presentes en la flor de cempasúchil son de importancia comercial y una actividad de relevancia en México. Existen por lo menos 5 empresas dedicadas a la extracción y purificación de estos compuestos. El uso final está orientado principalmente a la alimentación de aves, ya que proporciona una coloración adecuada a la yema del huevo y a la piel y carne de los pollos. Otros usos han sido considerados como su inclusión en alimento en piscicultura e inclusive dentro del tratamiento a la degeneración de la mácula ocular en humanos y en algunos tipos de cáncer.

Los colorantes en la flor son fundamentalmente diésteres de luteína, compuesto de la familia de los carotenos. Su extracción de la flor deshidratada se lleva a cabo con hexano, para proceder a una desesterificación de la luteína mediante un tratamiento de saponificación con sosa. La razón de esta operación reside en que la forma no esterificada es asimilada con mayor eficiencia por las aves, dando un mayor poder de pigmentación. El esquema base de la luteína y su reacción industrial y enzimática, se presentan en la Figura 1:

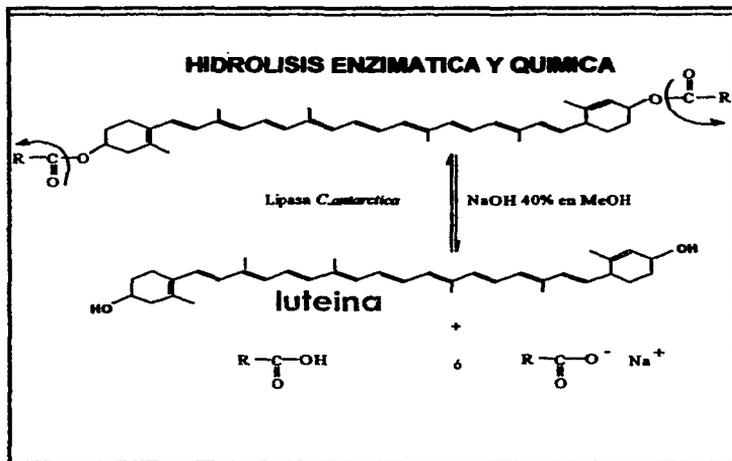


Figura 1. Esquema de la hidrólisis enzimática y química del diéster de luteína.

La búsqueda de otras opciones de desesterificación que no impliquen el empleo de sosa u otras bases fuertes y corrosivas resulta de interés como alternativa de proceso. Asimismo, la posibilidad de llevar a cabo simultáneamente la extracción y desesterificación en un solo paso presenta relevancia económica en el proceso. La finalidad de esta investigación fue el determinar si es factible llevar a cabo la hidrólisis de los pigmentos de la flor de *Cempsiúchil* con la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica*, en el mismo medio orgánico en el cual se extraen industrialmente.

## CAPÍTULO II

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 *Objetivo General***

- Determinar si la lipasa de *Candida antarctica* presenta actividad enzimática para romper los ésteres de luteína que ocurren de manera natural en la flor de cempasúchil.

#### **2.2 *Objetivos Específicos:***

- Determinar los niveles de agua necesarios para la expresión de la actividad enzimática.
- Establecer la funcionalidad de la reacción de desesterificación de la luteína con respecto a variables operativas como la concentración de sustrato y de enzima.

## **CAPÍTULO III**

### **ANTECEDENTES**

#### **3.1 Características generales de los carotenoides**

Son compuestos poliisoprenoides. Todos los carotenoides son variaciones de un esqueleto de 40 carbonos. Hay dos tipos de carotenoides; los llamados carotenos, que están compuestos sólo de hidrógeno y carbono, y las xantofilas, que son carotenoides que presentan algún grupo sustituyente con oxígeno en forma de grupos hidroxí, ceto o epoxi. A los extremos de la molécula, los carotenoides presentan grupos lineales o cíclicos (ciclohexano y ciclopentano).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que varían desde el color rojo hasta el amarillo. Se encuentran distribuidos en reino vegetal y también en algunos microorganismos. Los animales no pueden sintetizarlos por lo que deben ser ingeridos en los alimentos, y una vez absorbidos, son transformados en Vitamina A en el hígado gracias a la enzima carotinasas, y almacenados en el tejido adiposo (1). Existen alrededor de 563 carotenoides de estructura conocida, de los cuales los más comunes en la naturaleza son la fucoxantina, luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, licopeno, capsantina, bixina, criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno (2). Las principales propiedades fisicoquímicas de los carotenoides son:

- a) Eliminan radicales libres y con ello bloquean las reacciones que promueven éstos
- b) Son liposolubles
- c) Son fácilmente isomerizados y oxidados
- d) Absorben la luz
- e) Secuestran oxígeno
- f) Son termolábiles

Según su estructura química los carotenoides se clasifican en hidrocarburos (ej. alfa y beta caroteno), alcoholes (ej. fucoxantina, luteína), ácidos (ej. Bixina) y cetonas (ej. Capsantina).

Al manipular los carotenoides debe tomarse en cuenta que son sensibles a las altas temperaturas, lo que provoca la pérdida de color debido a la ruptura de los anillos ionona. También se ven afectados por la presencia de metales de transición como el cobre y el hierro debido a que aceleran las reacciones de oxidación; el oxígeno también provoca pérdida de color y la luz y los ácidos provocan la isomerización de la forma *trans* a la forma *cis* conduciendo a pérdida de color y de actividad biológica (3).

### **3.1.2 Extracción y saponificación de los carotenoides**

#### **Extracción**

La manipulación de los carotenoides es complicada, ya que son particularmente inestables a la luz, al oxígeno y al calor. Las

condiciones ácidas o alcalinas también pueden afectar a ciertos tipos de carotenoides. Cualquiera de estos factores puede provocar la degradación y/o transformación de los carotenoides presentes en una muestra, y el cambio en su composición. Para llevar a cabo su extracción a partir de productos naturales es necesario tomar muchas precauciones. Por ejemplo hacer uso de antioxidantes, especialmente cuando las muestras son saponificadas para obtener carotenoides libres. Algunos ejemplos de antioxidantes utilizados son ácido ascórbico, ascorbato de sodio y pirogallol, pero el más utilizado es el BHT (hidroxitolueno butilado). Generalmente se utiliza al 0.01% o 0.1% en la solución de extracción. Para extraer carotenoides no hay un procedimiento general debido a la gran variedad de muestras que los contienen, pero para productos alimenticios usualmente se utiliza MeOH o una mezcla de MeOH y otro solvente apolar (4).

### **Saponificación**

Después de la extracción, el segundo paso es la saponificación. Los carotenoides presentes en vegetales y frutas se encuentran esterificados con ácidos grasos de cadena larga. La luteína puede encontrarse libre, o esterificada por uno (monoéster) o dos (diéster) ácidos grasos. La saponificación se lleva a cabo en una solución de KOH que puede ser acuosa, metanólica o etanólica, y la concentración puede variar del 10 al 60% y tiene como objetivo remover triglicéridos y clorofilas (5). Después de la saponificación, la muestra es extraída con éter dietílico o con hexano. (4)

### 3.2 Características generales de la luteína

La luteína es una xantofila que se encuentra naturalmente en frutas y vegetales. Industrialmente, se obtiene a partir de la flor de Cemapasúchil, y sus pétalos secos tienen una concentración de luteína esterificada de alrededor del 60% del total de sus pigmentos. Los ácidos grasos con los que se encuentra esterificada son: láurico, mirístico, palmítico y esteárico (6). Para analizar los carotenoides, es importante considerar que sus espectros máximos de absorción varían de acuerdo al solvente utilizado. En la siguiente tabla se muestran las propiedades fisicoquímicas de la luteína libre en diferentes solventes orgánicos (7):

Solvente	Solubilidad mg/L	Máx (nm)	Absortividad	Absortividad molar
Acetona	800	446	2 540	144 500
Acetonitrilo	100	446	2 559	145 600
Benceno	600	456 (458)	2 350	133 700 (127 200)
Cloroformo	6 000	454 (458)	2 369	134 800
Ciclohexano	50	448	2 520	143 400
Ciclohexanona	4 000	454	2 359	134 200
Diclorometano	800	452	2 320	132 000
DMF	1 000	454	2 390	136 000
DMSO	1 000	460	2 369	134 800
Étanol	300	444 (445)	2 550	145 100
Acetato de etilo	800	446	2 529	143 900
Éter etílico	2 000	444	2 629	149 600
Hexano	20	444 (445)	2 589	147 300
2-propanol	400	444	2 599	147 900
Metanol	200	442 (444)	2 629	149 600
MTBE	2 000	444	2 589	147 300
THF	8 000	450	2 469	140 500

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la luteína en solventes orgánicos (7)

Por otro lado, la importancia de la forma isomérica de los carotenoides en su función biológica radica en que los *trans*-carotenoides son pigmentos con mayor estabilidad. En la naturaleza, en general, ocurren como una mezcla de *trans* (60-90%) y *cis*-carotenoides (10-40%). Los *trans*-carotenoides cambian a su forma *cis* por factores como luz, temperatura, alta actividad acuosa ( $A_w$ ) y oxígeno (8). En el caso de la luteína, pueden llegar a formarse hasta cuatro isómeros *cis* de luteína a partir de su forma *trans* (la cual es la forma biológicamente activa), cuando ésta se somete a tratamientos térmicos (9).

La estabilidad de la luteína es baja ante el calor y la luz UV, en comparación con su monoéster y su diéster, lo que sugiere que la esterificación de sus grupos  $-OH$  le confiere estabilidad (10).

### **3.2.1 Otras características de la luteína**

La luteína también tiene propiedades de antioxidante. Participa principalmente en el atrapamiento de peróxidos y superóxidos, lo que protege a las células de daños por oxidación. Además, forma parte de los carotenoides que pueden ser metabolizados y absorbidos por el hombre, por lo que puede prevenir enfermedades como la degradación macular, teniendo una función como fotonutriente, absorbiendo la luz ultravioleta y evitando una peroxidación de los lípidos que resulten en productos tóxicos para la retina.

Algunas fuentes naturales de luteína son el maíz, la espinaca, el brócoli, la zanahoria, la lechuga y los chícharos.

## **Lipasas**

### **3.3 Generalidades de las lipasas**

Las lipasas son enzimas que hidrolizan el enlace éster de los acilglicéridos. Su reacción es reversible, por lo que pueden efectuarse alternativamente reacciones de hidrólisis o de síntesis en función del potencial químico de las especies presentes.

Algunas de las reacciones que catalizan las lipasas son: hidrólisis de grasas, esterificación e interesterificación de grasas y otros lípidos para la preparación de diversos productos con alto valor en la industria. La mayor ventaja de las reacciones catalizadas por lipasas sobre la catálisis química, es que se pueden obtener una gran variedad de productos con diferente composición y propiedades dependiendo de la regio-especificidad de la enzima por el sustrato.

Las reacciones de hidrólisis tienen la finalidad de preparar alcoholes y ácidos grasos libres a partir de ésteres. Las reacciones catalizadas por lipasas pueden llevarse a cabo en solventes con muy poca cantidad de agua o en sistemas bifásicos, los cuales consisten en una fase lipofílica y una fase hidrofílica, y en este tipo de sistema la reacción ocurre en la interfase.

La reacción reversa de hidrólisis es la reacción de esterificación, donde se obtienen ésteres a partir de alcoholes y ácidos grasos. En este tipo de reacción se pueden utilizar lipasas en medios orgánicos, donde el contenido de agua y el  $A_w$  juegan un papel muy importante.

Otras reacciones similares son las de interesterificación, que incluyen la acidólisis y la alcoholólisis. En la acidólisis, se sustituye un ácido graso por otro, y en la alcoholólisis se sustituye un ácido graso por un alcohol. Los factores que más deben considerarse en este tipo de reacciones son el contenido de agua y el tipo de solvente.

### **3.3.1 Utilización de lipasas en medio orgánico**

Existen numerosas investigaciones de la utilización de lipasas en medios no convencionales. Estos estudios han aumentado a partir de que se descubrió a principios de los 80's que la actividad enzimática no está limitada a llevarse a cabo en medio acuoso. Los factores que influyen en la actividad y estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos son: el estado iónico de la enzima, inmovilización enzimática, hidratación del biocatalizador, el solvente, contenido de agua en el sistema y transferencia de masa.

#### ***El agua***

El agua tiene un papel ambiguo en las reacciones de lipasas en fase orgánica. Para favorecer la síntesis, la actividad termodinámica del agua debe mantenerse lo más baja posible. Sin embargo, el agua juega un papel importante en la estructura tridimensional de la proteína, y de ahí su actividad catalítica. La cantidad de agua presente es importante tanto para la estabilidad térmica como para la actividad de las enzimas en medios no acuosos. Siendo el nucleófilo en las reacciones de hidrólisis, el agua también puede ser un inhibidor competitivo.(11)

Si las enzimas son utilizadas en medios orgánicos ligeramente hidratados, una pequeña cantidad de agua en el solvente es necesaria para activar a la enzima. La cantidad de agua varía dependiendo de la

naturaleza del soporte de las enzimas inmovilizadas. Esto refleja diferencias en la distribución del agua entre el solvente orgánico, la enzima y el soporte. La liofilización puede reducir dramáticamente la actividad de síntesis de una enzima inmovilizada en agarosa, sílica y alúmina (12).

### ***El solvente***

La influencia del solvente abarca varios fenómenos: los cambios en la rigidez de la enzima, la estabilización de los estados de transición por la modificación de la polaridad del sitio activo y las variaciones en el total de energía libre asociada con las diferentes energías de solvatación. El parámetro más usado para describir la influencia del solvente en las reacciones enzimáticas es  $\log P$ , mismo que es el coeficiente de partición entre el 1-octanol y el agua. Sin embargo,  $\log P$  no tiene ninguna correlación con la eficiencia de la enzima. (11).

### **La temperatura**

La causa de la inactivación de las enzimas a temperaturas elevadas, es la pérdida de su conformación nativa. Recientemente, se ha demostrado que la temperatura a la cual las proteínas llegan a su desnaturalización térmica, depende fuertemente de la cantidad de agua asociada a la proteína (13).

### 3.3.2 Utilización de lipasas en extracción de colorantes

Entre las alternativas para buscar incrementar el rendimiento de extracción de colorantes, se han utilizado lipasas como la de *Candida cylindracea* que hidroliza diésteres de xantofilas con el fin de obtener xantofilas libres que son inestables en medios alcalinos. (14).

El solvente que se utiliza industrialmente para extraer el colorante de la flor de cempasúchil es el hexano. Las ventajas de utilizar hexano como medio orgánico en reacciones catalizadas por lipasas son la extracción-hidrólisis en un solo paso, la eliminación del uso de potasa o sosa, con lo que se evita la formación de sales de ácidos grasos o jabones saponificados como subproducto. Sin embargo, para ello se debe contar con un medio de reacción con la suficiente cantidad de agua para garantizar la demanda estequiométrica de la reacción de hidrólisis y un adecuado nivel de hidratación en la enzima que le permita expresar su actividad por el sustrato.

En estudios anteriores se demostró que la lipasa de *Candida cylindracea* tiene la capacidad de hidrolizar pigmentos de la flor de cempasúchil en medio orgánico a 40°C, pero que la velocidad de formación de productos de hidrólisis es mayor en fase acuosa que en fase orgánica (14,15). La máxima formación de luteína se da a las 144 h en fase orgánica (2.6%), mientras que en la fase acuosa se alcanza a las 24 h (28%). La formación de luteína en medio orgánico no

resulta ser la adecuada debido a que la enzima disminuye su actividad al estar en contacto tanto tiempo con el solvente. En fase orgánica, la enzima cambia su especificidad favoreciendo la formación de monoésteres con respecto a la luteína (15).

Sin embargo, otro trabajo demostró que la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* puede ser utilizada en medio orgánico para catalizar esterificaciones de vitaminas de hidroxí ácidos. Se logró la síntesis de retinil L-lactato por la transesterificación entre el retinol y el L-metil lactato con un rendimiento del 90%. Durante este trabajo, se probaron varias enzimas, sin embargo las que dieron mayores rendimientos fueron la lipasa de *Candida antarctica* y la lipasa de *R. miehei* utilizando hexano como medio no polar. La reacción con *Candida antarctica* se llevó a cabo a 55°C, y después de 5 horas, se observó la conversión del 60% del retinol. El máximo rendimiento (90%), se alcanzó a las 20 horas. (16)

### **3.4 Generalidades de la lipasa de *Candida antarctica*.**

La levadura *Candida antarctica* produce dos diferentes lipasas, llamadas A y B. Ambas enzimas son muy diferentes: La lipasa A es dependiente del calcio y altamente termoestable, mientras que la lipasa B es menos termoestable pero independiente del calcio. La especificidad del sustrato también difiere. La lipasa A tiene baja actividad con los ésteres simples, mientras que la lipasa B es muy

activa con una gran variedad de ésteres, amidas y tioles. La lipasa B tiene un peso molecular de 33 kD y un p.I. de 6.0 (17).

Una forma comercial común de esta lipasa es Novozym 435 de la compañía Novo, la cual está inmovilizada en una resina acrílica. Se utiliza en la síntesis de ésteres y amidas. Es lipasa B y se obtiene a partir de *Aspergillus oryzae* modificado genéticamente. La especificidad posicional de Novozym 435 depende de los reactivos utilizados. En algunas reacciones muestra especificidad por la posición 1,3. Funciona como triacilglicerol hidrolasa y también como carboxilesterasa. (18).

La cadena polipeptídica de *Candida antarctica* está compuesta de 317 aminoácidos, y el tamaño de la lipasa es de aproximadamente 30 x 40 x 50 angstroms. La triada Ser-His-Asp es la responsable de la reacción catalítica. En general, las lipasas se activan cuando son expuestas a una interfase entre aceite y agua. Esta activación interfacial no se ha observado en *Candida antarctica*.

Su pH óptimo es 7, pero la enzima es estable en un medio acuoso en el rango de pH de entre 3.5 y 9.5. El rango de temperatura en el que disminuye su actividad está entre 50 y 60°C dependiendo del buffer que se utilice. La temperatura de desnaturalización es más alta cuanto más bajo sea el pH. La inmovilización de la enzima la estabiliza y le permite ser utilizada en medios orgánicos. Cuando *Candida antarctica* está inmovilizada es muy termoestable y puede ser utilizada continuamente entre 60 y 80°C sin perder significativamente su

actividad por varios cientos de horas. En cuanto a solventes, puede ser utilizada con éxito en varios solventes apolares como hexano e iso-octano. Por otro lado *Candida antarctica* puede ser utilizada para reacciones de síntesis y de hidrólisis en medios no polares e inclusive en reacciones sin solvente (17).

En cuanto al  $A_w$ , se ha observado que un incremento pequeño en la cantidad de agua en la región de  $A_w=8$ , provoca una gran variación en los mg de agua/g de catalizador seco, como lo muestra su curva de adsorción de agua en la siguiente Figura (2):

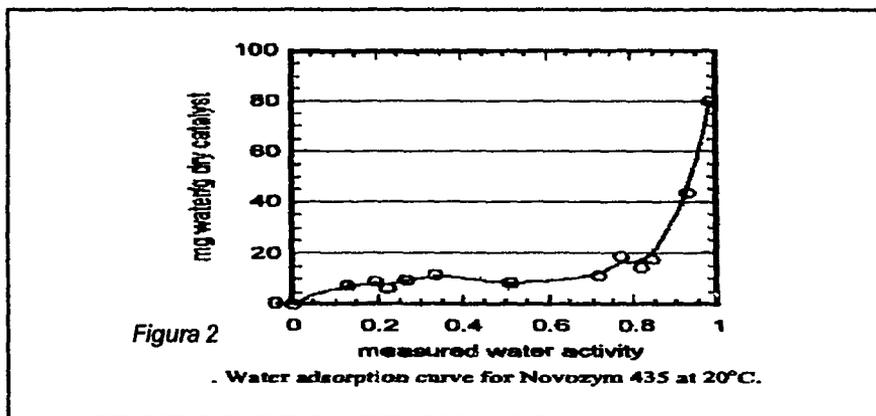


Figura 2 Curva de adsorción del agua de *Candida antarctica*

Observaciones hechas en el microscopio electrónico de esta enzima inmovilizada a diferentes valores de  $A_w$ , muestran que el agua que rodea a la partícula del biocatalizador forma una capa que impide

que el sustrato lipofílico acceda a la enzima, produciéndose una agregación de partículas (19).

### **3.4.1 Algunas aplicaciones de la lipasa de *Candida antarctica***

#### ***Síntesis e hidrólisis de ésteres simples***

Los ácidos grasos y sus ésteres con el glicerol son los sustratos naturales para las lipasas. Sin embargo, el uso de *Candida antarctica* no se limita a los triglicéridos.

Un ejemplo de éster que puede ser sintetizado con *Candida antarctica* es el miristrato de isopropilo, compuesto ampliamente utilizado en cosméticos. Una de las mayores ventajas de utilizar esta lipasa es que sus condiciones de reacción permiten evitar la formación de subproductos no deseados. Otra aplicación es la esterificación del ácido oleico con metanol, que se lleva a cabo selectivamente en presencia de diferentes tocoferoles y esteroides que no son sustratos de *Candida antarctica*.

Esta lipasa también ha sido utilizada para la hidrólisis de ésteres simples que contengan grupos funcionales específicos. Por ejemplo, los esteroides que han sido utilizados como sustratos para *Candida antarctica*. En cuanto a la síntesis de ésteres simples, los ácidos grasos pequeños son sustratos relativamente pobres mientras que los ácidos grasos desde el butanóico hasta el octadenóico son igualmente

buenos. Los alcoholes primarios son en general excelentes sustratos y también algunos alcoholes secundarios como el 2-propanol, pero los alcoholes terciarios no lo son (17).

### ***Reacciones de polimerización***

Una extensión de la síntesis de ésteres catalizada por lipasas, es la polimerización de ácidos hidroxílicos alifáticos o mezclas de di o polioles y diácidos alifáticos. *Candida antarctica* ha sido utilizada con éxito para obtener poliésteres alifáticos. Un ejemplo es la polimerización de una mezcla de ácido adipico y 1,4-butanodiol (17).

### ***Reacciones de alcoholisis***

En un estudio de la producción de combustible a partir de aceite vegetal, se observó que la lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* se inactiva cuando hay una mezcla 1:2 de equivalente molar entre el aceite vegetal y el total de ácidos grasos. Esta inactivación se elimina con tres adiciones sucesivas 1:3 de equivalente molar de metanol, lográndose la metanólisis con un 95% de conversión a los ésteres metílicos correspondientes (20)

Otro estudio de la etanolisis de aceite de atún mostró que la lipasa se inactiva en presencia de 2:3 de equivalente molar entre el etanol y el total de ácidos grasos. La inactivación se elimina con adiciones sucesivas del alcohol lográndose una conversión del 95% a los ésteres etílicos correspondientes (21).

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1 Materiales**

##### ***Sustrato***

Se empleó un sustrato purificado de harina de flor de Cemapasúchil, proporcionado por Bioquimex Reka (Querétaro, México). Se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , empacado al vacío y sin luz.

##### ***Enzima***

La lipasa de *Candida antarctica* (Novozym 435) fue un donativo de la compañía Novo (Dinamarca), con las siguientes características:

Actividad 10.000 PLU/g, expresada en unidades de laurato de propilo por gramo. La enzima está inmovilizada en una resina de acrílico, y las partículas tienen un diámetro de 0.3-0.9 mm. El contenido de agua es de 1-2%.

##### ***Solventes***

Hexano y acetona, grado reactivo analítico; Metanol y acetato de etilo, grado HPLC.

#### **4.2 Equipo y Materiales**

- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2 UV/Vis

- Placas de sílica gel de aluminio Alugram sil G/UV de 20 x 20 cm, Macherey-Nagel.
- Cromatógrafo HPLC con detector de arreglo de diodos, marca Hewlett Packard serie 1100
- Incubadora Innova 4330, New Brunswick Scientific
- Balanza analítica OHAUS con 5 decimales modelo AP2105
- Agitador orbital Thermolyne AROS 160
- Congelador REVCO modelo ULT390 marca Legaci
- Aparato para medir Aw, marca Rotronic
- Aparato Karl Fischer Aquatest 8, Photovolt
- Liofilizadora Heto FD 1.0

## **4.3 Métodos**

### **4.3.1 Espectroscopia**

Esta técnica se utilizó para el estudio de la degradación del diéster. Los barridos fueron de 200-800 nm (UV/vis).

### **4.3.2 Cromatografía en capa fina**

Se utilizó una fase móvil con composición hexano-acetato de etilo 70:30, y se aplicó para el monitoreo cualitativo de las reacciones.

### **4.3.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

Las condiciones fueron las siguientes:

Columna ODS 150 mm x 4.5 mm con poro de 5  $\mu\text{m}$ . Lectura del detector  $\lambda$  443,8 y  $\lambda$  510,8 nm

Fase móvil: Metanol: Acetato de etilo 70:30

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 10  $\mu\text{L}$

La medición se realizó a temperatura ambiente.

### **Hidrólisis en medio orgánico**

Las reacciones se llevaron a cabo en hexano, debido a que es el solvente en el cual se extrae industrialmente el colorante de la flor de Cempasúchil. Se evaluaron tres aspectos:

- 1) Diferentes concentraciones de sustrato para observar su efecto en la velocidad de reacción y el rendimiento
- 2) Diferentes concentraciones de biocatalizador para observar su efecto en la velocidad de reacción y el rendimiento
- 3)  $A_w$  óptimo del biocatalizador

Una vez determinadas las mejores condiciones de estas variables se siguió una cinética por 144 horas y se evaluó el rendimiento de la reacción.

La reacción de hidrólisis sin modificar condiciones se llevó a cabo de la siguiente forma:

- 1) En un matraz aforado de 250 mL, se pesaron 25 mg de sustrato en cada uno y se llevó al aforo con hexano, para tener una concentración de 0.1 mg/mL de diéster.
- 2) Se tomaron 20 mL y se añadieron a diferentes matraces con tapa de rosca de 50 mL.
- 3) Se agregaron 100 mg de biocatalizador a cada matraz, se taparon y se metieron a la incubadora a 60°C y 120 rpm
- 4) El matraz control tenía las mismas cantidades, pero la enzima había sido previamente termoinactivada en un autoclave a 121°C por 20 minutos.
- 5) La reacción se monitoreó cada 24 horas por medio de cromatografía en capa fina en un intervalo de tiempo de 0-144 horas.
- 6) Las muestras fueron separadas en el sobrenadante y la enzima con el colorante adsorbido en el soporte. Éste fue lavado dos veces con 2.5 mL de acetona cada vez, durante 10 minutos, y finalmente se juntaron sobrenadante y colorante extraído del soporte, y se llevaron al aforo con hexano en un matraz de 25 mL.
- 7) Las muestras se llevaron a sequedad con N<sub>2</sub>; después fueron redisueltas en 1 mL de una mezcla de Metanol/Acetato de Etilo 70:30. Posteriormente se filtraron y se almacenaron para su análisis por HPLC.

Un procedimiento similar se llevó a cabo en los casos de las reacciones donde se modificó la cantidad de biocatalizador, la cantidad de sustrato y el  $A_w$  del biocatalizador.

En la cinética donde se varió la cantidad de biocatalizador:

- 1) Se utilizó la concentración 0.1 mg/mL de diéster.
- 2) Se utilizaron las siguientes cantidades de biocatalizador: 10, 50, 100, 200 y 500 mg.
- 3) El monitoreo se llevó a cabo por HPLC en dos tiempos: 4 y 24 horas de reacción.

En la cinética donde se varió la cantidad de sustrato:

- 1) Se utilizaron las siguientes concentraciones de diéster: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL.
- 2) La cantidad de biocatalizador utilizada fue de 200 mg para todas las concentraciones de sustrato.
- 3) El monitoreo se llevó a cabo por HPLC en dos tiempos: 4 y 24 horas de reacción.

#### **4.3.4 Ajuste del $A_w$ del biocatalizador con soluciones saturadas y liofilización del biocatalizador**

En la cinética donde se varió el  $A_w$  del biocatalizador:

- 1) Se utilizaron las siguientes sales:  $Mg^{2+}$   $Cl_2^-$ ,  $CH_3$   $COO^-$   $K^+$  ,  $K_2^+$   $CO_3^{2-}$  ,  $(NH_4)_2$   $^{2+}$   $SO_4$   $^{2-}$  . Además también se ajustó el Aw del biocatalizador con agua de la llave y mediante liofilización. Para alcanzar el equilibrio, el biocatalizador permaneció durante cinco días en un desecador con vacío a 5°C con cada sal y con el agua de la llave. En el caso del biocatalizador que fue liofilizado, una noche antes de iniciar, éste era congelado a -70°C y luego llevado a la liofilizadora por 12 horas.
- 2) La concentración utilizada de sustrato fue de 0.1 mg/mL de diéster en todas las condiciones de Aw probadas.
- 3) La cantidad de biocatalizador fue de 100 mg en todas las condiciones de Aw probadas.
- 4) El monitoreo se llevó a cabo por HPLC en dos tiempos: 8 y 30 horas de reacción.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *5.1 Reacción de alcoholísis*

La primera parte del trabajo consistió en llevar a cabo la reacción de alcoholísis para obtener luteína libre, probando tres tipos de alcohol: Metanol, propanol y etanol, con concentraciones de 0.5, 0.75, 1.0 y 2.0% (v/v). Aparentemente la reacción sólo era posible con etanol en la concentración 0.5% (v/v), debido a que se llegó a observar la producción de luteína y a veces en concentraciones de hasta 20%. Sin embargo, no hubo reproducibilidad de resultados por lo que se abandonó la alcoholísis y el trabajo se enfocó hacia la hidrólisis. La razón fue que se encontró que en el control de las reacciones de alcoholísis, donde lo único que se omitía era el alcohol, sucedía la reacción, observándose esto al hacer el análisis por HPLC. Tal resultado parecía sugerir que la reacción dominante era la hidrólisis y no la alcoholísis, aún en presencia de cantidades estequiométricas de alcohol(es).

#### *5.2 Reacción de hidrólisis*

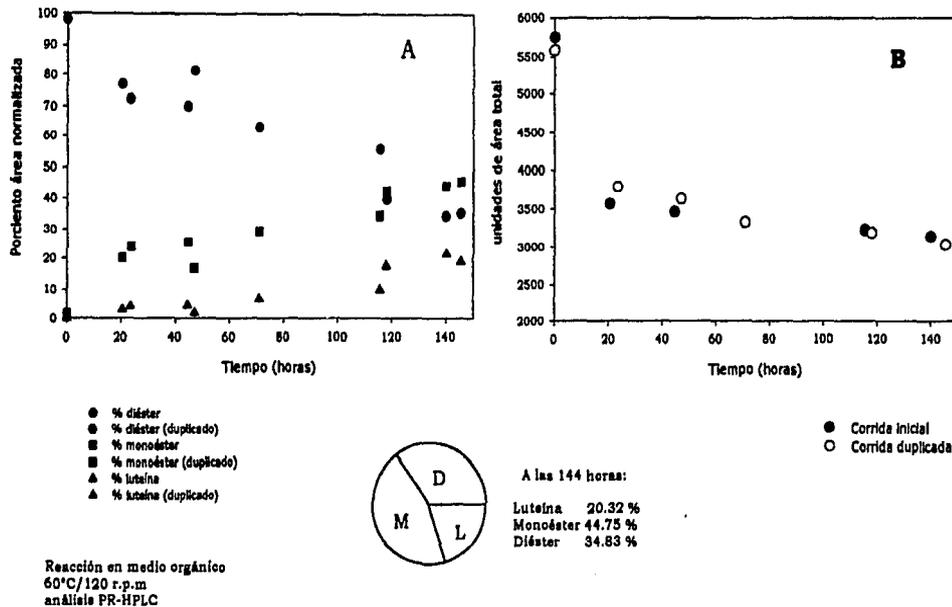
Una vez establecido que se iba a dar el seguimiento a la reacción de hidrólisis, se tuvo como primer objetivo hacer una cinética para

determinar los rendimientos de los diferentes productos. Para tener claridad en las condiciones de inicio de la reacción, al biocatalizador, que estaba almacenado en refrigeración a 4°C, se le midió el  $A_w$  y resultó ser de 0.45. La cantidad de agua en el hexano, medida por Karl Fischer, fue de 21  $\mu\text{g H}_2\text{O/mL}$ .

Con el fin de ver si los resultados eran repetibles, la cinética se hizo por duplicado. Cada cinética tomó 144 horas, equivalente a seis días, así que se hicieron de manera consecutiva una semana tras la otra. Además de observar la transformación de los diferentes productos con respecto al tiempo, también se hizo un seguimiento del área total con respecto al tiempo.

En un tiempo de 144 horas, a 60° C y 120 rpm, los resultados obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 3:

**Desesterificación enzimática para la producción de luteína en medio orgánico**



**Figura 3: Corridas duplicadas**

Estos resultados muestran que la cantidad de agua presente en el sistema debió de ser suficiente para garantizar la demanda estequiométrica en la reacción de hidrólisis, y tener también un nivel de hidratación suficiente en la enzima para que ésta pudiera expresar su actividad. Esto quiere decir que si el peso molecular aproximado del diéster de luteína es de 1,000 g/mol, en un volumen de 20 mL hay 2 mg que necesitan de al menos 72  $\mu$ L de agua para romper ambos enlaces del éster en los extremos de la molécula de luteína. Si la medición por Karl Fischer de agua en hexano dio 21  $\mu$ L/mL, quiere decir que en 20 mL había al menos 420  $\mu$ L de agua. En cuanto a los productos, después de 144 horas, se observa un máximo de conversión a luteína de 20.32%, a monoéster de 44.75% y el diéster que queda sin reaccionar representa el 34.83%. También vemos que los resultados no tuvieron una gran variación de una semana a la otra, y que la transformación hacia luteína es bastante lenta, dado que después de 72 horas todavía no se alcanza ni el 10%

### *5.2.1 Adsorción del colorante en el soporte*

Por otro lado, de la Figura 1-B se desprende que el colorante se adsorbe rápidamente en el soporte de la enzima. Debido a esto, es necesario hacer una extracción del colorante adsorbido. Sin embargo, como se puede observar en la gráfica, del área total a  $t= 0$ , al área total del primer tiempo de análisis por HPLC ( $t= 24$  horas) hay una pérdida de casi 2,500 unidades de área. Esto significaba que el

por ciento de recuperación durante la extracción era de menos del 60%. Con el fin de establecer si esta disminución de área se debía a que una fracción del colorante no podía recuperarse por medio de la extracción, o a una fuerte degradación del colorante durante las primeras 24 horas, se siguió una cinética paralela de dos condiciones:

- 1) Con el diéster en solución, sin biocatalizador, con el objetivo de eliminar la superficie de contacto.
- 2) Con el diéster en solución y enzima termoinactivada (según se describe en la sección de Métodos), con el objetivo de poder hacer la extracción, pero que la enzima no transformara al sustrato.

Los resultados se muestran en la Figura 4:

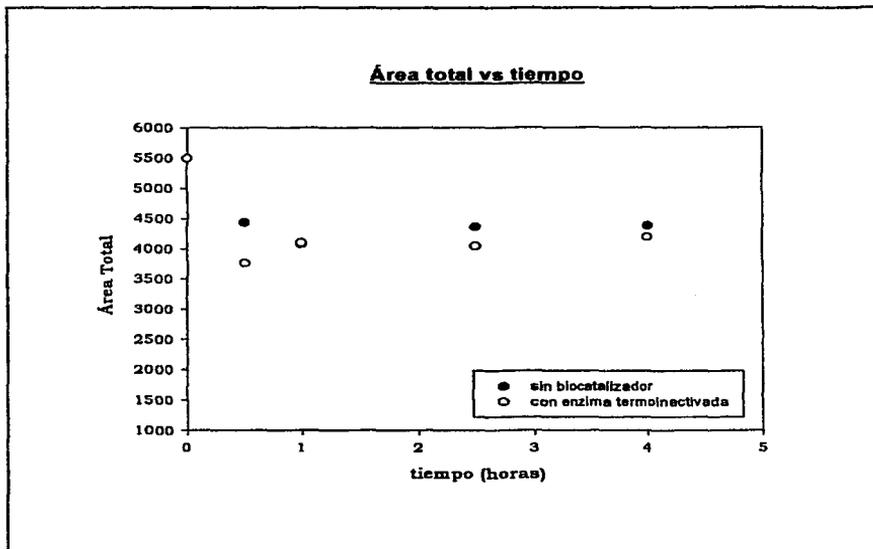


Figura 4. Cinética de degradación del colorante en cuatro horas.

La caída en el área de casi 1,000 unidades, significa que probablemente hay una fracción del colorante que es sumamente termolábil, ya que en el primer tiempo en el que se tomó muestra fue de tan sólo 30 minutos, se observó una degradación de casi un 20% del colorante. Posteriormente, el área total permaneció casi constante. Por otra parte, se logra recuperar alrededor del 90% del colorante adsorbido con respecto al control sin partículas adsorbentes de acrílico. Esto indica que la extracción del colorante es bastante eficiente.

Durante la cinética duplicada también se realizó un monitoreo cualitativo por cromatografía en capa fina cada 24 horas (según se describe en la sección de Métodos). A pesar de que esta técnica no permite resolver todos los monoésteres y sólo un diéster, es útil para identificar la luteína antes de hacer un análisis cuantitativo por HPLC. Primero eluye el compuesto menos polar, es decir el diéster, después los monoésteres y al final la luteína. Los  $R_f$  calculados de las especies presentes fueron los siguientes:

<b>Compuesto</b>	<b><math>R_f</math></b>
Diéster	0.92
Monoéster apolar	0.65
Monoéster polar	0.55
Luteína	0.19

*Tabla 2.  $R_f$  de las especies observadas por TLC*

### *5.2.2 Concentración del sustrato*

Con el fin de determinar la mejor concentración de sustrato, se hicieron reacciones variando este parámetro. El monitoreo fue por HPLC y se tomaron muestras a los tiempos 4 y 24 horas. Las concentraciones probadas fueron las siguientes: 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL de diéster, y los resultados se presentan en la Figura 5:

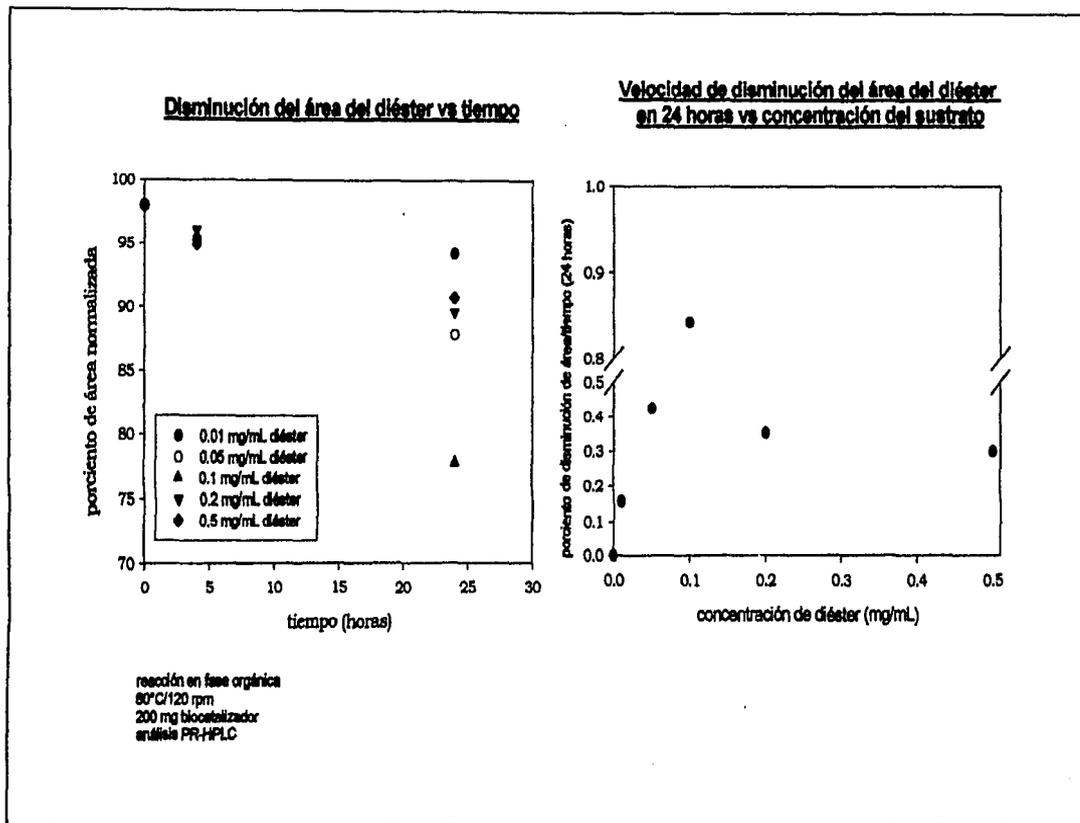
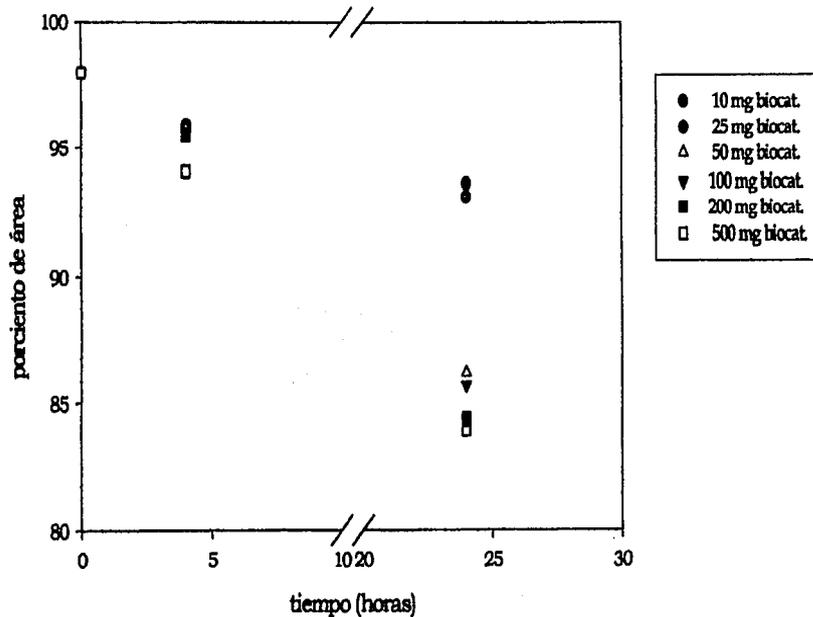


Figura 5. Efecto de la concentración de sustrato en la reacción enzimática de desesterificación

La mayor pendiente se observa con la concentración 0.1 mg/mL, mientras que ambos extremos de concentración probados (0.01 y 0.5 mg/mL) dan velocidades muy bajas de conversión en 24 horas. Con la concentración más alta, la extracción no es suficiente para recuperar todo el colorante adsorbido al soporte, y seguramente forma una capa que impide que más sustrato acceda a la enzima, mientras que la concentración más baja no favorece una rápida transformación del sustrato. Este comportamiento es análogo al fenómeno de inhibición por exceso de sustrato conocido para muchas enzimas.

### *5.2.3 Concentración del biocatalizador*

Posteriormente se siguió una cinética con diferentes cantidades de biocatalizador para encontrar la mejor. Se utilizaron 10, 50, 100, 200 y 550 mg en 50 mL de volumen de reacción. El monitoreo fue por HPLC en los tiempos 4 y 24 horas y los resultados se presentan en la Figura 6:

**Porciento de área vs tiempo con diferentes cantidades de biocatalizador****Figura 6: Porciento de área vs tiempo con diferentes cantidades de biocatalizador**

Según era de esperarse, la tasa de disminución del área en HPLC disminuyó en proporción a la cantidad de biocatalizador. A partir de los datos a las 24 horas de reacción, se obtuvo la actividad específica de la enzima, encontrándose 200 mg de biocatalizador como la primera cantidad que maximiza la conversión. Sin embargo puede verse que hay una saturación muy rápida del biocatalizador a partir de los 50 mg, pues no varía significativamente la actividad, como muestra la Figura 7. Por otro lado, sólo el 2% del total del peso es proteína (22). Por tanto, de los 200 mg, la cantidad de lipasa es de 4 mg.

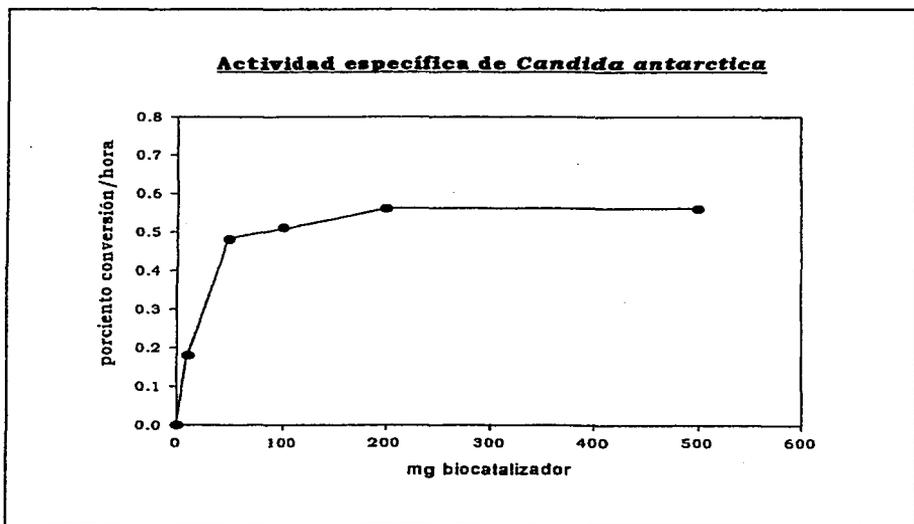


Figura 7: Actividad específica de *Candida antarctica*

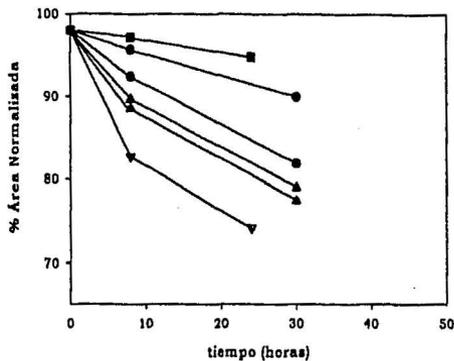
La actividad específica es 0.57 % de transformación por hora/mg de biocatalizador.

### **5.2.4 Aw del biocatalizador**

Probablemente el parámetro que causa mayores variaciones en la velocidad y el rendimiento de la reacción, es el Aw del sistema y por tanto del Aw inicial del biocatalizador y del solvente. Para modificar el Aw del biocatalizador, se utilizaron diferentes soluciones saturadas de acuerdo con procedimientos de hidratación conocidos:

- a) enzima liofilizada, Aw 0.018
- b)  $MgCl_2$ , Aw 0.22
- c)  $CH_3COOK$ , Aw 0.32
- d)  $K_2CO_3$ , Aw 0.43
- e)  $(NH_4)_2SO_4$ , Aw 0.8
- f) agua de la llave, Aw 0.92

**Desaparición del diéster vs tiempo a diferentes  $A_w$  del biocatalizador**

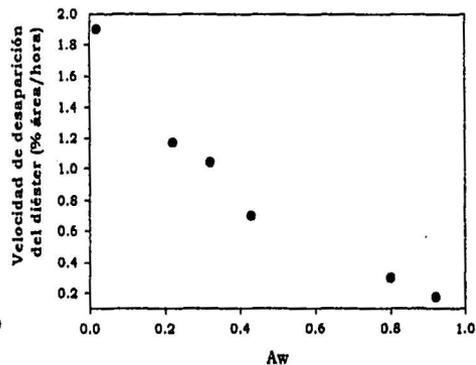


- $A_w$  0.8  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $m = -0.297$
- $A_w$  0.43  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $m = -0.695$
- ▲  $A_w$  0.32  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ,  $m = -1.04$
- ▲  $A_w$  0.22  $\text{MgCl}_2$ ,  $m = -1.17$
- $A_w$  0.92 agua,  $m = -0.17$
- ▽  $A_w$  0.018, liofilizada,  $m = -1.90$

reacción en medio orgánico  
60°C/120 rpm  
análisis RP-HPLC

\*\* unidades de la pendiente: por ciento de conversión/hora

**Velocidad de desaparición del diéster vs  $A_w$  de la enzima**



*Figura 8:  $A_w$  del biocatalizador*

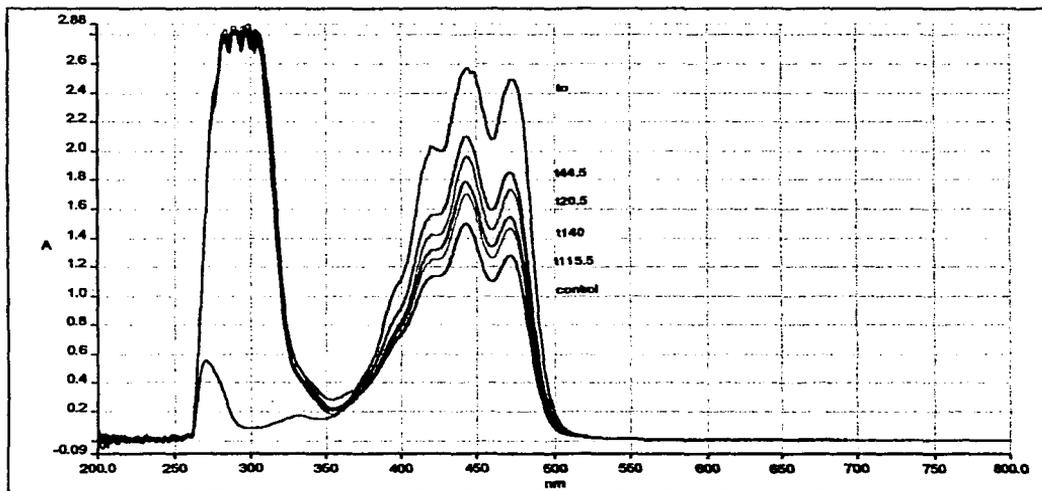
En la Figura 8, se observa que la mayor pendiente, en términos de velocidad de conversión, se obtuvo a la menor  $A_w$  (i.e. enzima liofilizada). Sin embargo, debe de haber suficiente agua en el medio para permitir que se lleve a cabo la hidrólisis. Esto podría explicar que cuando se repite esta condición pero el medio (hexano) es deshidratado, no hay reacción. En realidad, deber de existir una cantidad de agua tal en el medio (0.036 mg de agua por cada mg de diéster, según la relación de dos moles de agua por cada mol de diéster) para favorecer la reacción de hidrólisis. En una reacción típica, un  $A_w$  bajo eleva la actividad sintética de *Candida antarctica*, mientras que para la hidrólisis se requieren de valores de  $A_w$  más altos (19). Sin embargo, en esta reacción en particular, una cantidad mínima de agua puede ser un exceso y es por eso que la condición de liofilización de la enzima y una cantidad mínima de agua por mL de hexano, son suficientes para que se lleve a cabo la hidrólisis.

### 5.3 Degradación del colorante

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Con el fin de observar la degradación del colorante con respecto al tiempo, se llevó a cabo un seguimiento a la reacción por espectrofotometría. Los resultados se presentan en la Figura 9. Se observa en la región visible los tres picos característicos del sustrato no degradado ocurren a 443, 473 y 422 nm. A 330 nm se observan los isómeros cis de los carotenos, los cuales son productos de degradación. Por lo tanto, a  $t=0$  vemos cómo prácticamente no hay

degradación, y a medida que aumenta el tiempo disminuyen los picos del sustrato no degradado, mientras que los picos de los isómeros cis saturan el detector a partir del primer tiempo,  $t = 20.5$  horas.



*Figura 9. Variaciones en el espectro de absorción del colorante con respecto al tiempo*

Finalmente, el análisis cuantitativo de todos los experimentos se llevó a cabo por HPLC. A continuación se muestran a manera de ejemplo dos cromatogramas: Del sustrato sin reacción (Figura 10) y de una reacción a las 144 horas (Figura 11).

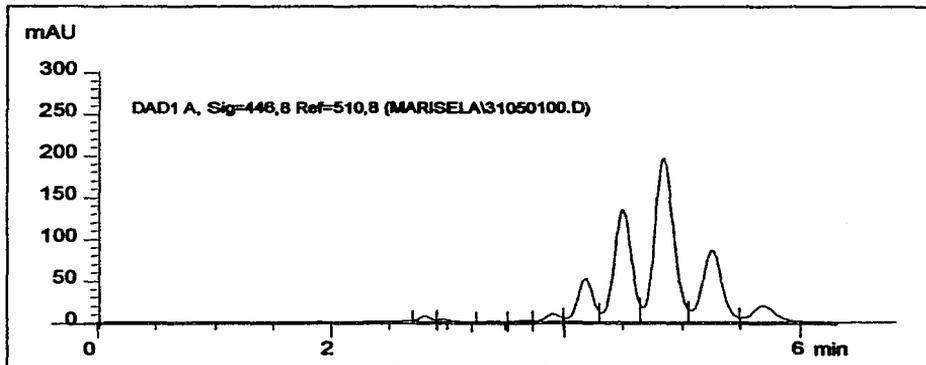


Figura 10. Sustrato sin reacción a  $t = 0$  horas

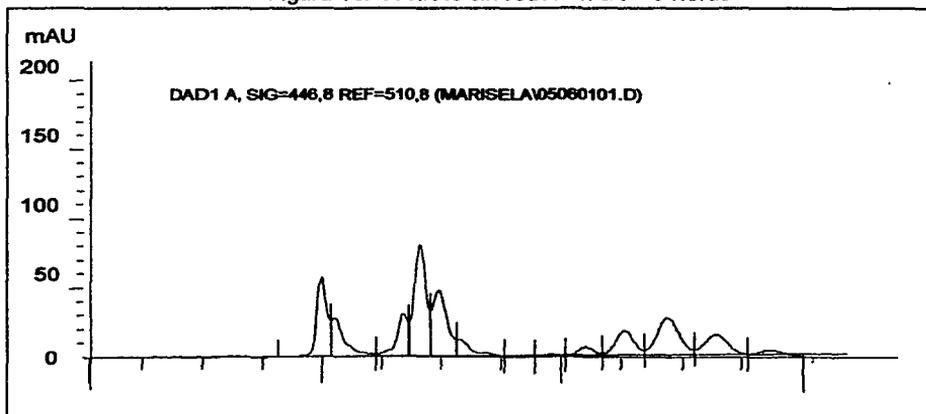


Figura 11. Reacción a  $t = 144$  horas

En el primer cromatograma, se pueden ver los seis picos característicos del diéster, desde los cuatro y arriba de los seis minutos, donde se encuentran sus tiempos de retención. En el segundo cromatograma, pueden observarse los picos secuenciales que caracterizan tanto a la luteína (dos minutos), como a los monoésteres (hacia los tres minutos) y al diéster que no reaccionó.

## CAPÍTULO VI

### 6.1 CONCLUSIONES

- La lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* es capaz de llevar a cabo reacciones de hidrólisis en medio orgánico para obtener luteína a partir de su diéster, teniéndose un máximo de conversión del 20% a las 144 horas.
- La concentración adecuada de sustrato para esta reacción es de 0.1 mg/mL de diéster.
- La cantidad de biocatalizador que se encontró como mejor para esta reacción, en términos de la primera cantidad que maximiza la conversión, es de 200 mg en 20 mL de medio, lo cual equivale a 4 mg de lipasa. Su actividad específica es de 0.57 % de transformación por hora/mg de biocatalizador.
- El  $A_w$  del biocatalizador más adecuado para esta reacción es cercano a cero, es decir, cuando la enzima es liofilizada ( $A_w$  0.018), pero el medio debe contar con la cantidad suficiente de agua para que la hidrólisis sea posible. A  $A_w$  mayores el rendimiento (porcentaje de transformación/hora) disminuye de manera sustancial. Sin embargo, parece ser que el agua determinante para la reacción proviene del solvente. Si hay un

“exceso” de agua, ésta forma una capa alrededor de la enzima, impidiendo que el sustrato tenga contacto con la enzima, y sin embargo, suprimir el agua por completo imposibilita la reacción de hidrólisis. Por tanto el resultado de este trabajo presenta una mejoría en cuanto a la conversión a luteína con respecto al tiempo, aunque está lejos de ser viable para una aplicación en la industria.

- Debido a que el colorante (ésteres o luteína) es adsorbido por el soporte de la enzima, es necesario llevar a cabo una extracción mediante acetona, con lo cual se logra tener alrededor de 90% de recuperación.
- Existe una degradación del colorante con respecto al tiempo, de cerca del 40% con respecto al área inicial, principalmente durante las primeras 24 horas.

## 6.2 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Diccionario Médico Roche, España, 1993, pág 290.
- (2) BRITON G., S.Liaaen-Jensen, Pfander H., Carotenoids, volumen 1; Isolation and Analysis. Editorial Birkhauser Verlag, 1995.
- (3) DESPHONDE, U. F., Salunkhe D.D. "Nutritional and health Aspects and Food Antioxidants", ed. Mrcel Dekker, 1996.
- (4) OLIVER Jordi, Andreu Palou, "Chromatographic Determination of Carotenoids in Foods", *Journal of Chromatography*, 881:543-555, (2000).
- (5) DAVIS B.H., "Carotenoids in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" Vol. 2, T.W. Goodwin, Capítulo 19, 1976.
- (6) PHILIP T., Chen T.S., "Separation and Quantitative Analysis of Some Carotenoid Fatty Acid Esters of Fruits By Liquid Chromatography", *J. Chromatography* , 435:113-126 (1998).
- (7) PHILIP, T, Berry J.W., "A Process For The Purification of Lutein-Fatty Acid Esters From Marigold Petals", *Journal of Food Science*, 40:163-163 (1975).
- (8) DELGADO Vargas Francisco, Octavio Paredes López, "Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles", *J. Agric. Food Chem.*,45:1097-1102 (1997).

- (9) SUBAGIO A, Wakaki H., Morita N., "Stability of lutein and its myristate esters", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 63, Iss 10, pp 1784-1786, (1999).
- (10) SUBAGIO A., Morita N., Sawada S., "Thermal-isomerization of All-trans-lutein in a Benzene Solution", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol 62, Iss 12, pp 2453-2456 (1998).
- (11) LORTIE R., "Enzyme Catalyzed Esterification", *Biotechnology Advances*, 15, No 1, 1-15, (1997)..
- (12) ARROYO Miguel, José María Sánchez Montero, José Vicente Sinisterra, " A New Method to Determine the Aw range in which Immobilized Lipases Display Optimum Activity in Organic Media", *Biotechnology Techniques*, vol 10, No. 4, 263-266, (1996).
- (13) TURNER Nigel A., Evgeny N. Vulfson, "At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?", *Enzyme and Microbial Technology* 27:108-113, (2000).
- (14) MATZUNO, T. "Structure and Characterization of Carotenoids from Various Habitats and Natural Sources. *Methods in Enzymology*" 213:22-31, (1992).
- (15) Tesis de Diana Avila Figueroa (30 de Junio de 2000). Química de Alimentos. Fac. Química, UNAM.
- (16) MAUGDARD T, Tudella J., Legoy M.D., "Study of Vitamin Ester Synthesis by Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Media" *Biotechnology Prog.* , 16: 358-362, (2000).

- (17) ANDERSON Emily M., Karin M. Larsson, Ole Kirk, " One Biocatalyst-Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis", *Biocatalysis and Biotransformations*, vol 16, 181-204.
- (18) Hoja del producto, Novozym 435, Page 1:2 B 606d-GB, Novo Nordisk.
- (19) CHAMOULEAU F., D. Coulon, M. Girardin, M. Ghoul, "Influence of water activity on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11:949-954 (2001).
- (20) WATANABE Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., "Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of the American Oil Chemists Society*, Vol. 77, Iss 4, pp 355-360 (2000).
- (21) WATANABE Y., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y., "Stepwise Ethanolysis of Tuna Oil Using Immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 88, Iss 6, pp 622-626 (2000).
- (22) SECUNDO Francesco, Giacomo Carrea, Carla Soregaroli, Donatella Varinelli, Raffaele Morrone, "Activity of Different *Candida antarctica* Lipase B Formulations in Organic Solvents", *Biotechnology and Bioengineering*, vol 73, No 2, April 20, (2001).

## 6.3 TABLAS Y FIGURAS

	página
<b>Tabla 1</b> <i>Propiedades fisicoquímicas de la luteína en solventes orgánicos</i>	19
<b>Tabla 2</b> <i>Rf de las especies observadas por TLC</i>	42
<b>Figura 1</b> <i>Esquema de la hidrólisis enzimática y química del diéster de luteína.</i>	13
<b>Figura 2</b> <i>Curva de adsorción del agua de <u>Candida antarctica</u></i>	27
<b>Figura 3</b> <i>Corridas duplicadas</i>	38
<b>Figura 4</b> <i>Cinética de degradación del colorante en cuatro horas</i>	41
<b>Figura 5</b> <i>. Efecto de la concentración de sustrato en la reacción enzimática de desesterificación</i>	43
<b>Figura 6</b> <i>Porcentaje de área vs tiempo con diferentes cantidades de biocatalizador</i>	45
<b>Figura 7</b> <i>Actividad específica de <u>Candida antarctica</u></i>	46
<b>Figura 8</b> <i>Aw del biocatalizador</i>	48
<b>Figura 9</b> <i>Variaciones en el espectro de absorción del colorante con respecto al tiempo</i>	50
<b>Figura 10</b> <i>Cromatograma de sustrato sin reacción</i>	51
<b>Figura 11</b> <i>Cromatograma de reacción a 144 horas</i>	51

