

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

**BIOCATÁLISIS SÓLIDO-GAS COMO ALTERNATIVA EN LA  
SINTESIS DE ACETATO DE ISOAMILO**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Presenta**

**URIEL AMAURY RUIZ CASTILLO**

**Comité de tutores**

**DIRECTOR: DR. HUERTA OCHOA SERGIO**

**CODIRECTORA: DRA. OLGA MIRIAM RUTIAGA QUIÑONES**

**ASESORA: DRA. ITZA NALLELY CORDERO SOTO**

Ciudad de México, agosto 2021

<b>CONTENIDO</b>	<b>2</b>
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Resumen	<b>6</b>
Abstract	7
Abreviaturas	8
Introducción	10
Justificación y objetivo	13
<b>1. Capítulo 1. Las moléculas de sabor y aroma</b>	<b>14</b>
1.1 Moléculas de sabor y aroma	15
1.1.1 Terpenos	16
1.1.2 Alcoholes Superiores	17
1.1.3 Aldehídos	17
1.1.4 Cetonas	18
1.1.5 Lactonas	18
1.1.6 Ésteres	19
1.2 Ésteres como aromas y sabores	19
1.2.1 Extracción a partir de plantas	21
1.2.2 Producción por síntesis química	22
1.2.3 Producción biotecnológica	24
1.2.3.1 Síntesis <i>de novo</i> de ésteres	24
1.2.3.2 Biocatálisis de ésteres	26
1.3 Perspectivas económicas de los ésteres	27
<b>2. Capítulo 2. Producción de acetato de isoamilo</b>	<b>30</b>
2.1 Acetato de isoamilo	31
2.2 Biocatalizadores utilizados en la síntesis de acetato de isoamilo	35
2.2.1 Enzimas	35
2.2.1.1 Alcohol aciltransferasas	36
2.2.1.2 Esterasas	37
2.2.1.3 Lipasas	38
2.2.2 Perspectivas económicas de las enzimas	40

2.2.3	Enzimas Inmovilizadas	41
2.2.4	Células completas	47
2.2.5	Células inmovilizadas	48
2.3	Sistemas de producción biocatalítica de acetato de isoamilo	50
2.3.1	Biocatálisis en solventes orgánicos	51
2.3.2	Biocatálisis libre de solventes	52
2.3.3	Biocatálisis en líquidos iónicos	53
2.3.4	Biocatálisis en fluidos super críticos	55
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Biocatálisis sólido-gas como alternativa de producción de acetato de isoamilo</b>	<b>57</b>
3.1	Biocatálisis sólido-gas	58
3.2	Reacciones en sistema sólido-gas	59
3.3	Parámetros de operación	62
3.3.1	Actividad de agua	62
3.3.2	Flujo molar de los reactantes	63
3.3.3	Temperatura	65
3.3.4	Presión absoluta	67
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Perspectivas y Conclusiones</b>	<b>68</b>
4.1	Conclusiones	69
4.2	Perspectivas	71
5.	Bibliografía	73
6.	Anexos	90
6.1	Anexo 1. Análisis de los parámetros termodinámicos de la síntesis de acetato de isoamilo	90
6.1.1.	Constante de equilibrio y extensión de la reacción	90
6.1.2.	Estimación de los parámetros termodinámicos	92
6.1.3.	Análisis de precios y proyección económica de reactivos	95
6.1.4.	Efecto del agua en la extensión de la reacción	96
6.1.5.	Conclusión	97
6.1.6.	Perspectivas	98

6.2 Anexo 2. Datos termodinámicos de los compuestos involucrados en la síntesis de acetato de isoamilo estimados por <i>Gent University</i>	99
6.3 Anexo 3. Cálculo del grado de avance de la reacción	101

<b>Índice de Figuras</b>	<b>4</b>
Figura 1. Reacción química de la esterificación de acetato de isoamilo (Esterificación de Fischer-Speier).....	23
Figura 2. Mercado global de compuestos aromáticos en 2019. Fuente: Grandviewresearch.com.....	28
Figura 3. Distribución del mercado de ésteres en Estados Unidos. Fuente: Grandview Research. ....	28
Figura 4. Métodos de producción de acetato de isoamilo. a) Extracción a partir de plantas, b) Producción por síntesis química, c) Síntesis de novo mediante la vía de Ehrlich, d) Biocatálisis. ....	32
Figura 5. Síntesis de novo de alcohol isoamílico dilucidada por Dickinson <i>et al.</i> (2000). ....	33
Figura 6. Tendencia del crecimiento del mercado de enzimas del 2016 al 2027, así como su distribución por industrias. Fuente: Grand View Research.....	41
Figura 7. Técnicas de inmovilización de enzimas.....	44
Figura 8. Sistemas de biocatálisis para la producción de acetato de isoamilo. a) en solventes orgánicos. b) libre de solventes. c) en fluidos supercríticos. d) en líquidos iónicos .....	50
Figura 9. Sistema de biocatálisis sólido-gas, el cual está compuesto por el gas acarreador, los contenedores de sustratos A y B inmersos en una solución salina saturada que mantiene la actividad de agua deseada, el reactor de lecho empacado y el contenedor de productos C.. ....	58
Figura 10. Secuencia de cálculo para el análisis termodinámico de la reacción de esterificación de acetato de isoamilo.. ....	90

<b>Índice de Tablas</b>	5
Tabla 1. Comparación de precios de venta de algunas MSAs. ....	16
Tabla 2. Métodos de obtención de ésteres. ....	21
Tabla 3. Materiales y formas de inmovilización de lipasas. ....	44
Tabla 4. Reacciones de biocatálisis en sistemas sólido-gas. ....	61
Tabla 5. Entalpías, energías libres de Gibbs y constantes de equilibrio de la reacción a diferentes temperaturas .....	92
Tabla 6. Evaluación del rendimiento de reacción respecto a distintas relaciones molares ácido: alcohol	93
Tabla 7. Evaluación del rendimiento de reacción respecto a distintas relaciones molares ácido: alcohol	94
Tabla 8. Prueba de medias múltiple Tukey de las diferentes relaciones molares analizadas	94
Tabla 9. Precios comerciales de las sustancias involucradas en la reacción en MXN	96
Tabla 10. Análisis de precios (MXN) de las sustancias involucradas en la reacción	96
Tabla 11. Efecto del agua en el reactor sobre el rendimiento de reacción a una proporción molar ácido: alcohol 2:1	97
Tabla 12. Efecto del agua en el reactor sobre el rendimiento de reacción a una proporción molar ácido: alcohol 4:1	97
Tabla 13. Datos termodinámicos de los compuestos involucrados en la síntesis de acetato de isoamilo	99

## RESUMEN

Las moléculas con propiedades de sabor y aroma, como los ésteres, son de suma importancia en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Entre estos ésteres, el acetato de isoamilo, reconocido por su codiciado aroma a plátano, presenta un mercado creciente a nivel mundial. Industrialmente se produce mediante síntesis química; método que genera productos de baja pureza y subproductos contaminantes. Debido a esto, la academia e industria han buscado procesos alternativos con mejores rendimientos, sustentables y que requieran menor energía. Se realizó una revisión de los métodos de obtención: extracción de plantas y síntesis microbológica, tanto por síntesis *de novo* como por biocatálisis. Se examinaron los principales microorganismos para la síntesis, enzimas implicadas y soportes utilizados. Se revisaron procesos empleando sistemas de biocatálisis en medios no convencionales: solventes orgánicos, libres de solventes, líquidos iónicos, fluidos supercríticos y sistemas sólido-gas. El sistema sólido-gas es un método novedoso de biocatálisis que aprovecha los bajos puntos de ebullición de ciertos sustratos para sintetizar compuestos como los aromas. Finalmente, en esta revisión se analizó la viabilidad de la producción de acetato de isoamilo mediante un sistema de biocatálisis sólido-gas, una tecnología considerada como biotecnología blanca.

## **ABSTRACT**

Molecules with properties of flavor and aroma, such as esters, are of utmost importance in the food, cosmetics, and pharmaceutical industry. Among these esters, isoamyl acetate, known for its desired banana aroma, presents a growing market worldwide. Industrially it is produced by chemical synthesis; a method that generates low purity products and polluting by-products. Because of this, academia and industry have sought alternative processes with better yields, sustainable and requiring less energy. The obtention methods, plant extraction and microbiological synthesis, using *de novo* synthesis and biocatalysis are revised. The main microorganisms for synthesis, enzymes involved and supports used are examined. It is swotted the biocatalysis processes in non-conventional media like organic solvents, solvent-free, ionic liquids, supercritical fluids, and solid-gas systems. The solid-gas system is a novel method of biocatalysis that takes advantage of the low boiling points of certain substrates to synthesize compounds such as aromas. Finally, in this review it is analyzed the feasibility of the production of isoamyl acetate by a solid-gas biocatalysis system, a technology considered as white biotechnology.

**Abreviaturas:**

2-PE: 2-feniletanol

2-PEAc: 2-feniletacetato

AATs: Alcohol Acetiltransferasas

AC: Carbón activado

AcA: Ácido Acético

AcE: Acetato de etilo

AcI: Acetato de Isoamilo

ADHs: Alcohol Deshidrogenasas

AlI: Alcohol Isoamílico

AnhA: Anhídrido Acético

$a_w$ : Actividad de Agua

$a_x$ : Actividad de sustratos

ATACR: Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada

BR: Biorreactor de Tanque Agitado

BSG: Biocatálisis sólido-gas

BVMOs: Baeyer-Villiger monooxigenasas

CALB: Lipasa B de *Candida antarctica*

CC: Células completas

CoA: Coenzima A

COVs: Compuestos Orgánicos Volátiles

Ea: Energía de activación

$E_{a_{inact}}$ : Energía de activación para la reacción de inactivación irreversible

EAT: Etanol Aciltransferasa

FAC: Carbón activado Funcionalizado

FSC: Fluidos Supercríticos

GU: Glutaraldehído

LIs: Líquidos iónicos

LS: Libres de solventes

MSAs: Moléculas de sabor y aroma

$P^0$ : Presión de vapor de saturación del agua.

PBR: Reactor de Lecho Empacado

$P^w$ : Presión parcial de vapor del agua

$P^x$ : Presión parcial de vapor del sustrato x en el gas entrando al sistema

$P^x_{sat}$ : Presión de vapor de saturación del sustrato puro

SO: Solventes Orgánicos

## INTRODUCCIÓN

En décadas recientes se ha demostrado que las moléculas de sabor y aroma (MSAs), utilizadas en la industria de alimentos, farmacéutica, cosméticos y de cuidado personal, también presentan actividad biológica en la salud humana por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y anti-obesidad (Cordero-Soto *et al.*, 2020). La creciente demanda del consumidor muestra una tendencia hacia productos naturales, por lo que es necesario apuntalar las investigaciones de procesos biotecnológicos que permitan incrementar rendimiento con menores requerimientos energéticos y generación de contaminantes.

En 2017, el mercado global de las MSAs fue de \$26.3 billones de dólares con perspectivas a crecer a \$37.0 billones de dólares en 2021, con una tasa de crecimiento anual compuesta de 6.4 %. Las MSAs representan el 25 % del mercado global de aditivos alimenticios (Brault *et al.*, 2014; Conceição de Souza *et al.*, 2019; Palmerín-Carreño *et al.*, 2019; Leffingwell & Associates, 2018 <http://www.leffingwell.com>). El precio de venta de las MSAs varía considerablemente de acuerdo con el modo de obtención, el costo de extracción de plantas o síntesis por métodos biotecnológicos, de 10 a 100 veces más alto que el que se produce por métodos químicos (Akacha & Gargouri, 2015; Dubal *et al.*, 2008; Sigma-Aldrich® <https://www.sigmaaldrich.com/>).

Dentro de las MSAs se encuentra un grupo importante, los ésteres, los cuales tienen un amplio mercado global, pueden ser usados en la industria de oleoquímicos y en cosméticos donde pueden actuar como emolientes, solventes, espesantes, tensoactivos y fragancias. En 2018 se estimó que el mercado de los ésteres presentó un crecimiento de USD 3.61 mil millones y se espera que crezca a una tasa compuesta anual de 4.8 % en los siguientes años, de acuerdo con los datos presentados por la consultoría Grandview Research (<https://www.grandviewresearch.com/>).

Uno de los ésteres de mayor importancia a nivel mundial es el acetato de isoamilo (Acl), también conocido como acetato de isopentilo. Este éster es sintetizado a partir de la esterificación del alcohol isoamílico (Alcl) y ácido acético (AcA). Se encuentra presente naturalmente, en frutas como la banana y pera, por lo que es usado

industrialmente para emular esta nota olfativa. El Acl representa uno de los compuestos saborizantes más importantes utilizados en las industrias de alimentos, con una demanda mundial anual de 74,000 kg (Kirdi *et al.*, 2017). Se usa como un compuesto aromatizante en una variedad de alimentos, como la miel, el caramelo, el café artificial y bebidas saborizadas (Torres *et al.*, 2010). También es uno de los principales componentes de sabor y aroma de las bebidas alcohólicas fermentadas, como el sake, la cerveza y los vinos (Torres *et al.*, 2010), de hecho, el Acl es uno de los ésteres que más contribuye al perfil aromático de los vinos blancos (Plata *et al.*, 2003).

Entre las alternativas de producción de ésteres está la extracción de plantas; sin embargo, existen muchas dificultades para llevar esto a una explotación a nivel industrial debido sus bajas concentraciones, que eleva su precio considerablemente (Dubal *et al.*, 2008). La síntesis química de ésteres es utilizada a nivel industrial debido a que se pueden producir grandes cantidades a menor costo. Este proceso llamado esterificación se lleva a cabo mediante el uso de catalizadores homogéneos, como el ácido sulfúrico y el ácido p-toluensulfónico. No obstante, se pueden presentar reacciones secundarias, corrosión en los equipos, además requiere de un mayor número de operaciones unitarias para el aislamiento de los productos y la eliminación de los residuos de sal formada durante el proceso (Joseph *et al.*, 2005). Los procesos biotecnológicos representan una alternativa muy interesante a la síntesis química, con importantes ventajas, tales como: alta especificidad (quimio, regio y estereoselectividad), altos rendimientos en condiciones de reacción suaves (baja temperatura y presión), reducción de subproductos, reutilización de biocatalizadores, entre otros (Gomes Almeida *et al.*, 2017).

La síntesis de ésteres con procesos biotecnológicos puede llevarse a cabo a través de rutas enzimáticas dentro del microorganismo en síntesis *de novo* que utiliza diversos componentes celulares para la producción de aromas a partir de moléculas simples (Braga *et al.*, 2018). Otra alternativa es la síntesis a través de biocatálisis con reacciones simples catalizadas con enzimas puras o con células completas (CC). El sustrato es transformado por el sistema enzimático del microorganismo a

través de una o varias reacciones para producir una molécula similar (Braga *et al.*, 2018). Se han utilizado diferentes sistemas de biocatálisis, los más empleados han sido: sistemas de catálisis en solventes orgánicos (SO), donde los reactantes se encuentran en un medio orgánico como hexano o heptano (Yan *et al.*, 2014); sistemas libres de solventes (LS), donde los compuestos se encuentran en igual proporción sin un disolvente externo o uno de los dos se comporta como disolvente (Hobbs & Thomas, 2007); sistemas con fluidos supercríticos (FSC), que son gases a alta presión que se comportan como solventes inertes (Dias *et al.*, 2018); y sistemas con líquidos iónicos (LIs), que son sales orgánicas en estado líquido y son altamente estables a temperaturas ambiente (Stevens *et al.*, 2019).

En los últimos años se han comenzado a estudiar los sistemas de biocatálisis sólido-gas (BSG), en donde enzimas o CC se encuentran en estado sólido dentro de un biorreactor de lecho empacado y los sustratos se encuentran en fase gaseosa. Esto permite la síntesis de volátiles de forma fácil, además que permite una baja actividad de agua lo que conlleva a que el equilibrio de la reacción se desplace a la síntesis. También evita la contaminación por microorganismos oportunistas y además es ambientalmente sustentable pues evita el uso de solventes tóxicos (Cordero-Soto *et al.*, 2020; Csanádi *et al.*, 2012; Létisse *et al.*, 2003).

Debido a que no hay revisiones bibliográficas recientes sobre Acl y sus formas de síntesis, el objetivo de esta revisión es analizar los diferentes procesos biotecnológicos reportados y la viabilidad de la producción de Acl mediante un sistema de BSG, método considerado en el área de la biotecnología blanca. Por lo que esta revisión está organizada de la siguiente forma: en el Capítulo 1 se describen las MSAs, su aroma y clasificación según su grupo funcional predominante y el papel que los ésteres tienen dentro de este grupo, así como sus formas de síntesis. En el Capítulo 2 trata a profundidad la producción de Acl, química y biotecnológica, así como las enzimas, soportes y microorganismos que se han empleado en su síntesis, al igual que se exploran algunos sistemas de producción biotecnológica que se han utilizado para su producción. El Capítulo 3 se analiza el sistema de BSG como un sistema potencial para la síntesis de Acl.

Finalmente, en el Capítulo 4 se dan las perspectivas y las principales conclusiones de esta revisión.

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a la alta demanda de acetato de isoamilo en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica, así como a la necesidad de procesos más limpios y amigables con el ambiente, se deben buscar alternativas que maximicen los rendimientos a un menor costo y eviten generar compuestos contaminantes.

Los sistemas de biocatálisis sólido gas (BSG), son una alternativa prometedora para procesos más limpios y que permitan una alta recuperación de producto. Debido a que los sustratos se encuentran en fase gaseosa, se evita utilizar solventes que generen un daño medioambiental, además su baja actividad de agua permite estabilizar enzimas, cambiar el equilibrio de las reacciones y evitan contaminación con otros microorganismos. También al tener poca resistencia a la difusividad, permite mayor contacto de los reactantes con el biocatalizador, lo que conlleva a mejores rendimientos de las reacciones.

Hay muy pocos estudios referentes a síntesis de compuestos aromáticos en sistemas de BSG, a pesar de que la mayoría son altamente volátiles y su manejo en este tipo de ambientes facilitarían en gran medida el proceso. Por lo tanto, el estudio de la síntesis de acetato de isoamilo en un sistema sólido-gas abre una ventana de oportunidades para realizar catálisis no convencional para la obtención de compuestos de alta pureza a bajo costo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Realizar una revisión bibliográfica de los estudios publicados sobre la síntesis de acetato de isoamilo, los biocatalizadores utilizados y los sistemas de producción. Finalmente, analizar la viabilidad del sistema sólido-gas como sistema alternativo para la síntesis de esta molécula.

**CAPÍTULO 1.**  
**LAS MOLÉCULAS DE SABOR Y AROMA.**

## 1.1. MOLÉCULAS DE SABOR Y AROMA

El aroma se define como una mezcla compleja de una gran cantidad de compuestos volátiles, cuya nota es específica y depende de la combinación de moléculas, concentración y el umbral de percepción de los compuestos volátiles individuales (Ahmed *et al.*, 2013). El sabor consiste tanto de la percepción en boca (dulzor, acidez o amargor) y del olor producido por varios de estos compuestos volátiles (Ahmed *et al.*, 2013). Los compuestos volátiles orgánicos (COVs), se pueden definir como cualquier compuesto orgánico que exista comúnmente como alcoholes, aldehídos, ésteres y con puntos de ebullición entre 50 °C y 260 °C (Abdul Manap *et al.*, 2018). Son compuestos de bajo peso molecular (<300 Da), caracterizados por tener baja polaridad y alta presión de vapor (Contarino *et al.*, 2019).

Los compuestos de sabor (*flavor*) y aroma (*fragrance*) son compuestos orgánicos de olor fuerte y agradable. Aunque son similares en estructuras, mensajeros químicos, y sus receptores son células olfativas en el sistema nasal, se les llama perfume o sabor según su uso. El término fragancia se usa para olores agradables en cosméticos y productos de consumo, pero el sabor se asocia solo con productos alimenticios (Hosoglu *et al.*, 2018). Debido a que una molécula puede ser capaz de conferir tanto aroma como sabor, se les engloba en un término como: Moléculas de Sabor y Aroma (MSAs).

Las MSAs varían en precio debido a origen, en general la extracción natural es mucho más costosa que la química, entre 10 y 100 veces más (Akacha & Gargouri, 2015), en cambio la síntesis biotecnológica puede ser económica en su producción y al ser etiquetada como natural puede aumentar su costo de venta considerablemente (Brault *et al.*, 2014). En la **Tabla 1** se muestran algunas MSAs y su precio de acuerdo con su origen, encontradas en el sitio comercial de Sigma-Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com/>).

**Tabla 1.** Comparación de precios de venta de algunas MSAs. Fuente: Sigma Aldrich® (<https://www.sigmaaldrich.com/>).

<b>Compuesto</b>	<b>Sabor</b>	<b>Tipo</b>	<b>Extracción (USD/kg)</b>	<b>Química (USD/kg)</b>	<b>Biotecnológica (USD/kg)</b>
<b><i>γ-Decalactona</i></b>	<i>Durazno</i>	<i>Lactona</i>	6,322.5	130	-
<b><i>Vanillina</i></b>	<i>Vainilla</i>	<i>Aldehído</i>	25,000	67 (≥99%)	1711 (≥97%)
<b><i>L-Carvona</i></b>	<i>Menta</i>	<i>Terpeno</i>	-	123.5 (≥97%)	525 (≥99%)
<b><i>Rasketona</i></b>	<i>Frambuesa</i>	<i>Cetona</i>	-	151.25 (≥98%)	1028.75 (≥98%)
<b><i>Feniletilacetato</i></b>	<i>Rosas/ miel</i>	<i>Éster</i>	-	87.5 (≥98%)	2195 (≥98%)

- - precio no reportado

Las moléculas de sabor y aroma (MSAs) se encuentran de forma abundante en la naturaleza, en forma de compuestos orgánicos, que de acuerdo con su estructura se clasifican en: terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, y ésteres (Berger, 2009). A continuación, se describen algunas de ellas.

### 1.1.1. Terpenos

Los terpenoides o isoprenoides son la clase más diversificada de compuestos naturales sintetizados a partir de plantas, animales o microorganismos, con una suma de hasta 40,000 compuestos diferentes (Braga *et al.*, 2018).

Uno de los precursores más estudiados en la producción de monoterpenoides biotecnológicos es el limoneno, que se utiliza como ingrediente de fragancias en productos de limpieza, perfumes o sabores a cítricos en caramelos y bebidas y es precursor de compuestos como carvona, carveol, alcohol perílico, terpineoles, mentol y pineno, entre otros (Braga *et al.*, 2018). Tiene dos isómeros: El D-limoneno, componente principal de los aceites esenciales presentes en la cáscara de los cítricos (70-98 %), como naranja, limón, mandarina, toronja y lima. Y el L-limoneno, tiene un olor a aguarrás y también se encuentra en las plantas como el componente principal de los volátiles emitidos por robles y pinos (Ciriminna *et al.*, 2014).

Otro terpeno importante es la (+)-nootkatona con un sabor parecido al de la toronja, ligeramente amargo y tiene un umbral de olor bajo de aproximadamente 1 µg/L en agua. Estas características organolépticas únicas convierten a la (+)-nootkatona en

un producto muy demandado por las industrias de fragancias, alimentos, cosméticos y farmacéutica. El otro enantiómero sintético, la (-)-nootkatona tiene un débil sabor a madera y picante, y su umbral de olor en la fase acuosa es tres órdenes de magnitud más alto (Fraatz *et al.*, 2009).

### **1.1.2. Alcoholes superiores**

En esta categoría se encuentran los alcoholes de más de dos carbonos (superiores al etanol) que proporcionan aromas y sabores a las bebidas alcohólicas como el vino (Loviso & Libkind, 2019). Un compuesto muy importante entre ellos es el 2-feniletanol (2-PE), un alcohol muy valorado por presentar un olor característico al de las rosas que regularmente se sintetiza químicamente a partir de sustratos como el tolueno, benceno, estireno o metilfenilacetato (Nomura *et al.*, 2001). También se puede extraer de pétalos de rosa o sintetizarse por microorganismos como *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* desde L-fenilalanina (Shaaban *et al.*, 2016). Este alcohol superior es el precursor un importante éster aromático, el 2-feniletilacetato (2-PEAc), compuesto con un delicado aroma a rosa (Białecka-Florjańczyk *et al.*, 2012).

En la cerveza se han descrito hasta 40 alcoholes superiores diferentes; los que más influyen en el sabor y aroma son el propanol, el isobutanol, el 2-PE, el alcohol amílico y el AlCl. Este último debe ser vigilado cuidadosamente debido a que se encuentra en mayor proporción y a altas concentraciones genera un sabor a solvente (Loviso & Libkind, 2019).

### **1.1.3. Aldehídos**

Entre este grupo de compuestos encontramos como el más importante a la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) un aldehído fenólico que es el componente principal de la vainilla natural, y la MSA más importante y utilizada del mundo (Walton *et al.*, 2003). Es ampliamente utilizado en las industrias de alimentos, bebidas y cosmética. Además, recientemente se ha demostrado que la vainillina tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-apoptóticas (Scipioni *et al.*, 2018).

Otro de los compuestos de gran importancia en esta categoría es el cinnamaldehído, componente principal de la canela, especia muy famosa obtenida de la corteza de los árboles del género *Cinnamomum*, donde las especies *C. cassia* y *C. verum* contienen un porcentaje variable de cinamaldehído con hasta un 85.3 % y un 90.5 %, respectivamente. Además, se ha reportado que esta molécula tiene propiedades antimicrobianas (Doyle & Stephens, 2019).

Por último, se encuentra el benzaldehído, que es el segundo MSA más producido del mundo después de la vainillina. Tiene un distintivo sabor a almendras amargas y se emplea en alimentos, bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos (Li *et al.*, 2018).

#### **1.1.4. Cetonas**

En este grupo el compuesto más importante es la rasketona o cetona de frambuesa (4-(4-hidroxifenil)-butan-2-ona) es el único compuesto responsable del aroma natural de la frambuesa, utilizado en las industrias alimentaria y cosmética por sus propiedades fragantes únicas), además de presentar efectos en la salud, particularmente sobre el metabolismo de los lípidos y puede ayudar a prevenir la obesidad y estimular la pérdida de peso (Wang *et al.*, 2019). También se encuentra la 2-octanona con un aroma descrito como queso madurado, tipo bleu o parmesano con notas terrosas y matices lácteos, por lo que se clasifica como aditivo alimenticio y se reporta que tiene una demanda mundial de 10–100 toneladas métricas por año (Api *et al.*, 2019).

#### **1.1.5. Lactonas**

Las lactonas tienen fragancias de frutas características, más comúnmente olores de coco, melocotón, dulces o nueces. Estos compuestos se forman a partir de  $\beta$  y  $\gamma$ -hidroxiácidos como producto de la condensación de un grupo alcohol y un grupo ácido carboxílico, y comúnmente se producen por vía química (Palmerín-Carreño *et al.*, 2019). Son bien conocidos por su gran variedad de sabores y aromas (melocotón, piña, chabacano, frambuesa, fresa, mango, papaya, nata, coco y nueces) (Braga *et al.*, 2018). Las lactonas más importantes tienen anillos de cinco

y seis miembros,  $\gamma$ - y  $\delta$ -lactonas, respectivamente, con 12 carbonos iguales o menores. Incluye compuestos como 4-dodecanólido (frutal-coco),  $\gamma$ -decalactona (durazno), 4-octanolido (coco, dulce-herbáceo), 5-dodecanólido (durazno, frutal-aceitoso),  $\delta$ -decalactona (coco, cremoso/durazno), y 6-pentil- $\alpha$ -pirona (coco fuerte) (Braga *et al.*, 2018).

#### **1.1.6. Ésteres**

Los ésteres de ácidos carboxílicos son moléculas lipofílicas que se utilizan como ingredientes aromatizantes en la industria alimentaria y como disolventes e intermedios en procesos químicos y farmacéuticos (Park *et al.*, 2009). Los ésteres son compuestos derivados de los alcoholes superiores. Entre los más importantes se encuentran: el acetato de etilo (aroma a frutas), acetato de isoamilo (afrutado, aroma de plátano), caproato de etilo y caprilato de etilo (manzana ácida) y acetato de feniletilo (flores, rosas, miel) (Verstrepen *et al.*, 2003b)

Los ésteres son MSAs de uso común, muy apreciados por los aromas frutales que aportan, presentes de forma natural en las frutas, las cuales están presentes en concentraciones bastante bajas, en su mayoría entre 1 y 100 ppm. Se emplean en productos alimenticios de frutas (bebidas, dulces, jaleas y mermeladas), productos horneados ( pan, galletas), vinos y productos lácteos (mantequilla cultivada, crema agria, yogur y queso) (Amaral *et al.*, 2010). Debido a su gran importancia comercial, en la siguiente sección se profundizarán los ésteres como MSAs, haciendo énfasis en su modo de producción.

### **1.2. ÉSTERES COMO AROMAS Y SABORES**

Los ésteres son un grupo de moléculas importantes en las que se incluyen las MSAs. Los ésteres son formados por la unión de un ácido carboxílico y un alcohol y pueden ser lineales, ramificados, saturados, insaturados o aromáticos (Lee & Trinh, 2020). Tienen aplicaciones importantes en las industrias de sabores, fragancias, cosméticos y productos farmacéuticos (Lee & Trinh, 2020; Romero *et al.*, 2007). Además, debido a su polaridad, volatilidad y biodegradabilidad se utilizan como solventes verdes de menor impacto ambiental, en contraste con los clásicos

solventes orgánicos derivados de hidrocarburos (Byrne *et al.*, 2016). Asimismo, los ésteres de cadena larga se emplean como biocombustibles en forma de biodiesel; por ejemplo, los ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos (Kruis *et al.*, 2019).

Los ésteres se clasifican según su cadena alifática en la que se encuentra el grupo alcohol. Así, se distribuirán entre ésteres de ácidos grasos de cadena larga (C14+), ésteres de ácidos grasos de cadena media (C5-C13) y ésteres de ácidos grasos de cadena corta (C1-C4). En los dos últimos se ubican los ésteres con propiedades de sabor y aroma, como los pentanoatos o ésteres de acetato como el isoamil y etilacetato (Kruis *et al.*, 2019).

Los ésteres con propiedades saborizantes también son clasificados en dos categorías en función de su grupo funcional (alcohol y ácido carboxílico). La primera categoría es la de ésteres de acetato, en la cual el grupo ácido es acetato y el grupo alcohol es etanol o un alcohol complejo derivado del metabolismo de los aminoácidos (Saerens *et al.*, 2010). Algunos ejemplos importantes son el acetato de etilo, 2-fenil acetato, y el acetato de isoamilo (aroma a plátano); además de ser considerados como componentes importantes en el vino y otras bebidas alcohólicas fermentadas (Verstrepen *et al.*, 2003b). Los ésteres de acetato son un grupo importante de moléculas derivadas de acetil-CoA, metabolito precursor importante para la síntesis celular, por lo que, se encuentran a menudo en la naturaleza (Lee & Trinh, 2020). El acetato de etilo (AcE) es un compuesto volátil muy abundante, con una concentración de entre 50 a 100 mg/L en productos lácteos y de 8 a 64 mg/L en cerveza y vino. Otros ésteres como el Acl, PEAc, hexanoato de etilo, no superan la concentración 1 mg/L; a pesar de ello, estas son concentraciones alrededor o justo por encima del umbral de detección humana y, por lo tanto, afectan en gran medida el aroma del producto alimenticio (Kruis *et al.*, 2019).

En la segunda categoría se considera a los ésteres de ácidos grasos, en la cual el grupo ácido es un ácido graso de cadena media y el grupo alcohol es generalmente etanol; por ejemplo, hexanoato de etilo (aroma frutal) y octanoato de etilo (aroma de manzana agria) (Saerens *et al.*, 2010). Estas moléculas se pueden obtener por extracción de fuentes naturales, catálisis química y producción biotecnológica. La

**Tabla 2** resume las principales características de estos métodos, así como sus ventajas y desventajas.

**Tabla 2.** Métodos de obtención de ésteres.

Método de obtención	Ventajas	Desventajas
<b>Extracción de plantas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Productos naturales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajos rendimientos (1-100 ppm)</li> <li>• Costoso</li> <li>• Producción estacionaria</li> </ul>
<b>Síntesis química</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto rendimiento industrial que permite cubrir la demanda global</li> <li>• Bajo costo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Subproductos contaminantes</li> <li>• Productos “no naturales”</li> <li>• Baja aceptabilidad por parte del consumidor</li> </ul>
<b>Síntesis biotecnológica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bio-sustentable</li> <li>• Condiciones de trabajo suaves</li> <li>• Productos de alto valor agregado etiquetados como naturales</li> <li>• Se pueden utilizar residuos agroalimentarios como materia prima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor rendimiento que en la síntesis química</li> <li>• Pueden presentar inhibición por producto del crecimiento microbiano</li> </ul>

### 1.2.1. Extracción de plantas

La extracción de MSAs de fuentes naturales se realiza a partir de plantas silvestres, plantas con cultivo agrícola y cultivo de tejidos vegetales (Dubal *et al.*, 2008). La extracción de plantas silvestres puede ser sencilla, y para ello es necesaria una estrategia regulada que evite la sobreexplotación y el peligro de extinción a la especie utilizada. El cultivo agrícola, podría ser una de estas estrategias que permitiría obtener el aroma renovando la población de plantas utilizadas; sin embargo, esto puede dificultarse si la planta requiere condiciones específicas de crecimiento, además de que no está exento el ataque por plagas, enfermedades y

de la dependencia de condiciones climáticas adversas (Dubal *et al.*, 2008). Por lo que las técnicas de cultivo de células vegetales pueden disminuir la dificultad en el suministro de sabores naturales de manera sostenible al ayudar a la propagación de la planta en particular, que permiten a las células crecer en un medio líquido o sólido como los microorganismos en fermentación (Dubal *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 1990).

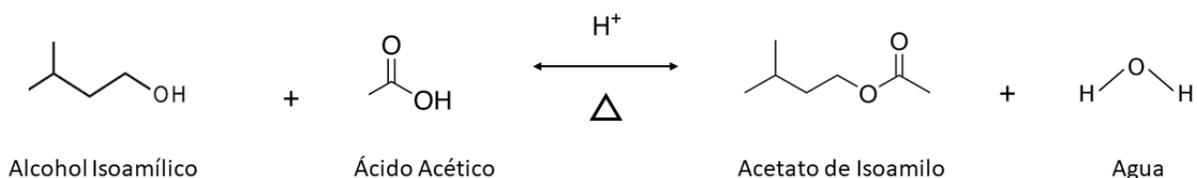
El proceso de extracción de los ésteres comerciales a partir de plantas puede llevarse a cabo por destilación de vapor del material vegetal, seguida de técnicas de destilación fraccionada (Akacha & Gargouri, 2015). Sin embargo, estos métodos de extracción están sujetos a varios problemas, como baja concentración del compuesto (de 1 a 100 ppm), los costos de procesamiento posterior y la variación estacional de los materiales y del clima, que pueden afectar significativamente el rendimiento y la calidad de los sabores extraídos haciendo este proceso inadecuado para aplicaciones industriales (Amaral *et al.*, 2010; Dubal *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2007).

Osborn *et al.* (1996) realizaron estudios de extracción de acetaldehído, etanol, y AcE de las semillas de cacahuate por un proceso de secado con aire caliente. Las mayores concentraciones de acetaldehído, etanol y AcE se obtuvieron a partir de las semillas inmaduras que fueron deshidratadas a 40 °C. La tasa de producción de AcE fue proporcional a la concentración de etanol, y la concentración máxima de AcE fue de aproximadamente 135  $\mu\text{mol/kg}$  de peso seco a las 60 horas. Hong *et al.* (1990) investigaron el potencial de cultivos de tejidos de fresa para la producción de MSAs típicas de la fruta, utilizando ácidos grasos de cadena corta y  $\alpha$ -cetoácidos. Al analizar mediante cromatografía de gases se comprobó que estos cultivos eran capaces de producir butirato de etilo y butirato de butilo al convertir el  $\alpha$ -cetovalerato en butanal y butanol.

### 1.2.2. Síntesis química

La producción industrial de estos compuestos se realiza principalmente por síntesis química; particularmente utilizando el mecanismo de esterificación de Fischer-Speier (**Figura 1**) en presencia de un catalizador ácido a altas temperaturas (Fischer

& Speier, 1895). Los alcoholes y ácidos carboxílicos se condensan en un proceso en el que se liberan moléculas de agua. Sin embargo, el proceso está definido por el equilibrio que reduce la velocidad de reacción con el tiempo y evita una conversión completa de todos los sustratos ácidos y alcohólicos. Además, se ha descubierto que el agua inhibe la actividad catalítica del catalizador utilizado (Kruis *et al.*, 2019). Los ésteres sintetizados por métodos químicos generalmente utilizan ácidos como catalizadores, lo que requiere de un postratamiento para eliminarlos y por lo tanto encarecen el producto final (Ghamgui *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Reacción química de la esterificación de acetato de isoamilo (Esterificación de Fischer-Speier).

Entre algunos ejemplos del uso de los sistemas químicos se encuentra el trabajo de Joseph *et al.* (2005), quienes catalizaron la esterificación de Fischer & Speier de ácido acético y alcohol bencílico para producir acetato de bencilo con un líquido iónico, ácido [p-toluenosulfónico de 1-butilo]<sup>-</sup> [3-metilimidazolio]<sup>+</sup>, como catalizador durante 2 h a manera de ácido de Brønsted, obteniendo una conversión máxima y selectividad de 100 %. Furuta *et al.* (2017), reportaron la catálisis de la esterificación de Fischer & Speier con diferentes ácidos carboxílicos y metanol utilizando un catalizador sólido de sílice funcionalizado con ácido sulfónico y grupos hidróxido a 110 °C con un tiempo de residencia de 3 min. Se sintetizaron 19 ésteres de cadena larga con rendimientos de reacción desde 6 % para 2-(2-Metoxi-2-oxoetil) benzoato de metilo y de hasta 99 % para laurato de metilo.

### 1.2.3. Síntesis biotecnológica

La síntesis biotecnológica de ésteres se caracteriza por utilizar condiciones de reacción no extremas, así como enzimas y microorganismos que son catalizadores con inocuidad al medio ambiente; estas son ventajas ecológicamente deseables. Además, de que los productos obtenidos por síntesis biotecnológica son económicamente ventajosos debido a que las regulaciones de Estados Unidos y Europa estipulan que los sabores obtenidos por procesos microbianos y enzimáticos pueden ser considerados como “compuestos naturales” siempre y cuando la materia prima utilizada sea de una fuente natural (Brault *et al.*, 2014). Entonces un producto sintetizado de forma biotecnológica puede ser etiquetado como “producto natural”, lo cual conlleva a una mejor aceptación del consumidor pues las tendencias del mercado actual se dirigen al consumo de productos naturales y menos industrializados. En la síntesis biotecnológica se utilizan dos procesos: la síntesis *de novo* y la biocatálisis que se describen a continuación.

#### 1.2.3.1 Síntesis *de novo* de ésteres

La síntesis *de novo* se define como la producción de compuestos aromáticos utilizando medios de cultivo sencillos, en la que las células microbianas catabolizan carbohidratos, grasas y proteínas y los productos de degradación se transforman posteriormente en MSAs (Braga *et al.*, 2018; Shaaban *et al.*, 2016). Estos medios de cultivo suelen ser los comerciales para crecimiento de microorganismos, como el medio comercial Luria-Bertani que Kunjapur *et al.*, (2014) utilizaron para el crecimiento *Escherichia coli* modificada genéticamente para sobreproducción de MSAs. Dado que utiliza todo el sistema metabólico del microorganismo, la síntesis *de novo* generalmente produce una mezcla de varios compuestos aromáticos en lugar de solo un único compuesto deseado (Shaaban *et al.*, 2016).

Algunos microorganismos, entre ellos bacterias (*Clostridium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *etc.*), hongos (*Beuveria*, *Pycnoporus*, *Aspergillus*, *etc.*) y levaduras (*Yarrowia*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *etc.*) pueden sintetizar ésteres como metabolitos secundarios durante la fermentación en síntesis *de novo* (Shaaban *et al.*, 2016; Verstrepén, *et al.*, 2003a). Para ello se requiere la

producción del alcohol superior (alcohol de más de 2 carbonos) por la vía de Ehrlich, en donde aminoácidos como valina, leucina, isoleucina, y fenilalanina son biotransformados a alcoholes superiores como isobutanol, alcohol amílico, AlCl, y 2-PE, respectivamente (Loviso & Libkind, 2019); y a partir del alcohol superior se sintetiza el éster respectivo, acetato de isobutilo, Acl, 2-PEAc, catalizados por lipasas, esterasas o alcohol acetiltransferasas (AATs) (Palmerín-Carreño *et al.*, 2019).

Dado que las MSAs en la naturaleza normalmente se producen a concentraciones muy pequeñas, se han desarrollado mecanismos de ingeniería genética para aumentar la producción. Guo *et al.* (2017) utilizaron ingeniería genética para aumentar la producción de 2-PEAc a partir de L-fenilalanina por *E. coli*, utilizando una vía sintética de cuatro pasos: transaminación de L-fenilalanina a fenilpiruvato con una aminotransferasa, descarboxilación del fenilpiruvato a fenilacetaldehído con 2-cetoácido descarboxilasa, y reducción de fenilacetaldehído a 2-PE con un aldehído reductasa, finalmente la esterificación de 2-PE a 2-PEAc con una AATs. Ellos reportan una coproducción de  $268 \pm 4.21$  mg/L de 2-PEAc y  $277 \pm 4.26$  mg/L de 2-PE a partir de 1 g/L de L-fenilalanina, donde aproximadamente el 28 % del sustrato L-fenilalanina se biotransformó en 2-PE y el 27 % en 2-PEAc.

En la síntesis de AcE, las levaduras pueden producirlo mediante adición exógena de acetato y etanol catalizado por una lipasa, o bien por síntesis *de novo*, desde azúcares que se transforman en piruvato y después en acetil-CoA y etanol (por fermentación) que por acción AATs se transforma en AcE (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, esto producirá irremediablemente, una baja concentración del éster debido a la preferencia del acetil CoA por la ruta de los ácidos tricarboxílicos. Löser *et al.* (2013) catalizaron la síntesis de AcE utilizando *Kluyveromyces marxianus* y lactosa del suero de leche, suplementado con hierro y cultivado aeróbicamente. Una dosis intermedia de Fe (aproximadamente 0.5  $\mu$ g de Fe/g de azúcar) provocó un rendimiento bastante alto de AcE. La masa de AcE relacionada con el consumo de azúcar fue de 0.239 g/g y un rendimiento máximo de 46.3 %.

### 1.2.3.2 Biocatálisis de ésteres

La síntesis por biocatálisis se define como el uso de enzimas o células en la catálisis de reacciones químicas (Kakaei *et al.*, 2019). En los procesos biocatalíticos, la síntesis de una o varias sustancias aromáticas se realiza mediante la adición de precursores al medio de cultivo (Shaaban *et al.*, 2016). Se ha reportado ampliamente la producción de varios ésteres con propiedades aromáticas como el bencilacetato (sistema SO), cinamil acetato (sistema LS), eugenil acetato (sistema FSC), entre otros (Gomes Almeida *et al.*, 2017).

Aljawish *et al.* (2019) realizaron esterificaciones con ácido fórmico y alcoholes (C4-C8) en acetonitrilo como solvente (0.5 M ácido, 1.5 M alcohol) y LS (1 M ácido, 10 M alcohol) a 40 °C, 400 rpm utilizando la CALB (2 %) como catalizador; y reportaron la obtención de la misma tasa de esterificación en todas las reacciones (90 %) pero a menor tiempo que el requerido en el sistema LS (8 h en acetonitrilo contra 5 h en el sistema LS).

Lozano *et al.* (2012) en presencia de LIs realizaron la síntesis de distintos ésteres con propiedades saborizantes catalizada por CALB entre un ácido alifático (acético, propiónico, butírico o valérico) y un alcohol aromático (alcohol isoamílico, nerílico, citronerílico o geranílico) con un rendimiento del producto cercano al 100 % en un medio de reacción con LI donde se obtuvieron dieciséis ésteres aromáticos de hasta 0.757 g/mL de concentración para el geranil valerato tras la separación del LI.

Los ésteres como aromas son de alta importancia industrial y estos pueden ser obtenidos por diversos métodos, por lo que es necesario estudiar a fondo estas estrategias de producción de ésteres para cada caso particular, pues no todos son aptos para todo tipo de catálisis, en este sentido, en lo sucesivo, se considerará a la producción de Acl como modelo de análisis. Para dimensionar de mejor forma la importancia de los ésteres, se realiza a continuación un análisis del mercado global de las MSAs con énfasis en los ésteres y su comparación con otras moléculas dentro de este grupo.

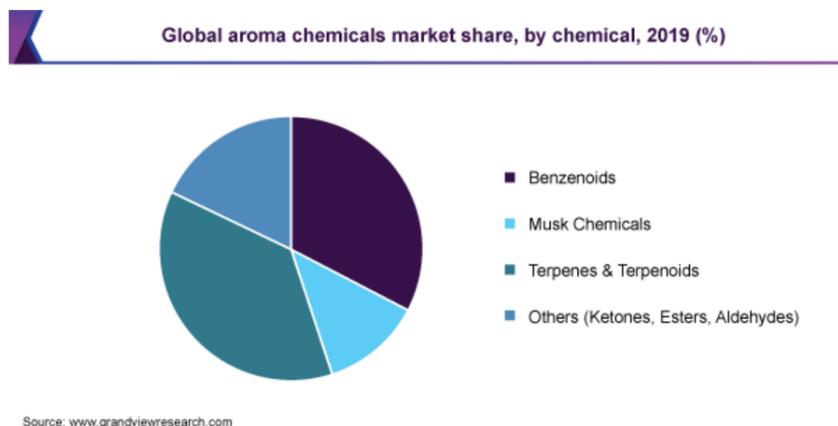
### 1.3 PERSPECTIVAS ECONÓMICAS DE LOS ÉSTERES.

En general el mercado mundial de las MSAs ha sido valuado en USD 5,500 millones en el año 2019 y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 5.8 % de 2020 a 2027 (<https://www.grandviewresearch.com/>).

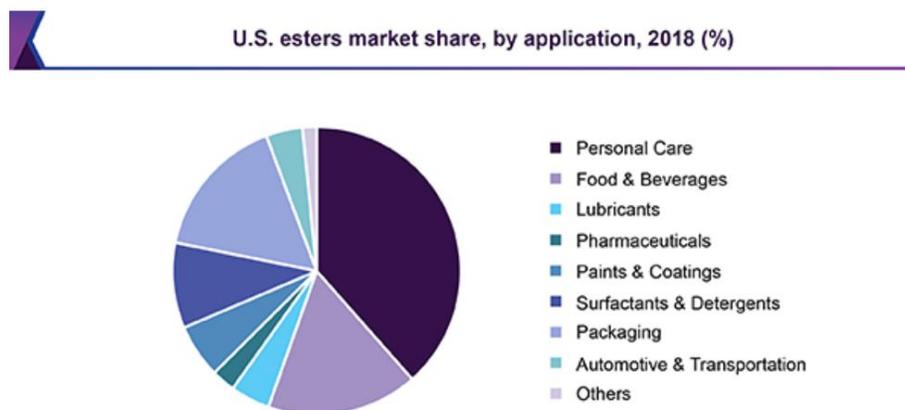
Debido a la importancia de las MSAs en el mercado de alimentos, salud y productos de cuidado personal, se han llevado a cabo diversos estudios para poder estimar su crecimiento y aplicaciones en las siguientes décadas. Dentro de las MSAs, los ésteres, aldehídos y cetonas tienen un mercado significativo (**Figura 2**), destacando los ésteres con aroma frutal, tomando en cuenta las diversas aplicaciones de estos compuestos, donde el mayor mercado de las MSAs se encuentra en los productos de cuidado personal, seguido por la industria de bebidas (**Figura 3**).

La industria de ésteres se valoró en 18.6 billones de USD en 2016, se espera que alcance los 26.8 billones de USD en 2022 a una tasa compuesta anual del 6.3 % entre 2017 y 2022 según las webs de evaluación de mercado Acme-Hardesty y Zion Market Research (<https://www.acme-hardesty.com/>; <https://www.globenewswire.com/>). Particularmente, se tiene previsto que los ésteres de ácidos grasos alcanzarán una demanda mundial de 2.3 billones de dólares USD en 2025 en sectores de alimentos, cuidado personal y cosméticos, así prevé ReportLinker (<https://www.reportlinker.com/>).

Comparando con otras MSAs en Estados Unidos (**Figura 2**), los más abundantes son los terpenos y terpenoides, con alrededor del 40 % del mercado. Dentro de estos compuestos, destaca el limoneno, ya que se emplea como precursor de diversos terpenos de interés industrial y además se utiliza ampliamente como aditivo en alimentos y como aroma en productos de limpieza, cosméticos y de cuidado personal (Braga *et al.*, 2018). Otro grupo de compuestos con gran importancia son los derivados del benceno, cubriendo un 30 % del mercado, entre estos compuestos se encuentra el 2-feniletanol, un alcohol superior con aroma a rosas que se sintetiza químicamente a partir de benceno, tolueno, estireno o metil fenilacetato (Nomura *et al.*, 2001).



**Figura 2.** Mercado global de compuestos aromáticos en 2019. Fuente: Grandviewresearch.com



**Figura 3.** Distribución del mercado de ésteres en Estados Unidos. Fuente: Grandview Research.

A pesar de que los ésteres cubren un porcentaje pequeño en el mercado global de MSAs, siguen teniendo una presencia importante en este mercado, teniendo aplicaciones en bebidas, alimentos, farmacéutica, perfumes, productos de limpieza, jabones, detergentes y productos de higiene bucal (Carroll et al., 2016; Lee & Trinh, 2020). Dentro de los ésteres, el acetato de isoamilo es de las moléculas más importantes en este sector con una demanda mundial anual de 74,000 kg (Kirdi et al., 2017), esta demanda seguirá aumentando en los próximos años. Debido su importancia comercial en las distintas industrias, constantemente se buscan nuevos

métodos de síntesis de este compuesto para poder cubrir la demanda mundial. Dada la diversidad de técnicas y métodos utilizados, en el siguiente capítulo se pretende realizar un análisis profundo de la síntesis de acetato de isoamilo, los métodos de síntesis, catalizadores, soportes empleados etc., que se han desarrollado hasta el momento.

**CAPÍTULO 2.**

**PRODUCCIÓN DE ACETATO DE ISOAMILO-  
BIOCATÁLISIS.**

## 2.1. ACETATO DE ISOAMILO

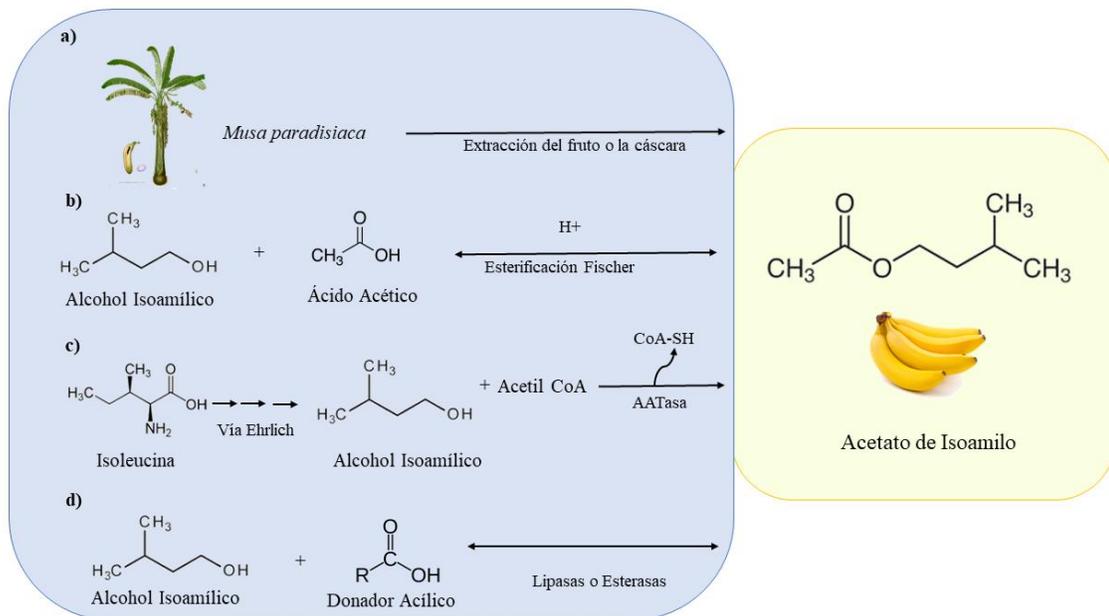
La producción de Acl puede realizarse por extracción a partir de fuentes vegetales, por producción mediante síntesis química (por esterificación al igual que los demás ésteres), por síntesis *de novo* mediante la vía de Ehrlich; o por biocatálisis utilizando enzimas o células completas (**Figura 4**).

La extracción natural que permite obtener este éster a partir de fuentes vegetales particularmente de la banana (*Musa acuminata*, *Musa balbisiana* y *Musa paradisiaca*) (**Figura 4a**). Boudhrioua *et al.* (2003) realizaron un estudio sobre los cambios del aroma en bananas debido a la maduración, extrayendo los componentes por medio de una micro extracción en fase sólida, obteniendo  $5.32 \pm 0.02$  % de Acl respecto a todos los compuestos aromáticos de la banana.

Sin embargo, debido al bajo rendimiento de extracción, y que no se logra satisfacer las necesidades del mercado, además de ser costoso para la explotación comercial. Por lo que, se ha optado por su síntesis química (**Figura 4b**) por medio del mecanismo de esterificación de Fischer & Speier con ácido sulfúrico concentrado como catalizador, utilizando como sustratos, AlCl y AcA (Torres *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso de ácidos fuertes y el requerimiento de condiciones extremas durante la reacción hace que el proceso sea altamente contaminante, por lo que se han buscado alternativas. En este sentido, se han utilizado últimamente catalizadores sólidos que permitan procesos más sustentables, como el caso de Corregidor *et al.* (2020) que realizaron la síntesis química de Acl a partir AlCl y vinilacetato utilizando un catalizador heterogéneo de zeolita con sitios ácidos de Brønsted como alternativa a la tradicional síntesis de Fischer obteniendo hasta un 98 % de conversión con una relación alcohol:éster 3:1.

Sintetizando una molécula similar, Xue *et al.* (2018) catalizaron la síntesis de benzoato de isoamilo desde ácido benzoico y AlCl utilizando ácido p-toluensulfónico como catalizador, debido a que puede ser utilizado a condiciones menos extremas y no es tan corrosivo en comparación con el ácido sulfúrico utilizado convencionalmente. Ellos reportaron una temperatura de 383.15 K, relación molar

ácido: alcohol de 1:6 como condiciones óptimas para obtener conversiones por arriba del 90 %.

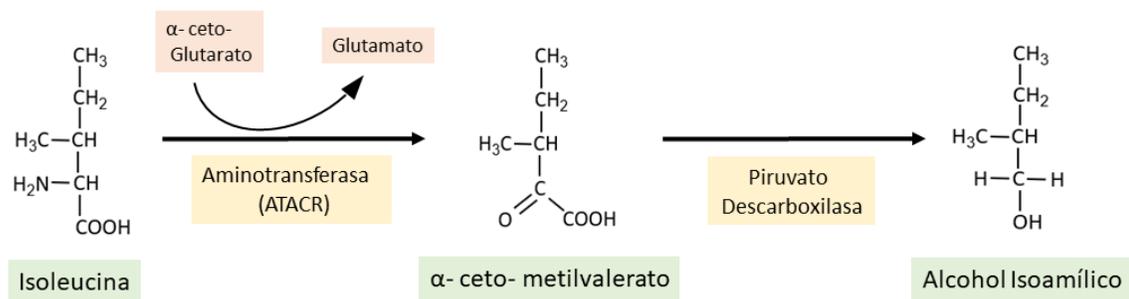


**Figura 4.** Métodos de producción de acetato de isoamilo. a) Extracción a partir de plantas, b) Producción por síntesis química, c) Síntesis *de novo* mediante la vía de Ehrlich, d) Biocatálisis.

En el caso particular de la producción biotecnológica del Acl mediante síntesis *de novo* (**Figura 4c**), los aminoácidos que están involucrados en su síntesis son la isoleucina y la valina, como parte del metabolismo secundario de microorganismos como *Saccharomyces*. Para que esto ocurra, deben actuar enzimas transaminasas que catalizan la transferencia de un grupo amino entre el aminoácido y su correspondiente cetoácido, descarboxilasas que eliminan el grupo carboxilo del cetoácido, y alcohol deshidrogenasas que reducen al aldehído producido en la anterior etapa para dar lugar al alcohol superior (Loviso & Libkind, 2019).

Dickinson *et al.* (2000) estudiaron las rutas metabólicas involucradas en el catabolismo de isoleucina para la síntesis de Acl (2-metilbutanol) en *S. cerevisiae*. Para ello propusieron 3 posibles rutas y para identificar cual era la correcta,

estudiaron una serie de mutantes con algunos genes eliminados de estas enzimas. Los experimentos realizados con las mutantes permitieron concluir que la ruta que sigue el organismo es la siguiente (**Figura 5**): primero la isoleucina se descarboxila para dar lugar  $\alpha$ -ceto-metilvalerato con una aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (ATACR) los cuales son valina, la leucina y la isoleucina. Posteriormente el  $\alpha$ -ceto-metilvalerato pasaría directamente a 2-metilbutanol por medio de una descarboxilación con piruvato descarboxilasa o una enzima similar.



**Figura 5.** Síntesis *de novo* de alcohol isoamílico dilucidada por Dickinson et al. (2000).

Una vez obtenido el alcohol superior, la síntesis del éster se realiza mediante la esterificación, donde las enzimas involucradas pueden ser AATs, esterasas o lipasas. Para síntesis *de novo* se ha documentado muy bien la síntesis con AATs en donde el donador del grupo acetilo es el acetil-CoA (Liu *et al.*, 2004; Verstrepen *et al.*, 2003a; Verstrepen *et al.*, 2003b). La síntesis de Acl en *S. cerevisiae* se realiza a través de la esterificación del Acl, en donde el acetil-CoA actúa como donador del grupo acetilo (**Figura 4c**) por medio de la AATs. El gen ATf1 es el que codifica para la síntesis de AATs en *S. cerevisiae* y ha sido ampliamente estudiado, se reporta que juega un papel importante en la producción de acetato de isoamilo y, en menor medida, AcE durante la fermentación de la cerveza en la síntesis *de novo* (Lilly *et al.*, 2000).

Diversas referencias que involucran la síntesis *de novo* de este compuesto son sobre fermentaciones alcohólicas donde usualmente se produce Acl a concentraciones bajas, por lo que no es suficiente para su explotación comercial. Plata *et al.* (2003) realizaron estudios de fermentación de vinos con 7 especies de levaduras midiendo la producción de etanol y AlCl, así como de sus ésteres, encontrando una mayor producción de ésteres y baja hidrólisis con *Kloeckera apiculata*, aun así, la concentración máxima alcanzada fue de 300 µg/mL para acetato de etilo y 0.6 µg/ mL para Acl. Si bien estos valores son suficientes para percibirlos en el vino y darle sus características sensoriales, no serían viables para una producción industrial.

Yilmaztekin *et al.*, (2009) utilizando *Williopsis saturnus* var. *saturnus* realizaron la síntesis *de novo* de este compuesto utilizando melaza potenciada con aceite de fusel. El aceite de fusel (1, 2 y 3 %) fue agregado a las 72 horas de fermentación, una vez alcanzada la fase estacionaria, se encontró que al agregar una concentración cada vez mayor de aceite de fusel disminuía la viabilidad celular (en un 5, 10 y 27 %, respectivamente). Las mejores conversiones se obtuvieron con 1 % de aceite de fusel (que contenía 948 y 989 mg/L de alcohol amílico y AlCl), la cantidad máxima de Acl se observó a las 144 h de fermentación a 354 mg/L. Donde el AlCl (3-metilbutanol) es más rápidamente catalizado al éster que el alcohol amílico (2-metilbutanol) (Yilmaztekin *et al.*, 2008).

Quilter *et al.* (2003) produjeron Acl con *S. cerevisiae* mediante la adición de 4 g/L L-leucina, 1000 ppm de aceite de fusel con 54.5 % de alcohol amílico en mosto de alta densidad y en condiciones de pH alcalino 8.5; logrando más de 80.7 ppm de Acl después de 5 resiembras del microorganismo para aumentar su especificidad. Además, lograron duplicar la cantidad de Acl utilizando mutantes aislados en medio 5,5,5, trifluoro-DL-leucina. Si bien la cantidad de Acl producido es baja en términos cuantitativos, es cien veces mayor que el umbral de percepción de este compuesto (1.6 ppm).

La otra manera de producir estos compuestos es mediante biocatálisis (**Figura 4d**). Esta puede realizarse tanto por CC como por enzimas aisladas, tanto en estado

libre suspendidas en un fluido o inmovilizadas en una matriz sólida. En las reacciones de un solo paso, las enzimas aisladas son más ventajosas en comparación con las CC, ya que no deberían producirse reacciones secundarias y los sustratos no tienen que ser transportados a través de las membranas. Sin embargo, en los procesos de bioconversión de varios pasos las CC son preferibles debido a que una sola célula puede contener todas las enzimas necesarias para llegar al producto final (De Carvalho, 2011).

Una gran ventaja de la producción de Acl por biocatálisis microbiana es la posibilidad de utilizar sustratos renovables y/o sostenibles, como subproductos agroalimentarios que aportan desde ácidos carboxílicos hasta biomasa lignocelulósica (Lee & Trinh, 2020). El AlCl principal precursor del Acl, puede obtenerse a partir de aceite de fusel, el cual contiene alrededor de 65 % de AlCl y es un subproducto de la industria vinícola (Kirdi *et al.*, 2017). El empleo de leucina y aceite de fusel han demostrado aumentar la producción de este compuesto desde 118 a 354 mg/L (Mhetras *et al.*, 2010; Quilter *et al.*, 2003; Yilmaztekin *et al.*, 2009).

En la biocatálisis del Acl, se hace reaccionar el AlCl con un donador acílico tal como AcA, anhídrido acético (AnhA), acetato de vinilo, AcE, acetato de amonio, entre otros (Kumari *et al.*, 2009; Romero, *et al.*, 2005). Para la producción de Acl se utilizan enzimas o CC de forma libre o inmovilizada, distintos sistemas de reacción (SO, LS, FSC, entre otros) (Cordero-Soto *et al.*, 2020) y condiciones de operación (temperatura, presión, actividad de agua) a fin de obtener un rendimiento prometedor para su potencial explotación industrial. Dada la importancia de la biocatálisis, se discutirá en los siguientes apartados los aspectos de su aplicación, las enzimas que intervienen en la síntesis de Acl, así como los sistemas biocatalíticos disponibles para ello.

## **2.2. BIOCATALIZADORES UTILIZADOS EN LA SÍNTESIS DE ACETATO DE ISOAMILO**

### **2.2.1. Enzimas**

Las enzimas microbianas que se han descrito como responsables de la esterificación son: AATs (EC 2.3.1.84), esterases (EC 3.1.1.3) alcohol

deshidrogenasas (ADHs) (EC 1.1.1.1), monoacilglicerol lipasas (EC3.1.1. 33) y Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs) (EC 1.14.13.92) (Reyes-Sanchez *et al.*, 2020). Se han sugerido AATs, ADHs y esterasas como los principales catalizadores en la síntesis de acetato de etilo (Kruis *et al.*, 2017). Algunas ADHs, enzimas clave en la producción y utilización de los alcoholes, también catalizan la formación de ésteres de carboxilato a partir de alcoholes y aldehídos mediante la oxidación de hemiacetales bajo el suministro del cofactor NAD(P)<sup>+</sup> (Park *et al.*, 2007); sin embargo, este suministro no sería conveniente en la biocatálisis a nivel industrial por el costo que implica el suministro del cofactor. Además, la actividad principal de estas enzimas es la de catalizar la interconversión de alcoholes a aldehídos o cetonas más que a la síntesis de ésteres (Kusano *et al.*, 1998). Para la síntesis de Acl, las 3 enzimas más importantes reportadas son las AATs, las esterasas y las lipasas.

#### 2.2.1.1. *Alcohol aciltransferasas*

La función de estas enzimas es llevar a cabo la catálisis de ésteres de acetato por condensación de alcohol y acetil-CoA para formar un éster (Reyes-Sanchez *et al.*, 2020). La síntesis de ésteres de acetato por levaduras de *S. cerevisiae* durante la fermentación del vino ha sido ampliamente estudiada y atribuida a la actividad de al menos tres AATs, las cuales son: alcohol acetiltransferasa, etanol acetiltransferasa y alcohol isoamílico acetiltransferasa (Lilly *et al.*, 2000). En algunas levaduras se ha sugerido la hipótesis que una AAT es la responsable de la síntesis de ésteres y que su función es liberar Coenzima A (CoA) libre en condiciones en las que se acumula demasiado acetil-CoA en la célula, lo que agota la reserva de CoA libre (Kruis *et al.*, 2017). Se ha reportado que en las levaduras *S. cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* sólo se produce Acl por medio de la síntesis con AAT con Acl y acetil CoA (Yoshioka & Hashimoto, 1981). Las AATs I y II que están codificadas por los genes ATF1 y ATFZ, respectivamente. Las enzimas Atflp y Atf2p son, al menos parcialmente responsables de la producción de Acl y AcE (Verstrepen *et al.*, 2003b). Aunque no hay pruebas precisas de la función biológica de estos compuestos, se ha sugerido

que la reacción de AAT Atf2p está relacionada con un proceso de desintoxicación (Rodríguez-Romero *et al.*, 2020).

Constantemente se están estudiando los efectos de estas enzimas, por ejemplo Kruis *et al.* (2017) describieron una nueva familia, las etanol aciltransferasas (EATs) dentro de las AATs, que contribuye en gran medida a la síntesis de acetato de etilo en *S. cerevisiae*, de la que destaca EAT1, donde la sobreexpresión de esta enzima aumentaba la producción del éster y al apagarse los genes que expresaban la enzima la producción de acetato de etilo disminuía en un 50 %, aunque no es Acl, el AcE comparte muchas rutas metabólicas con éste, de allí la importancia de analizarlo. Esto se comprueba en un trabajo posterior dentro del mismo grupo de investigación, Kruis *et al.* (2018) estudiaron el efecto combinado de las EATs en la síntesis de diferentes ésteres en *S. cerevisiae* con el de otras AATs de la misma levadura, así como de las eliminaciones de todas las AATs formadoras de ésteres. Quince enzimas de la familia EAT de nueve especies de levadura se sobreexpresaron en *S. cerevisiae* y fueron capaces de aumentar la producción de ésteres de acetato. Luego cuando analizaron mutantes con los genes apagados, al interrumpir todas las AATs conocidas, la mutante aún pudo seguir produciendo acetato de isoamilo y acetato de etilo hasta en un 50 %, por lo que aún existen algunos mecanismos desconocidos de producción de ésteres en esta levadura (Kruis *et al.*, 2018). Posiblemente podría atribuirse a las esterasas o ADH.

#### 2.2.1.2. *Esterasas*

Las esterasas (EC 3.1.1.x) representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la escisión y formación de enlaces éster. También llamadas esterasas "verdaderas" (EC 3.1.1.3, carboxil-éster hidrolasas), para diferenciarlas de las lipasas (Bornscheuer, 2002). Sin embargo, las esterasas se diferencian de las lipasas principalmente por la especificidad del sustrato y la activación interfacial (Panda & Gowrishankar, 2005). Las esterasas se han reconocido principalmente como enzimas que actúan sobre ésteres solubles en agua que contienen residuos de acilo de cadena corta (<8 átomos de carbono) (Romano *et al.*, 2015). Respecto a la activación interfacial, las lipasas, que tienen un dominio hidrófobo que cubre el sitio

activo, prefieren los triglicéridos de los ácidos grasos de cadena larga y, por lo tanto, tienen propiedades diferentes a las esterasas, que tienen una bolsa de unión para la cadena acilo del enlace éster (Panda & Gowrishankar, 2005). Se ha reportado actividad esterasa en ésteres como el acetato de etilo junto con las AATs (Yoshioka & Hashimoto, 1981).

La síntesis de Acl con esterasas se ha realizado utilizando una carboxilesterasa de *Bacillus licheniformis* con AlCl y p-nitrofenilacetato como donador acílico (Torres *et al.*, 2009). Hay pocos reportes de producción de Acl a partir de AlCl y AcA por actividad esterasa. De hecho, la evidencia sugiere que es más probable que la actividad de la esterasa reduzca la concentración de éster a que la mejore (Inoue *et al.*, 1994; Quilter *et al.*, 2003), como es el caso de Fukuda *et al.*, (1996) que aislaron y caracterizaron la carboxilesterasa est2 que hidroliza Acl, y al eliminar el gen que codifica esta enzima de la levadura, produce una acumulación de hasta 19 veces mayor de dicho éster. También es sabido que las lipasas pueden aceptar sustratos más grandes que las esterasas, por ello se utilizan más frecuentemente en la síntesis de ésteres (Zhang *et al.*, 2020).

Dado que en muchos casos no es claro cuál de las posibles enzimas es responsable de la síntesis de ésteres, Nardi *et al.* (2002) estudiaron la capacidad de *Lactococcus lactis* para sintetizar estos compuestos *in vitro*, preparando mutantes negativas a la *lacctococal* esterasa, esto con el objetivo de probar si dicha esterasa era enteramente responsable de la síntesis de ésteres en el organismo. Los resultados indicaron que la actividad residual de síntesis de éster del mutante negativo era del 3.4 % de la bacteria original, por lo que, aunque esta actividad residual podría deberse a alguna otra enzima dentro de la célula (como lipasas o AATs), la principal actividad de síntesis de ésteres en *L. lactis* es debido a la esterasa.

### 2.2.1.3. Lipasas

En la síntesis de ésteres por biocatálisis, las enzimas más estudiadas son las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) En tanto las lipasas se consideran generalmente como carboxiléster hidrolasas lipolíticas capaces de hidrolizar ésteres insolubles en agua, liberando ácidos grasos de cadena larga (> 8 átomos de

carbono) (Romano *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se emplean en entornos con baja actividad de agua, pueden realizar la reacción inversa, la esterificación. Las biotransformaciones catalizadas por lipasas han ganado importancia debido a su regio y estéreo-especificidad de sustrato, sus condiciones de reacción más suaves y el requerimiento de energía relativamente más bajo (Krishna *et al.*, 2000). Las reacciones más reportadas para estas enzimas son la hidrólisis, acidólisis, alcoholólisis, amilólisis, esterificación e interesterificación (Martinez-Perez *et al.*, 2019).

Las lipasas son producidas por diversos microorganismos, como bacterias, levaduras u hongos filamentosos (Fickers *et al.*, 2004). Se han descrito diversos géneros de microorganismos productores de lipasas, tales como, hongos de los géneros *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* y *Geotrichum*; levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Candida*; y bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* (Singh & Mukhopadhyay, 2012; Yadav *et al.*, 2019).

Respecto a la forma en que trabaja esta enzima, se ha ejemplificado con el AcE: las lipasas capturan primero el AcA para formar un complejo de lipasa-acetato. Entonces, el complejo se convierte en un intermedio de acil-lipasa bajo el efecto de la isomerización. Posteriormente, la acil-lipasa reacciona con el etanol para producir el complejo acetato de etilo-lipasa. Eventualmente, el AcE se liberará del complejo (Zhang *et al.*, 2020).

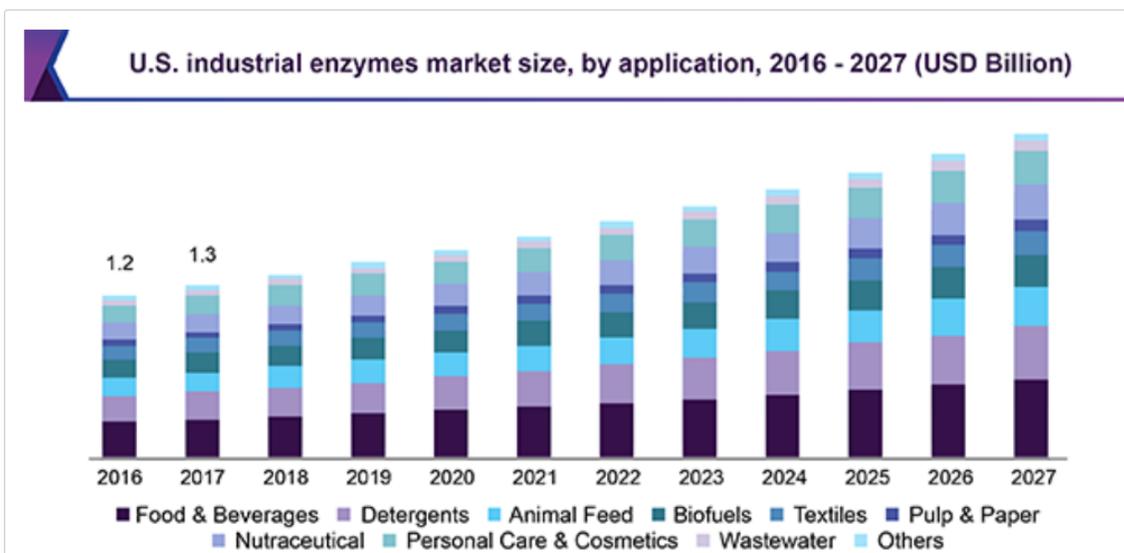
La lipasa comercial CALB *Novozym*® 435 ha sido la más estudiada por su alto rendimiento. Kumar *et al.* (2005) estudiaron la esterificación de ácidos grasos con diferente longitud de cadena y AlCl con tres lipasas diferentes, en donde la CALB mostró especificidad para ambos ácidos grasos (cadena corta, lineal y ramificada). Cvjetko *et al.* (2012) también realizaron la esterificación del AlCl empleando CALB. La lipasa mostró alta especificidad por el alcohol, obteniendo un rendimiento del 92 % de AclA empleando AcA como donador del grupo acetilo. Por otra parte, Mhetras *et al.* (2010) estudiaron la capacidad de producción de Acl de CALB y una

lipasa de *Aspergillus niger* NCIM 1207, en donde ambas produjeron prácticamente la misma cantidad de Acl (80 g/L) pero CALB lo hizo a un tiempo mucho menor (4 h) que la de *A. niger* (96 h).

En conclusión, las lipasas son las enzimas que más se han estudiado para la síntesis de ésteres y en particular el Acl, debido a que son fácilmente utilizadas en las reacciones de biocatálisis pues no requieren de elementos externos como cofactores, a diferencia de las AATs que son utilizadas principalmente en síntesis *de novo* y que su participación en biocatálisis involucraría la administración de la CoA como cofactor que encarecería el producto. Por otro lado, las esterasas a pesar de ser teóricamente más aptas para la síntesis de ésteres de cadena corta como el Acl, las reacciones de síntesis enzimática estudiadas hasta ahora se han llevado a cabo principalmente mediante lipasas. Esto debido al conocimiento popular sobre las lipasas como enzimas muy fuertes, como “caballos de trabajo”, y también porque son capaces de actuar de manera eficiente en interfaces orgánico-acuosas y en ambientes con restricción de agua (Torres *et al.*, 2010), por lo que a partir de ahora enfocaremos la revisión a esas enzimas principalmente.

### **2.2.2. Perspectivas económicas: Enzimas**

El mercado mundial de enzimas se valoró en USD 9.9 mil millones en 2019 y se espera que crezca a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) de 7.1 % de 2020 a 2027 de acuerdo con los datos reportados por la consultoría Grand View Research. Por esta razón, se prevé un aumento en la demanda de enzimas por parte de las industrias de alimentos y bebidas, biocombustibles, alimentación animal y limpieza del hogar. En la **Figura 6**, se puede observar la tendencia del crecimiento del mercado de enzimas, en donde el uso para alimentos y bebidas predomina en esta industria, así como una importante contribución en productos cosméticos.



**Figura 6.** Tendencia del crecimiento del mercado de enzimas del 2016 al 2027, así como su distribución por industrias. Fuente: Grand View Research.

Entre las enzimas más importantes, las enzimas hidrolíticas son muy importantes, utilizadas en diversas industrias como las de alimentos y bebidas, alimentación animal y farmacéuticas. Entre ellas destacan las lipasas que se utilizan principalmente para la hidrólisis catalítica de grasas o lípidos. Las lipasas encuentran aplicaciones versátiles en la industria alimentaria (fermentación de queso y yogur), panadería, detergentes y producción de biocombustibles. También se utilizan para la producción de biodiésel, que implica el procesamiento de glicéridos y ácidos grasos mediante reacciones de esterificación y transesterificación (<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>). El tamaño del mercado global de lipasa se estima que supere los 550 millones para 2024, con una CAGR de 6.3 %. (<https://www.gminsights.com/industry-analysis/lipase-market>).

### 2.2.3. Enzimas inmovilizadas

Las enzimas pueden utilizarse como catalizadores en la biocatálisis en forma libre o inmovilizada. Cuando se emplean enzimas libres; las enzimas, reactivos y productos están todos en la misma fase fluida, lo que imposibilita la separación a menos que se empleen sistemas de filtrado con membranas. Por lo tanto, una

alternativa es inmovilizar las enzimas en soportes sólidos y convertirlas en catalizadores heterogéneos (Thangaraj & Solomon, 2019). La inmovilización de enzimas es un proceso en el cual se le confina o localiza en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente (Arroyo, 1998). Esto conlleva a disminuir costos del proceso, simplificar el procesamiento posterior y diseñar biorreactores adaptados a la enzima inmovilizada (Polakovič *et al.*, 2017; Weitao *et al.*, 2016). Sin embargo, como desventaja se ha reportado que las enzimas purificadas cuestan aproximadamente 10 veces más que usar sistemas de CC (Wachtmeister & Rother, 2016). Además del inconveniente del costo de las enzimas puras, éstas pueden ser poco estables y requerir la adición de cofactores costosos. Por ejemplo, la ADH depende de la NADH, y estas costosas coenzimas deben regenerarse para asegurar una bioconversión continua (Goubet *et al.*, 2002). También la inmovilización puede disminuir la actividad enzimática (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2010).

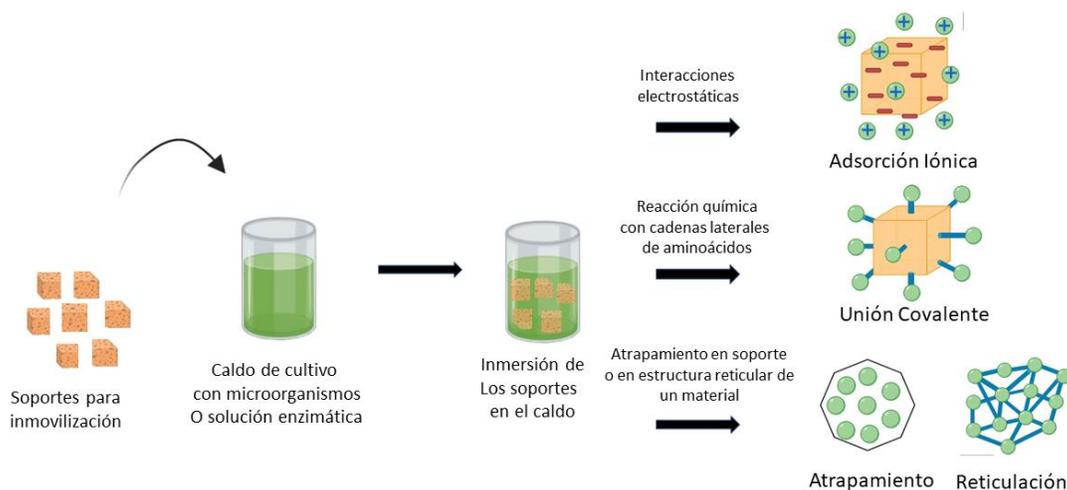
Los parámetros que influyen principalmente en la inmovilización son el tipo de soporte y el método de inmovilización utilizado. Los soportes que se utilizan para la inmovilización pueden ser de diferentes tipos, naturales clasificados en inorgánicos como carbón, zeolita, sílica y nanomateriales como oro, plata o nanotubos de carbón, los cuales tienen una buena resistencia mecánica y química (Thangaraj & Solomon, 2019). Los polímeros orgánicos naturales como celulosa, agarosa, quitina, albumina, tienen como ventaja biocompatibilidad, biodegradabilidad, hidrofobicidad y una notable afinidad a proteínas (Thangaraj & Solomon, 2019). Los polímeros sintéticos como acrilamida, poli anilina, polipropileno, nailon etc., tienen la ventaja de resistir ataques microbianos además que se pueden preparar con distintos grados de porosidad y grupos funcionales para mejorar la inmovilización (Thangaraj & Solomon, 2019). También se encuentran los polímeros híbridos, que se formulan combinando soportes químicos con naturales para mejorar sus características y propiedades fisicoquímicas, por ejemplo los copolímeros de poliuretano-queratina reportados por Saucedo-Rivalcoba *et al.*, (2011).

El tipo de material de soporte puede influir en la conformación de las enzimas respecto a su estado nativo y por lo tanto en sus actividades. Debeche *et al.* (2005) estudiaron el efecto de dos soportes de fibras orgánicas, una hidrofílica de fibra de vidrio y otra hidrofóbica de fibra de carbono, para la hidrólisis y transesterificación de ésteres con lipasas, en un sistema BSG. Encontraron que la actividad enzimática en la lipasa inmovilizada en fibra de carbono era 10 veces mayor que en fibra de vidrio, debido a que la estructura de la lipasa se mantenía mejor en un medio hidrofóbico aún a una alta humedad relativa de hasta 87 %.

En cuanto a los métodos de inmovilización, existen diversas técnicas, en donde la adsorción física, el atrapamiento, y la unión covalente son las más utilizadas (**Figura 7**). El método de inmovilización también puede afectar la síntesis de ésteres, Vitola *et al.* (2019) en la BSG de AcE, estudiaron dos métodos de inmovilización, electrostático (adsorción iónica) y covalente. Los resultados indicaron que la lipasa inmovilizada covalentemente es más eficaz cuando está mediada por microgeles, mostrando una actividad catalítica 1.25 veces mayor que la inmovilizada por adsorción iónica. Respecto al Acl, Vakili *et al.* (2020) reportaron un método para inmovilizar la lipasa pancreática porcina en tierra de diatomeas magnética recubierta de aminopropiltriétoxisilano con un rendimiento y eficiencia de inmovilización de  $78.0 \pm 0.3$  y  $80.1 \pm 0.6$  %, respectivamente, para la esterificación de AlCl con AcA en n-hexano, obteniendo un rendimiento de esterificación de 100 % a 37 °C después de 3 h.

El efecto del soporte en la reacción de Acl ya ha sido estudiado por Pinto Brito *et al.* (2020) quienes realizaron la esterificación con AlCl comparando dos soportes, uno de carbón activado (AC) y otro de carbón activado funcionalizado (FAC) con grupos amino-aldehído, este cambio redujo la porosidad y el área superficial del material (1260 vs 340 m<sup>2</sup>/g). La enzima inmovilizada en ambos soportes mostró una actividad específica superior a 0.450 U/mg en las mejores condiciones de inmovilización (pH 5.0 y 30 °C). Sin embargo, se obtuvo mayor conversión con la enzima inmovilizada en AC (93 %) que en el FAC (91 %), posiblemente debido a la disminución del área superficial disponible para la inmovilización. Se observa

entonces que el soporte si influye en la inmovilización y en la actividad catalítica de la enzima.



**Figura 7.** Técnicas de inmovilización de enzimas.

La **Tabla 3** presenta algunas lipasas que se han inmovilizado en diferentes soportes, y de distintas formas de inmovilización, siendo la adsorción física y la reticulación con glutaraldehído (GU) las más utilizadas, donde generalmente la adsorción es la más adecuada debido a que es barata, no necesita la adición de un agente adicional para la inmovilización y presenta buenas tasas de inmovilización.

**Tabla 3.** Materiales y métodos de inmovilización de lipasas.

Material	Fuente biológica	Método de inmovilización	Especificación	Referencia
<b>POLIMEROS NATURALES</b>				
Hidroxipropil metil celulosa	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Atrapamiento	Síntesis de β-amino éster. Relación soporte: lipasa (3.5:1), rendimiento ≥ 90 %	(Badgujar & Bhanage, 2016)
Perlas de quitosano húmedas y secas	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>	Reticulación	Retención de actividad inicial de 85 y 78 % respectivamente.	(Chiou & Wu, 2004)

Fibras de seda, una hidrofílica y una hidrofóbica funcionalizada con polidimetil-siloxano	Lipasa de <i>Candida</i> sp. 99-125	Adsorción física	El soporte hidrofóbico tuvo 2 veces más actividad enzimática que la hidrofílica y mantuvo su actividad en 27 ciclos	(Chen <i>et al.</i> , 2010)
Perlas de gelatina	Lipasa de <i>Pigeonpea ureasa</i>	Reticulación con glutaraldehído (GU)	La inmovilización máxima (75 %) se observó a 30 mg/mL de gelatina, 414 mg de enzima/perla, glutaraldehído al 1 % (v/v)	(Srivastava <i>et al.</i> , 2001)
Perlas de gel de alginato	Lipasa de <i>Pseudomonas</i> sp.	Atrapamiento	8.11U/mL de lipasa inmovilizada con 22.2 % de actividad inicial	(Cheirsilp <i>et al.</i> , 2009)
<b>POLIMEROS SINTÉTICOS</b>				
Nanofibras de Polianilina	Lipasa de <i>P. fluorescens</i>	Adsorción física	49.9 % de conversión de sustratos. Actividad enzimática 8 veces mayor que enzima libre	(Dwivedee <i>et al.</i> , 2018)
Nylon	Lipasa de <i>C. rugosa</i>	Reticulación con GU	Esterificación de ácidos grasos cadena larga. Máxima conversión en 60 mmol/g h.	(Zaidi <i>et al.</i> , 2002)
Espuma de Poliuretano	CALB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrapamiento</li> <li>• Adsorción</li> <li>• Adsorción iónica con polietilenimina (PEI)</li> <li>• Adsorción iónica con PEI y reticulación con GU</li> </ul>	Actividad Enzimática (UI/g soporte): 4.68 ± 0.13 5.52 ± 0.65 2.30 ± 0.27 3.09 ± 0.72 3.28 ± 0.68	(Nicoletti <i>et al.</i> , 2015)
Poliestireno gigaporooso con grupos epoxy	CALB	Unión covalente	200 mg/g soporte con una actividad de 293.8±13.9	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
<b>MATERIALES INORGÁNICOS</b>				

Mica modificada con aminopropilsilano	Lipasa de <i>C. rugosa</i>	Reticulación con GU	Inmovilización de hasta 8.22 mg de proteína / g de soporte	(Zaidan <i>et al.</i> , 2010)
Sílica mesoporosa	Lipasa pancreática porcina	Atrapamiento	El tamaño óptimo de poro fue de 8 nm con una actividad de hasta 122 IU/g soporte	(Kang <i>et al.</i> , 2007)
Zeolitas MCM-22 y MCM-36	CALB	Adsorción física	MCM-22: 20 mg CALB/g soporte MCM-36: 4 mg CALB/g soporte	(Dumitriu <i>et al.</i> , 2003)
Hidrotalcita	Lipozyme-TL IM	Adsorción física	13 mg proteína / g a pH 8.5 y 4 °C	(Yagiz <i>et al.</i> , 2007)
Carbón activado (granular y tela)	CALB	Adsorción física	Conversiones mayores: 100 % con carbón activado granular y 82 % con el de tela	(Naranjo <i>et al.</i> , 2010)
<b>COMPOSITOS</b>				
Compositos de óxido de grafeno magnético-quitosano con magnetita	Lipasa de <i>C. rugosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adsorción electrostática</li> <li>• Unión Covalente</li> <li>• Interacción metálica</li> </ul>	Inmovilización (mg lipasa/g soporte): 44.12 ± 0.34 48.49 ± 0.42 49.08 ± 0.47	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
Matrices híbridas de polisiloxano-alcohol polivinílico	Lipasa de <i>C. rugosa</i>	Unión covalente activada por metaperiodato de sodio	Rendimiento de inmovilización máximo del 40 % con la matriz que se preparó con 5.56 x10 <sup>-5</sup> polivinil alcohol	(Santos <i>et al.</i> , 2008)
Compositos de alcohol polivinílico-alginato y de óxido de polietileno-alginato	Lipasa pancreática porcina	Adsorción y reticulación	65-70 % de actividad enzimática mantenida a altas temperaturas por 40-60 min. La actividad se mantiene aún a pH 9. Reutilización de 14 y 7 ciclos con 60 % de actividad mantenida.	(Doğaç <i>et al.</i> , 2017)
Compositos de poli (metacrilato	Lipasa pancreática porcina	Reticulación con GU	Con una solución enzimática de lipasa	(Qi <i>et al.</i> , 2018)

de carboxibetaína) y magnetita			de 0.4 mg/mL se logró una capacidad de carga relativa del 100 % con las condiciones: 1 % GU, 4 h de inmovilización a pH 7 y 35°C	
Perlas de celulosa bacteriana- quitosano	Lipasa de <i>C. rugosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adsorción física</li> <li>• Reticulación</li> </ul>	Carga enzimática ( $\mu\text{m}/\text{perla}$ ) y actividad ( $\times 10^{-5}$ $\mu\text{mol}/(\text{min perla})$ ):	(Kim <i>et al.</i> , 2017)
			6.32 23.8 $\pm$ 1.1	
			6.76 16.7 $\pm$ 1.1	

#### 2.2.4. Células completas

En cuanto a la síntesis de Acl con CC, éstas representan una alternativa tecnológica que evita algunos problemas de la aplicación de enzimas. Entre estos, que la producción y purificación enzimas para su uso como biocatalizadores en procesos industriales de biotransformación requieren un mayor número de etapas incrementando el costo del proceso. Los sistemas con CC son especialmente ventajosos cuando son necesarios cofactores enzimáticos o cuando participa más de una enzima para realizar la biocatálisis (Torres *et al.*, 2010).

La biocatálisis de ésteres con CC ya ha sido reportado por Rajapriya *et al.* (2018) realizando la síntesis del cafeato de feniletilo con masa micelial de *A. niger* en LI, obteniendo una conversión de 84 % con relación 1:20 (ácido:alcohol) a 30 °C por 12 h. Por otro lado Yan *et al.* (2014) realizaron una serie de esterificaciones de ácidos carboxílicos (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) con etanol para producir ésteres de cadena corta utilizando micelio de *Aspergillus oryzae* con actividad lipasa, las mejores conversiones se dieron a 30 °C, relación molar 1:1 (2 M), 20 g/L de enzima, 200 rpm. Después de 48 h, se obtuvieron tasas de conversión superiores al 80 % en los ésteres de ácido heptanóico, octanóico y uno del hexanóico (hexanoato de propilo), donde el heptanoato de propilo y heptanoato de isoamilo exhibieron ambos una conversión de 90  $\pm$  1 %.

Han *et al.*, (2009) insertaron por ingeniería genética CALB en la superficie de *S. cerevisiae* y lo utilizaron como un sistema de CC para catalizar la esterificación de ácido hexanoico y etanol para la obtención de hexanoato de etilo, un compuesto de fragancia del licor. Las condiciones óptimas de reacción fueron temperatura de reacción 40 °C, concentración de ácido hexanoico 0.2 M, una relación ácido hexanoico a etanol 1:1.25 y una cantidad de células 60 g/L (17 U/g célula seca). El rendimiento alcanzó el 98.2 % a las 12 h en las condiciones óptimas.

Sin embargo, a pesar de las ventajas de la síntesis con CC y hasta el conocimiento de los autores, se han reportado muy pocos estudios de síntesis de Acl con CC. Entre ellos, Inoue *et al.* (1994) estudiaron la síntesis de éste compuesto con células de *Hansenula mrakii* y *S. cerevisiae* para investigar las propiedades bioquímicas del sistema productor de Acl en cada levadura, donde *S. cerevisiae* no pudo producir el éster a condiciones aeróbicas mientras *H. mrakii* pudo producir Acl cultivado tanto a 15 como a 30 °C en condiciones aeróbicas, la producción máxima detectada fue de 40 ppm de Acl a 15 °C. Brault *et al.*, (2014) utilizaron una lipasa clonada en *E. coli* por ingeniería genética para la transesterificación de triacetato de glicerilo para producir Acl en un sistema con CC. La mejor conversión de transesterificación de 50 mmol de triacetato de glicerilo en Acl proporcionó un rendimiento cercano al 100 % después de 24 horas usando una carga de biocatalizador al 10 % (p / p) en un reactor de lecho fluidizado.

### **2.2.5. Células completas inmovilizadas**

La inmovilización de CC puede mejorar su rendimiento principalmente al extender su vida útil. Otros beneficios importantes de la utilización de biocatalizadores de CC inmovilizadas son: el aumento de la carga del biocatalizador (cantidad de células que se pueden inmovilizar por metro cúbico de soporte de acuerdo a su porosidad, área superficial y topografía), la implementación de procesos continuos, y la simplificación del reciclaje de biocatalizadores, así como su procesamiento posterior (Polakovič *et al.*, 2017; Vakili *et al.*, 2020).

Andrade *et al.* (2012) Estudiaron el potencial de síntesis de etil ésteres con CC de dos cepas de *Rhizopus oryzae*, dos de *Mucor circinelloides* y una de *Penicillium*

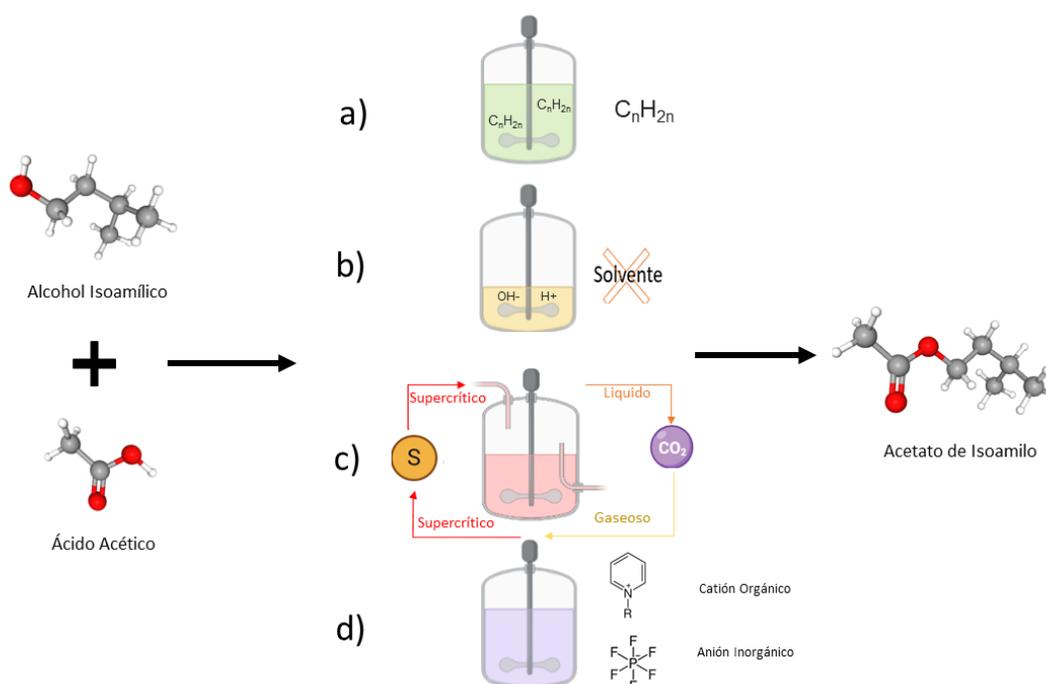
*socitrinum*, para ello evaluaron 3 soportes para inmovilización: espuma de poliuretano para inmovilización *in situ* (aunado al crecimiento) y, celita y polihidroxibutirato *extra situ* (después del cultivo celular, inmovilizando por adsorción). Los resultados indicaron que en todas las cepas a excepción de *P. citrinum* la actividad lipasa intracelular más alta se obtuvo con la espuma de poliuretano debido a que el micelio se adhiere fácilmente a este polímero. En cambio, en el caso de los otros dos soportes el micelio no se adsorbió completamente a éstos, permaneciendo suspendido en el medio de cultivo, además, mostraron una baja resistencia mecánica a la agitación. El rendimiento más alto de éster se obtuvo con *M. circinelloides* URM 4182 inmovilizada en espuma de poliuretano la cual fue de  $83.22 \pm 3.68$  % en menos de 96 h de reacción.

Tamalampudi *et al.* (2008) compararon el potencial de transesterificación de células enteras de *R. oryzae* inmovilizadas en espuma de poliuretano reticulada con la CALB inmovilizada en resina acrílica macro porosa, para alcoholisis de ácidos grasos de cadena larga. De los diferentes alcoholes probados, el metanol fue el más efectivo. El contenido máximo de ésteres metílicos en la mezcla de reacción alcanzó el 80 % en peso después de 60 h usando células, mientras que fue del 76 % después de 90 h usando CALB, mostrando que las células enteras pueden tener la misma actividad enzimática que las enzimas purificadas incluso a un menor tiempo, lo que representa una ventaja debido a que generalmente son menos costosas.

Estos sistemas de células o enzimas inmovilizadas pueden ser utilizados en diversos sistemas de biocatálisis pues la protección que el soporte les da a esos sistemas biológicos les confiere estabilidad y resistencia mecánica. A pesar de las ventajas antes mencionadas, no se ha explorado la síntesis de Acl con CC en ninguno de los sistemas de biocatálisis disponibles, sólo con enzimas purificadas, por lo que hay una gran área de oportunidad para explorar. Sin embargo, los sistemas que se han estudiado para la síntesis de este éster con enzimas han sido diversos, algunos de estos se presentan a continuación.

## 2.3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN BIOCATALÍTICA DE ACETATO DE ISOAMILO.

Para la síntesis de Acl, se han estudiado diversos sistemas de catálisis, cada uno de estos sistemas tiene ventajas y limitaciones; entre las limitaciones más importantes se encuentra la recuperación de los productos, que, dependiendo del proceso puede elevar el costo considerablemente. En los últimos años se han estudiado diferentes tipos de sistemas biológicos de catálisis que utilizan solventes distintos al agua denominados sistemas de catálisis en medios no convencionales, en los cuales las enzimas pueden realizar reacciones de síntesis de mejor forma que en la manera convencional en sistemas acuosos debido a la baja actividad de agua (Cantone *et al.*, 2007). Los sistemas de biocatálisis reportados para Acl son principalmente sistemas en solventes orgánicos (SO), libres de solventes (LS), en fluidos supercríticos (FSC) y en líquidos iónicos (LIs) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Sistemas de biocatálisis para la producción de acetato de isoamilo. a) en solventes orgánicos. b) libre de solventes. c) en fluidos supercríticos. d) en líquidos iónicos

### 2.3.1. Biocatálisis en solventes orgánicos

La biocatálisis en SO utiliza solventes no polares en lugar del agua, lo que permite trabajar a bajas actividades de agua ( $a_w$ ) (**Figura 8a**). Esto es ventajoso para la síntesis de ésteres con lipasas, dirigiendo la reacción a la síntesis y no a la hidrólisis. Tiene como ventaja la correcta solubilización de sustratos hidrofóbicos o poco solubles en medios acuosos, por lo que se disminuyen problemas difusionales (Marlot *et al.*, 1985). Aunque, una de las principales desventajas de este sistema es que los solventes orgánicos son muy contaminantes (Koutinas *et al.*, 2018).

Debido a su importancia, constantemente se buscan cepas y enzimas que tengan buena actividad enzimática en SO. Por ejemplo, Bollinger *et al.* (2020) realizaron una identificación de enzimas tolerantes a SO (metanol, acetonitrilo, dimetil sulfóxido, y 1,4-dioxano), utilizando 26 hidrolasas por medio del indicador nitrazina amarillo encontrando una nueva esterasa de *Pseudomonas aestusnigri*.

El tipo de SO puede influir en la conversión de los ésteres, en el trabajo de Yan *et al.* (2014) se evaluaron distintos solventes para la síntesis de ésteres de cadena corta, los cuales fueron: acetonitrilo, acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, tolueno, ciclohexano, hexano, heptano e iso-octano. Donde las mayores conversiones (> 65 %) se obtuvieron en los solventes con un coeficiente de partición ( $\log P$ ) entre 3.2 y 4.5. Esto, puede deberse al hecho de que los solventes con un  $\log P$  más bajo pueden capturar las moléculas de agua libre provocando la inactivación de la enzima, y los solventes con un valor más alto evitan el agua. La mayor conversión obtenida fue de 74 % en ciclohexano ( $\log P = 3.2$ ) (Yan *et al.*, 2014).

Respecto a las lipasas para síntesis de Acl, Krishna *et al.* (2000) utilizaron una lipasa de *Rhizomucor miehei* (antes *Mucor miehei*) inmovilizada en resina de intercambio aniónico utilizando AlCl y AcA como sustratos (0.06 M a una relación 1:1) en catálisis con n-heptano alcanzando una conversión de 96.4 % a las 72 h de reacción. También Romero *et al.* (2005a) que exploraron distintos parámetros de reacción para la síntesis de AclA en n-hexano. Entre ellos el efecto del donador acílico (ácido

acético, anhídrido acético, acetato de etilo y acetato de amonio), el biocatalizador, entre las lipasas comerciales Novozym 435 de *C. antarctica*, Lipozyme RM-IM de *R. miehei* y Lipozyme TL-IM de *Thermomyces lanuginosus*). El rendimiento máximo de éster alcanzado fue de 192 % con anhídrido acético (AnhA) 0.8 M, exceso de alcohol 3:1 y una concentración de enzima de 13.8 g/mol de anhídrido a 313 K, a estas condiciones se obtuvo una productividad de 9.5 g de Acl/(g de enzima h).

### 2.3.2. Biocatálisis libre de solventes

Una estrategia alternativa de biocatálisis es evitar el uso de solventes por completo, llevando a cabo la reacción utilizando sólo los reactivos y el catalizador (**Figura 8b**) (Hobbs & Thomas, 2007). Se han descrito dos formas de sistemas LS: en el primer sistema uno de los compuestos actúa como solvente, y en el segundo sistema ambos se encuentran en la misma proporción sin intervención de un solvente externo.

Con este tipo de sistemas se evitan problemas de contaminación por solventes además que algunos son muy costosos (Güvenç *et al.*, 2002). Aunado a esto, la recuperación del producto es más sencilla, ya que existen menos componentes en la mezcla al final de la reacción y ayuda a reducir los costos operativos y los impactos ambientales (Siong *et al.*, 2014). Como desventaja, puede existir inhibición debido a las altas concentraciones de sustratos. Una preocupación adicional es la estabilidad de la enzima en el sustrato que también se usa como solvente. Especialmente porque se sabe que los compuestos orgánicos polares como los alcoholes que se usan ampliamente en reacciones de (trans) esterificación pueden desnaturalizan las enzimas cuando se emplean como disolventes (Hobbs & Thomas, 2007).

Los sistemas LS son útiles para dilucidar aspectos cinéticos de las reacciones enzimáticas. Siong *et al.* (2014) utilizaron un sistema LS para modelar el mecanismo de reacción de forma Ping-Pong Bi-sustrato de CALB, para la producción de Acl. Con este tipo de modelos se pueden predecir: el perfil de concentración de cada sustrato a diferentes temperaturas, concentración de enzima y condiciones iniciales. También Kumari *et al.* (2009) sintetizaron Acl en un sistema LS utilizando 0.5 mol/L

AlCl y vinilacetato actuando como solvente y donador acílico utilizando una lipasa *R. oryzae* durante 8 h en un sistema de reacción a 40 °C y alcanzando una conversión de 95 %. Kirdi *et al.* (2017) catalizaron esta reacción en una transesterificación con AlCl destilado del aceite de fusel disuelto en AcE, esto en un reactor de lecho fluidizado con remoción continua de etanol producido. Güvenç *et al.* (2002) sintetizaron Acl con lipasas de *R. miehei* y CALB en catalisis LS con AlCl y AcA, encontrando una producción del éster maxima de 380 g/L con CALB a 80 % de conversión.

### 2.3.3. Biocatálisis en líquidos iónicos

Otro medio de reacción no convencional es en el que se utilizan LIs. Estos, son sales fundidas hechas de cationes orgánicos y aniones que son líquidos a temperaturas <100 °C (Stevens *et al.*, 2019) Consisten de grandes cationes orgánicos como iones de amonio cuaternario, imidazolio, piridinio, pirrolidinio, amonio, colinio, morfolinio y fosfonio, combinados con aniones de menor tamaño y forma más simétrica como Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, AlCl<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ROSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, y entre otros (**Figura 8d**) (Elgharbawy *et al.*, 2018; Heintz, 2005).

Las ventajas de los LIs respecto a los SO incluyen propiedades de solubilidad ajustables, efectos protectores o mayor estabilidad de las enzimas, efectos positivos sobre la especificidad de las enzimas o sobre el cambio del equilibrio de la reacción, así como la recuperabilidad y reciclabilidad (Shi *et al.*, 2017). Pueden ser empleados en sistemas utilizando sólo al LI o también, al estar compuestos de iones, proveen una alternativa polar y no-acuosa para reacciones bifásicas (Díaz, *et al.*, 2012). Los LIs son reutilizables debido a que los reactivos residuales, los productos de reacción y los catalizadores se separan mediante procedimientos adecuados, por ejemplo, eliminación a presión reducida o extracción. Los LIs pueden diseñarse como no inflamables y térmicamente estables (alta estabilidad térmica y un punto de ebullición hasta aproximadamente 300 °C) (Shamsuri, 2011). Gracias a estas ventajas, se han realizado una amplia variedad de reacciones enzimáticas en LIs, como esterificación, hidrólisis, amilólisis, alcoholólisis y polimerización (Elgharbawy *et al.*, 2018).

En cuanto al Acl, Cvjetko *et al.* (2012) catalizaron la producción de este compuesto utilizando AlCl y AnhA en LIs basados en cationes de imidazol cuaternario con cadenas laterales de alquilo, alqueno, alquino, bencilo, alcoxilo o N-aminopropilo. Entre los LIs probados, la actividad enzimática más alta junto con el rendimiento más alto de Acl se obtuvo en [C7mmim] [Tf2N] el cual fue de 92 % de conversión de Acl en 15 minutos usando AnhA 0.5 M y concentraciones de entrada de AlCl 1.5 M a 55 °C, obteniendo una productividad volumétrica de 61 mmol/L min.

Es común encontrar referencias en la literatura donde producen Acl en sistemas bifásicos de LIs y alcohol. Este tipo de sistemas utiliza dos líquidos con distinta polaridad y coeficiente de partición. Permite la separación de productos al jugar con la polaridad y evita concentraciones altas de sustrato que inhiban el proceso (Díaz Alvarez *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2012). Fehér *et al.* (2008) probaron distintos LIs en un sistema bifásico con el alcohol y CALB como biocatalizador, en donde la enzima mantiene su conformación tridimensional estable en el LI y el éster se mantiene en la fase alcohólica lo que facilita su recuperación. De los 6 LIs probados, el 1-hexil-3-metil-imidazolio-hexafluorofosfato ([hmim] PF6 dio mejores resultados, con las siguientes condiciones: 1 % de agua (p/p), relación molar 1:7 (ácido:alcohol), relación 1:1 (LI:alcohol), y 60 °C obteniendo una conversión del 90 %. Por su parte, Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera (2010) utilizando un sistema bifásico con AlCl y 1-butil-3-metilimidazolio hexa fluoro-fosfato a alta presión con CALB tanto libre como inmovilizada, encontrando que la enzima libre presentó una conversión 10 veces mayor que la inmovilizada. Además, encontraron que este sistema es más productivo que un sistema de catálisis en SO utilizando hexano, pues al comparar con un trabajo previo, notaron que mientras en el sistema con hexano sólo se alcanzó una concentración de 60 mM a 1 h de proceso, en el sistema bifásico se obtuvo una concentración de 1500 mM a las 4 h. Además, la catálisis en estos sistemas bifásicos tiene la ventaja que el sustrato potencialmente inhibitorio (el ácido acético) está en una fase diferente a la enzima, lo que reduce la inhibición por sustrato (Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera, 2010).

### 2.3.4. Biocatálisis en fluidos supercríticos

Es un sistema de biocatálisis que utiliza un gas que en condiciones supercríticas de alta presión está en estado líquido y tiene propiedades de solvente, lo que proporciona una alta difusividad y baja viscosidad, mejorando la transferencia de masa de los sustratos a las enzimas (**Figura 8c**). El más utilizado es el dióxido de carbono pues es barato e inerte (Dias *et al.*, 2018). Como ventaja permite la separación del producto al despresurizar el gas. Sin embargo, se incrementa el costo del proceso por las altas presiones que utiliza. Se ha probado que estos sistemas son útiles para la biocatálisis con lipasas y que éstas son estables en los fluidos supercríticos (Knez, 2009).

Romero *et al.* (2005b) realizó la biocatálisis de Acl con CO<sub>2</sub> super crítico a 15 MPa, utilizando CALB con AnhA como donador acílico y AlCl a 0.2 M en relación 1:1 obteniendo un rendimiento de reacción de 93 %; en contraste 10 % obtenido cuando se utiliza AcA como donador acílico, el cual causa inhibición por pH. Dos Santos *et al.* (2017) realizaron la comparación en la síntesis Acl con dos sistemas de catálisis supercrítica, uno en un reactor de tanque agitado (Batch Reactor; BR) y el segundo de lecho empacado (Pressurized Batch Reactor; PBR), encontrando que el reactor PBR presenta mejor productividad, pero menor conversión, alcanzando hasta 1.3 g/h de Acl. Recientemente, Dias *et al.* (2020) catalizaron la misma reacción utilizando aceite de fusel en un sistema LS, uno en SO y en un sistema con CO<sub>2</sub> supercrítico, reportando los mejores resultados en éste último a 15 MPa, 60 °C, la relación molar de los sustratos fue de 2:1 y el 2.5 % de la concentración de enzima produjeron la mayor conversión ( $88.4 \pm 0.5$  %) y productividad específica ( $36.9 \pm 0.2$  g Acl/(g enzima h)).

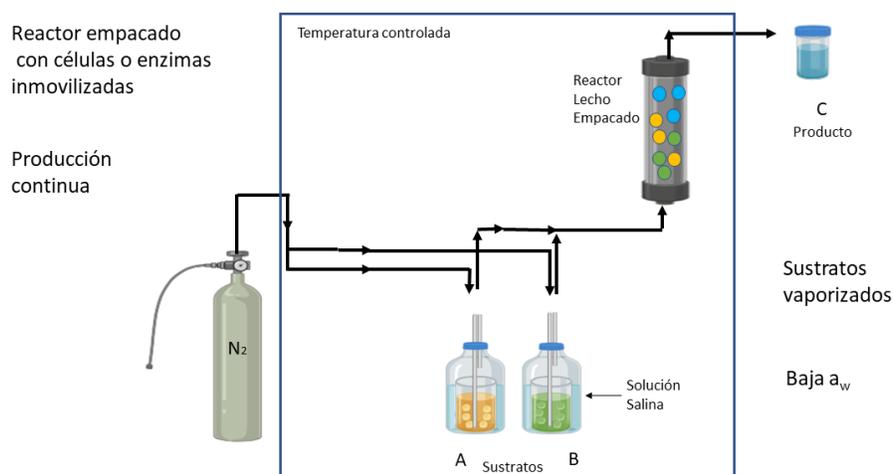
Como se observa todos estos sistemas tienen ventajas y desventajas en la producción de aromas. Otro de los retos que se encuentran en sistemas de biocatálisis, es la separación del producto que puede ser muy difícil y puede representar un alto costo del proceso de producción. Muchos sistemas replazan los procesos convencionales de separación, lo que permite desplazar el equilibrio termodinámico hacia una de las fases. La destilación es uno de los métodos más

utilizados para la recuperación de ésteres, pero sus altos requerimientos energéticos, limitan su aplicación industrial (Kirdi *et al.*, 2017). Por ello es necesario buscar alternativas que disminuyan el costo de separación de productos y permitan un alto porcentaje de producción y recuperación de productos.

**CAPITULO 3. BIOCATÁLISIS SÓLIDO-GAS  
COMO ALTERNATIVA DE PRODUCCIÓN DE  
ACETATO DE ISOAMILO.**

### 3.1. BIOCATÁLISIS SÓLIDO-GAS.

Uno de los sistemas más novedosos de biotecnología blanca para síntesis de MSAs es la BSG (Cordero-Soto *et al.*, 2020), en donde el biocatalizador se encuentra en forma sólida, mientras que los sustratos están en forma gaseosa o pueden ser fácilmente vaporizados (Csanádi *et al.*, 2012). El diseño más extendido de este sistema se compone de: contenedores de sustratos inmersos en una solución salina saturada para mantener la actividad de agua deseada, por estos contenedores se hace pasar un flujo controlado de nitrógeno como gas acarreador. Los sustratos entran de forma gaseosa al biorreactor empacado con el biocatalizador inmovilizado. El producto y los sustratos no transformados se recuperan por condensación o burbujeo a la salida del biorreactor (**Figura 9**) (Csanádi *et al.*, 2012; Lamare *et al.*, 2001).



**Figura 9.** Sistema de biocatálisis sólido-gas, el cual está compuesto por el gas acarreador, los contenedores de sustratos A y B inmersos en una solución salina saturada que mantiene la actividad de agua deseada, el reactor de lecho empacado y el contenedor de productos C.

Las principales ventajas de estos sistemas son: la transferencia de masa es más eficiente en la interfase sólido-gas, las enzimas y cofactores son más estables en sistemas con disponibilidad de agua limitada, y los problemas de solubilidad de sustratos o productos no existe porque se evita el uso de solventes (Lamare *et al.*,

2004). También, la limitación por difusión es reducida debido a la baja viscosidad de la fase gaseosa, la producción de subproductos es reducida, además los productos y sustratos no reaccionados pueden ser fácilmente recuperados por condensación, finalmente el riesgo de contaminación microbiana es mucho menor por la actividad de agua (Csanádi *et al.*, 2012). En el caso de las MSAs, es especialmente ventajoso debido a que su volatilidad que en otros sistemas de biocatálisis presentaría una desventaja, en este sistema es altamente aprovechado. En contraste con el enfoque tradicional, la volatilidad de los ésteres se vuelve ventajosa en la ruta de conversión microbiana (Lee & Trinh, 2020). La limitación principal de estos sistemas podría radicar en que generalmente se emplean para obtener moléculas de relativo bajo punto de ebullición.

### **3.2. REACCIONES EN SISTEMA SÓLIDO-GAS**

Se han descrito diversas reacciones en estos sistemas (**Tabla 4**) principalmente dirigidos a la síntesis de MSAs debido a que son fácilmente volatilizables a temperaturas relativamente bajas que manejan estos sistemas (cerca o menores que el punto de ebullición del agua) y con tiempos de retención hidráulica en el orden de segundos. Debeche *et al.* (2005) realizaron la hidrólisis de AcE y la transesterificación de vinil acetato con butanol con un flujo de nitrógeno 80 mL/min en un reactor de 20 mL, resultando en un tiempo medio de residencia de 15 s.

Se ha demostrado que en estos sistemas se pueden emplear CC para llevar a cabo la biocatálisis. Como la oxidación/reducción de etanol en acetaldehído y hexanal a hexanol por CC de *S. cerevisiae* en un sistema BSG (Goubet *et al.*, 2002; Maugard *et al.*, 2001). Por otro lado, al igual que en otros sistemas de biocatálisis, la inmovilización y los soportes utilizados juegan un papel importante en la síntesis de diversos compuestos, En la hidrólisis de éster, por CALB inmovilizada en membranas de fluoruro de polivinilideno funcionalizados, mediante dos tipos diferentes de enlace químico: electrostático y covalente. La inmovilización electrostática se llevó a cabo mediante una membrana funcionalizada con grupos amino, mientras que la inmovilización covalente se realizó mediante membrana funcionalizada con grupos aldehído, con o sin microgeles de poli(acrilamida de

superficie inmovilizada. Los resultados indicaron que la lipasa inmovilizada covalentemente mediada por microgeles mostró la mejor actividad catalítica de 4.4  $\mu\text{mol/h}$  (Vitola *et al.*, 2019).

Como se observa en la **Tabla 4**, el sistema BSG ya ha sido probado para la esterificación y la hidrólisis de ésteres utilizado principalmente lipasas. Las ADH también representan una clase de enzimas interesantes ya que la reducción quiral de cetonas puede conducir a la producción de alcoholes enantioméricamente puros para química fina (Sylvain Lamare *et al.*, 2004b). Hasta el conocimiento de los autores este sistema aún no ha sido utilizado para la síntesis del Acl a pesar de que es un candidato ideal para la síntesis en este sistema siendo un compuesto volátil con un punto de ebullición relativamente bajo.

A continuación, se describirán los parámetros de operación más importantes de estos sistemas, relacionándolos con los parámetros reportados en otros sistemas para la síntesis de Acl, como un punto a considerar para futuros trabajos.

**Tabla 4.** Reacciones de biocatálisis en sistemas sólido-gas.

Reacción	Biocatalizador	Soporte	Gas acarreador	T (K)	$a_w$	Tiempo de reacción (h)	% Conversión	Referencia
<b>Esterificación de Acetato de etilo</b>	Lipasas de: <i>R. oryzae</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Mucor java Nicus</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>P. fluorescents</i>	Tamices moleculares de aluminosilicato	He (20 mL/min)	298-318	0.001-0.038	1	22.74 (conversión máxima)	(Pires <i>et al.</i> , 2002)
<b>Hidrólisis de acetato de etilo</b>	Lipasa de <i>R. miehei</i>	Resina de intercambio iónico Duolite 568	He (50 mL/min)	318		Presión parcial de agua: 609 Pa	10-60	(Perez <i>et al.</i> , 2007)
<b>Hidrólisis de metil-, etil-, propil-y butil-propionato</b>	CALB	DimetilcloroSilano lavado con ácido	N <sub>2</sub> (28.5 mL/min)	343	0-0.3	< 10	< 5 (su objetivo era las tasas iniciales)	(Graber <i>et al.</i> , 2003)
<b>Esterificación de etilacetato</b>	CALB	NR	N <sub>2</sub> (2 dm <sup>3</sup> /h)	323	-	9	69.81	(Csanádi <i>et al.</i> , 2012)
<b>Reducción enantioselectiva</b>	Alcohol dehidrogena (R)-específica de <i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	Cuentas de vidrio no porosas	N <sub>2</sub> (10 mL/min)	313	0.8	80	NR	(Nagayama <i>et al.</i> , 2012)

NR No se reporta

### 3.3. PARÁMETROS DE OPERACIÓN

Los parámetros más importantes que gobiernan las reacciones BSG son la actividad del agua ( $a_w$ ), la concentración de los sustratos, la presión absoluta y la temperatura. En la revisión más reciente, Cordero-Soto *et al.* (2020) mencionan que existe baja comprensión de parámetros operacionales involucrados en el sistema sobre la productividad y el rendimiento. Entre ellos la  $a_w$ , la temperatura y la presión absoluta que influye sobre la presión o actividad de vapor de los reactivos y por lo tanto su relación molar en el reactor. También la  $a_w$  influye sobre la estabilidad y la hidratación del biocatalizador, que sin un control adecuado afectará negativamente a la actividad catalítica, la termodinámica y la cinética de la reacción.

#### 3.3.1. Actividad de agua

La  $a_w$  es un factor clave que afecta la eficiencia de la BSG, se define como una relación entre la presión parcial de vapor del agua en el sistema ( $P$ ) y la presión de vapor de saturación del agua ( $P^0$ ) a la misma temperatura:  $a_w = P / P^0$  (Kulishova & Zharkov, 2017). En este tipo de sistemas, la actividad de  $a_w$  cobra un papel importante, en especial en el caso de las lipasas. Algunas lipasas muestran una actividad óptima con una  $a_w$  muy baja (*Rhizopus arrhizus*, *R. niveus*, *C. antarctica*), algunas tienen una actividad mayor al aumentar la  $a_w$  (*Pseudomonas sp.*) y otras tienen perfiles intermedios con óptimos más amplios (*R. miehei* y *C. rugosa*) (Graber *et al.*, 2003).

La hidrofobicidad es una propiedad valiosa del material empleado como soporte del biocatalizador en un BSG, donde se debe evitar la humectación de los poros por el agua para evitar su bloqueo por el agua condensada y, por lo tanto, garantizar altos índices de flujo (Vitola *et al.*, 2019), de allí que se busquen actividades de agua relativamente bajas. Cuando se coloca el biocatalizador en contacto con una fase gaseosa que contiene vapor de agua de cierta actividad termodinámica absorberá las moléculas de agua hasta que se alcance el equilibrio del sistema (Kulishova & Zharkov, 2017). También, en el caso de las lipasas, se requieren actividades de agua bajas para catalizar la síntesis de ésteres y no su hidrólisis. Yang & Russell, (1996) estudiaron el efecto de la hidratación en una alcohol deshidrogenasa de

*S. cerevisiae* en un sistema BSG, donde observaron que la actividad enzimática aumentaba con el aumento de la humedad a la entrada del gas, se observó que la enzima necesitaba 0.16 g de agua/g de enzima para volverse activa.

En el trabajo de Vitola *et al.* (2019) catalizaron la hidrólisis de acetato de etilo con lipasa en BSG. Ellos investigaron el efecto de la velocidad de flujo molar del agua sobre la velocidad de hidrólisis de etilacetato variando el flujo del agua de 5.11 a 30.67 mmol/h. Se encontró que para esta reacción la velocidad volumétrica de hidrólisis aumenta ligeramente desde 0.017 hasta un valor de 0.023 mmol/(cm<sup>3</sup> h) cuando la velocidad de flujo molar de agua aumenta de 5 hasta 15.33 mmol/h y luego se vuelve constante porque se alcanza la hidratación de la enzima inmovilizada.

Para el Acl Ghamgui *et al.* (2006) estudiaron el efecto del agua inicial en la reacción de esterificación, debido a que tiene dos efectos importantes, por un lado una cantidad adecuada de agua protege a la enzima de la inhibición ácida y por el otro, cuando la cantidad es excesiva cambia el equilibrio de la reacción hacia la hidrólisis. Añadiendo varias cantidades de agua (de 5 a 40 %), se observó que la conversión aumentaba con la cantidad del agua hasta un 10 %, valor después del cual la síntesis disminuía. Resultados similares obtuvieron Brault *et al.* (2014) al estudiar concentraciones iniciales de agua de 0 % a 75 %, donde la conversión molar máxima de 50 % se obtuvo con 10 % de agua.

### **3.3.2. Flujo molar de los reactantes**

La principal estrategia para controlar la composición molar de cada sustrato en el gas acarreador se lleva a cabo mediante el cálculo de las diferentes presiones parciales en función de la termodinámica del sistema y el flujo del gas acarreador (Cantone *et al.*, 2007; Lamare *et al.*, 2004b). Otro sistema es la vaporización de los sustratos en el gas acarreador. En esta técnica de vaporización instantánea líquido-gas, también se requiere un control de los flujos molares de cada sustrato, aunque permite un mejor control en comparación con la técnica de mezcla de gases saturados, y se asegura la completa vaporización de las diferentes moléculas inyectadas en el sistema. mediante la realización de catálisis sólido-gas a presión

reducida (Lamare *et al.*, 2004b). Al igual que con la  $a_w$ , se puede fijar la actividad de los sustratos con la misma ecuación  $a_x = P^x / P^{x_{sat}}$  (presión parcial de vapor del sustrato  $x$  en el gas entrando al sistema ( $P^x$ ) entre la presión de vapor de saturación del sustrato puro ( $P^{x_{sat}}$ ) (Goubet *et al.*, 2002).

El flujo molar de los sustratos juega un papel importante en las reacciones BSG. En las reacciones de hidrólisis, se ha observado que al aumentar la cantidad de sustrato, la tasa de reacción aumenta hasta que se alcanza la saturación como es el caso de Vitola *et al.* (2019) al catalizar la hidrólisis de AcE, encontraron un máximo en un flujo molar de 12.3 mmol/h, a partir del cual la velocidad de reacción no aumenta, lo que significa que se llega a saturar la enzima. Se debe tomar en cuenta que en el caso de las reacciones bisustrato como son las esterificaciones, la diferencia de presiones tendrá un impacto sobre la reacción, aunque se coloquen en los matraces cierta proporción de reactivo, no necesariamente se respetará en la fase gaseosa. En la esterificación de AcE, se encontró una proporción en fase gaseosa de  $2 \pm 0.04$  (g/g) para una proporción molar de 80:20 (ac:alc),  $3.5 \pm 0.04$  en una proporción 75:25,  $0.9 \pm 0.05$  en una proporción 50:50,  $0.2 \pm 0.06$  y en una de 25:75 no es necesariamente lineal por lo que en este parámetro debe tenerse especial cuidado a fin de controlar mejor el biorreactor (Csanádi *et al.*, 2012).

En el caso de la síntesis de Acl en otros sistemas de reacción, no se puede hablar estrictamente de “flujos molares” pero sí de proporciones molares, se han estudiado diferentes proporciones, como es el caso de Romero *et al.* (2005b) que estudiaron el efecto de la proporción molar alcohol: ácido en la síntesis de Acl, el exceso de alcohol 3:1 propició a una mayor síntesis del éster, con un rendimiento de 192 % debido a que el AcA producido del AnhA reacciona con el exceso de alcohol. Obteniendo 9.5 g de Acl/g de enzima h.

Güvenç *et al.* (2002) por otro lado estudiaron el efecto de distintas proporciones molares ácido: alcohol 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1 y 5:1 para la síntesis de Acl en sistema libre de solventes. Al aumentar el ácido la conversión disminuyó de 43 a 17 % después de la relación 1:1. La mejor conversión se produjo en una relación 1:2 llegando a 40 mmol de Acl/g enzima. Por ello es importante recalcar que para

asegurar una relación molar óptima que produzca gran cantidad de este compuesto es necesario primero estudiar cómo se comportan en fase gaseosa como lo hicieron Csanádi *et al.* (2012).

### 3.3.3. Temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se ha descrito mediante dos parámetros térmicos bien establecidos: la constante catalítica de reacción,  $k_{cat}$ , que describe mediante la ecuación de Arrhenius el efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción, y la estabilidad térmica, descrita por la constante de inactivación irreversible o desnaturalización  $k_{inact}$  (Peterson *et al.*, 2007). La dependencia de la temperatura de estas constantes de velocidad se caracteriza, respectivamente, por la energía de activación catalítica  $E_a$  y la energía de activación para la reacción de inactivación irreversible,  $E_{a_{inact}}$  (Daniel *et al.*, 2008). Si se analiza una enzima durante un período fijo en un rango de temperaturas, se observa una gráfica con un óptimo aparente. Esta "temperatura óptima" observada no es una propiedad intrínseca de la enzima, ya que surge de una mezcla de propiedades térmicas y de la duración del ensayo (Daniel *et al.*, 2008).

Se ha estudiado la  $E_a$  de diferentes sistemas biocatalíticos, Csanádi *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la temperatura en la producción de AcE en un sistema BSG, al igual que calcularon la  $E_a$  necesaria para esta reacción. Encontraron que la actividad enzimática aumenta al aumentar la temperatura en un rango de 30-50 °C. Sin embargo, al llegar a 60 °C ocurre una desnaturalización por lo que la actividad enzimática disminuye drásticamente (aproximadamente de 110 mg AcE/dm<sup>3</sup> h a 50 °C vs 40 mg AcE/dm<sup>3</sup> h a 60 °C). Además, al calcular la energía de activación obtienen un valor de  $E_a = 9.2$  kJ/mol lo cual es menor que otros sistemas de catálisis como LIs (2.29 veces), SO (3.32 veces) y LS (5.75 veces), lo cual es un dato interesante porque significa que es mucho más fácil catalizar este tipo de reacciones enzimáticas en sistemas BSG que en otros sistemas de biocatálisis no convencional, además que la  $E_a$  puede ser mayor en estos sistemas debido a problemas de transferencia de masa que en el sistema BSG se encuentran minimizados.

En el caso de Goubet *et al.* (2002) que catalizaron la reducción de hexanal con CC de *S. cerevisiae*, la reacción se llevó a cabo con 200 mg de levadura. El flujo del gas de 680  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . La  $a_w$  del sistema se fijó en 0.57, la actividad del hexanal en 0.1 y la actividad del pentanol en 0.2. evaluaron un rango de temperaturas de 45 a 85 °C encontrando que el cambio de temperatura era especialmente importante, pues el tiempo que necesitaban para alcanzar la velocidad máxima de reacción disminuía dramáticamente de 540 a 10 min, y ésta permanecía constante por un tiempo (de menos de 10 min a 85 °C y varias horas a 45 °C). Por lo que, aunque la velocidad inicial en cada uno de los experimentos era mayor al aumentar la temperatura, la actividad enzimática del microorganismo disminuía drásticamente. Por ello se debe realizar el estudio de los rangos de temperatura en los que se pueden trabajar con el microorganismo o enzima a fin de encontrar un punto en el cual la reacción se produzca de forma óptima y con una vida media del microorganismo razonablemente alta.

Para el Acl, Romero, *et al.* (2005a) estudiaron el efecto de la temperatura en la síntesis de este compuesto en un sistema con SO, donde el punto de ebullición de la mezcla de reacción estaba en 341 K, por lo que trabajaron en un rango de temperaturas de 303 y 338 K, debido a que en ese sistema no es deseable la evaporación del compuesto de interés, como si lo es en el sistema BSG, y esa sería una temperatura baja fácilmente alcanzable en un sistema BSG. En el intervalo que escogieron la velocidad de reacción inicial aumentaba de forma proporcional con la temperatura. Además, calcularon la  $E_a$  con sus condiciones la cual fue de 11.3 kJ/mol, valor típico en este tipo de reacciones.

En un estudio preliminar dentro de este trabajo, se estudió el efecto de la proporción de los reactantes y la actividad del agua sobre la reacción termodinámica de Acl (Anexo 1). Los resultados indicaron que una relación molar ácido: alcohol 2:1 es la óptima para obtener rendimientos de alrededor del 80 % además que la ausencia de agua mejora la catálisis, por supuesto esto no es real en la práctica porque los biocatalizadores requieren una actividad de agua mínima para su estabilidad y

conformación, por lo que con una  $a_w$  de 0.1 sería suficiente para activar esta reacción.

#### **3.3.4. Presión absoluta**

Se ha mencionado que la presión en estos reactores es una variable termodinámica importante, pues al disminuir la presión en el sistema BSG debería ser capaz de disminuir el consumo de gas acarreador y mejorar la eficiencia de condensación del producto después de la reacción (Lamare *et al.*, 2004b; Mizobuchi & Nagayama, 2015). En general la presión ha sido una variable muy poco estudiada en estos sistemas. Mizobuchi & Nagayama (2015), realizaron la reducción de 4-metil-2-pentanona a (R)-4-metil-2-pentanol, utilizando 2 propanol como cosustrato, empleando presión absoluta de 213 hPa a 1013 hPa, rango en el cual no encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática por lo que esta podría no ser una variable de importancia para estos sistemas.

En el caso del Acl en otros sistemas de reacción, la presión normalmente no ha sido un parámetro estudiado, a excepción de los sistemas de FSC. Sin embargo, en estos sistemas lo que se busca es aumentar la presión y no disminuirla, como es el caso de Eisenmenger & Reyes-De-Corcuera (2010) al sintetizar Acl en un reactor a alta presión hidrostática con un LI y encontraron que la esterificación a 500 MPa era de 15 veces mayor que a condiciones atmosféricas a una temperatura de 40 °C.

**CAPÍTULO 4.**  
**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

#### 4.1. CONCLUSIONES

Las moléculas de sabor y aroma son de gran importancia para las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos, con una proyección a una tasa de crecimiento anual compuesta de 5.8 % de 2020 a 2027. Dentro de estas moléculas, los ésteres ocupan un importante porcentaje en dicho sector debido a su versatilidad y aplicaciones industriales, con una proyección a una tasa compuesta anual del 6.3 % entre 2017 y 2022.

Entre los ésteres destaca el acetato de isoamilo por su característico sabor a plátano. Actualmente, su producción a nivel industrial se realiza mediante síntesis química, donde se reportan importantes avances para sustituir el ácido sulfúrico concentrado por catalizadores más sustentables como el ácido p-toluensulfónico o los catalizadores ácidos de zeolita que parecen ser muy prometedores. No obstante, este tipo de síntesis queda limitado a uso no alimentario/farmacéutico y no puede ser etiquetado como natural.

Como alternativas de procesos biotecnológicos, se tiene la síntesis *de novo*; sin embargo, estas rutas requieren de suministro constante de cofactores lo que dificulta su explotación industrial, además que la síntesis *de novo* generalmente produce otras moléculas de sabor y aroma que después deben separarse, encareciendo el proceso. Otra alternativa biotecnológica de síntesis es la biocatálisis con enzimas. Las lipasas son las enzimas más adaptadas a este proceso debido a su robustez y versatilidad, generalmente se utilizan inmovilizadas en soportes debido a las ventajas de reutilización y que normalmente no afectan su actividad catalítica. En el proceso de inmovilización se han utilizado diversos tipos de soportes (orgánicos, inorgánicos, sintéticos e híbridos) de los cuales los soportes híbridos o también llamados compositos, parecen ser una alternativa interesante, debido a que combinan características reológicas, de biodegradabilidad, robustez y porosidad de los soportes sintéticos y los orgánicos.

Se han reportado diversos sistemas de biocatálisis para la síntesis de acetato de isoamilo: sistema en solventes orgánicos (SO), libre de solvente (LS), fluidos supercríticos (FSC), y líquidos iónicos (LI). Estos sistemas aún se siguen estudiando

y mejorando debido a que presentan diversos problemas que permitan llevarlos a una escala industrial, entre estos problemas está la toxicidad, desactivación enzimática, altos costos de energéticos, entre otros. Además, todos estos, con excepción de los FSC presentan el reto de separar el compuesto del medio de reacción. De los sistemas biocatalíticos estudiados para la producción de este éster, el más eficiente hasta ahora ha sido el sistema LS con una producción máxima de 380 g/L con CALB Novozym 435 que ha demostrado ser la lipasa comercial más eficiente en el mercado.

Si bien los sistemas sólido-gas están limitados a la síntesis de moléculas con relativamente bajo punto de ebullición, esta característica hace que la biocatálisis sólido-gas sea una alternativa muy prometedora para la síntesis de ésteres con características de sabor y aroma. De los parámetros que controlan la síntesis de compuestos en los sistemas sólido-gas, la proporción molar de sustratos es uno de los parámetros más importantes a controlar y dependerá de la forma de operación que se utilice para vaporizar los sustratos para hacerlos fluir a través del biorreactor. Por otro lado la temperatura y la actividad de agua deben ser cuidadosamente controladas, la temperatura debe mantenerse en una temperatura intermedia de tal manera que proporcione la energía necesaria para la síntesis pero no produzca desactivación enzimática del biocatalizador y en el caso de la actividad del agua esta debe mantenerse baja, a un nivel que permita la adecuada hidratación del biocatalizador pero que mantenga la actividad lipasa hacia la síntesis de compuestos y no la hidrólisis. La presión por su parte aún no hay evidencia suficiente de su efecto en la reacción de síntesis en sistemas sólido-gas.

## 4.2. PERSPECTIVAS

Como resultado de esta revisión bibliográfica, orientada a proveer información de las alternativas de procesos para la síntesis de acetato de isoamilo, se tienen las siguientes perspectivas que permitan estructurar estrategias para el desarrollo de un proceso sustentable y eco amigable.

Se observó una importante ventana de oportunidad de desarrollo tecnológico, debido al crecimiento sostenido del mercado de las moléculas de sabor y aroma en las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentos, aunado a la tendencia de los consumidores por productos considerados “naturales”. Lo que ocasiona que la industria y la academia busquen alternativas biotecnológicas para desarrollar nuevos procesos de síntesis de estos compuestos, con altos rendimientos de reacción, menor consumo de energía y al mismo tiempo eviten la emisión de contaminantes. Dentro de estas alternativas biotecnológicas, los procesos de biotecnología verde y blanca son generalmente más seguros y con un menor impacto ambiental que los catalizadores químicos, debido a que utilizan enzimas o células microbianas en condiciones de reacción menos extremas.

Entre los sistemas de biocatálisis no convencional, la biocatálisis sólido-gas es una alternativa biotecnológica prometedora para la síntesis de ésteres como el acetato de isoamilo. Se revisaron ventajas y desventajas de un sistema de reacción sólido-gas como alternativa de producción, que indican que hay varios aspectos del proceso que deben estudiarse. Por ejemplo: los parámetros de operación, los cuales aún no han sido completamente establecidos, presentando discrepancias como la presión absoluta del sistema, que afecta una mejor volatilización de los sustratos y la caída de presión en el biorreactor. Para ello es necesario realizar más estudios termodinámicos y de perfiles de flujo. También se requiere controlar adecuadamente la relación molar de los sustratos en el biorreactor controlando los flujos del gas acarreador y la temperatura del sistema. Otro parámetro importante es la actividad de agua y su sistema de control a través de soluciones salinas saturadas. Otro aspecto importante por desarrollar es un sistema robusto de

medición de temperatura, presión y actividad de agua para la captura de datos en línea, tal que se pueda proponer un adecuado control del proceso.

Finalmente, se requiere realizar un análisis de ingeniería de biorreactores que permita ver la interrelación entre la termodinámica de la reacción, la cinética y los fenómenos de transporte en el biorreactor que sirva de base para llevar a cabo el diseño y operación de un biorreactor con potencial a ser escalado a nivel industrial.

Como complemento a este trabajo de revisión bibliográfica se llevaron a cabo algunas actividades, cuyos resultados se incluyen en los Anexos: tales como la termodinámica de la reacción. La cual nos permite ver hacia donde se desplaza el equilibrio de la reacción y la máxima conversión que se puede alcanzar. Además, se realizó un análisis de precios y proyección económica de reactivos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars. Phamaceutical*, 39(2), 23-39.
- Abdul Manap, N. R., Shamsudin, R., Maghpor, M. N., Abdul Hamid, M. A., & Jalar, A. (2018). Adsorption isotherm and kinetic study of gas-solid system of formaldehyde on oil palm mesocarp bio-char: Pyrolysis effect. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 970–983. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.067>
- Ahmed, M., El, M., Zhang, F., Wu, F., Zhou, C., & Tao, J. (2013). *Advances in Fruit Aroma Volatile Research*. 8200–8229. <https://doi.org/10.3390/molecules18078200>
- Akacha, N. Ben, & Gargouri, M. (2015). Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioprocesses Processing*, 94(September 2014), 675–706. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011>
- Aljawish, A., Heuson, E., Bigan, M., & Froidevaux, R. (2019). Lipase catalyzed esterification of formic acid in solvent and solvent-free systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20(May), 101221. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101221>
- Amaral, P. F. F., Rocha-Leão, M. H. M., & Coelho, M. A. Z. (2010). Bioconversion of Flavors. *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, 115–128. <https://doi.org/10.1002/9780470622834.ch8>
- Andrade, G. S. S., Freitas, L., Oliveira, P. C., & De Castro, H. F. (2012). Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 84, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.02.011>
- Api, A. M., Belsito, D., Botelho, D., Bruze, M., Burton, G. A., Buschmann, J., Dagli, M. L., Date, M., Dekant, W., Deodhar, C., Francis, M., Fryer, A. D., Jones, L., Joshi, K., La Cava, S., Lapczynski, A., Liebler, D. C., O'Brien, D., Patel, A., ... Tsang, S. (2019). RIFM fragrance ingredient safety assessment, 2-octanone, CAS Registry Number 111-13-7. *Food and Chemical Toxicology*, 127(January), S71–S80. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.029>
- Badgujar, K. C., & Bhanage, B. M. (2016). Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds. *Process Biochemistry*, 51(10), 1420–1433. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.008>
- Berger, R. G. (2009). Biotechnology of flavours-the next generation. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1651–1659. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0083-5>
- Białecka-Florjańczyk, E., Krzyczkowska, J., Stolarzewicz, I., & Kapturowska, A. (2012). Synthesis of 2-phenylethyl acetate in the presence of *Yarrowia*

- lipolytica KKP 379 biomass. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(3–4), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.10.010>
- Bollinger, A., Molitor, R., Thies, S., Koch, R., Coscolín, C., Ferrer, M., & Jaeger, K.-E. (2020). Identification of organic solvent tolerant carboxylic ester hydrolases for organic synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, February, 1–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.00106-20>
- Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Federation of European Microbiological Societies*, 26, 73–81.
- Boudhrioua, N., Giampaoli, P., & Bonazzi, C. (2003). Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. *LWT - Food Science and Technology*, 36(6), 633–642. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00083-5)
- Braga, A., Guerreiro, C., & Belo, I. (2018). Generation of Flavors and Fragrances Through Biotransformation and De Novo Synthesis. *Food and Bioprocess Technology*, 11(12), 2217–2228. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2180-8>
- Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lépine, F., & Doucet, N. (2014). Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an E. coli whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091872>
- Byrne, F. P., Jin, S., Paggiola, G., Petchey, T. H. M., Clark, J. H., Farmer, T. J., Hunt, A. J., Robert McElroy, C., & Sherwood, J. (2016). Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0051-z>
- Cantone, S., Hanefeld, U., & Basso, A. (2007). Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chemistry*, 9(9), 954–997. <https://doi.org/10.1039/b618893a>
- Carroll, A. L., Desai, S. H., & Atsumi, S. (2016). Microbial production of scent and flavor compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.003>
- Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P., & H-Kittikun, A. (2009). Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.03.001>
- Chen, B., Yin, C., Cheng, Y., Li, W., Cao, Z., & Tan, T. (2010). Using silk woven fabric as support for lipase immobilization : The effect of surface hydrophilicity / hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass and Bioenergy*, 39, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.033>
- Chiou, S., & Wu, W. (2004). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*, 25, 197–204.

[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00482-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00482-4)

- Chorkendorff, I., & Niemantsverdriet, J. W. (2003). Concepts of Modern Catalysis and Kinetics. In *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.*
- Ciriminna, R., Lomeli Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: A versatile chemical of the bioeconomy. *Chemical Communications*, 50(97), 15288–15296. <https://doi.org/10.1039/c4cc06147k>
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82(July 2018), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.008>
- Cordero-Soto, I. N., Castillo-Araiza, C. O., García-Martínez, L. E., Prado-Barragán, A., & Huerta-Ochoa, S. (2020). Solid/gas biocatalysis for aroma production: An alternative process of white biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 164(May). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107767>
- Corregidor, P. F., Acosta, D. E., Gonzo, E. E., & Destéfanis, H. A. (2020). Isoamyl acetate preparation from reaction of vinyl acetate and Isoamyl alcohol catalyzed by H-ZSM-5 zeolite: a kinetic study. *Molecular Catalysis*, 481(April), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.06.009>
- Csanádi, Z., Kurdi, R., & Bélafi-Bakó, K. (2012). Ethyl-Acetate Synthesis in Gas Phase By Immobilised Lipase. *Hungarian Journal of Industry an Chemistry Veszprém*, 40(1), 39–44.
- Cvjetko, M., Vorkapić-Furač, J., & Žnidaršič-Plazl, P. (2012). Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochemistry*, 47(9), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.028>
- Daniel, R. M., Danson, M. J., Eisenthal, R., Lee, C. K., & Peterson, M. E. (2008). The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications. *Extremophiles*, 12(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0089-7>
- De Carvalho, C. C. C. R. (2011). Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnology Advances*, 29(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.09.001>
- Debeche, T., Marmet, C., Kiwi-Minsker, L., Renken, A., & Juillerat, M. A. (2005). Structured fiber supports for gas phase biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 911–916. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.012>
- Dias, A. L. B., dos Santos, P., & Martínez, J. (2018). Supercritical CO<sub>2</sub> technology applied to the production of flavor ester compounds through lipase-catalyzed reaction: A review. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 23(December 2017), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.11.011>

- Dias, A. L. B., Hatami, T., Martínez, J., & Ciftci, O. N. (2020). Biocatalytic production of isoamyl acetate from fusel oil in supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104917>
- Díaz Alvarez, Juan Carlos; Martínez Rey, Ramiro; Barrero Acosta, R. (2012). Líquidos iónicos : propiedades fisicoquímicas y aplicación potencial en el mejoramiento de crudos pesados. *Revista ION*, 25(1), 61–87.
- Dickinson, J. R., Harrison, S. J., Dickinson, J. A., & Hewlins, M. J. E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 10937–10942. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10937>
- dos Santos, P., Meireles, M. A. A., & Martínez, J. (2017). Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Supercritical Fluids*, 127, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.019>
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Dubal, S. A., Tilkari, Y. P., Momin, S. A., & Borkar, I. V. (2008). Biotechnological routes in flavour industries. *Advanced Biotech, March*, 20–31.
- Dumitriu, E., Secundo, F., Patarin, J., & Fehete, I. (2003). Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 119–133. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(03\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00015-8)
- Dwivedee, B. P., Soni, S., Laha, J. K., & Banerjee, U. C. (2018). Facile immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on polyaniline nano fibers (PANFs-PFL): A route to develop robust nanobiocatalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.049>
- Eisenmenger, M. J., & Reyes-De-Corcuera, J. I. (2010). Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(1–2), 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.07.002>
- Elgharbawy, A. A., Azizah, F., Alam, Z., & Moniruzzaman, M. (2018). Ionic liquids as a potential solvent for lipase-catalysed reactions : A review. *Journal of Molecular Liquids*, 251, 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.050>
- Fehér, E., Illeova, V., Kelemen-Horváth, I., Bélafi-Bakó, K., Polakovič, M., & Gubicza, L. (2008). Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid – alcohol biphasic system. *Molecular Catalysis*, 50, 28–32. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.09.019>
- Fickers, P., Nicaud, J. M., Gaillardin, C., Destain, J., & Thonart, P. (2004). Carbon

- and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 742–749.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02190.x>
- Fischer, E., & Speier, A. (1895). Darstellung der Ester. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 28, 3252–3258.
- Fraatz, M. A., Berger, R. G., & Zorn, H. (2009). Nootkatone-a biotechnological challenge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(1), 35–41.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-1968-x>
- Fukuda, K., Kuwahata, O., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate- hydrolyzing esterase gene (EST2) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(1), 8–15.  
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89447-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89447-5)
- Furuta, A., Fukuyama, T., & Ryu, I. (2017). Efficient flow fischer esterification of carboxylic acids with alcohols using sulfonic acid-functionalized silica as supported catalyst. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 90(5), 607–612.  
<https://doi.org/10.1246/bcsj.20170025>
- Ghamgui, H., Karra-Chaâbouni, M., Bezzine, S., Miled, N., & Gargouri, Y. (2006). Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 788–794. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.011>
- Gomes Almeida, A., de Meneses, A. C., Hermes de Araújo, P. H., & de Oliveira, D. (2017). A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 95–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>
- Goubet, I., Maugard, T., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2002). Role of water activity and temperature on activity and stability of dried whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous solid-gas bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 425–430. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00101-1)
- Graber, M., Bousquet-Dubouch, M. P., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2003). Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system: Effects of water on kinetic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1648(1–2), 24–32. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00027-X)
- Guo, D., Zhang, L., Pan, H., & Li, X. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of 2-Phenylethylacetate from L-phenylalanine. *MicrobiologyOpen*, 6(4), 1–5. <https://doi.org/10.1002/mbo3.486>
- Güvenç, A., Kapucu, N., & Mehmetoğlu, Ü. (2002). The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process*

- Biochemistry*, 38(3), 379–386. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00099-7)
- Han, S. Y., Pan, Z. Y., Huang, D. F., Ueda, M., Wang, X. N., & Lin, Y. (2009). Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.02.007>
- Hari Krishna, S., Manohar, B., Divakar, S., Prapulla, S. G., & Karanth, N. G. (2000). Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 131–136. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00149-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00149-0)
- Heintz, A. (2005). Recent developments in thermodynamics and thermophysics of non-aqueous mixtures containing ionic liquids. a review. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 37(6), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2005.04.003>
- Hobbs, H. R., & Thomas, N. R. (2007). Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions. *Chemical Reviews*, 107(6), 2786–2820. <https://doi.org/10.1021/cr0683820>
- Hong, Y. C. (Albert), Huang, L. C., Reineccius, G. A., Harlander, S. K., & Labuza, T. P. (1990). Production of aroma compounds from strawberry cell suspension cultures by addition of precursors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21(3), 245–251. <https://doi.org/10.1007/BF00047617>
- Hosoglu, M. I., Guner, O., & Yuceer, Y. K. (2018). Different Bioengineering Approaches on Production of Bioflavor Compounds. In *Role of Materials Science in Food Bioengineering* (Issue April). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00002-4>
- Inoue, Y., Fukuda, K., Wakai, Y., Sudsai, T., & Kimura, A. (1994). Ester Formation by a Yeast *Hansenula mrakii* IFO0895: Contribution of Esterase for Iso-Amyl Acetate Production in Sake Brewing. *Lebensm. Wiss. u. Technology*, 27, 189–193.
- İspirli Doğaç, Y., Deveci, İ., Mercimek, B., & Teke, M. (2017). A comparative study for lipase immobilization onto alginate based composite electrospun nanofibers with effective and enhanced stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.120>
- Joseph, T., Sahoo, S., & Halligudi, S. B. (2005). Brønsted acidic ionic liquids: A green, efficient and reusable catalyst system and reaction medium for Fischer esterification. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 234(1–2), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2005.03.005>
- Kakaei, K., Esrafil, M. D., & Ehsani, A. (2019). Introduction to Catalysis. *Interface Science and Technology*, 27, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814523-4.00001-0>

- Kang, Y., He, J., Guo, X., Guo, X., & Song, Z. (2007). Influence of Pore Diameters on the Immobilization of Lipase in SBA-15. *Ind. Eng. Chem. Res.*, *46*, 4474–4479. <https://doi.org/10.1021/ie061440n>
- Kim, H. J., Jin, J. N., Kan, E., Kim, K. J., & Lee, S. H. (2017). Bacterial cellulose-chitosan composite hydrogel beads for enzyme immobilization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *22*(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0381-4>
- Kirdi, R., Ben Akacha, N., Messaoudi, Y., & Gargouri, M. (2017). Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *22*(4), 413–422. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0616-4>
- Knez, Ž. (2009). Enzymatic reactions in dense gases. *Journal of Supercritical Fluids*, *47*(3), 357–372. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.012>
- Koutinas, M., Yiangou, C., Osório, N. M., Ioannou, K., Canet, A., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2018). Application of commercial and non-commercial immobilized lipases for biocatalytic production of ethyl lactate in organic solvents. *Bioresource Technology*, *247*, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.130>
- Kruis, A. J., Bohnenkamp, A. C., Patinios, C., van Nuland, Y. M., Levisson, M., Mars, A. E., van den Berg, C., Kengen, S. W. M., & Weusthuis, R. A. (2019). Microbial production of short and medium chain esters: Enzymes, pathways, and applications. *Biotechnology Advances*, *37*(7), 107407. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.006>
- Kruis, A. J., Gallone, B., Jonker, T., Mars, A. E., van Rijswijck, I. M. H., Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Smid, E. J., Steensels, J., Verstrepen, K. J., Kengen, S. W. M., van der Oost, J., & Weusthuis, R. A. (2018). Contribution of Eat1 and Other Alcohol Acyltransferases to Ester Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03202>
- Kruis, A. J., Levisson, M., Mars, A. E., van der Ploeg, M., Garcés Daza, F., Ellena, V., Kengen, S. W. M., van der Oost, J., & Weusthuis, R. A. (2017). Ethyl acetate production by the elusive alcohol acetyltransferase from yeast. *Metabolic Engineering*, *41*, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.03.004>
- Kulishova, L. M., & Zharkov, D. O. (2017). Solid/gas biocatalysis. *Biochemistry (Moscow)*, *82*(2), 95–105. <https://doi.org/10.1134/S000629791702002X>
- Kumar, R., Modak, J., & Madras, G. (2005). Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *41*(8), 1940–1945. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.007>

- Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V. K., Banerjee, R., & Dasgupta, S. (2009). Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor. *Food Technology and Biotechnology*, 47(1), 13–18.
- Kunjapur, A. M., Tarasova, Y., & Prather, K. L. J. (2014). Synthesis and accumulation of aromatic aldehydes in an engineered strain of escherichia coli. *Journal of the American Chemical Society*, 136(33), 11644–11654. <https://doi.org/10.1021/ja506664a>
- Kusano, M., Sakai, Y., Kato, N., Yoshimoto, H., Sone, H., & Tamai, Y. (1998). Hemiacetal dehydrogenation activity of alcohol dehydrogenases in *saccharomyces cerevisiae*. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 62, Issue 10, pp. 1956–1961). <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1956>
- Lamare, S., Caillaud, B., Roule, K., Goubet, I., & Legoy, M. D. (2001). Production of natural esters at the pre-industrial scale by solid/gas biocatalysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 19(5–6), 361–377. <https://doi.org/10.3109/10242420108992024>
- Lamare, Sylvain, Legoy, M.-D., & Graber, M. (2004a). Solid/gas bioreactors: powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chemistry*, 6(9), 445–458. <https://doi.org/10.1039/b405869k>
- Lamare, Sylvain, Legoy, M. D., & Graber, M. (2004b). Solid/gas bioreactors: Powerful tools for fundamental research and efficient technology for industrial applications. *Green Chemistry*, 6(9), 445–458. <https://doi.org/10.1039/b405869k>
- Lee, J. W., & Trinh, C. T. (2020). Towards renewable flavors, fragrances, and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 168–180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.017>
- Létisse, F., Lamare, S., Legoy, M. D., & Graber, M. (2003). Solid/gas biocatalysis: An appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1652(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00262-0)
- Li, H., Meng, Y., Shu, C., Li, X., Kiss, A. A., & Gao, X. (2018). Innovative Reactive Distillation Process for the Sustainable Synthesis of Natural Benzaldehyde. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(11), 14114–14124. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b02686>
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 744–753. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.744-753.2000>
- Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2004). Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 14(11), 923–945. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.010>

- Löser, C., Urit, T., Stukert, A., & Bley, T. (2013). Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *Journal of Biotechnology*, 163(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.009>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2018.08.006>
- Lozano, P., Bernala, J. M., & Navarro, A. (2012). Clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases. *Green Chemistry*, 14(11), 3026–3033.
- Marlot, C., Langrand, G., Triantaphylides, C., & Baratti, J. (1985). Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports. *Biotechnology Letters*, 7(9), 647–650.
- Martínez-Pérez M., Spiropoulos-Gonçalves E. C., Vici A. C., Santos-Salgado J. C., Texeira-de Moraes-Polizeli M. L. 2019. Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology. In: Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives, (Yadav, A. N., Mishra, S., Singh, S., & Gupta, A., ed). Springer Switzerland. DOI: 10.1007/978-3-030-10480-1.
- Maugard, T., Lamare, S., & Legoy, M. D. (2001). Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2), 164–168. <https://doi.org/10.1002/bit.1048>
- Mhetras, N., Patil, S., & Gokhale, D. (2010). Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: A Potential Biocatalyst for Synthesis of Isoamyl Acetate. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), 432–437. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0087-4>
- Mizobuchi, M., & Nagayama, K. (2015). Reduced pressure gas phase bioreactor as a tool for stereoselective reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Parvibaculum lavamentivorans*. *Biochemical Engineering Journal*, 93, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.018>
- Nagayama, K., Spieß, A. C., & Büchs, J. (2012). Enhanced catalytic performance of immobilized *Parvibaculum lavamentivorans* alcohol dehydrogenase in a gas phase bioreactor using glycerol as an additive. *Chemical Engineering Journal*, 207–208, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.06.135>
- Naranjo, J. C., Córdoba, A., Giraldo, L., García, V. S., & Moreno-piraján, J. C. (2010). Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1–2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.002>
- Nardi, M., Fiez-Vandal, C., Tailliez, P., & Monnet, V. (2002). The EstA esterase is responsible for the main capacity of *Lactococcus lactis* to synthesize short chain fatty acid esters in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 994–

1002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01793.x>

- Nicoletti, G., Cipolatti, E. P., Valério, A., Carbonera, N. T. G., Soares, N. S., Theilacker, E., Ninow, J. L., & de Oliveira, D. (2015). Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(9). <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1415-6>
- Nomura, K., Ogura, H., & Imanishi, Y. (2001). Direct synthesis of 2-phenylethanol by hydrogenation of methyl phenylacetate using homogeneous ruthenium-phosphine catalysis under low hydrogen pressure. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 166(2), 345–349. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(00\)00476-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(00)00476-3)
- Osborn, G. S., Young, J. H., & Singleton, J. A. (1996). MEASURING THE KINETICS OF ACETALDEHYDE, ETHANOL AND ETHYL ACETATE WITHIN PEANUT KERNELS DURING HIGH TEMPERATURE DRYING. *American Society of Agricultural Engineers*, 39(3), 1039–1045.
- Palmerín-Carreño, D. M., Cordero-Soto, I. N., Valle-Cervantes, S., Ríos-Nuñez, L. G., Prado-Barragán, L. A., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2019). Multiphase bioreactors in the food industry: Aroma production. In *Advances in Chemical Engineering* (1st ed., Vol. 54). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2019.01.004>
- Panda, T., & Gowrishankar, B. S. (2005). Production and applications of esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 160–169. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1840-y>
- Park, Y. C., San, K. Y., & Bennett, G. N. (2007). Characterization of alcohol dehydrogenase 1 and 3 from *Neurospora crassa* FGSC2489. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0998-5>
- Park, Y. C., Shaffer, C. E. H., & Bennett, G. N. (2009). Microbial formation of esters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2170-x>
- Perez, V. H., Miranda, E. A., & Valença, G. P. (2007). Kinetics of gas-phase hydrolysis of ethyl acetate catalyzed by immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136(1), 23–37. <https://doi.org/10.1007/BF02685936>
- Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., & Eisenthal, R. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: Determination and validation of parameters. *Biochemical Journal*, 402(2), 331–337. <https://doi.org/10.1042/BJ20061143>
- Pinto Brito, M. J., Bauer, L. C., Flores Santos, M. P., Santos, L. S., Ferreira Bonomo, R. C., da Costa Ilhéu Fontan, R., & Veloso, C. M. (2020). Lipase

immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials*, 309(June).  
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110576>

- Pires, E. L., Miranda, E. A., & Valença, G. P. (2002). Gas-phase enzymatic esterification on immobilized lipases in MCM-41 molecular sieves. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 98–100, 963–976. <https://doi.org/10.1385/ABAB:98-100:1-9:963>
- Plata, C., Millán, C., Mauricio, J. C., & Ortega, J. M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00101-6)
- Polakovič, M., Švitel, J., Bučko, M., Filip, J., Neděla, V., Ansorge-Schumacher, M. B., & Gemeiner, P. (2017). Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications. *Biotechnology Letters*, 39(5), 667–683. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2300-y>
- Qi, H., Du, Y., Hu, G., & Zhang, L. (2018). Poly(carboxybetaine methacrylate)-functionalized magnetic composite particles: A biofriendly support for lipase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2660–2666. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.150>
- Quilter, M. G., Hurley, J. C., Lynch, F. J., & Murphy, M. G. (2003). The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(1), 34–40. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00591.x>
- Rajapriya, G., Morya, V. K., Mai, N. L., & Koo, Y. M. (2018). *Aspergillus niger* whole-cell catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, 111(May), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.10.005>
- Reyes-Sanchez, F. J., Paez-Lerma, J. B., Rojas-Contreras, J. A., Lopez-Miranda, J., Soto-Cruz, N. O., & Reinhart-Kirchmayr, M. (2020). Study of the Enzymatic Capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the Synthesis of Esters. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 29(1–6), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000507551>
- Rodríguez-Romero, J. de J., Aceves-Lara, C. A., Silva, C. F., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., & Arrizon, J. (2020). 2-Phenylethanol and 2-phenylethylacetate production by nonconventional yeasts using tequila vinasses as a substrate. *Biotechnology Reports*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00420>
- Romano, D., Bonomi, F., de Mattos, M. C., de Sousa Fonseca, T., de Oliveira, M. da C. F., & Molinari, F. (2015). Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 33(5), 547–565.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.006>

- Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C., & Daneshfar, A. (2007). A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *Journal of Biotechnology*, 127(2), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.009>
- Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., & Ghaziaskar, H. S. (2005). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.033>
- Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C., Habulin, M., Primožič, M., & Knez, Ž. (2005). Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 33(1), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.05.004>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 165–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x>
- Santos, J. C., Paula, A. V., Rocha, C. G. F., Nunes, G. F. M., & Castro, H. F. De. (2008). Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane – polyvinyl alcohol prepared by sol – gel technique and their potential for immobilizing enzyme. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354(42–44), 4823–4826. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.04.019>
- Saucedo-Rivalcoba, V., Martínez-Hernández, A. L., Martínez-Barrera, G., Velasco-Santos, C., & Castaño, V. M. (2011). (Chicken feathers keratin)/polyurethane membranes. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 104(1), 219–228. <https://doi.org/10.1007/s00339-010-6111-4>
- Scipioni, M., Kay, G., Megson, I., & Kong Thoo Lin, P. (2018). Novel vanillin derivatives: Synthesis, anti-oxidant, DNA and cellular protection properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.072>
- Shaaban, H. A., Mahmoud, K. F., Amin, A. A., & El Banna, H. A. (2016). Application of biotechnology to the production of natural flavor and fragrance chemicals. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(6), 2670–2717. <https://doi.org/10.1021/bk-2005-0908.ch004>
- Shamsuri, A. A. (2011). Ionic Liquids: Preparations and Limitations. *MAKARA of Science Series*, 14(2), 101–106. <https://doi.org/10.7454/mss.v14i2.677>
- Shi, Y. gang, Wu, Y., Lu, X. yang, Ren, Y. ping, Wang, Q., Zhu, C. min, Yu, D., & Wang, H. (2017). Lipase-catalyzed esterification of ferulic acid with lauryl alcohol in ionic liquids and antibacterial properties in vitro against three food-related bacteria. *Food Chemistry*, 220, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.187>

- Sim Siong, L., Yusoff Azudin, N., & Abd Shukor, S. R. (2014). Process Modelling of Isoamyl Acetate Synthesis. *Journal of Engineering Science*, 10(i), 59–71.
- Singh, A. K., & Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: A review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2), 486–520.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9444-3>
- Srivastava, P. K., Kayastha, A. M., & Srinivasan. (2001). Characterization of gelatin-immobilized pigeonpea urease and preparation of a new urea biosensor. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 34, 55–62.
- Stevens, J. C., Das, L., Mobley, J. K., Asare, S. O., Lynn, B. C., Rodgers, D. W., & Shi, J. (2019). Understanding Laccase-Ionic Liquid Interactions toward Biocatalytic Lignin Conversion in Aqueous Ionic Liquids [Research-article]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(19), 15928–15938.  
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02151>
- Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2008). Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 185–189.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.002>
- Thangaraj, B., & Solomon, P. R. (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 167–194.  
<https://doi.org/10.1002/cben.201900017>
- Torres, Sebastián, Baigorí, M. D., Swathy, S. L., Pandey, A., & Castro, G. R. (2009). Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Research International*, 42(4), 454–460.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.005>
- Torres, Sebastian, Pandey, A., & Castro, G. R. (2010). Banana flavor : Insights into isoamyl acetate production. In A. E. Cohen (Ed.), *Bananas: Nutrition, Diseases and Trade Issues* (Issue January, pp. 225–244). Nova Publishers.
- Vakili, F., Mojtabavi, S., Imanparast, S., Kianmehr, Z., Forootanfar, H., & Faramarzi, M. A. (2020). Immobilization of lipase on the modified magnetic diatomite earth for effective methyl esterification of isoamyl alcohol to synthesize banana flavor. *3 Biotech*, 10(10), 1–13.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02437-5>
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., Delvaux, F. R., Box, P. O., Osmond, G., & Sa, A. (2003). Flavor active esters Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110–118. [papers2://publication/uuid/4C7C28D1-D329-490A-A219-A059C0CD5F7C](https://doi.org/10.1016/j.jb.2003.08.002)
- Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1,

- Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5228–5237. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003>
- Vitola, G., Mazzei, R., Poerio, T., Barbieri, G., Fontananova, E., Büning, D., Ulbricht, M., & Giorno, L. (2019). Influence of Lipase Immobilization Mode on Ethyl Acetate Hydrolysis in a Continuous Solid-Gas Biocatalytic Membrane Reactor. *Bioconjugate Chemistry*, 30(8), 2238–2246. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00463>
- Wachtmeister, J., & Rother, D. (2016). Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.05.005>
- Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505–515. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00149-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3)
- Wang, C., Zheng, P., & Chen, P. (2019). Construction of synthetic pathways for raspberry ketone production in engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09748-5>
- Wang, J., Zhao, G., Jing, L., Peng, X., & Li, Y. (2015). Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide-chitosan composite for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 98, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.11.013>
- Wang, W., Zhou, W., Li, J., Hao, D., Su, Z., & Ma, G. (2015). Comparison of covalent and physical immobilization of lipase in gigaporous polymeric microspheres. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(11), 2107–2115. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1450-3>
- Weitao, S., Das, R. K., Naghdi, M., Brar, S. K., & Verma, M. (2016). A Review on the Important Aspects of Lipase Immobilization on Nanomaterials. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 64(4), 496–508. <https://doi.org/10.1002/bab.1515>
- Xue, J., Zeng, Z., Xue, W., & Yang, H. (2018). Kinetics of esterification of benzoic acid and isoamyl alcohol catalyzed by P-toluenesulphonic acid. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(11), 2443–2449. <https://doi.org/10.1002/cjce.23158>
- Yagiz, F., Kazan, D., & Akin, A. N. (2007). Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. *Chemical Engineering Journal*, 134, 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.03.041>
- Yan, H. De, Zhang, Q., & Wang, Z. (2014). Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. *Catalysis Communications*, 45, 59–62. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2013.10.018>
- Yang, F., & Russell, A. J. (1996). The role of hydration in enzyme activity and

stability: 1. Water adsorption by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(6), 700–708. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960320\)49:6<700::AID-BIT12>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960320)49:6<700::AID-BIT12>3.0.CO;2-9)

Yilmaztekin, M., Erten, H., & Cabaroglu, T. (2008). Production of isoamyl acetate from sugar beet molasses by williopsis saturnus var. saturnus. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 34–38.

Yilmaztekin, M., Erten, H., & Cabaroglu, T. (2009). Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by Williopsis saturnus var. saturnus. *Food Chemistry*, 112(2), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.079>

Yoshioka, K., & Hashimoto, N. (1981). Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers' yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(10), 2183–2190. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864861>

Zaidan, U. H., Rahman, M. B. A., Basri, M., Othman, S. S., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. (2010). Silylation of mica for lipase immobilization as biocatalysts in esterification. *Applied Clay Science*, 47(3–4), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.11.004>

Zaidi, A., Gainer, J. L., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., & Mir, A. (2002). Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n -hexane : kinetic parameters and chain-length effects. *Journal of Biotechnology*, 93, 209–216.

Zhang, S., Guo, F., Yan, W., Dong, W., Zhou, J., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2020). Perspectives for the microbial production of ethyl acetate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(17), 7239–7245. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10756-z>

#### Referencias electrónicas

Acme-Hardesty. The Rising Demand for Esters and Sustainable Ingredients in the Personal Care Market. Acme-Hardesty Company. Retrieved January 6, 2021 from <https://www.acme-hardesty.com/esters-personal-care-market/>

Food ingredients first. Solvay increases natural vanillin production amid heightened market demand. Retrieved on April 26, 2021 on: <https://www.foodingredientsfirst.com/news/solvay-increases-natural-vanillin-production-amid-heightened-market-demand.html#:~:text=Click%20to%20EnlargePeter%20Browning,natural%20vanillin%20is%20US%24500>

- Grandview Research. Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. Retrieved on April 25, 2021 on <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>.
- Grandview Research. Aroma Chemicals Market Size, Share & Trends Analysis Report By Source (Natural, Synthetic), By Chemical (Terpenes & Terpenoids, Benzenoids, Musk Chemicals), By Application (Flavors, Fragrances), And Segment Forecasts, 2020 – 2027. Retrieved on April 26, 2021 on: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aroma-chemicals-market>
- Grandview Research. U.S. Esters Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Fatty Esters, Phosphate Esters, Acrylic Esters, Cellulose Esters, Allyl and Aromatic Esters), By Application, And Segment Forecasts, 2019 – 2025. Retrieved on April 25, 2021 from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/us-esters-market>.
- Gminsight. Lipase Market Size, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Development Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2021 – 2027. Retrieved on April 25, 2021, from <https://www.gminsights.com/industry-analysis/lipase-market>.
- Leffingwell & Associates (2018). 2013 - 2017 Flavor & Fragrance Industry Leaders. Leffingwell & Associates (Services and Software for the Perfume, Flavor, Food and Beverage Industries). Retrieved December 17, 2020, from [http://www.leffingwell.com/top\\_10.htm](http://www.leffingwell.com/top_10.htm)
- ReportLinker (2020). Global Fatty Esters Industry. Retrieved January 6, 2021 from [https://www.reportlinker.com/p05485910/Global-Fatty-Esters-Industry.html?utm\\_source=GNW](https://www.reportlinker.com/p05485910/Global-Fatty-Esters-Industry.html?utm_source=GNW)
- Sigma-Aldrich. Vanillin ReagentPlus 99%. Retrieved January 23, 2021 from: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v1104?lang=es&region=MX&qclid=CjwKCAiAxeX\\_BRASEiwAc1QdkYmVjiBSYPlcvMkus\\_kbswEabSqUzgUrvRndW5KcYabG7oait\\_nmRxoCchHQQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v1104?lang=es&region=MX&qclid=CjwKCAiAxeX_BRASEiwAc1QdkYmVjiBSYPlcvMkus_kbswEabSqUzgUrvRndW5KcYabG7oait_nmRxoCchHQQAvD_BwE)
- Sigma-Aldrich. Vanillin ReagentPlus 99%. Retrieved January 23, 2021 from: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v1104?lang=es&region=MX&qclid=CjwKCAiAxeX\\_BRASEiwAc1QdkYmVjiBSYPlcvMkus\\_kbswEabSqUzgUrvRndW5KcYabG7oait\\_nmRxoCchHQQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v1104?lang=es&region=MX&qclid=CjwKCAiAxeX_BRASEiwAc1QdkYmVjiBSYPlcvMkus_kbswEabSqUzgUrvRndW5KcYabG7oait_nmRxoCchHQQAvD_BwE)
- Sigma-Aldrich. Vanillin Natural 97%. Retrieved January 23, 2021 from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w310727?lang=es&region=MX>

Sigma-Aldrich.  $\gamma$ -Decalactone 98% Food Grade, Artificial. Retrieved February 10, 2021 from:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w236004?lang=es&region=MX>

Sigma-Aldrich.  $\gamma$ -Decalactone 97% Food Grade, Natural. Retrieved April 26, 2021 from:  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w236128?lang=es&region=MX&gclid=Cj0KCQjwyZmEBhCpARIsALzmnLuOoKFhDWV5G3mguzcZMdNyUvWsth7nOtk6Ff9afo-Evv61iVb-C0aAluDEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w236128?lang=es&region=MX&gclid=Cj0KCQjwyZmEBhCpARIsALzmnLuOoKFhDWV5G3mguzcZMdNyUvWsth7nOtk6Ff9afo-Evv61iVb-C0aAluDEALw_wcB)

Sigma-Aldrich. 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone 98% Food Grade, synthetic. Retrieved Jun 03, 2021, from:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w258806?lang=es&region=MX>

Sigma-Aldrich. 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone 98% Food Grade, natural. Retrieved Jun 03, 2021, from:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w258814?lang=es&region=MX>

Sigma-Aldrich. L-Carvone 97% Synthetic. Retrieved Jun 03, 2021, from:  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w224901?lang=es&region=MX&cm\\_sp=Insite\\_-\\_caSrpResults\\_srpRecs\\_srpModel\\_6485-40-1-\\_srpRecs3-2](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w224901?lang=es&region=MX&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_6485-40-1-_srpRecs3-2)

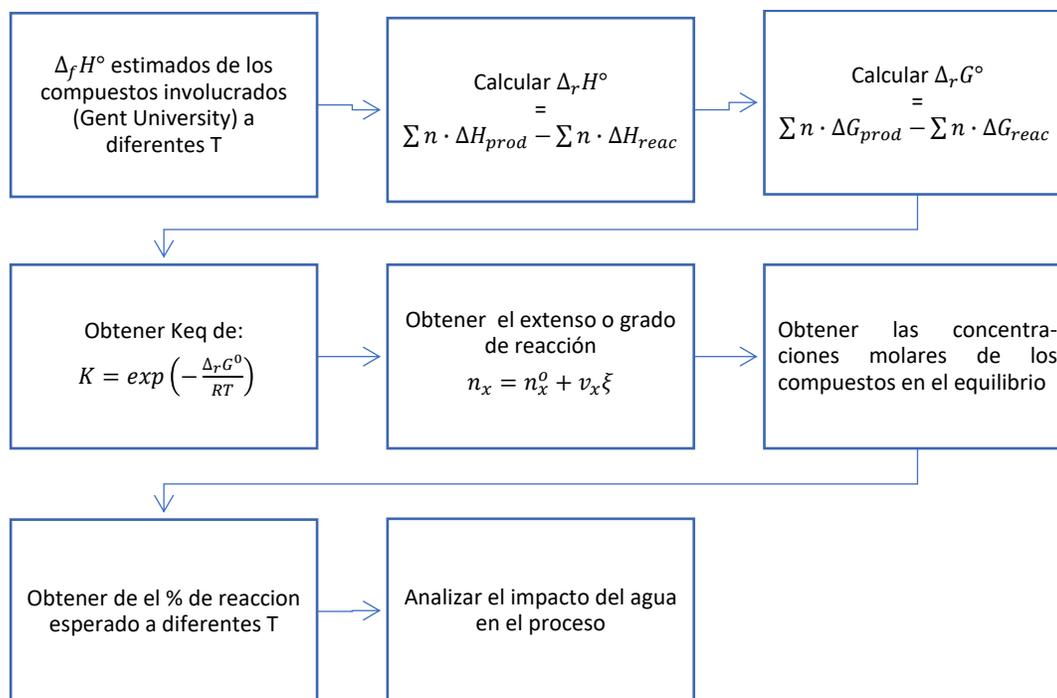
Sigma-Aldrich. L-Carvone 98% Natural. Retrieved Jun 03, 2021, from:  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w258814?lang=es&region=MX>

Zion Market Research (2017). Global Oleochemicals Market will reach USD 26.8 Billion in 2022: Zion Market Research. GlobeNewsWire. Retrieved January 6, 2021 from <https://www.globenewswire.com/news-release/2017/02/23/927021/0/en/Global-Oleochemicals-Market-will-reach-USD-26-8-Billion-in-2022-Zion-Market-Research.html>

## 6. ANEXOS

### 6.1 Anexo 1. Análisis de los parámetros termodinámicos de la síntesis de acetato de isoamilo.

En la **Figura 10** se presenta la secuencia de cálculo desarrollada para el análisis de los parámetros termodinámicos de la reacción de la síntesis de acetato de isoamilo.



**Figura 10.** Secuencia de cálculo para el análisis termodinámico de la reacción de esterificación de acetato de isoamilo.

#### 6.1.1. Constante de equilibrio y extensión de la reacción

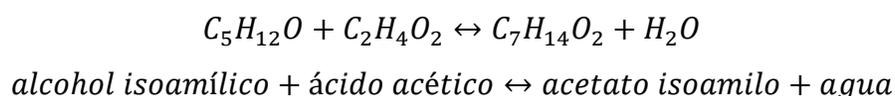
Se evaluó un rango de temperatura de 30 a 70 °C ya que son las temperaturas más reportadas en estudios previos para llevar a cabo la reacción. Igualmente se estudió la relación molar de los reactantes:

*Relación molar (mol de ácido: mol de alcohol)*

En la literatura sólo fueron evaluadas relaciones molares 1:1, 2:1 y 1:2. En este estudio teórico se tomaron relaciones de 1:2, 1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, y 7:1, fijando los moles de alcohol y variando los de ácido, no se tomaron más valores donde el

alcohol predominara en la reacción pues se observó en un primer análisis que al aumentar el ácido aumentaba el rendimiento.

Se calcularon las entalpías de reacción ( $\Delta_r H$ ) y energías libres de Gibbs de reacción ( $\Delta_r G$ ), en  $\text{kJ mol}^{-1}$ , así como las constantes de equilibrio ( $K_{eq}$ ), a partir de las entalpías y energías de formación ( $\Delta_f H$  y  $\Delta_f G$ ) de los reactivos y productos involucrados en la reacción, la cual es:



Las  $\Delta_f H$  y  $\Delta_f G$  de cada compuesto fueron obtenidos (30 a 70 °C) por el grupo de estadística termodinámica de la Universidad de Gent (Bélgica) (Anexo 2).

Primero, para calcular las  $\Delta_r H^\circ$  y  $\Delta_r G^\circ$  se utilizaron las ecuaciones Ex1.1 y Ex1.2 a partir de los datos de Gent, entonces se calculó  $K_{eq}$  con Ex1.3, este parámetro termodinámico, representa la relación de los productos entre los reactivos (Ex 1.4) por lo que indicará hacia a donde se desplaza la reacción predominantemente, si a la formación de reactivos ( $K_{eq} < 0.5$ ) o a productos ( $K_{eq} > 0.5$ ).

$$\Delta_r H^\circ = \sum n \cdot \Delta H_{prod} - \sum n \cdot \Delta H_{reac} \quad \text{(Ecuación Ex1.1)}$$

$$\Delta_r G^\circ = \sum n \cdot \Delta G_{prod} - \sum n \cdot \Delta G_{reac} \quad \text{(Ecuación Ex1.2)}$$

$$K = \exp\left(-\frac{\Delta_r G^\circ}{RT}\right) \quad \text{(Ecuación Ex1.3)}$$

$$K_{eq} = \frac{[C_7H_{14}O_2]^1 \cdot [H_2O]^1}{[C_5H_{12}O]^1 \cdot [C_2H_4O_2]^1} \quad \text{(Ecuación Ex1.4)}$$

El grado de avance de reacción que se encuentra relacionado directamente con las concentraciones de reactivos y productos, fue calculado como lo describe Chorkendorff & Niemantsverdriet (2003) (Anexo 3).

Finalmente se analizó el efecto del agua en el sistema sobre la reacción de esterificación, añadiendo teóricamente agua de forma progresiva, con los valores 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2 y 4. Dado que esta es producto de la reacción, su presencia en el ambiente podría modificar el rendimiento de la reacción.

Se compararon las relaciones molares 2:1 y 4:1 para observar de qué manera se afectaban y si existe diferencia entre dichas relaciones molares.

### 6.1.2. Estimación de los parámetros termodinámicos

Se observan en la **Tabla 5** los valores  $\Delta_r H$ ,  $\Delta_r G$  y  $K_{eq}$ . Los valores negativos de  $\Delta_r H$  indica que la reacción es exergónica, es decir libera calor, mientras más alto es el valor a signo negativo, indica que libera más energía. La  $\Delta_r G$  que relaciona la entalpía con la entropía ( $\Delta S$ ) y la temperatura (T), de manera:  $\Delta_r G = \Delta_r H - T \Delta S$ . Cuando los valores de la  $\Delta_r G$  son positivos, indican que la reacción no ocurre de forma espontánea y viceversa; en este caso, se observa que a menores T se registran las menores  $\Delta_r H$  y por lo tanto las menores  $\Delta_r G$ , por lo que estas liberan más energía y por lo tanto son más espontáneas. Respecto a la  $K_{eq}$  es el cociente de las concentraciones molares de los productos entre los reactantes en el equilibrio, por lo que un mayor valor de  $K_{eq}$ , indicará una mayor concentración de productos que de reactantes, es decir, la reacción se desplaza hacia los productos. De entrada, estos son valores indican que efectivamente la reacción se producirá a las condiciones propuestas.

**Tabla 5.** Entalpías, energías libres de Gibbs y constantes de equilibrio de la reacción a diferentes temperaturas.

T (°C)	$\Delta H_{reac}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{reac}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$K_{eq}$
30	-3.63	-2.70	2.92
35	-3.57	-2.69	2.86
40	-3.52	-2.68	2.79
45	-3.46	-2.66	2.74
50	-3.41	-2.65	2.68
55	-3.36	-2.64	2.63
60	-3.31	-2.63	2.58
65	-3.25	-2.62	2.54
70	-3.20	-2.61	2.50

Una vez obtenidos estos valores, se procedió a calcular el grado de avance de la reacción, como describe Chorkendorff & Niemantsverdriet (2003) (Anexo 2). Los resultados se encuentran condensados en la **Tabla 6**, en ella se aprecia que conforme aumenta la relación molar ácido:alcohol, aumenta el rendimiento de la reacción y que el cambio es más drástico en relaciones bajas (1:2) a partir de entonces se nota un crecimiento más lento. También se observa que conforme aumenta la temperatura hay una ligera disminución en el porcentaje de la reacción.

**Tabla 6.** Evaluación del rendimiento de reacción respecto a distintas relaciones molares ácido: alcohol.

T°C	Relación molar (ácido/alcohol)							
	1:2	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1
30	40.54	63.10	81.09	87.63	90.87	92.77	94.02	94.91
35	40.41	62.84	80.82	87.42	90.70	92.63	93.91	94.81
40	40.28	62.57	80.56	87.21	90.52	92.49	93.78	94.70
45	40.16	62.33	80.32	87.02	90.37	92.36	93.67	94.60
50	40.04	62.09	80.07	86.82	90.21	92.23	93.56	94.50
55	39.92	61.87	79.85	86.64	90.06	92.10	93.45	94.41
60	39.81	61.64	79.61	86.45	89.91	91.97	93.34	94.31
65	39.70	61.44	79.41	86.28	89.77	91.86	93.24	94.23
70	39.60	61.24	79.20	86.11	89.63	91.74	93.14	94.14

Se realizó un análisis estadístico para determinar la significancia ( $\alpha=0.05$ ) del cambio en la proporción molar de los reactantes. El Análisis de Varianza (ANOVA) (**Tabla 7**) indica que al menos una media de datos es diferente a las demás, al realizar la prueba de comparación múltiple de medias Tukey (**Tabla 8**), se observa que al aumentar la cantidad de ácido acético respecto al alcohol isoamílico, el rendimiento aumenta considerablemente hasta un valor de 4.5 a partir del cual las medias se comienzan a traslapar pues su diferencia no es significativa, además el aumento tan drástico de reactivo conlleva a pérdidas por sustrato no utilizado.

**Tabla 7.** Evaluación del rendimiento de reacción respecto a distintas relaciones molares ácido: alcohol.

**Pruebas de efectos Inter sujetos**

Variable dependiente: % Rendimiento

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Relación molar	27892.522	13	2145.579	9897.693	7.79E-165
Error	24.279	112	0.217		
Total	899791.763	126			
Total corregido	27916.801	125			

**Tabla 8.** Prueba de medias múltiple Tukey de las diferentes relaciones molares analizadas.

**% Rendimiento**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Ácido:Alcohol	N	Subconjunto													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
.5	9	40.051													
1.0	9		62.124												
1.5	9			73.620											
2.0	9				80.102										
2.5	9					84.131									
3.0	9						86.842								
3.5	9							88.778							
4.0	9								90.225						
4.5	9									91.346					
5.0	9										92.238				
5.5	9											92.965	92.965		
6.0	9												93.568	93.568	
6.5	9													94.077	94.077
7.0	9														94.511
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.069	.266	.547	.777	

De acuerdo con el análisis efectuado, se puede afirmar que el rendimiento de la reacción es directamente proporcional a la concentración molar de ácido, e inversa

a la de alcohol. Son destacables las relaciones molares 2:1 y 4:1, debido a que presentan gran rendimiento y no involucran el derroche de tanto reactivo.

No obstante, estos resultados contrastan totalmente con lo reportado por Romero *et al.*, 2005, pues al ensayar relaciones molares 2:1 de ambos reactivos les sucedió el efecto contrario. Un exceso de donador acílico (anhídrido acético) causaba desactivación enzimática, disminuyendo la tasa inicial de reacción, probablemente por la acidificación del medio. Por el contrario, el exceso de alcohol aumentaba el rendimiento de reacción más allá del 100 % (a 114 %) debido a que parte del ácido acético producido reaccionaba con el exceso de alcohol. Lo mismo reportan Xue *et al.*, 2018 en su esterificación química de alcohol isoamílico y ácido benzoico, pues en una relación molar 6:1 obtenían un rendimiento de reacción de 95.18 % respecto al 66.65 % obtenido en la relación molar 1:1, por lo que estos datos necesitan ser corroborados a profundidad.

### **6.1.3. Análisis de precios y proyección económica de reactivos**

Trabajando con las relaciones molares propuestas anteriormente, se realizó un análisis del precio en el mercado actual, de los reactivos y el producto de la reacción, para ponderar cual sería la proporción molar óptima en la cual trabajar durante la fase experimental. Del análisis de la **Tabla 8**, se seleccionaron 2 proporciones molares, 2:1 y 4:1, esta última utiliza el doble de ácido acético, pero aumenta el rendimiento de reacción en un 10 %, por lo que se analizará que tan beneficioso es esto en un análisis costo beneficio presentado a continuación.

La **Tabla 9** muestra el precio por mol de cada una de las sustancias a utilizar y en la **Tabla 10** se observa la comparativa entre precio de inversión de reactivos vs el precio del producto final relacionado con el rendimiento teórico alcanzable. Si bien ambas no superan el precio de inversión, una relación molar 2:1 genera un mayor margen de “ganancia”, además se puede afirmar que no vale la pena desperdiciar más reactivo por solo 10 % más de rendimiento que no genera gran ventaja, por lo que para un desarrollo práctico se recomienda estudiar una relación molar 2:1.

**Tabla 9.** Precios comerciales de las sustancias involucradas en la reacción en MXN.

Producto	Presentación	Precio unitario	Precio/ L o kg	PM (g/mol)	Densidad	Precio/mol
Ácido Acético	2.5 L	921	368.4	60.05	1.05	21.07
Alcohol Isoamílico	1 L	771	771	88.15	0.8	64.73
Acetato Isoamilo	1 kg	1750	1750	130.18	0.87	227.82

Tomados de la página de Sigma Aldrich y Merck (<https://www.sigmaaldrich.com>, <https://www.merckmillipore.com>)

**Tabla 10.** Análisis de precios (MXN) de las sustancias involucradas en la reacción.

Relación molar	Ácido	Alcohol	Total de reactivos	Acetato	Rendimiento	Acetato	Margen de \$\$
<b>2:1</b>	\$21.07 (2)	\$64.73	\$106.87	\$227.82	80%	\$182.08	\$75.38
<b>4:1</b>	\$21.07 (4)	\$64.73	\$149.01	\$227.82	90%	\$ 205.04	\$56.03

#### 6.1.4. Efecto del agua en la extensión de la reacción

Se analizó el efecto del agua en el sistema sobre la reacción de esterificación, dado que esta es producto de la reacción, su presencia en el ambiente modifica el rendimiento, así como también el equilibrio de la reacción, desplazándolo hacia los reactivos. Se compararon las relaciones molares 2:1 (**Tabla 11**) y 4:1 (**Tabla 12**). En ambos casos el porcentaje de reacción disminuye al aumentar la cantidad de agua en el ambiente, pero se observa cómo es ligeramente más influyente en la relación molar 2:1.

**Tabla 11.** Efecto del agua en el reactor sobre el rendimiento de reacción a una proporción molar ácido: alcohol 2:1.

T (°C)	CANTIDAD MOLAR DE AGUA con Relación Molar 2:1 (ácido: alcohol)												
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	4
30	81.09	79.68	78.34	77.05	75.82	74.63	73.48	72.38	71.32	70.29	69.30	60.91	49.47
35	80.82	79.41	78.05	76.75	75.50	74.30	73.14	72.03	70.96	69.92	68.92	60.49	49.01
40	80.56	79.12	77.75	76.44	75.17	73.96	72.80	71.68	70.60	69.55	68.55	60.06	48.54
45	80.32	78.87	77.48	76.16	74.89	73.67	72.49	71.36	70.27	69.22	68.21	59.67	48.13
50	80.07	78.61	77.21	75.88	74.59	73.36	72.18	71.04	69.94	68.89	67.86	59.28	47.71
55	79.85	78.37	76.96	75.61	74.32	73.08	71.89	70.74	69.64	68.57	67.55	58.92	47.33
60	79.61	78.13	76.70	75.34	74.04	72.79	71.59	70.44	69.32	68.25	67.22	58.55	46.93
65	79.41	77.91	76.48	75.11	73.80	72.54	71.33	70.17	69.05	67.97	66.93	58.23	46.59
70	79.20	77.69	76.24	74.86	73.54	72.28	71.06	69.89	68.77	67.68	66.64	57.90	46.24

**Tabla 12.** Efecto del agua en el reactor sobre el rendimiento de reacción a una proporción molar ácido: alcohol 4:1.

T (°C)	CANTIDAD MOLAR DE AGUA con Relación Molar 4:1 (ácido: alcohol)												
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	2	4
30	90.87	90.06	89.26	88.49	87.73	86.98	86.25	85.53	84.83	84.14	83.46	77.29	67.52
35	90.70	89.87	89.07	88.28	87.51	86.75	86.01	85.28	84.57	83.86	83.18	76.93	67.08
40	90.52	89.69	88.87	88.07	87.28	86.52	85.76	85.02	84.30	83.59	82.89	76.57	66.62
45	90.37	89.52	88.69	87.88	87.08	86.31	85.54	84.79	84.06	83.34	82.63	76.24	66.22
50	90.21	89.35	88.51	87.68	86.88	86.09	85.32	84.56	83.81	83.09	82.37	75.91	65.81
55	90.06	89.19	88.34	87.50	86.69	85.89	85.10	84.34	83.59	82.85	82.13	75.60	65.43
60	89.91	89.02	88.16	87.31	86.49	85.68	84.89	84.11	83.35	82.60	81.87	75.29	65.04
65	89.77	88.88	88.00	87.15	86.31	85.50	84.69	83.91	83.14	82.39	81.65	75.01	64.69
70	89.63	88.73	87.84	86.98	86.13	85.30	84.50	83.70	82.93	82.17	81.42	74.72	64.34

### 6.1.5. Conclusión

Estos resultados serán de utilidad para determinar las mejores condiciones de trabajo en la fase experimental. El análisis termodinámico indica que es favorable la esterificación entre el alcohol isoamílico y el ácido acético, sin embargo, los resultados difieren diametralmente con lo reportado en la literatura, por lo que necesita un profundo análisis al respecto.

Destaca entre los hallazgos encontrados, la relación molar óptima, pues al principio se pensaba solamente en probar las relaciones molares 1:2 1:1 y 2:1 presentados en la literatura revisada, ahora se sabe que a mayor cantidad de ácido, mayor rendimiento de reacción, aunque esto diferirá un tanto cuando se trabaje experimentalmente por la naturaleza del catalizador, se sabe que los organismos viven en un determinado rango de pH y no se puede simplemente agregar grandes cantidades de ácido sin tener repercusiones en el microorganismo.

#### **6.1.6. Perspectivas**

Se necesita analizar teóricamente como podría controlarse la cantidad de los reactivos en la fase gaseosa a partir de su fase líquida, esto a fin de garantizar la proporción molar 2:1 propuesta, además se obtuvo como dato que el agua modifica el rendimiento de la reacción por lo que ésta también tendrá que ser controlada, por medio de su actividad de agua.

**6.2 Anexo 2. Datos termodinámicos de los compuestos involucrados en la síntesis de acetato de isoamilo estimados por *Gent University*.**

**Tabla 13.** Datos termodinámicos de los compuestos involucrados en la síntesis de acetato de isoamilo

	T	H (au)	G (au)	H (kcal mol <sup>-1</sup> )	G= H-TS (kcal mol <sup>-1</sup> )
Water	303.15	-76.38	-76.41	-47931.61	-47945.75
	308.15	-76.38	-76.41	-47931.57	-47945.99
	313.15	-76.38	-76.41	-47931.53	-47946.22
	318.15	-76.38	-76.41	-47931.49	-47946.45
	323.15	-76.38	-76.41	-47931.45	-47946.69
	328.15	-76.38	-76.41	-47931.41	-47946.93
	333.15	-76.38	-76.41	-47931.37	-47947.16
	338.15	-76.38	-76.41	-47931.33	-47947.40
	343.15	-76.38	-76.41	-47931.29	-47947.64
Acetic Acid	303.15	-229.01	-229.05	-143708.42	-143729.41
	308.15	-229.01	-229.05	-143708.34	-143729.76
	313.15	-229.01	-229.05	-143708.25	-143730.11
	318.15	-229.01	-229.05	-143708.17	-143730.45
	323.15	-229.01	-229.05	-143708.08	-143730.81
	328.15	-229.01	-229.05	-143708.00	-143731.16
	333.15	-229.01	-229.05	-143707.91	-143731.51
	338.15	-229.01	-229.05	-143707.82	-143731.87
	343.15	-229.01	-229.05	-143707.73	-143732.22
Isoamyl Alcohol	303.15	-272.80	-272.84	-171182.87	-171209.02
	308.15	-272.80	-272.84	-171182.71	-171209.45
	313.15	-272.80	-272.84	-171182.55	-171209.89
	318.15	-272.80	-272.84	-171182.40	-171210.32
	323.15	-272.80	-272.84	-171182.23	-171210.76
	328.15	-272.80	-272.84	-171182.07	-171211.21
	333.15	-272.80	-272.84	-171181.91	-171211.65

	338.15	-272.80	-272.84	-171181.74	-171212.10
	343.15	-272.80	-272.84	-171181.57	-171212.55
Isoamyl Acetate	303.15	-425.43	-425.48	-266960.54	-266993.32
	308.15	-425.43	-425.48	-266960.33	-266993.87
	313.15	-425.43	-425.48	-266960.12	-266994.41
	318.15	-425.43	-425.48	-266959.90	-266994.96
	323.15	-425.43	-425.48	-266959.68	-266995.51
	328.15	-425.43	-425.49	-266959.46	-266996.07
	333.15	-425.43	-425.49	-266959.24	-266996.63
	338.15	-425.43	-425.49	-266959.01	-266997.19
	343.15	-425.43	-425.49	-266958.78	-266997.76

### 6.3 Anexo 3. Cálculo de la grado de avance de la reacción.

El grado de avance de la reacción expresa cómo evoluciona una reacción química dependiendo de la cantidad de especies químicas que intervienen en una reacción y la termodinámica (Chorkendorff & Niemantsverdriet, 2003).

Dada la reacción:



Con:

$$K_{eq} = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} = \frac{\left[\frac{n_C}{V}\right]^c \cdot \left[\frac{n_D}{V}\right]^d}{\left[\frac{n_A}{V}\right]^a \cdot \left[\frac{n_B}{V}\right]^b}$$

A V constante:

$$K_{eq} = \frac{[n_C] \cdot [n_D]}{[n_A] \cdot [n_B]} \quad (\text{ec 1})$$

Donde los moles del equilibrio, es igual a:

$$n_x = n_x^\circ + v_x \xi \quad (\text{ec 2})$$

Donde:

$n_x$  = moles de x sustancia en el equilibrio

$n_x^\circ$  = moles iniciales de la sustancia x

$v_x$  = coeficiente estequiométrico

$\xi$  = el grado de avance de la reacción

Por convención de signos, los reactantes tendrán número estequiométrico negativo y los productos, positivo.

$$n_C = n_C^\circ + v_C \xi$$

$$n_D = n_D^\circ + v_D \xi$$

$$n_A = n_A^\circ - v_A \xi$$

$$n_B = n_B^\circ - v_B \xi$$

Para los propósitos de este estudio se suponen números estequiométricos igual a uno.

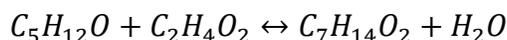
Sustituyendo en ecuación de la constante de equilibrio

$$K_{eq} = \frac{[n_C^\circ + v_C \xi] \cdot [n_D^\circ + v_D \xi]}{[n_A^\circ - v_A \xi] \cdot [n_B^\circ - v_B \xi]}$$

Despejando:

$$\xi^2 \cdot (K_{eq} - 1) - \xi \cdot [K_{eq} \cdot (n_A^\circ + n_B^\circ) + n_C^\circ + n_D^\circ] + K_{eq} \cdot (n_A^\circ \cdot n_B^\circ) - n_C^\circ \cdot n_D^\circ = 0$$

Para el cálculo concreto de



*alcohol isoamílico + ácido acético ↔ acetato isoamilo + agua*

Se supone un número arbitrario de moles iniciales de los reactivos en fase gaseosa.

El número de moles de productos serán cero inicialmente:

$$n_{alcohol}^\circ = 4 \text{ mol} \qquad n_{ácido}^\circ = 3 \text{ mol}$$

$$n_{ester}^\circ = 0 \text{ mol} \qquad n_{agua}^\circ = 0 \text{ mol}$$

Entonces, para cada uno de los compuestos:

$$n_{ester} = n_{ester}^\circ + v_{ester} \xi = 0 \text{ mol} + (1 \text{ mol}) \xi = \xi \qquad \text{(ec 3)}$$

$$n_{agua} = n_{agua}^\circ + v_{agua} \xi = 0 \text{ mol} + (1 \text{ mol}) \xi = \xi \qquad \text{(ec 4)}$$

$$n_{alcohol} = n_{alcohol}^\circ - v_{alcohol} \xi = 4 \text{ mol} - (1 \text{ mol}) \xi = 4 - \xi \qquad \text{(ec 5)}$$

$$n_{ácido} = n_{ácido}^\circ - v_{ácido} \xi = 3 \text{ mol} - (1 \text{ mol}) \xi = 3 - \xi \qquad \text{(ec 6)}$$

A una T= 30°C esta reacción presentará una constante de equilibrio K=2.9236  
(Tabla 2)

Sustituyendo valores en ecuación de la constante de equilibrio en función del extenso:

$$2.9236 = \frac{[\xi] \cdot [\xi]}{[3 - \xi] \cdot [4 - \xi]} = \frac{\xi^2}{\xi^2 - 7\xi + 12}$$

Resolviendo:

$$\xi_1 = 2.14794$$

$$\xi_2 = 8.4917$$

Sustituir en ecuaciones 3-6, solo hay una solución físicamente posible, pues solo hay un equilibrio. Como físicamente es imposible tener valores negativos de moles, la solución correcta es  $\xi_1 = 2.14794$  que resolviendo:

$$n_{alcohol} = 4 \text{ mol} - \xi = 4 \text{ mol} - 2.14794 = 1.852 \text{ mol}$$

$$n_{ácido} = 3 \text{ mol} - \xi = 3 \text{ mol} - 2.14794 = 0.852 \text{ mol}$$

$$n_{ester} = \xi = 2.14794 \text{ mol}$$

$$n_{agua} = \xi = 2.14794 \text{ mol}$$

Una vez con estos valores se puede calcular el porcentaje de reacción:

$$\% \text{ reaccion} = \frac{n_{alcohol}^{\circ} - n_{alcohol}}{n_{alcohol}^{\circ}} \cdot 100 = \frac{4 \text{ mol} - 1.852 \text{ mol}}{4 \text{ mol}} \cdot 100 = 54.45 \%$$

¿Se ve afectado  $\xi$  por los moles iniciales?

Considerar ahora:

$$n_{alcohol}^{\circ} = 2 \text{ mol}$$

$$n_{ácido}^{\circ} = 4 \text{ mol}$$

$$n_{ester}^{\circ} = 0 \text{ mol}$$

$$n_{agua}^{\circ} = 0 \text{ mol}$$

Por lo tanto, repitiendo el cálculo:

$$\xi_1 = 1.62174$$

$$\xi_2 = 7.49741$$

La segunda raíz vuelve a dar valores negativos, por lo que la solución es la primera raíz.

Así:

$$n_{alcohol} = 2 \text{ mol} - \xi = 2 \text{ mol} - 1.62174 = 0.37826 \text{ mol}$$

$$n_{ácido} = 4 \text{ mol} - \xi = 4 \text{ mol} - 1.62174 = 2.37826 \text{ mol}$$

$$n_{ester} = \xi = 1.62174 \text{ mol}$$

$$n_{agua} = \xi = 1.62174 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned} \%reaccion &= \frac{n_{alcohol}^{\circ} - n_{alcohol}}{n_{alcohol}^{\circ}} \cdot 100 = \frac{2 \text{ mol} - 0.37826 \text{ mol}}{2 \text{ mol}} \cdot 100 \\ &= 81.0873 \% \end{aligned}$$

Por lo tanto, los moles iniciales SÍ afectan el grado de reacción, y por lo tanto los moles en el equilibrio, además del % de reacción.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00291

Matrícula: 2192802334

BIOCATÁLISIS SÓLIDO-GAS COMO ALTERNATIVA EN LA SÍNTESIS DE ACETATO DE ISOAMILO

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 3 del mes de septiembre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. LILIA ARELY DE JESUS PRADO BARRAGAN  
DRA. DULCE MARIA PALMERIN CARREÑO  
DR. GERARDO RAFAEL HERNANDEZ CARBAJAL  
DRA. ITZA NALLELY CORDERO SOTO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: URIEL AMAURY RUIZ CASTILLO

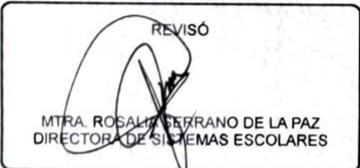
y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

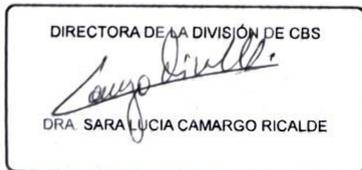
Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



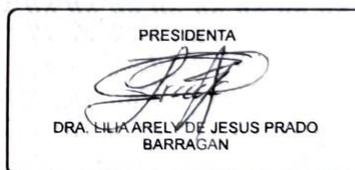
URIEL AMAURY RUIZ CASTILLO  
ALUMNO



REVISÓ  
MTRA. ROSALVA FERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES



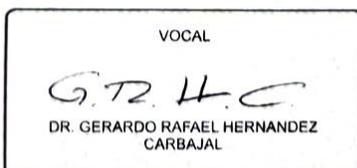
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS  
DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE



PRESIDENTA  
DRA. LILIA ARELY DE JESUS PRADO BARRAGAN



VOCAL  
DRA. DULCE MARIA PALMERIN CARREÑO



VOCAL  
DR. GERARDO RAFAEL HERNANDEZ CARBAJAL



SECRETARIA  
DRA. ITZA NALLELY CORDERO SOTO