

Actividad enzimática de xilanasa inmovilizada en perlas de alginato de sodio en la hidrogenación de citral en medio líquido

Enzymatic activity of xylanase immobilized in sodium alginate beads in citral hydrogenation using liquid medium

María Guadalupe Cortez Ávila*, Alba Nelly Ardilas Arias**, Juan Manuel Salgado Román*, Rosa Hernández Soto*, José Alfredo Hernández Maldonado*

RESUMEN

El citral es un aldehído α,β -insaturado, susceptible a reacciones de hidrogenación, produciendo geraniol, nerol y citronelol, compuestos de interés en química fina. Industrialmente, el citral es hidrogenado utilizando catalizadores de metales nobles soportados en TiO_2 . El interés por utilizar biocatalizadores para efectuar esta reacción dada su eficiencia y selectividad se ha incrementado de forma reciente. La inmovilización de biocatalizadores en alginato favorece su estabilidad contra desnaturalizantes químicos y térmicos. La hidrogenación de citral se realizó en medio líquido, utilizando xilanasa inmovilizada (650 mUI/mL) a temperatura y velocidad de agitación constantes. A pH de 5.88 se encontró que la reducción de citral fue mayor al 99.9%, obteniendo nerol, geraniol y citronelal. La concentración de H_2O_2 no influyó de modo significativo en la actividad enzimática, mientras que el pH sí influyó en forma inversamente proporcional. La estabilidad de la matriz de alginato se redujo considerablemente al incrementar el pH. La máxima velocidad de reacción fue a pH de 5.88.

ABSTRACT

Citral is an aldehyde α,β -unsaturated, susceptible to hydrogenation reactions, with the formation of geraniol, nerol and citronellol, compounds with special interest in the fine chemical. Industrially, citral is hydrogenated using noble metal catalysts supported on TiO_2 . The interest in using biocatalysts to carry out this reaction, for its efficiency and selectivity, has increased recently. Biocatalysts immobilization in alginate enhances their chemical and thermal stability against chemical and thermal denaturing. Hydrogenation of citral was carried out in liquid medium using immobilized xylanase (650 mIU/mL). Under controlled conditions of temperature and stirring speed. The reduction of citral obtained was higher than 99.9% at a pH of 5.88; achieving as products: nerol, geraniol and citronellal. The concentration of H_2O_2 had no significant influence on the enzyme activity, on the contrary the pH, inversely influenced. Maximum speed of immobilized xylanase reaction, was obtained at pH 5.88, the stability of the alginate matrix is significantly reduced by increasing the pH.

INTRODUCCIÓN

La hidrogenación es el método más usado en la reducción de compuestos orgánicos para la obtención de diversos productos utilizados en varias industrias y procesos (Daly *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013). Un ejemplo de esto es la hidrogenación selectiva de citral, el cual es la materia prima para la síntesis de iononas, vitaminas A y E. Los compuestos obtenidos de este proceso también son utilizados para la obtención de intermediarios en síntesis orgánica, en la industria química, en la producción de sabores, en la industria farmacéutica, de fragancias y perfumes (Lawrence, 2003; Rojas, Perea & Ortiz, 2009; Somolinos, 2009; Stolle, Gallert, Schmöger & Ondruschk, 2013). El citral, por ser un aldehído α,β -insaturado, presenta reacciones de

Recibido: 26 de junio de 2015
Aceptado: 17 de diciembre de 2015

Palabras clave:

Xilanasa; peróxido de hidrógeno; hidrogenación; citral; inmovilización.

Keywords:

Xylanase; hydrogen peroxide; hydrogenation; citral; immobilization.

Cómo citar:

Cortez Ávila, M. G., Ardilas Arias, A. N., Salgado Román, J. M., Hernández Soto, R., & Hernández Maldonado, J. A. (2016). Actividad enzimática de xilanasa inmovilizada en perlas de alginato de sodio en la hidrogenación de citral en medio líquido. *Acta Universitaria*, 26(1), 48-55. doi: 10.15174/au.2016.852

* Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Instituto Politécnico Nacional (UPIIG-IPN), Campus Guanajuato. Av. Mineral de Valenciana núm. 200, Industrial Puerto Interior, Silao de la Victoria, Guanajuato, México, C.P. 36275. Tel.: (55) 57-29-60-00, ext. 81416, fax: 81450. Correos electrónicos: lupis89_3@hotmail.com; albanellya@gmail.com; manuelroman272@hotmail.com; rosyhdez@yahoo.com; jahmuam@gmail.com

** Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Cra. 48 núm. 7-151, Medellín-Colombia.

hidrogenación con la formación de alcoholes insaturados como geraniol, nerol y citronelol (figura 1). Para llevarlo a cabo, en la hidrogenación se han utilizado varios catalizadores con base en platino (Pt), iridio (Ir), oro (Au), entre otros (Bailón-García, Carrasco-Marín, Pérez-Cadenas, Maldonado-Hódar, 2014; Díaz *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Rodríguez, De los Reyes, Viveros & Montoya, 2013; Rojas, Martínez, Mancípe, Borda & Reyes, 2012; Zhao, Xu, Li & Wang 2014), soportados en óxidos reducibles, como TiO_2 , CeO_2 y Fe_2O_3 (Rojas, Borda & Valencia, 2005), que pueden proporcionar oxígeno en las reacciones de oxidación, óxidos mixtos, como Al_2O_3 - SiO_2 y CeO_2 - ZrO_2 (Santiago-Pedro, Tamayo-Galván, Viveros-García, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013), además también se han buscado donadores de hidrogeno para llevar a cabo la reacción de hidrogenación (Liu *et al.*, 2013).

En estos sistemas se ha encontrado que la selectividad depende directamente del soporte utilizado, obteniéndose preferentemente citronelol en el caso de óxidos mixtos (Rodríguez *et al.*, 2013) y la formación de alcoholes insaturados para los óxidos reducibles como TiO_2 , en ambos casos se obtuvo el 100% de hidrogenación de citral. La reducción catalizada con Au necesita formar una aleación con Pt e Ir para lograr la reducción total de citral (Díaz *et al.*, 2011).

De igual forma, el citral ha sido utilizado inicialmente como sustrato y/o inhibidor en diferentes reacciones enzimáticas. Las enzimas obtenidas de aldehído dehidrogenasa (EC 1.2.1.3) se han usado para la síntesis irreversible por hidrólisis de ésteres y deshidrogenación de aldehídos, tales como la síntesis de ácido retinoico (Kikonyogo, Abriola, Dryjanski & Pietruszko, 1999). Demyttenaere, Herrera & De Kimpe (2000) estudiaron la biotransformación de nerol y geraniol junto con la de citral usando *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. en diferentes medios, demostrando que el geraniol presenta los mejores resultados como inhibidor y sustrato. Linalool fue obtenido por biotransformación de citral con los dos hongos, mientras que α -terpineol y limoneno fueron obtenidos por la acción de *A. niger*. En cambio, el uso de enoato reductasa guió la formación de citronelol, citronelal y geraniol/nerol, teniendo mayor rendimiento los dos primeros (Hall, Hauer, Stuermer, Kroutila & Fabera, 2006; Stolle *et al.*, 2013). También es posible conseguir citronelal a partir de la biotransformación de citral usando *Zymomonas mobilis* y *Citribacter freundii* en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y tolueno. Además, se ha estudiado el efecto que tiene la combi-

nación de agua con diferentes solventes, observándose que con *Z. mobilis* se tiene una enantioselectividad (e.e.) del 99%, dado que la producción de alcoholes fue suprimida en presencia de solventes orgánicos, mientras que con *C. freundii* se obtuvo una e.e. del 75% en la formación de citronelal (Müller, Hauer & Rosche, 2006; Stolle *et al.*, 2013). En otro estudio se identificó una de las enzimas que está implicada en la hidrogenación de citral que es la “vieja enzima amarilla” (OYE), de *Gluconobacter oxydans*, reductasa dependiente del mononucleótido de flavina, capaz de reducir estereoselectivamente el doble enlace $\text{C}=\text{C}$ α - β de citral (Yin, Yang, Wei, Ma & Wei, 2008), con la que se obtuvieron buenos rendimientos de geraniol y citronelal. También se ha empleado la β -D-glucosidasa (Gamero, Manzanares, Querol & Bellosch, 2011) para la síntesis de monoterpenos desde la hidrogenación de citral y la biotransformación de sus derivados, consiguiendo buenos rendimientos. La cloroperoxidasa obtenida de *Caldariomyces fumago* es capaz de biotransformar terpenos, teniendo gran actividad y selectividad con limoneno como sustrato (Arias, Stashenko & Torre, 2007; Ladero, Santos, García-Ochoa, 2000). Esta enzima reúne las características deseadas para ser el biocatalizador de la reducción del citral, sin embargo, debido a su difícil obtención de fuentes naturales se ha intentado utilizar otras enzimas que no presenten este inconveniente, entre las cuales están la xilanasas (Bailey, Bielek & Poutanen, 1992; Polizeli, Rizzatti, Monti, Terenzi, Jorge & Amorim, 2005). Asimismo, se han logrado altos rendimientos de formación de citronelal usando células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae* (Esmaeili, Rohany & Safaiyan, 2012), encontrando mejores rendimientos con células inmovilizadas a pH de 5.5 °C y 27 °C. Endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) provenientes de *Trichoderma reesei* son utilizadas en la hidrólisis de xilano y compuestos aromáticos (Hung, Peng, Tzen, Chen & Liu, 2008; Knob, Terrasan & Carmona, 2010; Nagar, Gupta, Kumar, Kumar & Kuhad, 2010), presentando buena estabilidad al ser inmovilizadas en perlas de alginato de sodio y Al_2O_3 (Nagar *et al.*, 2010).

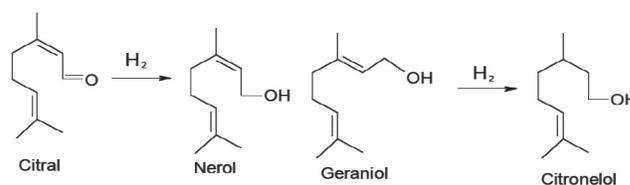


Figura 1. Esquema de reacción de hidrogenación de citral. Fuente: Anderson, Griffin, Johnston & Alsters (2003).

Debido a la forma de hidrogenar el sustrato, en este trabajo se pretende estudiar la actividad de la xilanasa inmovilizada en perlas de alginato de sodio en la hidrogenación de citral en fase líquida, además de conocer el efecto que tiene el pH y la concentración de H_2O_2 en su actividad biocatalítica. En tanto el H_2O_2 es la fuente de hidrógeno de la enzima para llevar a cabo la reducción de citral, la importancia de su cuantificación radica en conocer cuánto se está consumiendo en la reacción, ya que al mismo tiempo se llevan a cabo reacciones paralelas como la oxidación de alcoholes (nerol y geraniol).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Endo-1, 4 β -xilanasa (*Trichoderma longibrachiatum*, EC 3.2.1.8, 650 mUI/mL), citral, nerol, geraniol, citronelal y citronelol y todos los demás compuestos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co.

Preparación y activación de perlas de alginato de sodio

La formación de las perlas de alginato de sodio con un diámetro de 3 mm se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Pal & Khanum (2011), disolviendo 2 g de alginato de sodio en 100 mL de agua desionizada caliente hasta su completa solubilización; posteriormente se dejó caer muy lento gota a gota la solución de alginato en $CaCl_2$ 0.2 M a 4 °C. A continuación, las perlas fueron almacenadas por 24 h en $CaCl_2$ 0.02 M a 4 °C para provocar su endurecimiento; después, las perlas fueron filtradas para retirar el $CaCl_2$, y adicionalmente se realizaron lavados con agua desionizada 10 veces el volumen de $CaCl_2$ utilizado. En seguida, para lograr que las perlas fueran activadas, éstas fueron añadidas a una solución de glutaraldehído 9% (p/v) y buffer citrato a pH de 5 (0.05 M), manteniendo en agitación por 90 min. Finalmente, las perlas fueron almacenadas en el glutaraldehído con buffer citrato a 4 °C por 24 h.

Inmovilización de xilanasa

Las perlas almacenadas en glutaraldehído con buffer citrato a 4 °C se filtraron y lavaron con agua desionizada, inmediatamente después fueron colocadas en una solución de xilanasa con concentración de

650 mUI/mL, y se mantuvieron con agitación vigorosa por 1.5 h a temperatura ambiente. Finalmente, las perlas de alginato con la enzima inmovilizada se almacenaron a 4 °C, hasta su uso.

Actividad biocatalítica de la enzima y cuantificación de citral consumido

Las perlas de alginato de sodio con la xilanasa inmovilizada se colocaron en buffer fosfato (0.1 M) al pH deseado (5.8 – 8.5), después se añadió solución de citral (2.2 mM) y se adicionaron 300 μ L de H_2O_2 a diferentes concentraciones cada 1.5 h, dando inicio a la reacción enzimática a 25 °C y 150 rpm, para lo cual se utilizó un *shaker* (ZHCHENE, modelo ZHWY-200D). La reacción fue monitoreada por 24 h, tomando muestras cada 1.5 h. Para la cuantificación del consumo de citral durante el tiempo de reacción se construyó una curva de calibración, a 265 nm, máxima banda de absorción de citral (Ospina, Adames & Mendoza, 1983), la cual se ajustó al modelo de Lambert-Beer, usando un factor de dilución de 0.11. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de UV-Vis (Jenway, modelo 6715); adicionalmente a cada una de las muestras se les determinó la absorbancia a longitudes de onda de 205 nm, 220 nm, 280 nm y 295 nm reportadas por Ospina *et al.* (1983) para monitorear de forma cualitativa la formación de productos de hidrogenación de citral. La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima inmovilizada fueron calculadas usando la linealización propuesta por Lineweaver & Burke (1934) para los diferentes pH.

Cuantificación del consumo de H_2O_2

Se preparó una solución de 0.1 M de Permanganato de potasio ($KMnO_4$) y se calentó hasta ebullición. De soluciones problema de agua oxigenada en concentraciones 1 mM y 2 mM, se tomaron alícuotas de 0.25 mL, y se transfirieron a matraz volumétrico de 5 mL, diluyendo con agua desionizada hasta el aforo. Posteriormente, de cada muestra se transfirieron 1.25 mL hacia un vaso de precipitado de 10 mL, a continuación se agregó 0.15 mL de H_2SO_4 6 M y 1.25 mL de agua desionizada. La solución se calentó a 60 °C y se valoró. La titulación volumétrica de la muestra de H_2O_2 con la solución estándar de permanganato duró hasta la aparición de un color rosado permanente (Sant, 1956).

Cromatografía de capa fina

La separación preparativa de los productos de reacción utilizando cromatografía de capa fina (*Thin Layer Chromatography* [TLC, por sus siglas en inglés]), se realizó en placas con fase estacionaria de gel de sílice con indicador de fluorescencia UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck AG, Darmstadt, Alemania), con dimensiones de 5 cm × 10 cm, previamente activadas a 40 °C durante 1 h. La fase móvil utilizada fue agua:acetonitrilo (50/50, v/v). Todos los reactivos usados fueron grado HPLC. Alicuotas de 50 µL de muestras y estándares fueron aplicados en diferentes carriles de la placa. Previamente a la elución de las placas, la cámara se saturó durante 15 min con la fase móvil. Una vez eluidas las muestras, las placas fueron expuestas a temperatura ambiente hasta la completa evaporación del solvente; posteriormente fueron expuestas y observadas bajo luz ultravioleta, detectando el recorrido de las muestras mediante fluorescencia azul; el factor de retención (R_f) se calculó con la relación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el estándar o muestra}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Análisis estadístico

Se realizó un diseño por bloques con un nivel de significancia de 0.05; todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y para el análisis estadístico se utilizó el *software* Minitab 16.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La hidrogenación de citral por acción catalítica de la enzima se determinó para los tres valores de pH y las cuatro concentraciones de H₂O₂, mediante el uso de curvas de calibración de citral (figura 2) y sus derivados. En la figura 3 se puede observar que a pH de 5.88 (figura 3a) se tiene prácticamente el 100% de conversión de citral a 15 h de reacción. De forma similar a pH de 6.65 (figura 3b) se observa que la reducción del citral es mayor al 90% a las 6 h de reacción, no obstante, a las 13 h de reacción se aprecia un aumento en la concentración de citral, esto puede deberse a que los productos obtenidos reaccionan con el H₂O₂ presente en la solución, provocando que la hidrogenación de citral sea reversible bajo estas condiciones.

Por otro lado, a pH de 8.46 (figura 3c) se advierte que la máxima transformación que se obtiene del citral es del 76%. Ello implica que en estas condicio-

nes la actividad catalítica de la enzima no sea buena, en contraste con los rendimientos obtenidos a pH bajos. Con base en estos resultados, se infiere que las mejores condiciones de operación son a pH 5.88, 25 °C, agitación de 150 rpm. La reducción de citral se lleva a cabo a partir del hidrógeno que la xilanasas obtiene del medio, ya que la enzima une su sitio activo con el citral para llevar a cabo el rompimiento del doble enlace C = C y así formar nerol y geraniol. Por otro lado, se observa que la concentración de H₂O₂ no afecta significativamente la actividad enzimática de la xilanasas en la hidrogenación de citral sin importar el pH de la solución (figura 4), pues se advierte el mismo patrón de hidrogenación del citral en las reacciones con concentración de H₂O₂ 1 mM y 2 mM, lo que concuerda con los resultados logrados por Esmaeili *et al.* (2012), quienes utilizando *S. cerevisiae* bajo condiciones similares en la biotransformación de citral obtuvieron el mismo porcentaje de conversión. La temperatura de operación de este sistema es benéfica, en comparación con la utilizada para la hidrogenación selectiva de citral en fase líquida sobre catalizadores Ir-Fe/TiO₂ reducidos a alta temperatura (Rojas *et al.*, 2005), donde es necesario llevar dicho parámetro a 500 °C, lo que genera un mayor consumo de energía incrementando los costos de operación. Además, con el uso de catalizadores con base de Pt (Rodríguez *et al.*, 2013) se obtiene una actividad catalítica similar en un mayor tiempo, pero en condiciones de reacción muestran que el uso de enzimas proveerían un mejor sistema catalítico, al no tener que usar altas temperaturas y presión de H₂ en el sistema.

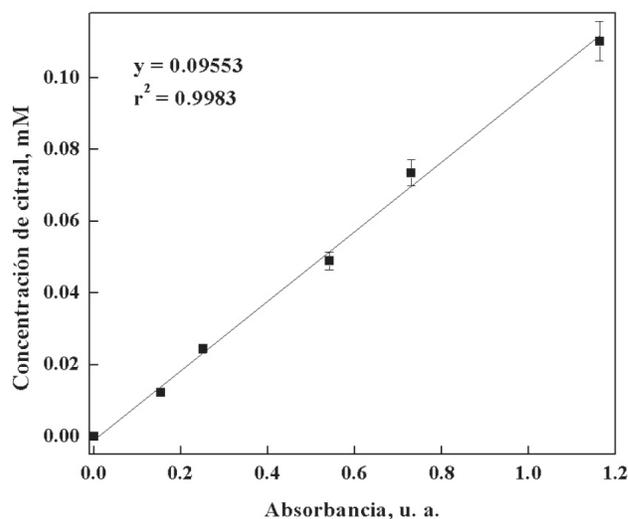


Figura 2. Curva de calibración de citral.
Fuente: Elaboración propia.

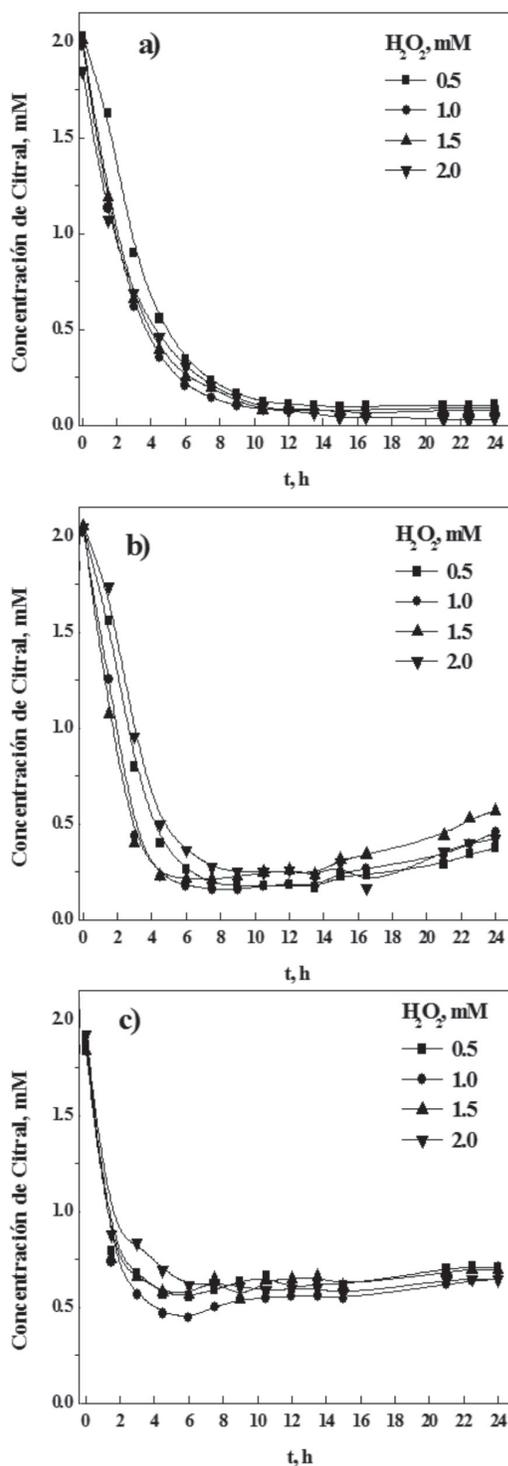


Figura 3. Efecto de pH en la hidrogenación de citral. a) 5.88, b) 6.65 y c) 8.46. Fuente: Elaboración propia.

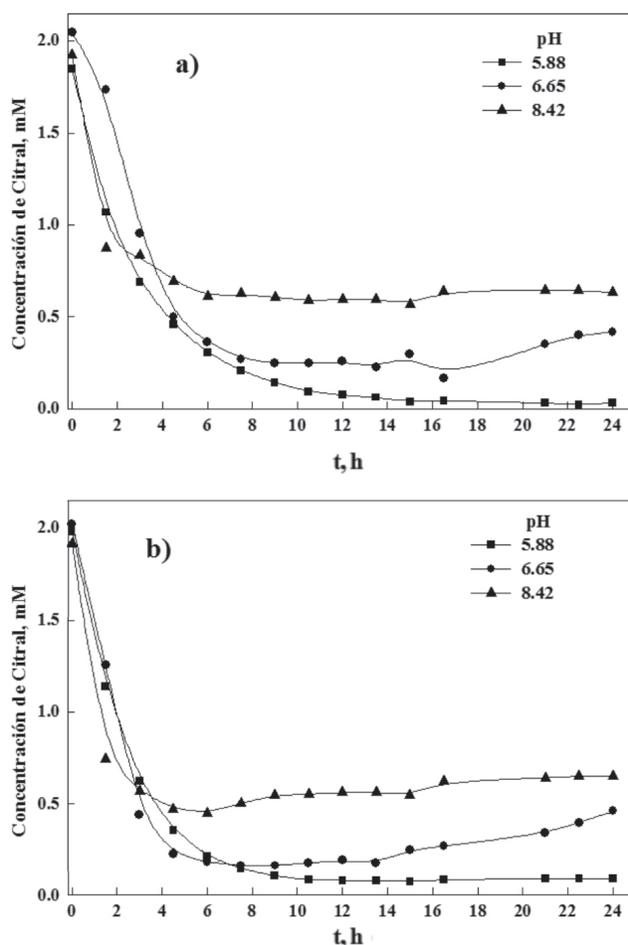


Figura 4. Efecto del pH en la hidrogenación de citral usando xilanasa inmovilizada, a) [H₂O₂] = 1 mM y b) [H₂O₂] = 2 mM. Fuente: Elaboración propia.

La cuantificación de los derivados de la hidrogenación de citral durante el tiempo de reacción demostró que nerol disminuye conforme transcurre la reacción, lo que sugiere que a pH 5.88 y pH 6.65, este compuesto sigue siendo hidrogenado, de tal manera que se pueden formar otros compuestos como citronelal o citronelol, debido a que la enzima reacciona con el H₂O₂. Por otra parte, a pH de 8.46 se percibió que la transformación de citral en nerol presenta una disminución en la velocidad de reacción a estas condiciones de reacción. En el caso de geraniol en los diferentes valores de pH manejados, se puede observar un comportamiento análogo al nerol, presentando a pH 5.88 y pH 6.65 consumo de dicho compuesto de 50% y 37%, respectivamente, mientras que a pH de 8.46 se tuvo

una conversión del 70%. Como se mencionó anteriormente, la concentración de H_2O_2 no fue significativa para la hidrogenación de citral al igual que para la conversión de nerol y geraniol. Con el uso de catalizadores de $Ir-Fe_2/TiO_2$ (Rojas *et al.*, 2005), en la hidrogenación de citral, sólo se observaron geraniol y nerol como productos de reacción, lo que corresponde a la hidrogenación selectiva del grupo carbonilo con altos rendimientos. En contraste con la biotransformación de citral con *S. cerevisiae* (Esmeaili *et al.*, 2012), los productos conseguidos fueron limoneno, geraniol y citronelol, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona y citronelol. Por otro lado, los rendimientos que se observan con el uso de la xilanasa inmovilizada son comparables con los obtenidos en la biotransformación con *S. cerevisiae*.

En cuanto a la estabilidad de las perlas de alginato con xilanasa inmovilizada, se observa que a pH de 8.46 las perlas pierden su estabilidad a las 5 h de la reacción, mientras que a pH de 6.66, con el paso del tiempo las perlas se hidrataron, y aproximadamente después de 6 h perdieron su estructura. Por su parte, las perlas mantenidas a pH de 5.88 mantuvieron su estructura y forma inicial, aun después de las 24 h de la reacción.

Para la determinación del consumo de H_2O_2 se utilizó la técnica de permanganometría; los resultados se concentran en la tabla 1, donde se muestra que el consumo de peróxido fue superior al 99% en todos los experimentos. En promedio, el consumo de H_2O_2 fue de 99.63% para 1 mM y 99.64% para 2 mM. Con base en los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima inmovilizada para las diferentes condiciones de reacción (figura 5), se puede inferir que a pH de 5.88 la velocidad máxima de reacción es mayor comparada con las velocidades alcanzadas en los otros valores de pH; no obstante, a pH de 6.65 el sustrato es más afín a la enzima. En el caso de pH de 8.46, no se pudieron determinar los parámetros debido a que las perlas de alginato se disolvieron y los datos no pudieron ser tratados con ningún método de linealización. Los valores de V_{max} y K_M se concentran en la tabla 2. El modelo utilizado para encontrar los parámetros de la reacción enzimática se basa en la ecuación de Michaelis-Menten. V_{max} es la velocidad máxima de reacción en condiciones de saturación y K_M indica la afinidad que tiene la xilanasa por el sustrato (citral). Si el coeficiente de determinación (r^2) es muy cercano a 1 (alrededor del 0.99), se puede asumir que los datos experimentales de la curva de calibración se ajustan al modelo de la línea recta.

En el análisis estadístico por bloques, las variables utilizadas fueron pH y concentración de peróxido de hidrógeno, teniendo un modelo con un 96.28% de confianza. El valor negativo del coeficiente del pH indica que sea cual sea el valor de pH, se espera que disminuya en 0.0389 el valor de la concentración consumida de citral durante la hidrogenación.

Modelo matemático:

$$Y = 0.609 + 0.0058 [H_2O_2] - 0.0389 \text{ pH}$$

En cuanto a la actividad catalítica, se demostró que la concentración de peróxido de hidrógeno no tiene relevancia en el experimento; caso contrario del pH, el cual a menor pH mayor es su actividad catalítica, y con el análisis estadístico realizado se comprueba que el pH es la variable que tiene mayor relevancia en la hidrogenación de citral.

Tabla 1.
Determinación de consumo de H_2O_2 usando permanganometría.

t (h)	Volumen gastado de $KMnO_4 \cdot 10^5$, L		Moles finales $\cdot 10^{10}$		Moles consumidos $\cdot 10^7$		% de consumo de H_2O_2	
	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM	1 mM	2 mM
0.0	6.0	3.0	1.50	7.50	1.26	1.20	98.82	99.38
1.5	2.5	2.5	6.25	6.30	1.26	1.20	99.51	99.48
3.0	2.0	2.5	6.25	6.30	1.26	1.20	99.51	99.48
4.5	2.0	2.0	5.00	5.00	1.27	1.20	99.61	99.58
6.0	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
7.5	2.0	2.0	5.00	5.00	1.27	1.20	99.61	99.58
9.0	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
10.5	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
12.0	1.5	1.0	3.75	2.10	1.27	1.20	99.70	99.79
13.5	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
15.0	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
16.5	1.5	1.5	3.75	3.80	1.27	1.20	99.70	99.69
18.0	1.0	1.5	2.50	3.80	1.25	1.20	99.80	99.69
22.5	2.0	1.5	5.00	3.80	1.27	1.20	99.61	99.69
24.0	2.5	1.5	5.00	3.80	1.27	1.20	99.61	99.69

Fuente: Elaboración propia.

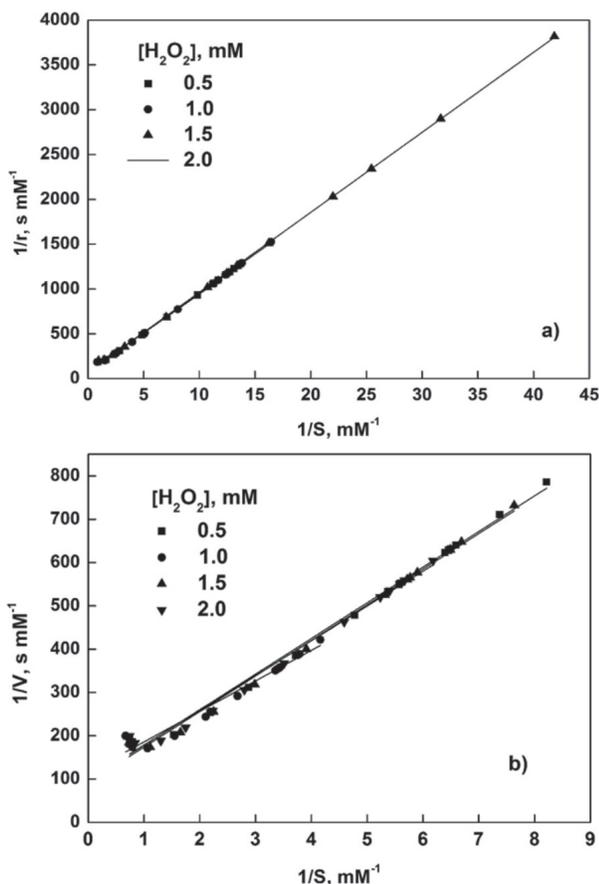


Figura 5. Determinación de parámetros cinéticos xilanasa en la hidrogenación de citral. a) pH = 5.88 y b) pH = 6.65. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de xilanasa inmovilizada en la hidrogenación de citral.

pH	V_{max} , mM/s	K_M , mM
5.88	0.01422	1.2694
6.88	0.01094	0.8994
8.46	N.D.	N. D.

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

El estudio realizado para la hidrogenación de citral, utilizando xilanasa de *T. longibrachiatum* inmovilizada en perlas de alginato, arroja buenos resultados, ya que durante la experimentación se lograron establecer

las mejores condiciones de reacción a pH de 5.88 para la biotransformación de 98% de citral; el valor obtenido es cercano al establecido para catalizadores heterogéneos y *S. cerevisiae*. En cuanto al consumo de dicho compuesto, la influencia que se tiene con respecto a la concentración de H_2O_2 no es significativa; por otro lado, al aumentar el pH la actividad catalítica de la enzima disminuye significativamente, aunque a pH mayor a 7.0 se evidenció la degradación de las perlas de alginato. Por medio de la permanganometría se obtuvo que independientemente de la concentración de H_2O_2 , el consumo de este agente hidrogenante es de más del 99%, lo que indica que nerol y geraniol se siguen transformando en los productos secundarios de la hidrogenación de citral como nerol y geraniol.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico para la realización de este trabajo (proyectos SIP 20130806 y SIP 20141238). Asimismo, agradecen a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería del Instituto Politécnico Nacional (UPIIG-IPN), Campus Guanajuato, por la infraestructura prestada.

REFERENCIAS

- Anderson, R., Griffin, K., Johnston, P., & Alsters, P. L. (2003). Selective Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds and Carboxylic Acids with Platinum Group Metal Catalysts. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 345(4), 517-523.
- Arias, G. P., Stashenko, E., & Torre, R. (2007). Biotransformación de terpenos r(+)-limoneno, α -pineno y β -terpineno por medio de cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. *Scientia et Technica*, XIII(33), 75-78.
- Bailey, M. J., Bielej, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270.
- Bailón-García, E., Carrasco-Marín, F., Pérez-Cadenas, A. F., & Maldonado-Hódar, F. J. (2014). Microspheres of carbon xerogel: An alternative Pt-support for the selective hydrogenation of citral. *Applied Catalysis A: General*, 482, 318-326. doi: 10.1016/j.apcata.2014.06.011
- Daly, H., Manyar, H. G., Morgan, R., Thompson, J. M., Delgado, J. J., Burch, R., & Hardacre, C. (2014). Use of Short Time-on-Stream Attenuated Total Internal Reflection Infrared Spectroscopy To Probe Changes in Adsorption Geometry for Determination of Selectivity in the Hydrogenation of Citral. *American Chemical Society Catalysis*, 4(8), 2470-2478.
- Demyttenaere, J. C. R., Herrera, M. C., & De Kimpe, N. (2000). Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, 55(4), 363-373.

- Díaz, G., Gómez-Cortés, A., Hernández-Cristobal, O., Murcia, J. J., Borda, G., & Rojas, H. (2011). Hydrogenation of Citral Over IrAu/TiO₂ Catalysts. Effect of the Preparation Method. *Topic in Catalysis*, 54(8), 467-473.
- Esmaili, A., Rohany, S., & Safaiyan, S. (2012). Biotransformation of citral by free and immobilized *S. Cerevisiae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(2), 88-290.
- Gamero, A., Manzanares, P., Querol, A., & Belloch, C. (2011). Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 92-97.
- Hall, M., Hauer, B., Stuermer, R., Kroutila, W., & Fabera, K. (2006). Asymmetric whole-cell bioreduction of an α , β -unsaturated aldehyde (citral): competing prim-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(21), 3058-3062.
- Hung, Y. J., Peng, C. C., Tzen, J. T. C., Chen, M. J., & Liu, J. R. (2008). Immobilization of *Neocallimastix patriciarum* xylanase on artificial oil bodies and statistical optimization of enzyme activity. *Bioresource Technology*, 99(18), 8662-8666.
- Kikonyogo, A., Abriola, D. P., Dryjanski, M., & Pietruszko, R. (1999). Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 704-712.
- Knob, A., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407.
- Ladero, M., Santos, A., & García-Ochoa, F. (2000). Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized *B. galactosidase* from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microbial Technology*, 27(8), 583-592.
- Lawrence, B. M. (2003). *Progress in Essential Oils 1976-2000*. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation.
- Lineweaver, H., & Burke, D. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Liu, R., Wang, Y., Cheng, H., Yu, Y., Zhao, F., & Arai, M. (2013). Reduction of citral in water under typical transfer hydrogenation conditions-Reaction mechanisms with evolution of and hydrogenation by molecular hydrogen. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 366(1), 315-320.
- Müller, A., Hauer, B., & Rosche, B. (2006). Enzymatic reduction of the α , β -unsaturated carbon bond in citral. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(3-6), 126-130.
- Nagar, S., Gupta, V. K., Kumar, D., Kumar, L., & Kuhad, R. C. (2010). Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *Journal of Industrial Microbiol and Biotechnology*, 37(1), 71-83.
- Ospina de Nigrinis, L. S., Adames, M., & Mendoza, E. (1983). Estudio del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* Bailey. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 4(12), 95-113.
- Pal, A., & Khanum, F. (2011). Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, 46(6), 1311-1322.
- Polizeli, M. L., Rizzatti, A. C., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Rodríguez, A., De Los Reyes, J., Viveros, T., & Montoya, A. (2013). Efecto del soporte en la hidrogenación selectiva de citral sobre catalizadores de platino soportados en sílice-circonia y sílice-titania. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(1), 55-69.
- Rojas, H., Martínez, J. J., Mancipe, S., Borda, G., & Reyes, P. (2012). Citral hydrogenation over novel niobia and titania supported Au, Ir-Au and Ir catalysts. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 106(2), 445-455.
- Rojas, J. P., Perea, J. A., & Ortiz, C. C. (2009). Evaluation of the biotransformation of geraniol and (r)-(+)-pinene using cell of *rhodococcus opacus* dsm 44313. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7(2), 104-112.
- Rojas, S. B., Borda, G., & Valencia, R. (2005). Hidrogenación selectiva de citral en fase líquida sobre catalizadores Ir-Fe/TiO₂ reducidos a altas temperaturas. *Revista Colombiana de Química*, 34(2), 127-138.
- Sant, B. R. (1956). Thiocyanate interference in the permanganometry of hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*, 15, 413-414. doi: 10.1016/0003-2670(56)80077-9
- Santiago-Pedro, S., Tamayo-Galván, V., & Viveros-García, T. (2013). Effect of the acid-base properties of the support on the performance of Pt catalysts in the partial hydrogenation of citral. *Catalysis Today*, 213, 101-108. doi: 10.1016/j.cattod.2013.04.032
- Somolinos, M. G. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1928-1939.
- Stolle, A., Gallert, T., Schmöger, C., & Ondrusch, B. (2013). Hydrogenation of citral: a wide-spread model reaction for selective reduction of α , β -unsaturated aldehydes. *RSC Advances*, 3, 2112-2153. doi: 10.1039/C2RA21498A
- Yin, B., Yang, X., Wei, G., Ma, Y., & Wei, D. (2008). Expression of Two Old Yellow Enzyme Homologues from *Gluconobacter oxydans* and Identification of their Citral Hydrogenation Abilities. *Molecular Biotechnology*, 38(3), 241-245.
- Zhao, J., Xu, X., Li, X., & Wang, J. (2014). Promotion of Sn on the Pd/AC catalyst for the selective hydrogenation of cinnamaldehyde. *Catalysis Communications*, 43, 102-106. doi: 10.1016/j.catcom.2013.09.019