

**ACTIVACIÓN DE LIPASA DE *CÁNDIDA RUGOSA* PARA LA ESTERIFICACIÓN
DE ÁCIDO OLEICO CON N-BUTANOL EN ISOCTANO.**

EDGAR ANDRÉS RESTREPO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
MANIZALES
2005

**ACTIVACIÓN DE LIPASA DE *CÁNDIDA RUGOSA* PARA LA ESTERIFICACIÓN
DE ÁCIDO OLEICO CON N-BUTANOL EN ISOCTANO.**

EDGAR ANDRÉS RESTREPO

Trabajo final para optar por el título de
Ingeniero Químico
Modalidad
PARTICIPACIÓN EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DIRECTOR:

CARLOS EDUARDO ORREGO A.
Ingeniero Químico

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
MANIZALES
2005

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Manizales, marzo de 2005.

**A mis tres madres Nora, Adalgisa
y Análida**

AGRADECIMIENTOS

El autor del trabajo desea expresar su agradecimiento a:

El profesor Carlos Eduardo Orrego director del trabajo de grado por invitarme a participar de este proyecto.

Los profesores Oscar Julián Sánchez y Carlos Ariel Cardona por la ayuda en la solución de problemas tanto teóricos como prácticos.

Al grupo de investigación de la línea de profundización de procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos por permitirme la utilización del laboratorio cuando lo necesité.

Los estudiantes Mauricio Andrés Herrera y Jaime Andrés Figueroa quienes me ayudaron a solucionar algunos problemas además de sugerirme algunas nuevas ideas.

Carlos Arturo Osorio, Germán González, César Augusto Sánchez, Wilmar Osorio, Oscar Fabio Salazar y Mónica Cruz compañeros en los que siempre encontré una voz de aliento para continuar con la realización de este trabajo.

CONTENIDO

OBJETIVOS	pág 11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1 MARCO TEÓRICO	16
1.1 POR QUÉ LAS ENZIMAS SON MENOS ACTIVAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS QUE EN AGUA.	16
1.1.1 Cambios estructurales.	16
1.1.2 Aumento de la barrea de activación.	17
1.1.3 Movilidad conformacional.	17
1.1.4 pH.	17
1.1.5 Como aumentar la actividad enzimática en solventes orgánicos.	18
1.2 ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA PARA MEDIO NO ACUOSO.	19
1.2.1 Activación enzimática vía excipientes.	20
1.2.1.1 Activación inducida por sales. Efecto de la cosmotropicidad (<i>kosmotropicity</i>) de la sal en la actividad enzimática.	20
1.2.1.2 Éteres corona.	22
1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LIPASAS.	23
1.3.1 Lipasa de <i>Cándida rugosa</i> .	24
2 MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.1 ACTIVACIÓN DE LIPASA DE <i>CÁNDIDA RUGOSA</i> .	26
2.1.1 Activación de lipasa de <i>Cándida rugosa</i> por medio de sulfato de sodio.	26
2.1.2 Activación de lipasa de <i>Cándida rugosa</i> por medio de un éter corona.	27
2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	27

2.2.1	Prueba del valor ácido.	27
2.3	PREPARACIÓN DEL MEDIO REACCIONANTE.	28
3	RESULTADOS	29
3.1	ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO CON N-BUTANOL EN ISOCTANO.	31
3.2	CÁLCULO EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	33
4	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	37
5	CONCLUSIONES	40
	RECOMENDACIONES	41
	BIBLIOGRAFÍA	42
	ANEXO A	44
	ANEXO B	45
	ANEXO C	50

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1 Representación de los estados de protonación que puede tener una proteína.	18
Figura 2 Diferencia existente en la actividad de la <i>Subtilisina Carsberg</i> cuando es suspendida en hexano para una transesterificación compara con la hidrólisis del éster en un buffer acuoso.	20
Figura 3 Incremento del sitio activo de la enzima por el incremento de la kosmotropicidad de la sal.	22
Figura 4 Representación de las estructuras de varias lipasas. Arriba de izquierda a derecha: <i>Pseudomonas glumae</i> , <i>Cándida rugosa</i> y <i>Cándida Antarctica B</i> . Abajo de izquierda a derecha: <i>Huminícola lanuginosa</i> , <i>Fusarium solani pisi</i> y la lipasa pancreática humana. La tentativa de ubicación del sitio activo de la enzima es señalado de color gris.	24
Figura 5 Representación espacial de la lipasa de <i>Cándida rugosa</i> .	25
Figura 6 Representación esquemática de la esterificación propuesta para medir la actividad enzimática.	28
Figura 7 Enzima liofilizada con sulfato de sodio.	29
Figura 8 Enzima liofilizada con sulfato de sodio (vista cercana).	30
Figura 9 Enzima liofilizada con 18-crown-6.	30
Figura 10 Enzima liofilizada con 18-crown-6 (vista cercana).	31
Figura 11 Promedio de los resultados obtenidos para cada esterificación.	33
Figura 12 Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima libre.	34
Figura 13 Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima activada con sulfato de sodio.	35
Figura 14 Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima activada con 18-crown-6.	36

LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1 Causas de la baja actividad enzimática en solventes orgánicos y formas de enfrentarlas.	18
Tabla 2 Sales utilizadas en el estudio del efecto de la cosmotropicidad de la sal en la activación de enzima.	21
Tabla 3 Esterificaciones realizadas sin catalizador.	31
Tabla 4 Esterificaciones realizadas con aproximadamente 10 mg de enzima libre.	32
Tabla 5 Esterificaciones realizadas con aproximadamente 4,2 mg de enzima activada con sulfato de sodio.	32
Tabla 6 Esterificaciones realizadas con aproximadamente 8 mg de enzima activada con 18-crown-6.	32
Tabla 7 Actividad enzimática de cada uno de los preparados enzimáticos activados.	38

LISTA DE ANEXOS

Anexo A Prueba del valor ácido.

Anexo B Ficha técnica de la Lipasa de *Cándida rugosa* utilizada.

Anexo C Análisis estadístico de las regresiones lineales obtenidas.

OBJETIVOS

GENERAL

Activar la Lipasa de *Cándida rugosa* por medio de dos protocolos de activación de enzimas y medir la actividad enzimática en la esterificación del ácido oleico con n-butanol en isooctano como solvente.

ESPECIFICOS

- Liofilizar para activar la Lipasa de *Candida rugosa* en presencia de una sal (sulfato de sodio) y en presencia de un éter corona denominado 18-crown-6.
- Medir la actividad enzimática de la Lipasa de *Candida rugosa* libre sin ningún tratamiento de activación y de cada uno de los preparados enzimáticos activados.
- Comparar los resultados obtenidos de la actividad enzimática de los preparados enzimáticos con respecto a la enzima libre.

RESUMEN

El presente trabajo de grado se encaminó a ensayar dos protocolos que se encuentran en la literatura para la activación de enzimas, con el fin de verificar cual de ellos da lugar a una mayor actividad enzimática en la esterificación de ácido oleico con n-butanol en isooctano como solvente siendo la enzima ensayada lipasa de *Cándida rugosa*.

El primer protocolo de activación está basado en la adición de una sal a la enzima, en este caso sulfato de sodio con una previa disolución de ésta en una solución buffer, para una posterior liofilización; el segundo consiste en la co-liofilización con un éter corona.

Los resultados arrojan un aumento de la actividad enzimática cuando la enzima es liofilizada con sulfato de sodio y con el éter corona en comparación con la enzima libre, dando los mejores resultados la enzima liofilizada con el sulfato de sodio, para las condiciones experimentales planteadas en el presente trabajo.

Este trabajo hace parte del proyecto de investigación aprobado por COLCIENCIAS, "Obtención de Biodiesel a partir de aceite de palma utilizando enzimas inmovilizadas" (Código DIMA 20201003312).

ABSTRACT

The present work of degree was directed to test two protocols that they find in the literature for the activation of enzymes, in order verified which of them gives place to a major enzymatic activity in the esterificación of oleic acid with n-butanol in isooctane as solvent being the tested enzyme *Cándida rugosa* lipase.

The first protocol of activation is based on the addition of a salt to the enzyme, on this case sulphate of sodium with a previous dissolution of this one on a solution buffer, for a later freeze-dried; the second one consists of the freeze-dried with a crown ether.

The results throw an increase of the enzymatic activity when the enzyme is freezed-dried with sulphate of sodium and with the crown ether in comparison with the powder enzyme, giving the best results the enzyme freezed-dried with the sulphate of sodium, for the experimental conditions raised in the present work.

This work does part of the project of investigation approved by COLCIENCIAS, "Biodiesel's obtaining from palm oil using immobilized enzymes" (DIMA Code 20201003312).

INTRODUCCIÓN

Las lipasas por su amplio poder catalizador son utilizadas en muchas reacciones orgánicas, entre las que se cuentan la hidrólisis y la esterificación. Estas reacciones usualmente se dan con un alto grado de selectividad, haciendo de las lipasas un importante grupo de biocatalizadores en la química orgánica. Además las lipasas también presentan otras características especiales entre las cuales, una de mucha importancia es la estabilidad en solventes orgánicos [1, 2].

Por sus características las lipasas son clasificadas en dos grandes grupos como hidrolasas y sintetetasas. Las lipasas como hidrolasas han sido utilizadas en la industria de producción de detergentes, ya que al ser agregadas a éstos, solucionan problemas tales como la alta variación en el contenido de triglicéridos por las manchas de la grasa y los efectos de la desnaturalización química o degradación proteolítica causada por los aditivos que se le agregan a los detergentes; en la industria alimenticia son utilizadas las lipasas para aumentar el valor sensorial y nutricional de una gran cantidad productos; como por ejemplo los triglicéridos [3, 4].

Las lipasas como sintetetasas son utilizadas por los químicos para catalizar una amplia variedad de transformaciones estereoselectivas, uno de los aspectos más interesantes es precisamente la selectividad que presentan las lipasas, lo que hace pensar en la posibilidad de llevar estos procesos a escala industrial. Así es como las lipasas como sintetetasas se han utilizado para producir dioles, α y β hidroxiaácidos, cianohidrininas, clorohidrininas, lactonas, aminas, diaminas, amino alcoholes, α y β amino ácidos y por último ésteres. Todas estas reacciones son posibles llevarlas a cabo debido a la alta interacción que presentan las lipasas con los carbonos quirales y con los grupos carboxílicos, dando lugar a lo que se conoce como reacciones de enantioselectividad (síntesis donde se producen dos moléculas donde una es la imagen espectral de la otra). A pesar de esta posibilidad, el número de publicaciones y por ende el número de industrias que hacen uso de los procesos enantioselectivos es limitado, principalmente debido a: actividad enzimática limitada en solventes orgánicos y dificultades para regenerar la enzima. Aún así en años recientes están surgiendo las soluciones para estos problemas entre las que se cuentan: optimización de las condiciones de reacción, escogencia del solvente adecuado e implementación de métodos de activación; punto donde se centra el presente trabajo [4].

Este trabajo se orientó a la implementación de dos protocolos de activación de enzimas, los cuales son reportados en muchas investigaciones además de su facilidad de ser efectuados a nivel de laboratorio, escogiéndose como medio para medir la actividad enzimática una reacción de esterificación de ácido oleico con n-butanol en isooctano. El primer protocolo de activación está basado en la adición de una sal a la enzima, en este caso sulfato de sodio con una previa disolución de

ésta en una solución *buffer*, para una posterior liofilización; el segundo consiste en la co-liofilización con un éter corona (*crown ether*).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PORQUE LAS ENZIMAS SON MENOS ACTIVAS EN SOLVENTES ORGÁNICOS QUE EN AGUA.

En los últimos 20 años, la enzimología en medio no acuoso ha surgido como un área de la biotecnología de mayor investigación y desarrollo. Aunque en principio la idea de procesos enzimáticos en solventes orgánicos fue inicialmente tomada con escepticismo por la comunidad científica, ahora esta área de la biotecnología es estudiada y explotada por numerosos laboratorios en todo el mundo [5, 6].

La razón del por qué la enzimología no acuosa ha generado tal expectativa es que las enzimas exhiben unas propiedades interesantes en solventes orgánicos; como su selectividad, ésta selectividad enzimática en solventes orgánicos no es muy diferente de la alcanzada en presencia de agua pero tiene la ventaja de ser mucho más controlada e incluso revertida por el solvente, así es como el solvente se vuelve una parte muy importante de estos estudios.

Un gran número de técnicas de acondicionamiento de enzimas para ser utilizadas en solventes orgánicos han sido desarrolladas, como por ejemplo, la coliofilización con sales, grasas, éteres corona; principalmente para la síntesis de intermedios ópticamente activos. Aunque siempre ha estado presente el hecho de saber que las enzimas son menos activas en solventes orgánicos que en agua. Por ejemplo, las proteasas, α -*quimotripsina* y la *subtilisina* tienen actividades de 10^4 a 10^5 más bajas en octano anhidro que en agua; además ambas enzimas también siguen siendo menos activas en otros solventes orgánicos. Tal disminución en la actividad enzimática parece ser el caso típico para una gran cantidad de enzimas, porque las velocidades de reacción de los procesos enzimáticos en solventes orgánicos son en efecto menores que en agua [7, 8, 9].

A continuación se describen brevemente factores que influyen en la actividad enzimática en solventes orgánicos:

1.1.1 Cambios estructurales.

Los cambios estructurales pueden ser causados por mezclas orgánicas-acuosas, lo que se ha conocido como un tipo de desnaturalización que puede sufrir una proteína. Es de esperarse que tal situación sea aún más probable cuando se tenga una enzima en un medio casi totalmente anhidro.

La cristalografía de rayos X es el método que se ha utilizado para seguir estos posibles cambios estructurales, pero solo ha sido posible aplicarlo a enzimas que se tengan en forma de cristales entrecruzados [5, 6].

1.1.2 Aumento de la barrera de activación.

Cuando el medio acuoso es reemplazado por un solvente orgánico, el sustrato es 'expulsado' del medio de reacción por un efecto hidrofóbico, lo que conlleva una elevación de la barrera de activación dando lugar a una baja actividad enzimática [5, 6].

1.1.3 Movilidad conformacional.

La interacción de las proteínas con el agua es vital en todas las funciones biológicas, particularmente en la actividad enzimática, porque el agua actúa como un lubricante, permitiendo que las enzimas exhiban la movilidad conformacional requerida para una óptima catálisis. En solventes orgánicos, generalmente; las enzimas no están próximas a esta acomodación, debido a unas bajas constantes dieléctricas llevando a fuertes interacciones electrostáticas y de aquí a enzimas más rígidas, por lo que la movilidad de la enzima disminuye conllevando este efecto una disminución de la actividad catalítica. Aún así las enzimas muestran una actividad significativa en este tipo de medios porque retienen agua (denominada agua esencial) con fuertes enlaces, siendo más fuertes cuando se sumergen en solventes libres de agua [5, 8, 9].

1.1.4 pH.

En solución acuosa, la catálisis enzimática depende mucho del pH y donde el máximo de actividad corresponde a un pH óptimo. Sin controlar el pH en solventes orgánicos, es imposible controlar los estados de protonación de la enzima, debiendo ser estos controlados por otros factores. Esto cambió cuando se descubrió que las enzimas tienen 'memoria de pH', es decir, su comportamiento catalítico es reflejo del pH último al cual fue sometido la enzima en solución acuosa, estado que aún conservan después de ser liofilizadas. En la Figura 1, se muestra una representación de los estados de protonación que puede tener una proteína [5, 6, 10].

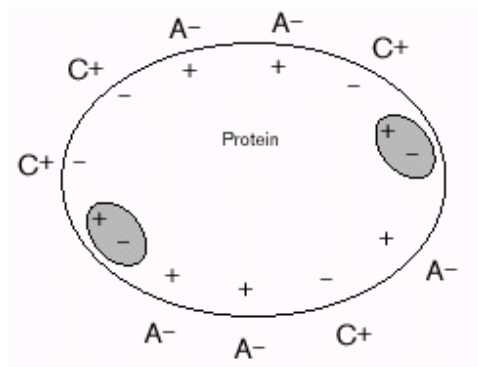


Figura 1. Representación de los estados de protonación que puede tener una proteína [6].

1.1.5 Como aumentar la actividad enzimática en solventes orgánicos.

Los resultados de las investigaciones muestran que son muchos los factores fisicoquímicos que pueden hacer que la actividad enzimática en solventes orgánicos sea menor comparada con el agua. Aún así todos los métodos de activación de enzimas para medio no acuoso reportados tratan de minimizar todos estos factores de forma individual [5, 11].

La estrategia más popular ha sido tratar de prevenir la desnaturalización de la enzima. Esto ha sido posible por medio de la liofilización de las enzimas en presencia de lioprotectantes tales como azúcares, sales inorgánicas y éteres corona. Con estos procedimientos se han logrado aumentos de la actividad enzimática de hasta cuatro órdenes de magnitud. Otra alternativa ha sido agregar pequeñas cantidades de agua al medio, aumentando la actividad enzimática de dos a tres órdenes de magnitud [5, 11].

Tabla 1. Causas de la baja actividad enzimática en solventes orgánicos y formas de enfrentarlas [6].

Causa	Comentario	Solución
Bloqueo del centro activo	Responsable de una pequeña parte de la reducción de la actividad catalítica.	Usar la enzima en forma de cristales entrecruzados y no las partículas de la enzima en su forma amorfa.
Cambio conformacional	No es usual que ocurra por contacto con el solvente, puede ocurrir por la forma con la que se	Uso de lioprotectantes.

	rehidrate una enzima o por liofilización de ésta.	
Reducción de la movilidad conformacional	Crítica con solventes anhidros e hidrofílicos, debido a que despoja a la enzima de su agua esencial.	Optimizar la actividad de agua, hidratar el solvente o usar solventes hidrofóbicos.
pH no adecuado	Puede ser responsable de la reducción de hasta 100 veces en la actividad enzimática.	Usar soluciones <i>buffer</i> .

1.2 ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA PARA MEDIO NO ACUOSO.

Existen varias formulaciones para activar enzimas que pueden ser preparadas para su uso en medio no acuoso. Muchos progresos considerables se han logrado en años pasados en el entendimiento y mejoramiento de los mecanismos de la activación enzimática en medios deshidratados. Este incremento ha sido logrado fundamentalmente al desarrollar una amplia colección de técnicas para activar, estabilizar y generar enantioselectividad en enzimas para importantes transformaciones químicas. Esto, a su turno, es el resultado de un incremento exponencial de los procesos enzimáticos que son desarrollados a escala comercial [12].

Aunque hoy sigue presente una pregunta y es el por qué las velocidades de reacción de reacciones catalizadas por enzimas en medios acuosos, son típicamente bajas. La Figura 2 muestra un ejemplo de esta situación. La *Subtilisina* cataliza la hidrólisis de un éster amino ácido en un *buffer* acuoso y es cerca de cuatro órdenes de magnitud mayor más reactiva que la transesterificación del mismo sustrato en hexano.

En años recientes, muchas técnicas han sido desarrolladas para mejorar la baja actividad catalítica de las enzimas en solventes orgánicos, incluyendo la liofilización en presencia de lioprotectantes; sin embargo, tales técnicas tienen rendimientos modestos en el mejoramiento de la actividad enzimática, en casi todos los casos los niveles de activación sólo son de 10 a 100 veces mayores, en comparación con la enzima libre. Esto no es suficiente para una aplicación a gran escala del bioproceso en medio no acuoso. Recientes trabajos han mostrado que una variedad de técnicas pueden ser usadas para generar una alta actividad de las enzimas para su uso en solventes orgánicos. Además, en su gran mayoría se pueden realizar a un bajo costo [12].

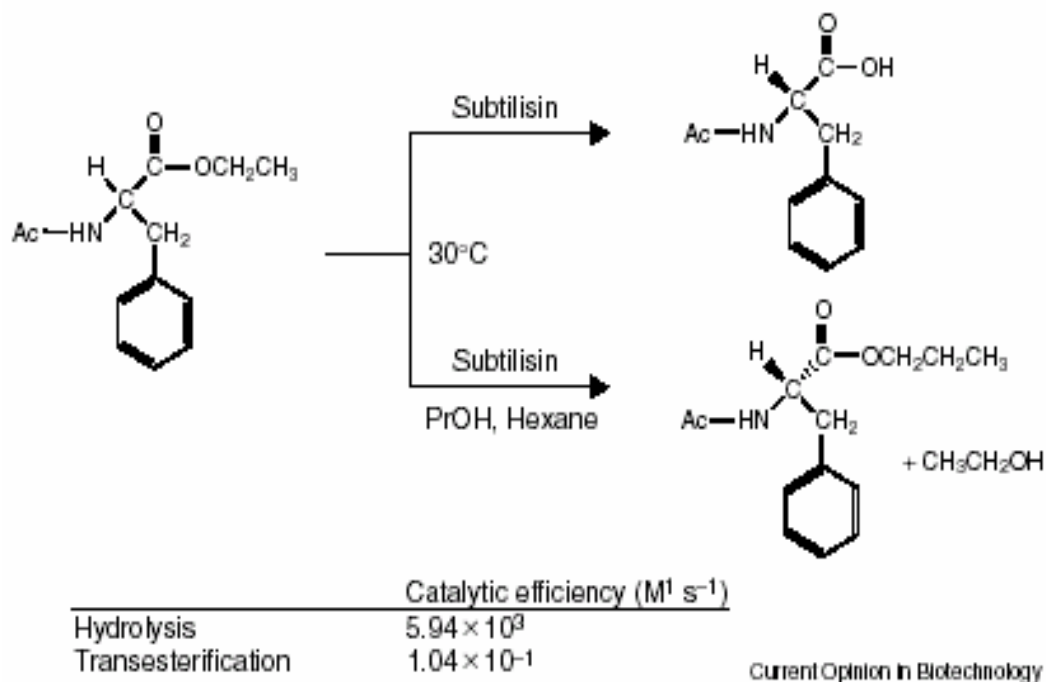


Figura 2. Diferencia existente en la actividad de la *Subtilisina Carsberg* cuando es suspendida en hexano para una transesterificación compara con la hidrólisis del éster en un *buffer* acuoso [12].

1.2.1 Activación enzimática vía excipientes.

La actividad enzimática puede ser mejorada por técnicas extremadamente simples de liofilización de la solución de la enzima en agua en presencia de moléculas orgánicas o inorgánicas (por ejemplo sales). Estos excipientes aparecen para promover un amplio rango de activación enzimática a través de muy diferentes mecanismos. Estas técnicas son totalmente similares, sin embargo, no todas son factibles de realizar a gran escala [11, 12].

1.2.1.1 Activación inducida por sales. Efecto de la cosmotropicidad (*kosmotropicity*) de la sal en la actividad enzimática.

Se ha demostrado que las enzimas liofilizadas en presencia de sales podían mejorar drásticamente su eficiencia catalítica. Por ejemplo, para una preparación enzimática que contenía un 98% (w/w) de KCl su actividad enzimática se aumentaba hasta en 4000 veces comparada con la enzima sin este tratamiento.

Ru *et al* [13]. investigaron la influencia que ejercía el tipo de sal en la activación de las enzimas, para lo cual caracterizaron las sales de acuerdo con la afinidad que presentaban con el agua, lo que se describe por medio del coeficiente β de Jones – Dole. A partir de este coeficiente se pueden distinguir dos tipos generales de sales; las caótropas, que son las que muestran un carácter no favorecedor de la estructura del agua (*water – structure breaking*) y para las cuales el coeficiente β de Jones – Dole es negativo y las cosmótropas, que son las que muestran un carácter favorecedor de la estructura del agua (*water – structure making*) correspondiendo para ellas un valor positivo del coeficiente β . Estos investigadores concluyeron que el contenido de agua, el contenido de sitio activo de la enzima y la actividad enzimática de la enzima liofilizada se incrementan a medida que se incrementa la cosmotropicidad de la sal. Las sales analizadas en este estudio se muestran en la Tabla 2 con su respectivo valor del coeficiente β de Jones – Dole y en la Figura 3 se da conocer el efecto de la cosmotropicidad de la sal [13, 14].

Tabla 2. Sales utilizadas en el estudio del efecto de la cosmotropicidad de la sal en la activación de enzimas [13].

cation	β coefficient	anion	β coefficient
Na ⁺	0.086	CH ₃ CO ₂ ⁻	0.250
		SO ₄ ²⁻ ^a	0.208
		F ⁻	0.100
	† Kosmotropes		
	‡ Chaotropes		
K ⁺	-0.007	Cl ⁻	-0.007
		Br ⁻	-0.032
		I ⁻	-0.068

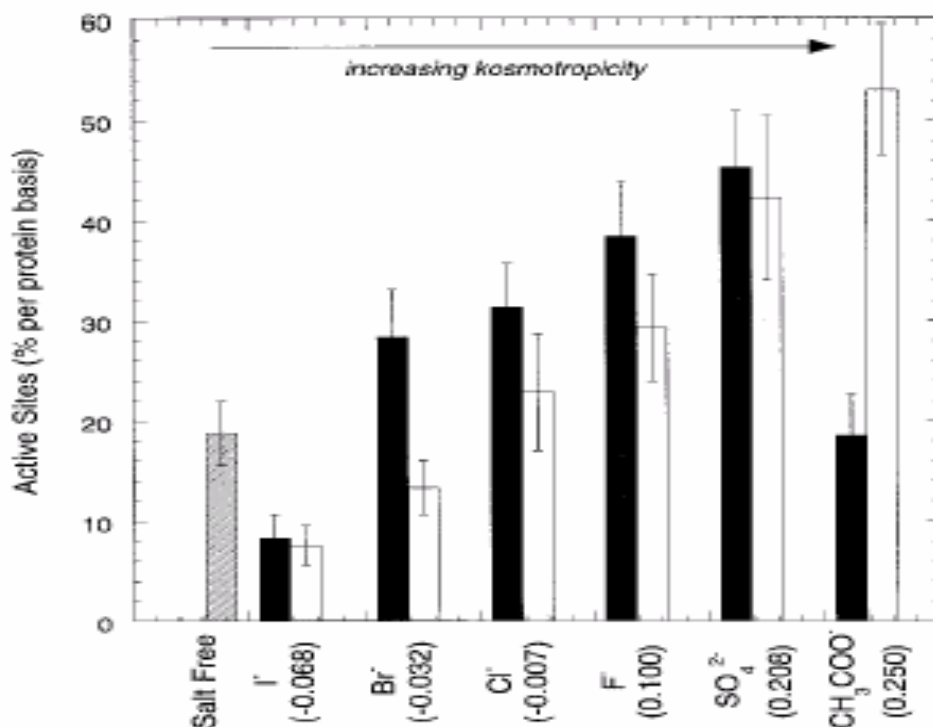


Figura 3. Incremento del sitio activo de la enzima por el incremento de la kosmotropicidad de la sal [13].

En la Figura 3 se muestra como la sal que contenga el ión sulfato, es la que da origen a un aumento considerable de los sitios activos de la enzima.

Muchas son las enzimas que se han utilizado para analizar en ellas el efecto que tiene la activación por medio de sales, entre las cuales están la *Subtilisina Carlsberg*, la *α-quimotripsina*, la *termolisina*, las lipasas, la *penicilina amidasa* y las peroxidasas [13, 14].

1.2.1.2 ÉTERES CORONA.

Los éteres denominados corona son moléculas orgánicas macrocíclicas (poliéteres cíclicos compuestos de unidades de etileno-oxígeno) descubiertas hace aproximadamente 40 años, que han mostrado capacidad de activar enzimas por medio de una liofilización del medio acuoso. Estudios de la década pasada muestran que esta técnica da resultados muy altos en la eficiencia biocatalítica en medio orgánico. En el caso de la *α-quimotripsina* catalizando la síntesis de péptidos, los incrementos fueron de cerca de 450 veces más altos donde el producto es el acetonitrilo usando el éter denominado 18-crown-6 en una relación

molar de 50:1 de enzima. El mecanismo de activación por medio de éteres no es completamente claro, sin embargo, dos hipótesis se han propuesto: en la primera, se muestra que el éter 18-*crown*-6 forma complejos no covalentes con los grupos amino de la proteína, la segunda propone que estos éteres preservan la estructura local del sitio activo de la enzima durante la catálisis en un medio deshidratado [11].

También se ha demostrado que la simple adición de éter corona al solvente orgánico aumenta la actividad enzimática, lográndose un aumento de la actividad enzimática hasta de dos órdenes de magnitud comparada con la enzima libre [11,15, 16].

1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LIPASAS.

Las lipasas son enzimas las cuales catalizan la hidrólisis o la formación de lípidos, por lo que representan un grupo muy versátil de catalizadores biológicos. Generalmente las lipasas tienen preferencia por un tipo de sustrato, si es un triglicérido o un diglicérido tienen diglicéridos y monoglicéridos como productos, más que por el glicerol y ácidos grasos. Además existen muchas lipasas que son activas en solventes orgánicos donde pueden catalizar un gran número de reacciones incluyendo la esterificación, la transesterificación, y la síntesis de péptidos [17].

Todas las enzimas del tipo lipasas tienen un mismo pliegue estructural, por lo cual poseen muchos lazos estructurales que pueden estar en contacto con un sustrato. Ejemplos de estas estructuras son mostrados en la Figura 4.

Las lipasas son enzimas de interés general dentro de muchas aplicaciones industriales; por ejemplo, en la producción de detergentes, grasas y aceites, síntesis orgánica, producción de surfactantes y en las industrias del cuero y del papel.

Comercialmente las lipasas más útiles son obtenidas de microorganismos que producen una amplia variedad de lipasas extracelulares, incluyendo microorganismos tales como: bacterias, hongos y levaduras, donde la formación de una zona opaca alrededor de las colonias indica la producción de lipasa por parte de los microorganismos. La producción de lipasa está influenciada por el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, por el pH del medio de cultivo, la temperatura y la concentración de oxígeno disuelto en el medio [17].

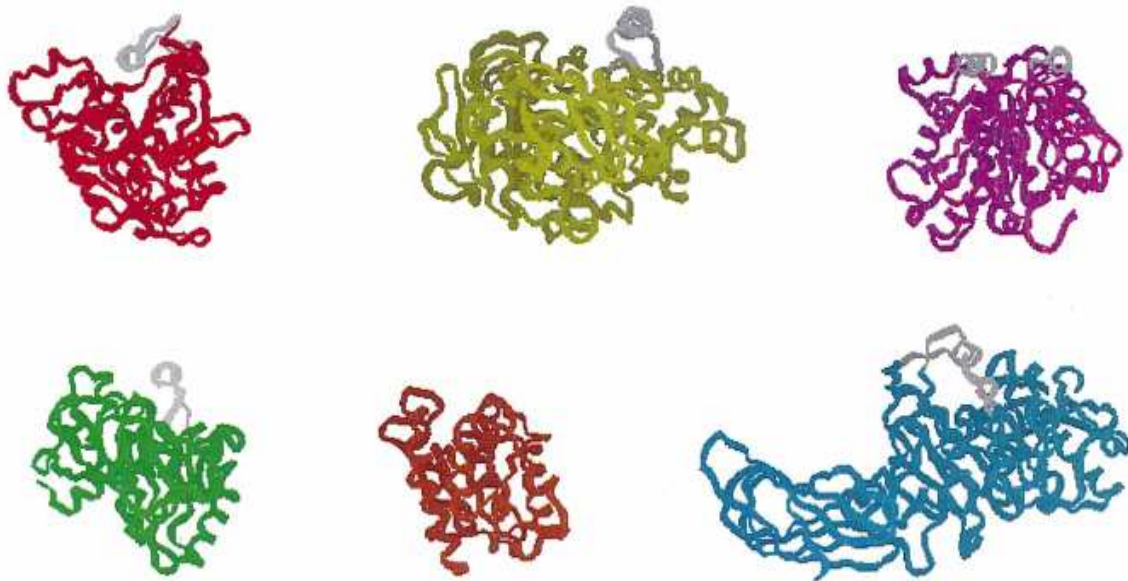


Figura 4. Representación de las estructuras de varias lipasas. Arriba de izquierda a derecha: *Pseudomonas glumae*, *Cándida rugosa* y *Cándida Antarctica B.* Debajo de izquierda a derecha: *Huminícola lanuginosa*, *Fusarium solani pisi* y la lipasa pancreática humana. La tentativa de ubicación del sitio activo de la enzima es señalado de color gris [17].

La estabilidad térmica de las lipasas está relacionada con la estructura, la cual también se ve influenciada por factores ambientales tales como el pH y la presencia de iones metálicos [17].

1.3.1 Lipasa de *Cándida rugosa*.

La lipasa de *Candida Rugosa* se produce mediante un procedimiento de fermentación con la levadura del género *Cándida* donde el control ambiental de diferentes factores en el medio de fermentación es el proceso más importante a seguir, como el control de la fuente de carbono y nitrógeno y las condiciones de aireación, utilizando diferentes estrategias de operación. Así una alternativa importante es la monitorización prácticamente completa de la fermentación que consiste en el seguimiento en línea de la actividad enzimática y de las velocidades de consumo de oxígeno y de producción de CO₂ mediante espectrometría de masas. Esta lipasa es muy isoforme lo que le proporciona diferencias muy sutiles en las propiedades catalíticas de cada una de sus estructuras [18].

En la figura 5 se muestra la representación que se le ha asignado a lipasa de *Cándida rugosa*, donde la ubicación del sitio activo se encuentra remarcado.

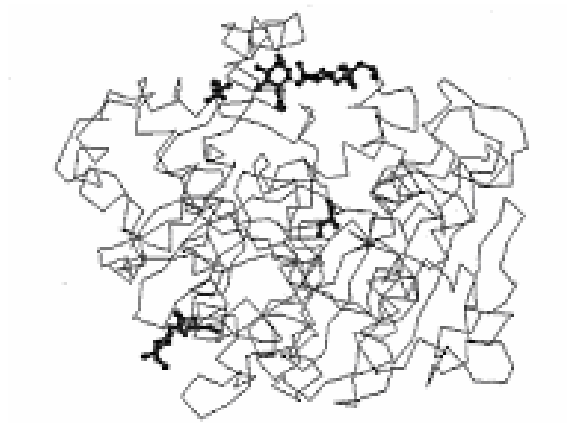


Figura 5. Representación espacial de la lipasa de *Cándida rugosa* [18].

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ACTIVACIÓN DE LIPASA DE *CÁNDIDA RUGOSA*.

La activación de la lipasa de *Cándida Rugosa* se llevó a cabo implementando dos protocolos para tal fin, el primero hace uso del sulfato de sodio y el otro de un éter corona.

La realización de los objetivos planteados en este trabajo fueron llevados a cabo en el laboratorio de alimentos II y en el Laboratorio de procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.

Equipos: un baño termostataado para mantener una temperatura constante de 40°C en todos los ensayos y el liofilizador piloto que se encuentra en el Laboratorio de alimentos II.

La lipasa de *Cándida rugosa* utilizada es identificada como, Lipase AYS “AMANO”, la ficha técnica completa de esta enzima puede ser consultada en el Anexo B.

2.1.1 Activación de la lipasa de *Cándida rugosa* por medio de sulfato de sodio [13].

En este procedimiento el fin de agregarle sulfato de sodio a la enzima es el de ser un *Lyoprotectant* (agente protector de la estructura de la enzima en la liofilización), además de cumplir con la condición de pertenecer al grupo de las sales cosmotrópicas. El procedimiento seguido se describe a continuación:

- Se tomaron 10 mg de enzima y se disolvieron en 1 ml de solución *buffer* (fosfato de sodio de concentración 20mM (milimolar) y con un pH de 7,4).
- Después se adicionaron 19 ml de la solución de sulfato de sodio (0.658 M).
- Se congeló a -20°C.
- Se liofilizó durante 30 horas a -60°C y 2.1 mmbar (milibares).

2.1.2 Activación de la lipasa de *Cándida rugosa* por medio de un éter corona [19].

El éter corona utilizado fue el 18-*crown*-6 el cual fomenta un aumento de los sitios activos de la enzima. El protocolo de activación seguido con este éter corona fue el siguiente:

- Se tomaron 10 mg de enzima y se disolvieron en 1 ml de solución *buffer* (fosfato de sodio de concentración 20mM y con un pH de 7,4).
- Después se agregó el 18-*crown*-6 en la siguiente proporción, 0.08 g de *crown ether*/g de enzima.
- Se congeló a -20°C .
- Posteriormente se liofilizó durante 30 horas a -60°C y 2,1 mmbar.

2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad enzimática se le determinó tanto a la enzima libre como a cada uno de los preparados enzimáticos activados, en la reacción de esterificación de ácido oleico con n-butanol en isooctano. Para la determinación de esta actividad enzimática se procedió a medir la cantidad de ácido oleico presente en el medio de reacción, por medio de la prueba denominada valor ácido (ver Anexo A); las unidades con las cuales se expresó la actividad enzimática fueron μmoles de ácido oleico esterificados por cantidad de enzima (en miligramos) utilizada como catalizador y por hora, para un medio de reacción compuesto de soluciones de ácido oleico 0.1 M y de n-butanol 0.1 M en isooctano y un contenido de agua aproximado de 0.04 a 0.05 %.

2.2.1 Prueba del valor ácido [20].

Para la implementación de este método se siguió el protocolo de la AOCS (*American Oil and Chemical Society*), método oficial Cd 8-63 (ver Anexo A). El valor ácido se define como la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en un gramo de muestra. Con muestras que no contienen ácidos libres sino otros tipos de ácidos como los grasos, el valor ácido puede ser directamente convertido a un porcentaje de ácidos grasos presentes en la muestra, dividiendo este resultado por un factor que para el ácido oleico es de 1.99.

2.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO REACCIONANTE.

La preparación del medio reaccionante se hizo contando con los siguientes reactivos y siguiendo la metodología de Hsu, A.-F., Jones, K. C., Marmer, W. N. y Foglia [21]:

- Ácido Oleico
- n-butanol.
- Isooctano
- Lipasa de *Candida rugosa*.

Se mezcló el ácido oleico con n-butanol en isooctano saturado de agua, como disolvente hidrofóbico y con Lipasa de *Candida rugosa* como catalizador de la reacción. El producto de esta reacción de esterificación es el oleato de butilo, como se describe de forma esquemática en la Figura 6.

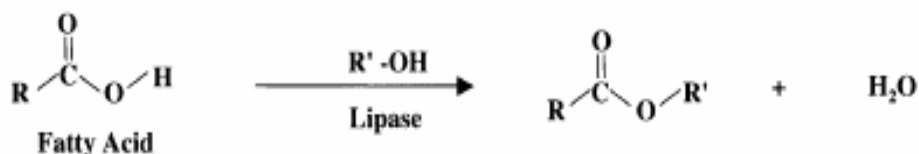


Figura 6. Representación esquemática de la esterificación propuesta para medir la actividad enzimática.

Para evitar que la enzima se desnaturalizara se agregó primero a la solución de ácido oleico y después se le adicionó la solución de alcohol. La temperatura de reacción fue de 40°C, la cual se controló por medio de un baño termostataado con una agitación constante de 70 rev/min.

3. RESULTADOS

La enzima liofilizada con sulfato de sodio quedó con un contenido de humedad aproximado de 9%, el cual se determinó por un análisis de Karl-Fisher, en las Figuras 7 y 8 se muestra la enzima liofilizada obtenida con este procedimiento.



Figura 7. Enzima liofilizada con sulfato de sodio.



Figura 8. Enzima liofilizada con sulfato de sodio (vista cercana)

La enzima liofilizada con el 18-*crown*-6 quedó con un contenido de humedad aproximado de 7,8%, el cual se determinó por un análisis de Karl-Fisher, en las Figuras 9 y 10 se muestra la enzima liofilizada obtenida con este procedimiento.



Figura 9. Enzima liofilizada con 18-*crown*-6

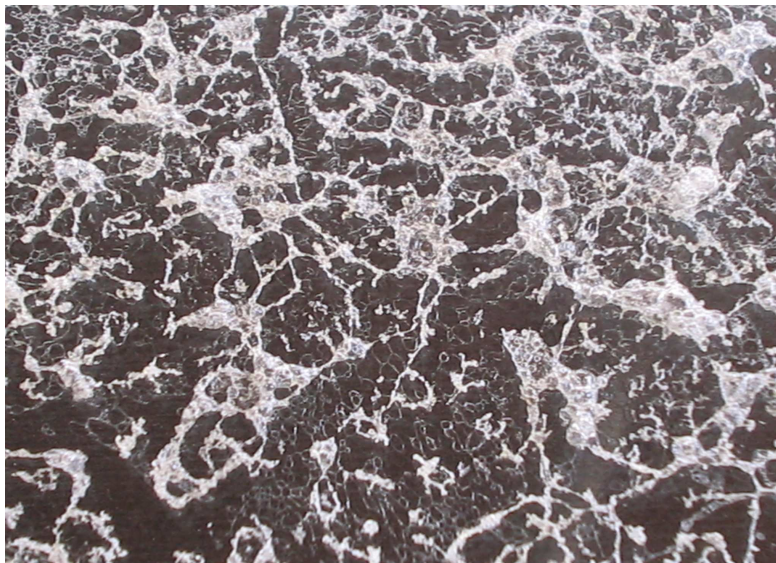


Figura 10. Enzima liofilizada con 18-crown-6 (vista cercana)

Ambos productos liofilizados fueron almacenados a -20°C .

3.1 ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDO OLEICO CON N-BUTANOL EN ISOOCTANO.

Esta esterificación se llevó a cabo utilizando como catalizador tanto la enzima libre así como cada uno de los preparados enzimáticos activados, también se realizó un ensayo de esta esterificación sin presencia de catalizador, todos estos ensayos fueron realizados a una temperatura de 40°C en un medio de reacción de ácido oleico 0.1 M en isooctano y n-butanol 0.1 M en isooctano. Cada uno de estos ensayos se efectuó por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los mismos, los resultados son mostrados en las Tablas 3, 4, 5 y 6.

Tabla 3. Esterificaciones realizadas sin catalizador.

Tiempo (horas)	Gramos de ácido oleico esterificados		Promedio
	Ensayo 1	Ensayo 2	
0	0	0	0
2	0,010	0,006	0,0080
4	0,015	0,018	0,0175
6	0,027	0,030	0,0285

Tabla 4. Esterificaciones realizadas con aproximadamente 10 mg de enzima libre.

Tiempo (horas)	Gramos de ácido oleico esterificados		Promedio
	Ensayo 1	Ensayo 2	
0	0	0	0
2	0,020	0,022	0,021
4	0,049	0,057	0,053
6	0,066	0,064	0,065

Tabla 5. Esterificaciones realizadas con aproximadamente 4,2 mg de enzima activada con sulfato de sodio.

Tiempo (horas)	Gramos de ácido oleico esterificados		Promedio
	Ensayo 1	Ensayo 2	
0	0	0	0
2	0,012	0,009	0,0105
4	0,033	0,029	0,0310
6	0,053	0,049	0,0510

Tabla 6. Esterificaciones realizadas con aproximadamente 8 mg de enzima activada con 18-crown-6.

Tiempo (horas)	Gramos de ácido oleico esterificados		Promedio
	Ensayo 1	Ensayo 2	
0	0	0	0
2	0,024	0,019	0,0215
4	0,050	0,048	0,0490
6	0,060	0,055	0,0575

Así los resultados promediados de estos ensayos generan la Figura 11.

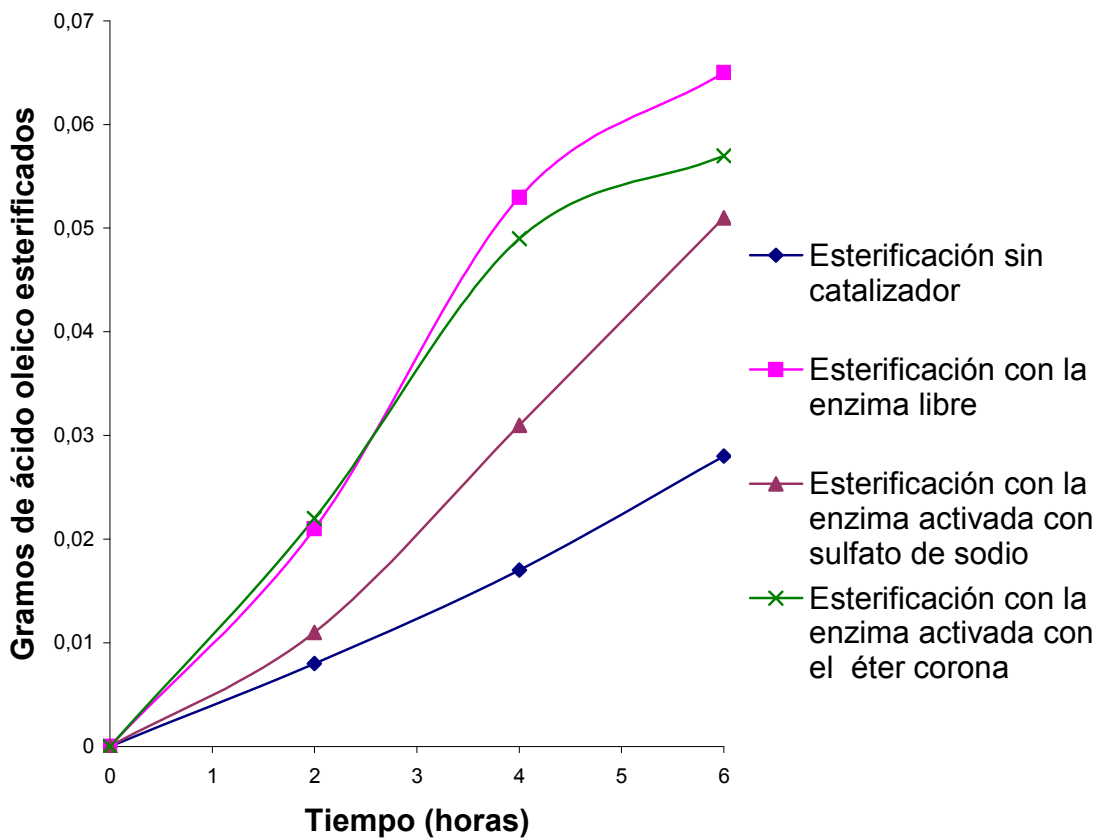


Figura 11. Promedio de los resultados obtenidos para cada esterificación.

3.2 CÁLCULO EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Para efectuar este cálculo se realizaron gráficas de μ moles de ácido oleico esterificadas por mg de enzima utilizada contra tiempo, la dispersión de los datos mostró una tendencia lineal por lo tanto la pendiente de esta recta será la actividad enzimática, dando unidades de μ moles de ácido oleico esterificadas/mg de enzima*hora, el análisis estadístico para esta aproximación lineal fue hecho en el paquete estadístico STATGRAPHICS el cual se muestra en Anexo C.

Las Figuras 12, 13 y 14 muestran la dispersión de los datos experimentales y la aproximación lineal hecha para la esterificación con: 10 mg enzima libre, 4,2 de enzima activada con el sulfato de sodio y con 8 mg de enzima activada con el 18-crown-6, respectivamente; donde la pendiente de cada recta es el valor de la actividad enzimática.

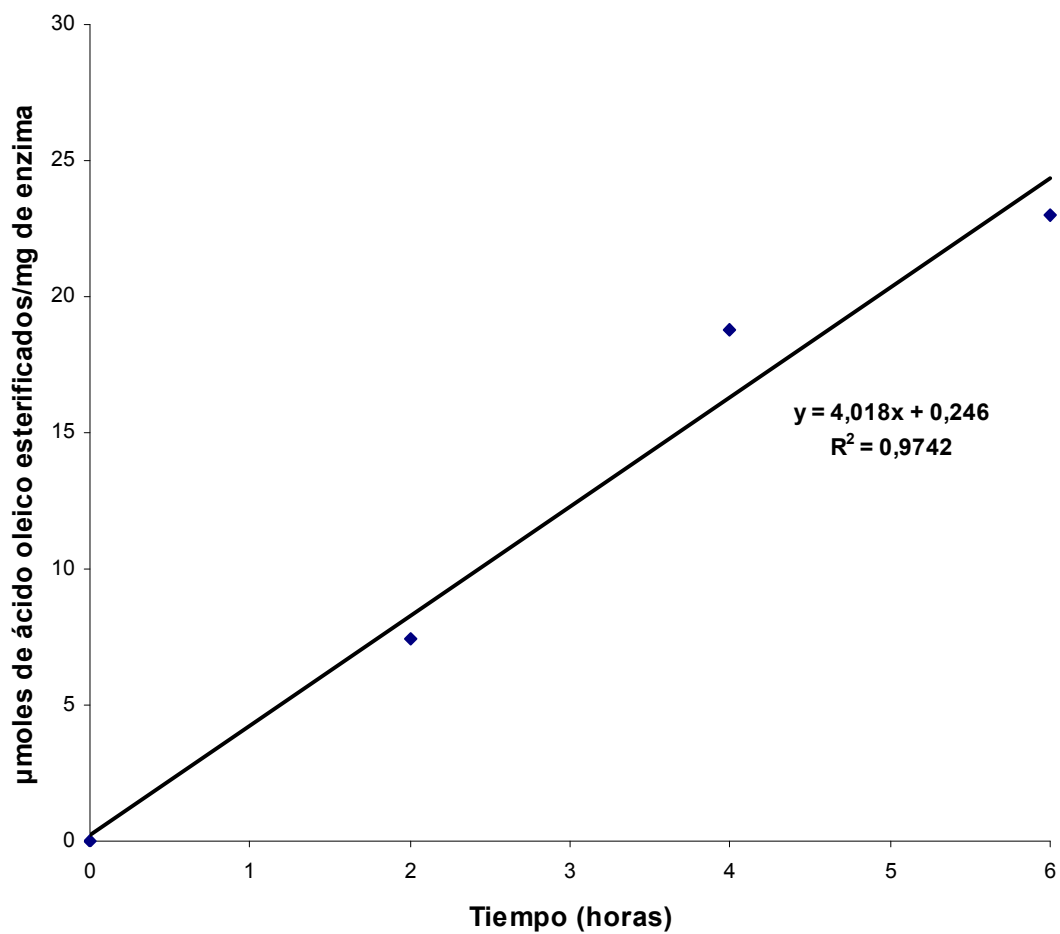


Figura 12. Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima libre.

Del valor de la pendiente se observa que la actividad enzimática da un resultado de $4,018 \mu\text{moles de ácido oleico esterificadas/mg de enzima}\cdot\text{hora}$, para la enzima libre.

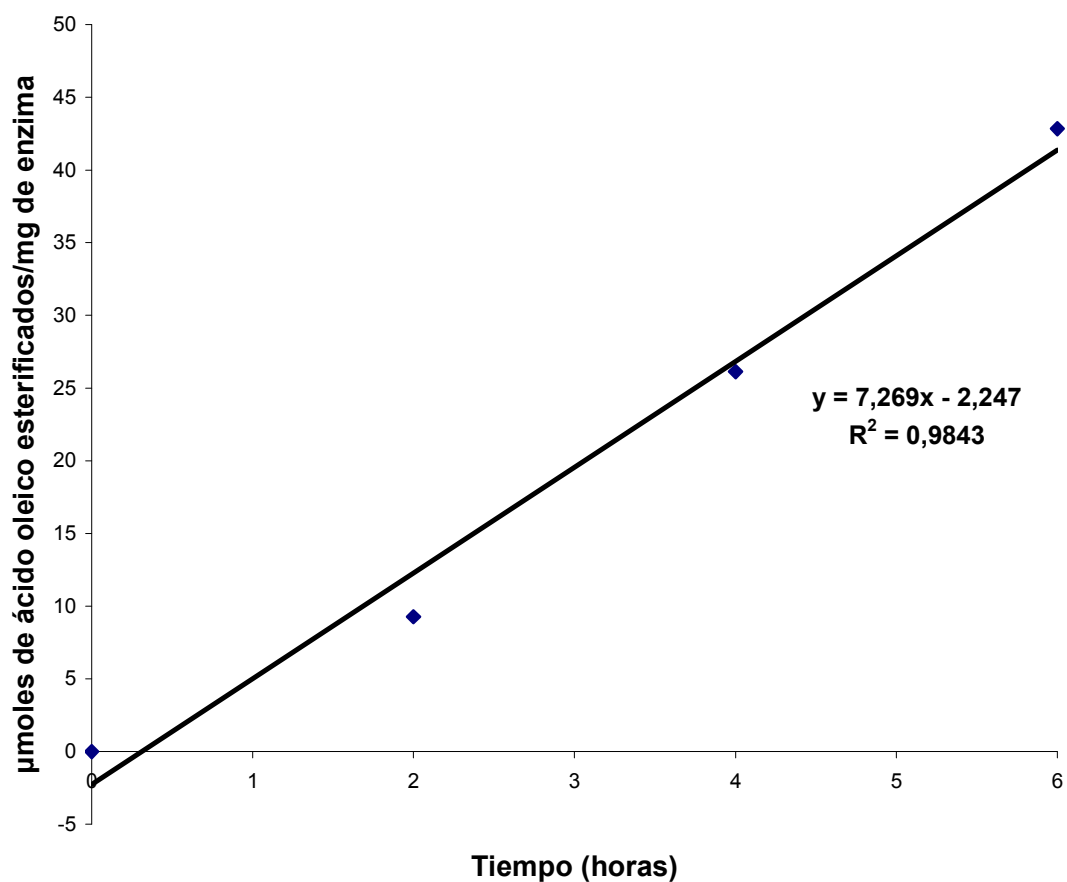


Figura 13. Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima activada con sulfato de sodio.

Arrojando un resultado de la actividad enzimática de 7,269 µmoles de ácido oleico esterificadas/mg de enzima*hora, que es el valor de la pendiente para ésta recta, para la enzima activada con sulfato de sodio.

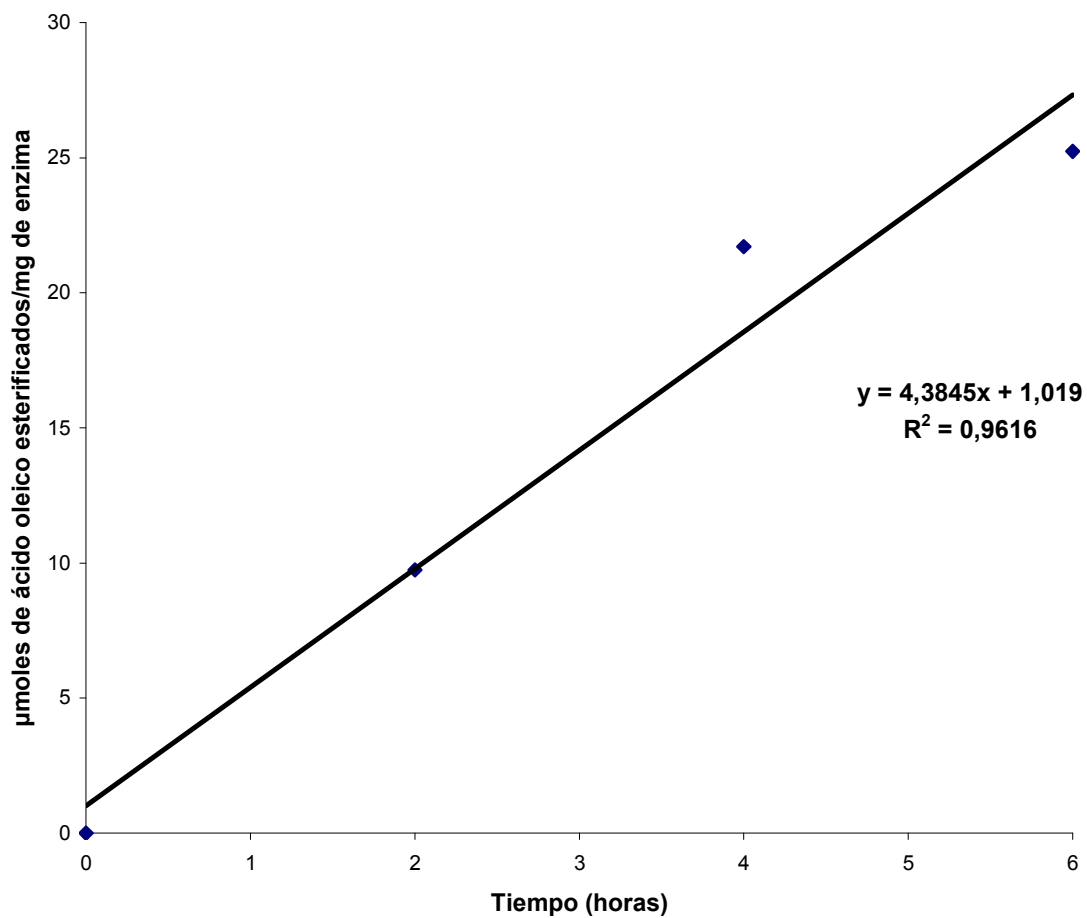


Figura 14. Representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima activada con 18-crown-6.

Cuyo valor de la pendiente arroja un resultado de la actividad enzimática de 4,3845 μmoles de ácido oleico esterificadas/mg de enzima*hora, para la enzima activada con 18-crown-6.

4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La aplicación de ambos protocolos de activación se pudo llevar a cabo debido a que ambas técnicas obedecen a procedimientos de una fácil aplicación en el laboratorio

Las Figuras 7 y 9 muestran ambos productos liofilizados, los cuales como se reportó; quedaron con un bajo contenido de humedad, aunque cabe anotar que fue más fácil la utilización de la enzima activada con el 18-*crown*-6, debido a que como se reportó, la enzima liofilizada con sulfato de sodio está presente con un gran exceso de sal; lo que dificulta la agitación cuando se está llevando a cabo la reacción.

En la Figura 11 se muestra como la cantidad de gramos de ácido oleico esterificados en la reacción sin catalizador son en efecto menores que los esterificados ya sea con la enzima libre o con cada uno de los preparados enzimáticos activados, en el tiempo de seis horas, demostrándose así el efecto de catalizador que tiene la enzima en la reacción.

En general la actividad enzimática de la enzima libre y de cada uno de los preparados enzimáticos dieron los resultados esperados; ya que se esperaba un mayor aumento en la actividad enzimática de la enzima activada con el sulfato de sodio, lo que al final se pudo comprobar; teniendo en cuenta que ésta observación sólo se puede hacer para el tiempo de seis horas y para las condiciones experimentales planteadas.

Los resultados arrojados de la actividad enzimática de la enzima libre y de los preparados enzimáticos se pueden considerar confiables para el intervalo de tiempo trabajado, como se explica a continuación: la Figura 12 muestra la representación gráfica para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima libre y el análisis estadístico arrojó que el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.05, así el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% y el valor del R^2 indica que el modelo explica el 97.4185% de la variabilidad de la variable dependiente. Para la enzima activada con sulfato de sodio el análisis estadístico dio que el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.01, así el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 99% y el valor del R^2 indica que el modelo explica el 98.432% de la variabilidad de la variable dependiente (situación representada en la Figura 13) y en la Figura 14 se muestra la representación lineal para el cálculo de la actividad enzimática de la enzima activada con 18-*crown*-6 dando el análisis estadístico que el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.05, así el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% y el valor del R^2 indica que el modelo explica el 96.1648% de la variabilidad de la variable

dependiente. La información completa del análisis estadístico puede ser consultada en el Anexo C.

En la Tabla 7 se resumen estos resultados además del reporte de cuanto más se activó la enzima con los dos procedimientos seguidos con respecto a la enzima libre.

Tabla 7. Actividad enzimática de cada uno de los preparados enzimáticos activados.

Presentación de la enzima	Actividad	Número de veces más activa
Libre	4,018	1
Activada con sulfato de sodio	7,269	1,8
Activada con el 18-crown-6	4,3845	1,1

Indicando en principio que el mejor método de activar la lipasa de *Cándida rugosa* utilizada, es el que hace uso del sulfato de sodio; teniendo en cuenta que ésta observación sólo es correcta para las condiciones en las que se realizaron cada uno de los ensayos de esterificación, ya que no se sabe la influencia que tendría la utilización de la misma cantidad de enzima libre, activada con sulfato de sodio y activada con 18-crown-6 en el valor de la actividad enzimática.

Aunque se puede decir que la enzima no se activó lo suficiente; ya que en la literatura reporta un aumento de actividad que oscila en el rango de 10 a 100 veces aproximadamente, tal situación se puede explicar con las siguientes razones:

- El almacenamiento de la enzima se limitó solamente a mantenerla a -20°C, sin controlar otras variables como por ejemplo su humedad.
- Las condiciones de liofilización que se lograron no se aproximaron a las reportadas en la literatura, tal circunstancia obedeció a las características de operación del liofilizador que se encuentra en el laboratorio, ya que este no está diseñado para operar a condiciones de presión y temperatura más bajas.
- La manipulación y almacenamiento de los productos liofilizados fue difícil, debido a que estos productos ganaban humedad muy rápidamente haciendo difícil su uso; por lo que se hizo necesario liofilizar muchas veces para contar con producto fresco siempre que se iba a realizar un ensayo.

Éstos resultados abren la posibilidad de llevar a cabo una activación de la lipasa de *Cándida rugosa* con la cual se logre un aumento de la actividad enzimática considerable para así emplearla en una reacción de mayor valor comercial como lo es transesterificación de aceites comerciales, cuyo producto es conocido como Biodiesel.

5. CONCLUSIONES

- Se activó lipasa de *Candida rugosa* por medio de dos métodos, uno con una co-liofilización con sulfato de sodio y el otro con una co-liofilización con 18-*crown-6*, ambos aditivos son agentes *Lyoprotectants*, las condiciones de liofilización fueron -60°C y 2.1 mmbar.
- A ambos preparados enzimáticos activados se les determinó la actividad enzimática en la esterificación de ácido oleico con n-butanol en isooctano, cumpliendo el isooctano la condición de ser un solvente hidrofóbico.
- Se le determinó también la actividad enzimática a la enzima libre en el mismo medio de reacción y así se pudo comprobar que la enzima activada con sulfato de sodio y con 18-*crown-6* presentaba unos valores de 1.8 y 1.1 veces de más actividad enzimática respectivamente, en comparación con la enzima libre; para las condiciones experimentales planteadas en el presente trabajo.
- Aunque no se puede concluir de manera absoluta que el mejor método de activación sea el que utiliza sulfato de sodio, por no haber utilizado la misma cantidad de catalizador en todos los ensayos con la enzima libre, activada con sulfato de sodio y activada con el 18-*crown-6*, se puede notar; sin embargo, que éste método apunta a ser el mejor; ya que fueron en los ensayos realizados con ésta enzima donde se obtuvo un mayor aumento de la actividad enzimática, aún bajo la condición de ser en éstos donde se utilizó la cantidad más baja de catalizador, 4,2 mg; a diferencia de 10 mg con la enzima libre y 8 mg con la enzima activada con el éter corona.
- El producto liofilizado obtenido con el 18-*crown-6*, fue el de más fácil utilización en la práctica, ya que la enzima liofilizada con sulfato de sodio está presente con un exceso de sal, lo que dificulta la agitación cuando se está llevando a cabo la reacción.

RECOMENDACIONES

- Realizar los ensayos de esterificación con la enzima libre y activada siempre con la misma cantidad de catalizador, para saber la verdadera influencia que tendría la cantidad de catalizador en la actividad enzimática.
- Analizar la variación que tendría la presencia de agua en el medio de reacción, en el valor de la actividad enzimática.
- Realizar ensayos de esterificación a diferentes temperaturas, para saber la influencia que tiene ésta en la enzima cuando se activa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Karl-Erich Jaeger y Thorsten Eggert. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:390–397.
2. Ashok Pandey, Sailas Benjamin, Carlos R. Soccol, Poonam Nigam,, Nadia Krieger y Vanete T. Soccol. Review. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 1999, 29:119-131.
3. Rohit Sharma. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001, 19:627-662.
4. Munishwar N. Gupta y Ipsita Roy. Enzymes in organic media: forms, functions and applications. *Eur. J. Biochem* 2004, 271:2575-2583.
5. Alexander Klivanov. Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Tibtech* 1997, 16:97-101.
6. Peter J. Halling. Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions. *Current Opinion in Chemical Biology* 2000, 4:74-80.
7. Aleksey Zaks y Alexander M. Klivanov. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *The journal of biology chemistry* 1988, (7) 263:3194-3201.
8. Aleksey Zaks y Alexander M. Klivanov. The effect of water on enzyme actino in organic media. *The journal of biology chemistry* 1988, (17) 263:8017-8021.
9. Sun Bok Lee y Ki-Joo Kim. Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *Journal of fermentation and bioengineering* 1995, (5) 79:473-478.
10. Sven Panke y Marcel G. Wubbolts. Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:111-116.
11. Alexander M. Klivanov. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001, (11) 409:241-246.
12. Moo-Yeal Lee y Jonathan S Dordick. Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:376–384.
13. Michael T. Ru, Scott Y. Hirokane, Andy S. Lo, Jonathan S. Dordick, Jeffrey A. Reimer, y Douglas S. Clark. On the Salt-Induced Activation of Lyophilized Enzymes in Organic Solvents: Effect of Salt Kosmotropicity on

- Enzyme Activity. *Journal of American Chemical Society* 2000, (8) 122:1565-1571.
14. Michael T. Ru, Jonathan S. Dordick, Jeffrey A. Reimer y Douglas S. Clark. Optimizing the SALT-induced activation of enzymes in organic solvents: effects of lyophilization time and water content. *Biotechnology and bioengineering* 1999, (2) 63:233-241.
 15. Dirk-Jan van Unen, Johan F.J. Engbersen, David N. Reinhoudt. Studies on the mechanism of crown-ether-induced activation of enzymes in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001, 11:877-882.
 16. Yurie Mine, Kimitoshi Fukunaga, Kyoko Itoh, Makoto Yoshimoto, Katsumi Nakao y Yoshiaki Sugimura. Enhanced enzyme activity and enantioselectivity of lipases in organic solvents by crown ethers and cyclodextrins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003, (5) 95:441-447.
 17. Allan Svendsen. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1543:223-238.
 18. Stefania Brocca, Mattias Persson, Ernst Wehtje, Patrick Adlercreutz, Lilia Alberghina y Marina Iotti. Mutants provide evidence of the importance of glycosidic chains in the activation of lipase 1 from *Candida rugosa*. *Protein Science* 2000, 9:985-990.
 19. Mattias Persson, Irina Mladenoska, Ernst Wehtje, Patrick Adlercreutz. Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 31: 833-840.
 20. *American Oil Chemists' Society* (1998) Acid value of fats and oils, in AOCS Book of official methods, American Oil Chemist's Society, Champaign, IL.
 21. An-Fei Hsu, Kerby Jones, Thomas A. Foglia y William N. Marmor. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnol. Appl. Biochem* 2002, 36:181-186.

ANEXO A

PRUEBA DEL VALOR ÁCIDO.

Preparación de los reactivos necesarios:

- Adicionar 6 g de KOH a un litro de agua, calentar durante 10 minutos con agitación constante, adicionar 2 gramos de hidróxido de bario, calentar otros 10 minutos adicionales, enfriar, tapar y almacenar por al menos ocho horas. Estandarizar con ftalato ácido de potasio usando fenolftaleína como indicador.
- Una mezcla solvente que consiste de volúmenes iguales de alcohol isopropílico y tolueno.
- La solución indicadora de fenolftaleína debe ser al 1%.

Prueba del valor ácido:

- Adicionar 2 ml de fenolftaleína a 125 ml de la mezcla solvente y neutralizar con el KOH.
- Adicionar 125 ml de la mezcla solvente neutralizada a la muestra problema y titular con el KOH.

Los cálculos se realizan de la siguiente forma:

Valor ácido, mg de KOH en la muestra = $((A-B) \cdot N \cdot 56.1) / W$.

Donde:

A: ml de KOH usados en la titulación de la muestra problema.

B: ml de KOH usados en la titulación de la mezcla solvente.

N: normalidad del KOH estandarizado.

W: gramos de muestra problema.

Para expresar este resultado en porcentaje de ácido oleico, se divide entre 1,99.

ANEXO B

FICHA TÉCNICA DE LA LIPASA DE *CÁNDIDA RUGOSA* UTILIZADA.

ESPECIFICACIONES.

Metales pesados (como el Pb): No más de 8%.
Arsénico (como As_2O_3): No más de 30 $\mu\text{g/g}$.
Hongos: No más de 100/g.
Coliformes: No más de 30/g.
E. coli: Negativo/25 g.
Salmonella: Negativo/25 g.

CARACTERÍSTICAS.

Granulada de color amarillo parduzco.
Peso molecular: 64000.
Punto isoeléctrico: 4,3.
Condiciones de inactivación: 85°C durante 10 minutos.

APLICACIONES.

En la industria, para la hidrólisis de grasas y aceites para el desarrollo del sabor.

HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD PARA EL MATERIAL DE ENZIMA.

Fecha de publicación: 01.03.2003
Número: 8005-0-06
Pagina 3/8 (Español)

1. IDENTIFICACIÓN DE LA PREPARACIÓN Y DE LA EMPRESA

Nombre comercial del producto: Lipase AYS "Amano"
Descripción: Preparación de enzima en polvo

Fabricante: AMANO ENZYME INC.
2-7, 1-Chome, Nishiki, Naka-ku Nagoya 460-8630, JAPAN
Teléfono de emergencia: Japón (Sede): +81-(0)-52-211-3032
USA: +1-847-649-0101/(800-446-7652)
Europa: +44-(0)-1608-644677

2. INFORMACIÓN SOBRE LOS INGREDIENTES

Caracterización química del componente activo: Proteína de enzima
Sinónimos: Lipase
Número IUB: 3.1.1.3
Número CAS: 9001-62-1
Número EINECS: 232-619-9
Clasificación de la preparación: Xn (dañina), R42
Límite de exposición: No establecido (TLV: No establecido)

3. IDENTIFICACIÓN DE PELIGRO

La repetida inhalación de polvo de enzima puede inducir sensibilización y puede causar reacciones alérgicas en individuos sensibilizados. El contacto con la piel puede causar irritación.

El Límite de Exposición permisible de la OSHA, el valor umbral límite de la ACGIH, el Programa NTP-Carcinógeno y el Programa IARC-Carcinógeno no están disponibles.

4. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS

Contacto con la piel: Lave la piel con mucha agua.

Contacto con los ojos: Enjuague los ojos con mucha agua.

Ingestión: Enjuague a fondo la boca y la garganta con agua. Beba agua. Si se produjese irritación, consulte al médico.

Inhalación: Evacue el área expuesta. Si ocurren síntomas de irritación o sensibilización (falta de respiración, respiración sibilante o tos trabajosa) consulte al médico.

5. MEDIDAS CONTRA INCENDIO

Protección contra Incendios y explosiones: No hay medidas especiales

Medios adecuados para extinguir el fuego: Agua, espuma

Medios No adecuados: Ninguno

Peligros especiales de exposición: Ninguno

El Punto de inflamabilidad, los Límites inflamables, y la Temperatura de Encendido Automático, no aplican.

6. MEDIDAS PARA LA LIBERACIÓN ACCIDENTAL

Se deberá limpiar inmediatamente la superficie donde se haya derramado alguna preparación. Evite que se acumule polvo. Utilice de preferencia medios mecánicos como una aspiradora con filtro potente o de gran eficacia. Eche el resto por el desagüe usando copiosas cantidades de agua. Evite salpicar y el lavado de alta presión (evite la formación de aerosoles). Asegúrese que haya suficiente ventilación. Lave las ropas contaminadas. Deseche la bolsa del lavado conforme al punto 13. Si la persona que hace la limpieza no tiene bolsa, deshágase del contenido utilizando absoluta Protección. Véase el punto 8 y de acuerdo con el punto 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAJE

Evite la acumulación de polvo. Evite salpicar y el lavado de alta presión. Asegúrese que haya buena ventilación en la habitación cuando manipula la preparación. Guarde el contenedor en un sitio frío y seco.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL

Equipo Protector Personal Recomendado

Protección respiratoria: Aparato respiratorio aprobado para este tipo de polvo y concentraciones potenciales en el aire, por ej. Una máscara que cubra completamente el rostro.

Protección de las manos: Guantes impermeables, como guantes de látex

Protección a los ojos: Anteojos protectores o visera/máscara protectora para los ojos

Otro tipo de Protección: Mameluco u otra ropa normal de trabajo

9. FÍSICA Y REACTIVIDAD

Apariencia: De polvo blancuzco (color hueso) a marrón (café)

Olor: Pequeño olor

pH: No aplica

Solubilidad en agua: Soluble

Propiedades explosivas: No establecidas

Otros: No se dispone de datos sobre: el punto de ebullición, la presión del vapor, la densidad del vapor, la gravedad específica, el porcentaje de volatilidad por volumen ni del índice de evaporación.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Este material es estable bajo condiciones normales de uso

Las condiciones que se deben evitar: Ninguna

Materiales que se deben evitar: Ninguno

Productos de descomposición peligrosos: Ninguno

Polimerización peligrosa: No ocurre

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

La inhalación de aerosoles o polvo como consecuencia de la manipulación inapropiada puede inducir a la sensibilización y puede causar reacciones alérgicas en individuos con mucha sensibilidad a las preparaciones de enzima. El contacto con la piel puede causar irritación. La preparación no es tóxica y la ingestión de una pequeña cantidad no se considera un peligro, pero refiérase al punto 4.

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

La preparación es biodegradable. No es dañina para los organismos acuáticos o marinos cuando se disuelve con copiosas cantidades de agua. Véase el punto 6.

13. CONSIDERACIONES PARA SU DESECHO

No se necesitan métodos de desecho especiales, excepto aquellas en concordancia con las regulaciones de la administración local. En caso de derrame, recoja cuidadosamente y disuelva en agua antes de desechar. Véase punto 6.

14. INFORMACIÓN SOBRE EL TRANSPORTE

No.de la ONU: No aplica

Marítima: No aplica

Por carretera/ferrocarril: No aplica

Aérea: No aplica

15. INFORMACIÓN REGULADORA

La preparación no contiene ingredientes listados como sustancias peligrosas en el Anexo I de la Directiva de la CEE 67/548. Sin embargo, es una preparación peligrosa dentro del significado de la regulación 88/379 de la CEE.

Etiquetado: Xn (dañino)

R-42: Puede causar sensibilización por inhalación

S-22/S-23: No respire el polvo aerosol.

16. INFORMACIÓN ADICIONAL

La información contenida en esta Hoja de Datos de Seguridad para el Material de Enzima, se considera cierta y correcta a la hora de imprimirse. No obstante, la exactitud o totalidad de la información y cualquier recomendación o sugerencias que se hagan sin garantía o caución.

Debido a que las condiciones están fuera del control de nuestra compañía, es de responsabilidad del usuario determinar las condiciones del uso seguro de esta preparación. La información en esta hoja no representa las especificaciones analíticas, para las cuales refiérase a nuestra Especificación.

El formato de esta Hoja de Datos de Seguridad para el Material de Enzima cumple con la Directiva de la CEE 91/55/CEE, y está recomendada por la Asociación de Fabricantes de Productos de Enzima de Fermentación "AMFEP".

ANEXO C

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS REGRESIONES LINEALES OBTENIDAS.

Enzima libre.

Análisis de la regresión

Parámetro	Estimado	Error estándar	Valor T	P-Valor
Constante	0.246	1.7305	0.142155	0.9
Variable independiente	4.018	0.462496	8.68763	0.013

Análisis de varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados promedio	Relación F	P-Valor
Modelo	322.886	1	322.886	75.47	0.013
Residuo	8.55612	2	4.27806		

Total 331.443 3

$R^2=97.4185\%$

Error estándar=2.06835

Como el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.05, el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%.

El valor del R^2 indica que el modelo explica el 97.4185% de la variabilidad de la variable dependiente.

Enzima activada con sulfato de sodio.

Análisis de la regresión

Parámetro	Estimado	Error estándar	Valor T	P-Valor
Constante	-2.247	2.42731	-0.925717	0.4523
Variable independiente	7.269	0.648725	11.2051	0.0079

Análisis de varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados promedio	Relación F	P-Valor
Modelo	1056.77	1	1056.77	125.55	0.0079
Residuo	16.8338	2	8.41689		

Total 1073.6 3

$R^2=98.432\%$

Error estándar=2.90119

Como el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.01, el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 99%.

El valor del R^2 indica que el modelo explica el 98.432% de la variabilidad de la variable dependiente.

Enzima activada con 18-crown-6.

Análisis de la regresión

Parámetro	Estimado	Error estándar	Valor T	P-Valor
Constante	1.019	2.31662	0.439866	0.703
Variable independiente	4.3845	0.619142	7.08157	0.0194

Análisis de varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados promedio	Relación F	P-Valor
Modelo	384.477	1	384.477	50.15	0.0194
Residuo	15.3335	2	7.66674		

Total 399.81 3

$R^2=96.1648\%$

Error estándar=2.76889

Como el P-valor calculado del análisis de varianza es menor de 0.05, el modelo es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95%.

El valor del R^2 indica que el modelo explica el 96.1648% de la variabilidad de la variable dependiente.