

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE CITRONELOL

RESUMEN

Los ésteres de citronelol son componentes de los aceites esenciales con diversos usos en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia. Estos compuestos pueden obtenerse por alcoholisis usando catalizadores químicos o biocatalizadores. En esta investigación se evalúa la síntesis enzimática de los mismos a partir de aceites vegetales y citronelol, realizándose un screening con cuatro lipasas comerciales en dos sistemas de reacción diferentes.

PALABRAS CLAVES: Enzimas, ésteres de citronelol, síntesis enzimática.

ABSTRACT

The citronellol esters are component of the essential oils with diverse uses in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. These compounds can be obtained by alcoholysis using chemical catalysts or biocatalysts. In this investigation the enzymatic synthesis of the same ones is evaluated starting from vegetable oils and citronellol, being carried out a screening with four commercial lipases in two different reaction systems.

KEYWORDS: Enzymes, citronellol esters, enzymatic synthesis.

ERICK RODRÍGUEZ PEÑA

Ingeniero Químico
CENIVAM –CICTA
Universidad Industrial de
Santander
errope23@hotmail.com

FABIÁN E. CASTELLANOS

Químico, M Sc.
CENIVAM-CICTA
Universidad Industrial de
Santander
maequi3@uis.edu.co

AIDÉ PEREA VILLAMIL

Química, M Sc,
Doctora en Química.
CENIVAM-CICTA
Escuela de Química
Universidad Industrial de
Santander
aperea@uis.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo de productos naturales se ha incrementado, debido a la conciencia de las personas por su salud. Es por ello, que su utilización es un requerimiento especial para la producción de nuevos alimentos en procesos industriales.

La obtención de aromatizantes y sabores naturales se ha llevado a cabo tradicionalmente por la extracción directa de las plantas o por síntesis química. Sin embargo, estos métodos, no pueden suplir la demanda actual de estos componentes porque su aislamiento es muy costoso. Una de las alternativas a este problema es la utilización de la biotecnología, aplicando técnicas y métodos como el uso de enzimas, uso de microorganismos y cultivo de tejido de células vegetales. [1]

La aplicación de enzimas es una técnica muy usada en los procesos de biotransformación porque su separación de los productos se realiza por técnicas sencillas, reduciendo los costos de operación. Con el uso de enzimas se pueden obtener también productos de mayor valor agregado con mayor aceptabilidad dentro de la industria por la manera como son obtenidos. El uso de lipasas en reacciones de transesterificación, acidólisis y esterificación directa en medios no convencionales y en medios libres de solvente es una buena alternativa para la obtención de diversos productos. Varios estudios realizados han demostrado la potencialidad de las enzimas en los procesos que tienen como fin la producción de esteres terpénicos, los cuales presentan una gran variedad de propiedades organolépticas deseadas para la industria. [2]

Dentro de los esteres terpénicos, los esteres de citronelol han sido producidos usando varias lipasas a escala de laboratorio [3]. Sin embargo, para su posterior implementación en procesos de tipo industrial es necesario evaluar su desempeño durante una reacción debido a que el control correcto de la concentración de la enzima, la relación alcohol/aceite, la temperatura y el tiempo de reacción son requerimientos para maximizar la producción final [4,5].

En esta investigación se evalúa el desempeño de tres lipasas inmovilizadas y una lipasa cruda, en la síntesis de esteres de citronelol en un sistema libre de solvente y un sistema con solvente (heptano) usando como sustrato aceite de palmiste y citronelol.

2. CONTENIDO

2.1 Materiales

Se emplearon como sustratos aceite de palmiste refinado suministrado por la Empresa Santandereana de Aceites – SACEITES S.A. y citronelol del 99,9% de pureza. Como catalizadores se emplearon: lipasa estereo específica (sn-1, 3) de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada por adsorción en un soporte de sílice (Lipozyme TL IM), lipasa inmovilizada en una resina macroporosa de intercambio aniónico, (Lipozyme RM IM) ambas suministradas por Novozyme S.A. Enzima lipasa extracelular de *Alcaligenes* sp. inmovilizada en tierra diatomácea granulada (Lipase QLG).

2.2 Diseño experimental

La reacción de alcoholisis se llevó a cabo en biorreactor de 10 ml; para su calentamiento se utilizó un baño termostático y para su agitación se utilizó agitación orbital. En todas las reacciones se emplearon como sustratos aceite de palmiste y citronelol en una relación molar 1:3.5. Las reacciones se llevaron a cabo en ausencia y presencia de heptano. En todos los casos se midió el consumo de citronelol.

La actividad esterificante se midió en un sistema de reacción similar, usando como sustratos ácido butírico y butanol en presencia de hexano y de heptano, mientras que la actividad hidrolítica se midió empleando como sustrato aceite de palmiste. La determinación de la actividad hidrolítica de las enzimas se llevó a cabo utilizando una adaptación del método descrito por Moreno y col., 2001 [6] y la actividad esterificante se realizó según el método reportado por Kiran y col., 2000 [7].

2.3 Análisis de las muestras

La composición en ácidos grasos del aceite de palmiste se determinó empleando cromatografía de gases de alta resolución según la norma NTC 5013 de 2001. La determinación de los ésteres de citronelol se realizó utilizando un cromatógrafo Agilent HP 6890 Plus con detector FID. Se empleó una columna DB-WAX (30m x 0.32 mm x 0.25 μ m) con la siguiente programación de temperatura: 50 °C mantenidos por 2 minutos, una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta 150°C, seguida por una rampa de calentamiento de 10 °C/min hasta 170 °C y una rampa final de calentamiento de 30 °C/min hasta 250°C y por último 250 °C mantenidos por 20 min. Las demás condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector 250 °C en modo split con relación 30:1, gas de arrastre (Helio) a 39.6 mL/min, temperatura del detector 250°C, flujo de aire 350 mL/min, flujo de hidrógeno 35 mL/min, flujo del gas make-up (helio): 30 mL/min. Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención con la muestra obtenida por esterificación con KOH en citronelol analizado bajo las mismas condiciones.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Actividad esterificante e hidrolítica

Los resultados obtenidos, permiten señalar que la enzima con mayor valor de actividad esterificante es la lipasa Lipozyme TL IM, seguida por la lipasa QL; cabe destacar que esta última no se encuentra inmovilizada.

Cuando se utiliza solvente en la reacción para medir la actividad esterificante, este ejerce un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima, como puede observarse en las tablas 1 y 2, en donde se muestran los valores de

actividad esterificante en diferentes solventes. En el caso de la enzima Lipozyme TL IM la actividad esterificante disminuye en un 46,4 % al emplear como solvente hexano. Similares resultados se obtuvieron para las demás enzimas evaluadas.

Sistema de reacción	Enzima	Promedio ^a	Desviación estándar
Butírico + heptano	TL IM	0,014	4,94E-05
Butírico + heptano	RM IM	0,010	1,54E-05
Butírico + heptano	QLG	0,009	0,0002
Butírico + heptano	QL	0,012	0,0003

Tabla 1. Actividad esterificante de las lipasas

^a El valor promedio de la actividad esterificante esta en μ mol min^{-1} mg^{-1} de lipasa

Sistema de reacción	Enzima	Promedio ^a	Desviación estándar
Butírico + hexano	TL IM	0,0065	0,0001
Butírico + hexano	RM IM	0,0050	0,0005
Butírico + hexano	QLG	0,0036	0,0002
Butírico + hexano	QL	-	-

Tabla 2. Evaluación de la actividad esterificante en hexano.

^a El valor promedio de la actividad esterificante esta en μ mol min^{-1} mg^{-1} de lipasa

La actividad hidrolítica de las lipasas está directamente relacionada con la actividad en síntesis, pero es independiente de la actividad en las reacciones de alcoholisis, sin embargo, es recomendable que la lipasa presente una alta actividad hidrolítica ya que en el mecanismo de reacción de alcoholisis se presentan pasos de hidrólisis y síntesis sucesiva de ésteres. La lipasa TL IM presenta el valor más alto de actividad hidrolítica en comparación a las demás lipasas evaluadas (Tabla 3).

Enzima	Promedio ^a	Desviación estándar	Coefficiente de correlación
TL IM	1180	0,05	0.9994
RM IM	191	0,03	0.9899
QLG	324	0,04	0.9985
QL	697	0,04	0.9964

Tabla 3. Actividad hidrolítica de las lipasas

^a El valor promedio de la actividad hidrolítica esta en μ mol min^{-1} g^{-1} de lipasa

En cuanto a las velocidades de reacción se encuentra que la reacción de esterificación es más lenta que la reacción de hidrólisis.

2.4.2 Evaluación de las lipasas

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se evaluaron dos sistemas: a) libre de solvente y b) en presencia de

heptano. En cada caso se midió el efecto de la temperatura (40°C y 60°C) y el tiempo de reacción, para las cuatro enzimas evaluadas.

2.4.2.1 Sistema libre de solvente.

En las figuras 1 y 2, también se representa la variación en el consumo de citronelol a diferentes temperaturas y diferentes tiempos.

Se establece que la temperatura juega un papel determinante en el consumo de citronelol. A 40 °C todas las enzimas inmovilizadas muestran valores de consumo de citronelol menores al 80 % (Figura 1), mientras que a una temperatura de reacción de 60 °C todas las enzimas alcanzan valores de consumo superiores al 80 % (figura 2).

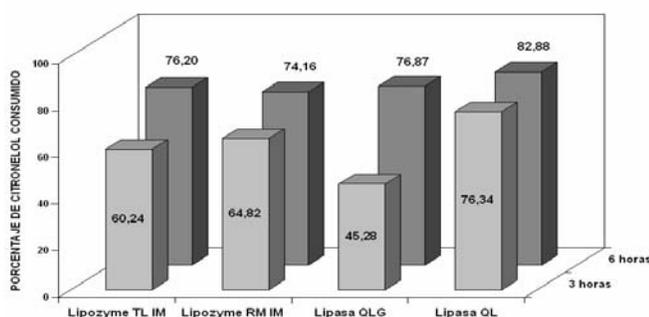


Figura 1. Screening de lipasas a 40 °C en un sistema libre de solvente

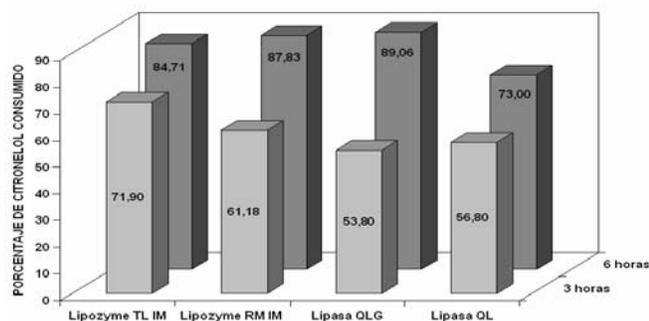


Figura 2. Screening de lipasas a 60 °C en un sistema libre de solvente

En cuanto al tiempo, en los dos casos a 40 °C y a 60 °C se observa en general que a medida que aumenta el tiempo de reacción aumenta el grado de conversión.

log P es definido como el coeficiente de partición de un solvente entre el agua y 1-octanol en un sistema de dos fases. Después de 6 horas de reacción a 40 °C, la enzima más activa es la lipasa QL alcanzando el máximo valor en cuanto a porcentaje de citronelol consumido (82,9%);

mientras que dentro de las enzimas inmovilizadas los mayores valores se alcanzan con las Lipasas RM IM y TL IM.

A 60 °C, las tres enzimas inmovilizadas presentan niveles de conversión similar y superior a los de la enzima QL que es una enzima no inmovilizada. En cualquier caso es necesario, realizar la cinética de la reacción con la enzima seleccionada, para establecer un equilibrio entre la actividad de la enzima y su estabilidad térmica.

2.4.2.2 Sistema de reacción en presencia de heptano.

El efecto de los solventes orgánicos en la actividad enzimática ha sido estudiado por diversos autores [7]. Es por ello, que se realizó un estudio bibliográfico preliminar entre los solventes más empleados para llevar a cabo las reacciones de alcoholisis. Bajo este criterio, se estudiaron dos solventes hidrofóbicos (log P1 ≥2), el heptano (log P = 4.0) y el hexano (log P = 3.5). De dicho estudio, se pudo concluir que los solventes con un alto coeficiente de partición favorecían la actividad esterificante de las enzimas. Por lo tanto, para estudiar el desempeño de las enzimas lipasas en un sistema con solvente se utilizó el heptano en el screening realizado.

Las lipasas que presentan desempeños favorables frente a la reacción de alcoholisis con citronelol en un sistema con heptano como solvente a 40 °C (figura 3) y a 60 °C (figura 4) son: la lipasa lipozyme TL IM y la lipasa Lipozyme RM IM. Sin embargo la lipasa Lipozyme TL IM tiene mayor velocidad de reacción que la lipasa Lipozyme RM IM.

La lipasa QLG y la lipasa QL muestran un descenso en su actividad esterificante en el sistema de reacción con solvente, alcanzando al cabo de seis horas de reacción porcentajes de conversión del 42.27 % y 40.92 % respectivamente, a 40 °C.

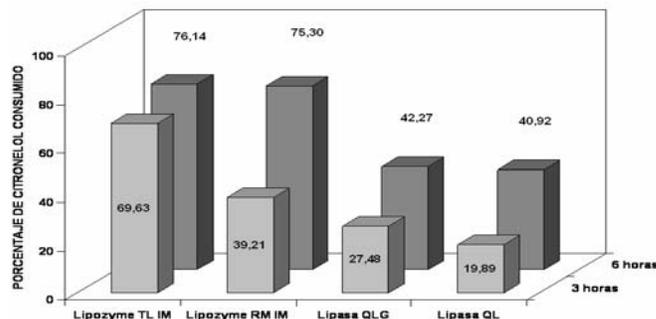


Figura 3. Screening de lipasas a 40 °C en un sistema con heptano.

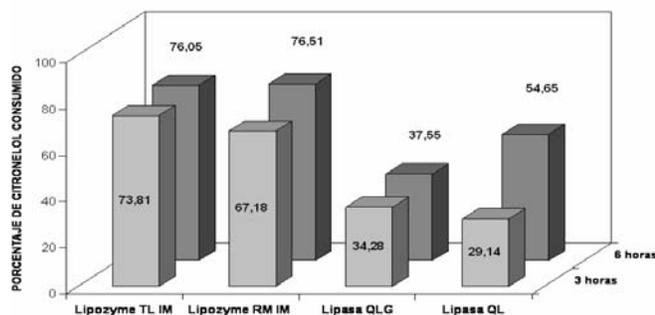


Figura 4. Screening de lipasas a 60 °C en un sistema con heptano.

Al comparar los resultados para los dos sistemas sin solvente y con solvente, se observa que el solvente ejerce un efecto inhibitorio de la actividad enzimática, en algunos casos en mayor proporción que en otros. Así en el caso de las enzimas Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM, hay una disminución en la conversión del 10% aproximadamente, mientras que en el caso de las enzimas Lipasa QLG y Lipasa QL, la conversión disminuye apreciablemente, del orden de un 50%.

Lo anterior muestra que los solventes con mayor polaridad como el heptano, promueven la reacción de alcoholisis, mientras que el hexano con una polaridad inferior disminuye la actividad esterificante de las enzimas evaluadas.

Con respecto a los niveles de conversión obtenidos a diferentes tiempos de reacción, se aprecia que al aumentar el tiempo aumentan los niveles de consumo de citronelol. Sin embargo, en el caso de Lipozyme TL IM el incremento en los niveles de conversión después de tres (3) horas de reacción, solo es del 2,2%, por lo cual, es necesario evaluar la cinética para seleccionar un tiempo óptimo de reacción.

Finalmente, con base en los resultados, se selecciona la enzima Lipozyme TL IM para llevar a cabo la reacción de alcoholisis entre el citronelol y aceites vegetales.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los mejores desempeños en la reacción de alcoholisis se alcanzan con las enzimas Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM. La Lipozyme TL IM es más económica.

En cuanto al efecto de la temperatura la enzima que presentó mayor estabilidad térmica, tanto en un sistema libre de solvente como en uno con solvente orgánico es la Lipozyme TL IM seguida por la Lipozyme RM IM; cabe destacar que la enzima menos estable fue la lipasa QLG.

Los mayores niveles de conversión se alcanzan en el sistema libre de solvente.

Se recomienda con la enzima seleccionada, optimizar las condiciones de reacción y estudiar la cinética de la reacción de alcoholisis enzimática.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ANASTAS, Paul T. et al. The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry. *Catalysis Today*. 2000, 55: 11-22
- [2] MELO, L.L.M.M. et al. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biochemistry*. 2005, 40: 3181-3185
- [3] GANAPATI, Y. D and LATHI, P. S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2004, 27: 113-119
- [4] KRISHNA, S. Developments and trends in enzyme catalysis in non conventional media. *Biotechnology Advances*. 2002, 20:239-267.
- [5] CHATTERJEE, T. and BHATTACHARYYA, D.K. Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system. *Biotechnology Letters*. 1998, 20(9): 865-867
- [6] MORENO, N. Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma. Bucaramanga, 2001, 109 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- [7] KIRAN, K.R. et al. An esterification method for determination of lipase activity. *Biotechnology Letters*. 2000, 22: 1511-1514
- [8] CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. and COMBES, D. Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. *Enzyme Microb Technol.* (1992), 14: 293 – 298