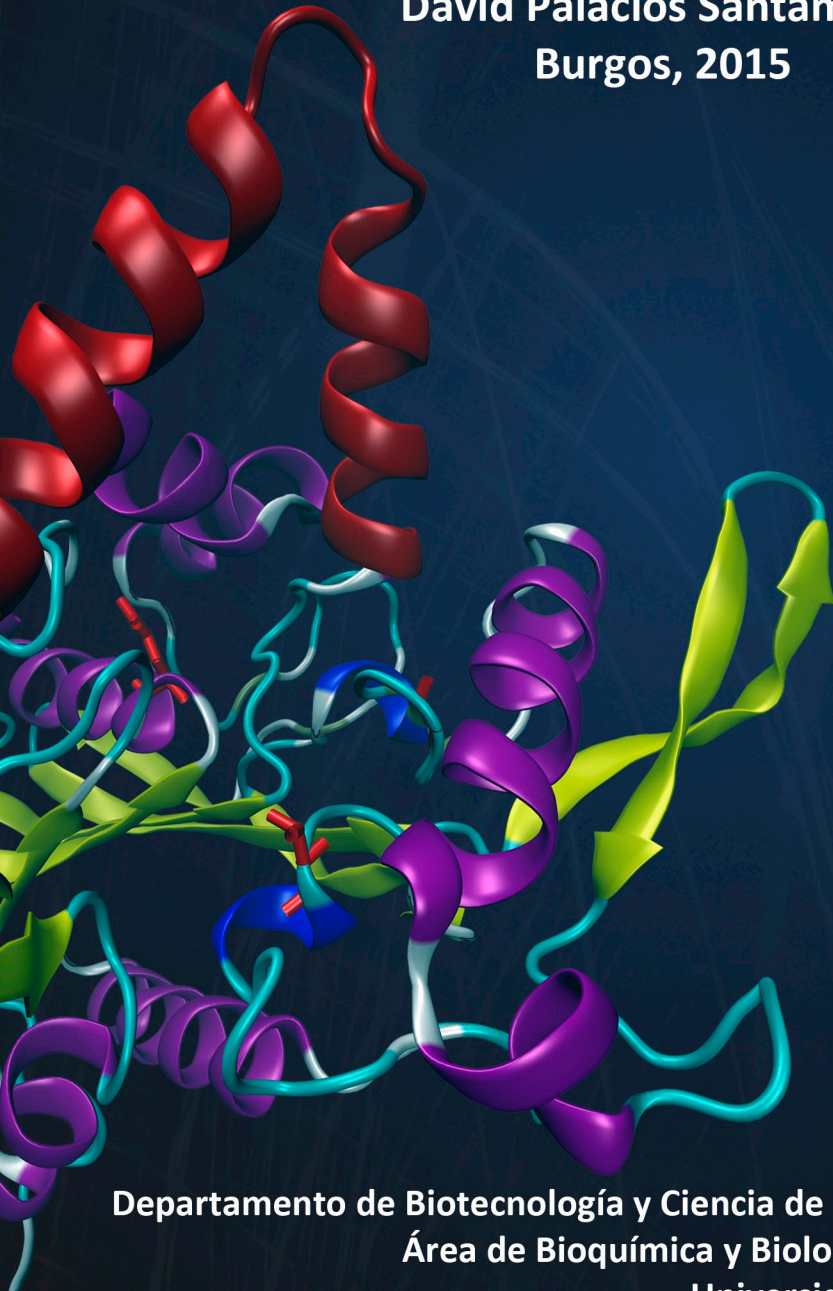


Tesis Doctoral

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LIPASAS
COMERCIALES CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
PARA LA MODIFICACIÓN DE ACEITES**

**David Palacios Santamaría
Burgos, 2015**



**Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Burgos**





Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Estudio y caracterización de lipasas comerciales con potencial biotecnológico para la modificación de aceites

TESIS DOCTORAL

David Palacios Santamaría

Burgos, 2015



Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dña. NATIVIDAD ORTEGA SANTAMARÍA y M^a DOLORES BUSTO
NÚÑEZ PROFESORAS TITULARES DEL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

Informan:

Que D. DAVID PALACIOS SANTAMARÍA ha realizado bajo su dirección,
el trabajo titulado “Estudio y caracterización de lipasas comerciales con
potencial biotecnológico para la modificación de aceites”.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos para ser
presentado como Tesis Doctoral, expresan su conformidad con dicha
presentación.

En Burgos a 14 de Septiembre de 2015

Fdo. Natividad Ortega Santamaría

Fdo. M^a Dolores Busto Núñez



Universidad de Burgos
Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos
Área de Bioquímica y Biología Molecular

Dña. PILAR MÚÑIZ RODRÍGUEZ, DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS
ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Estudio y caracterización de lipasas comerciales con potencial biotecnológico para la modificación de aceites” presentada por D. David Palacios Santamaría para optar al grado de Doctor por la Universidad de Burgos ha sido realizada en el Área de Bioquímica y Biología Molecular de este Departamento bajo la dirección de las doctoras, Natividad Ortega Santamaría y M^a Dolores Busto Núñez.

Y para que conste, firmo el presente certificado,

En Burgos a 14 de Septiembre de 2015

Fdo. Pilar Muñiz Rodríguez

Agradecimientos

Después de tanto tiempo trabajando en este proyecto, que por fin ve la luz, tengo que dar las gracias a muchas personas que me han ayudado y apoyado, sin su ayuda no hubiese sido capaz de superar este reto.

En primer lugar, quiero agradecer de forma especial a mis directoras las Dras. Natividad Ortega y M^a Dolores Busto, por su confianza, consejos y enseñanzas. Gracias por vuestra paciencia ordenando mi caos y por tener siempre un hueco para ayudarme cuando lo he necesitado.

A los miembros del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Burgos por ofrecerme su apoyo, en especial al Dr. Manuel Pérez –Mateos por darme la oportunidad de trabajar en éste área.

Así mismo, me gustaría agradecer a los miembros del área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos, especialmente a las Dras. Sagrario Beltrán y Nuria Rubio por su aportación al capítulo IV de esta Tesis.

También quiero acordarme de mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias (Laura, Beaufray, Marín, Cipri, Ana, Javi, Ana, Dani, Sandra, Mandi, José Carlos, Rober, Alberto, Félix, Gonzalo, Conchi...), así como de la gente del equipo de fútbol sala de la EPS, sin vosotros esto no hubiese sido lo mismo.

Quiero dar las gracias a mi familia y amigos, por soportarme y aguantar mis despistes porque mi cabeza estaba en otro sitio. A mis padres Jesús y Charo, que siempre han confiado en mí, empujándome a seguir estudiando cuando otros me decían que lo dejase. A mi hermana Mónica y a su marido Yonay, por resolverme todas las dudas informáticas y ofrecerme su ayuda en todo momento. También quiero acordarme de mis tíos y primos, en

especial de Mari y Javi, siempre dispuestos a echarnos una mano, así como de la parte salmantina y madrileña de la familia.

Como no, a mi mujer Mamen que ha sufrido muy de cerca esta tesis, aguantado que su marido fuese a todos los sitios con el portátil a cuestas y no tuviese tiempo para poder viajar con ella. Gracias. A mis hijas Leyre y Sandra, capaces de sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles haciendo más llevadero este tramo final.

Por último, quiero dedicar esta tesis a mis abuelos cuyo recuerdo siempre tengo presente.

David

"Las ideas no duran
mucho. Hay que hacer
algo con ellas."

Santiago Ramón y Cajal

Índice general

Introducción

Introducción y objetivos..... 1

Capítulo I

Lipasas y lípidos funcionales7

Capítulo II

Estudio cinético de lipasas comerciales libres e
inmovilizadas. Reacciones de hidrólisis77

Capítulo III

Síntesis enzimática de lípidos estructurados enriquecidos
en ácido α -linolénico..... 141

Capítulo IV

Síntesis enzimática de monoglicéridos mediante
glicerólisis 199

Conclusiones

Conclusiones generales261

Introducción y objetivos

INTRODUCCIÓN

Las lipasas o carboxil éster hidrolasas forman un grupo muy diverso y heterogéneo de enzimas que presentan una gran versatilidad de sustrato y de reacción. Estas enzimas poseen una elevada estabilidad en medios anhidros, como disolventes orgánicos o medios “free solvent”, por lo que pueden aplicarse en la síntesis de compuestos orgánicos con una baja solubilidad en agua, no emplean costosos cofactores y se pueden obtener a partir de una gran variedad de microorganismos que las secretan al medio, facilitando y abaratando su producción. Todo ello conlleva que las lipasas tengan un gran interés y potencial para ser aplicadas en sectores muy diversos.

En la industria alimentaria, una de las principales aplicaciones de las lipasas se centra en la producción de aceites o grasas sintetizadas de forma dirigida (lípidos estructurados), para que la composición y distribución en ácidos grasos se ajuste a unas características nutricionales y/o físico-químicas determinadas. Entre las metodologías más empleadas en la producción enzimática de estos lípidos se encuentran las reacciones de interesterificación, acidólisis, y los procesos en dos pasos, alcoholólisis y esterificación.

Existe una corriente creciente en la sociedad, preocupada por sus hábitos dietéticos, que demanda alimentos de una mejor calidad nutricional y más saludables. Los alimentos funcionales nacen para cubrir esta demanda del mercado de forma que sin sustituir las bases de una dieta sana, se incluyan en la alimentación y corrijan algunos de los desequilibrios derivados del ritmo de vida actual. Esta sensibilización de la población ha influido en distintos ámbitos como es el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de lípidos funcionales. A este respecto, uno de los principales objetivos que se persigue con la reformulación de triglicéridos es la mejora de las características nutricionales de las grasas y aceites incrementando el contenido en

ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con efectos beneficiosos para la salud, como el ácido esencial α -linolénico (ALA).

En este contexto, el **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del potencial biotecnológico de lipasas comerciales (libres e inmovilizadas) para la modificación de aceites, con la finalidad de mejorar sus características nutricionales.

Los **objetivos específicos** desarrollados en esta investigación se resumen en los siguientes capítulos en los que se ha estructurado esta Tesis:

Capítulo I: Lipasas y lípidos funcionales.

En este primer capítulo se incluye una revisión bibliográfica de las principales características estructurales, reacciones catalizadas y principales aplicaciones biotecnológicas de las **lipasas**. También se hace especial hincapié en los beneficios de la ingesta de **ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)** y su utilización para la producción de **lípidos estructurados**. Por último, se incluye una revisión de la síntesis de estos **lípidos funcionales** catalizada por lipasas.

Capítulo II: Estudio cinético de lipasas comerciales libres e inmovilizadas. Reacciones de hidrólisis.

El estudio se centra en la determinación de la capacidad hidrolítica de diez preparados comerciales de lipasas (libres e inmovilizados). En primer lugar, se describe el desarrollo de una **nueva metodología** reproducible, rápida y sencilla para evaluar la actividad hidrolítica de estas enzimas, ensayándose el efecto de distintos emulsionantes. A continuación, los preparados enzimáticos se **caracterizaron** en base a su **especificidad de sustrato** y cinética (determinación de los parámetros K_m y V_{max}). También se determinó la actividad de las lipasas hacia diferentes triglicéridos.

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron seleccionar las enzimas más adecuadas para llevar a cabo la síntesis de lípidos estructurados, enriquecidos en ácidos α -linolénico (Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM), y de monoglicéridos (Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM), que se describe en los Capítulos III y IV, respectivamente.

Capítulo III: Síntesis enzimática de lípidos estructurados enriquecidos en ácido α -linolénico.

La producción de lípidos estructurados **enriquecidos** en ácido **α -linolénico (ALA)**, mediante **acidólisis** enzimática de gliceriltriocanoato (TO) en medio orgánico, se desarrolla en este tercer Capítulo. En este estudio se evaluó el efecto de la **relación molar de sustratos**, **temperatura** y **tiempo de reacción** sobre la reacción de esterificación catalizada por Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM utilizando la metodología de superficie de respuesta. A partir de este diseño de experimentos se obtuvieron las condiciones óptimas para la incorporación de ALA en el triglicérido.

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar la lipasa y las condiciones de reacción más adecuadas para el enriquecimiento en ALA de **aceite de palma** comercial. Adicionalmente, se evaluó la **estabilidad oxidativa** de los productos de reacción.

Capítulo IV: Síntesis enzimática de monoglicéridos mediante glicerólisis.

En el capítulo IV se aborda la síntesis enzimática de **monoglicéridos** ricos en ácidos grasos poliinsaturados mediante **glicerólisis** enzimática (con Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM) de aceite de anchoa en un medio **“free-solvent”**. Para ello, se llevó a cabo el estudio del comportamiento bioquímico de las lipasas en la producción de monoglicéridos y determinación de las condiciones óptimas de reacción. En este capítulo se incluye también un análisis del efecto de la **temperatura**, la **relación**

glicerol/triglicérido y la **concentración** de enzima sobre el **progreso de la reacción** (producción de mono, di y triglicéridos) y sobre la **estabilidad oxidativa** de los productos finales. Mediante la metodología de superficie de respuesta se determinaron las condiciones óptimas de producción de monoglicéridos con una mejor estabilidad oxidativa.

Lipasas y lípidos funcionales

CAPÍTULO I

Capítulo I Lipasas y lípidos funcionales

Resumen	11
1. Lipasas	12
1.1. Estructura y mecanismo catalítico	12
1.2. Versatilidad y especificidad de las lipasas.....	19
1.3. Reacciones catalizadas por lipasas. Medios de reacción.....	25
1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas.....	28
1.4.1. Interés en la inmovilización de lipasas	32
2. Lípidos funcionales.....	36
2.1. Destino metabólico de los lípidos. Beneficios sobre la salud humana	36
2.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs	42
2.1.2. Estabilidad oxidativa	45
2.2. Lípidos estructurados	48
2.2.1. Reformulación de triglicéridos para la mejora de sus características nutricionales.....	48
2.2.2. Reformulación de triglicéridos para la mejora de sus características físico-químicas.....	51
2.3. Síntesis enzimática de lípidos estructurados.....	52
3. Referencias	57
Abreviaturas	71
Listado de figuras	73
Listado de tablas	75

Capítulo I

Lipasas y lípidos funcionales

Resumen

Las lipasas o carboxil éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.X) forman un grupo muy diverso y heterogéneo de enzimas cuya función biológica se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo lipídico. En el centro activo de las lipasas existen distintas regiones cuya geometría y propiedades físico-químicas determinan algunas de sus características específicas y diferenciales. Presentan la particularidad de ejercer su actividad en la interfase lípido-agua, en este ambiente se producen cambios conformacionales de la estructura denominada “lid” que dan lugar a las formas abierta (catalíticamente activa) y cerrada (inactiva). Este grupo de enzimas posee una gran versatilidad, siendo capaces de actuar sobre un gran número de sustratos y catalizar diferentes reacciones (hidrólisis, esterificaciones y transesterificaciones) dependiendo del medio en el que se encuentren. Por otro lado, junto a esta flexibilidad catalítica, las lipasas presentan preferencias en los triglicéridos por el tipo y posición de los ácidos grasos sobre los que actúan. Esto hace que las lipasas sean un grupo de enzimas con un enorme potencial biotecnológico y de aplicación en sectores industriales muy diversos. En la industria alimentaria, una de las principales aplicaciones de las lipasas se centra en la producción de lípidos estructurados (SL), aceites o grasas sintetizadas de forma dirigida para que la composición y distribución en ácidos grasos se ajuste a unas características nutricionales y/o físico-químicas determinadas. De esta manera, el enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) con efectos beneficiosos para la salud (cardioprotector, antiinflamatorio, normalización del perfil lipídico), como el ácido esencial α -linolénico (ALA), permite obtener lípidos funcionales. Entre las metodologías más empleadas en la producción enzimática de SL se encuentran las reacciones de interesterificación, acidólisis, y los procesos en dos pasos (alcohólisis y esterificación) catalizadas por lipasas.

1. Lipasas

1.1. Estructura y mecanismo catalítico

Las lipasas o carboxil éster hidrolasas (E.C. 3.1.1.X) forman un grupo muy diverso y heterogéneo de enzimas que catalizan la ruptura de enlaces éster. Tienen una amplia distribución en la naturaleza y pueden encontrarse en todo tipo de organismos desde animales, plantas y hongos, así como en procariotas. A pesar de que estas serían hidrolasas han sido extensamente estudiadas todavía existen numerosos aspectos sobre su función fisiológica que se desconocen. Se ha observado su implicación en procesos muy diversos dependiendo del organismo y del tejido de estudio, pero en todos los casos la función más extendida se encuentra estrechamente relacionada con el metabolismo lipídico, tanto en la digestión y absorción de grasas como en su almacenamiento como reserva energética.

Las lipasas poseen una serie de propiedades que las hacen especialmente interesantes para su aplicación industrial por lo que resulta de gran importancia profundizar en el estudio de sus características funcionales. La resolución de un gran número de estructuras tridimensionales ha hecho posible explicar algunas de estas características como es su activación en presencia de interfases. A pesar de la gran diversidad de organismos en los que se pueden encontrar lipasas y la heterogeneidad de los procesos en los que participan, todas ellas poseen una serie de rasgos estructurales comunes que las definen. La estructura central de las lipasas conocida como **plegamiento α/β hidrolasa**, es compartida por varios grupos de enzimas como tioesterasas, dienolactona hidrolasas, dehalogenasas y carboxipeptidasas que también catalizan reacciones de hidrólisis. Este plegamiento α/β hidrolasa (Figura 1) se encuentra formado por una estructura básica que frecuentemente consta de 8 láminas β interconectadas mediante

hélices α dando lugar a un dominio en el que se encuentra el centro activo con los tres aminoácidos implicados directamente en la catálisis o **triada catalítica** (Brady *et al.*, 1990; Ollis *et al.*, 1992).

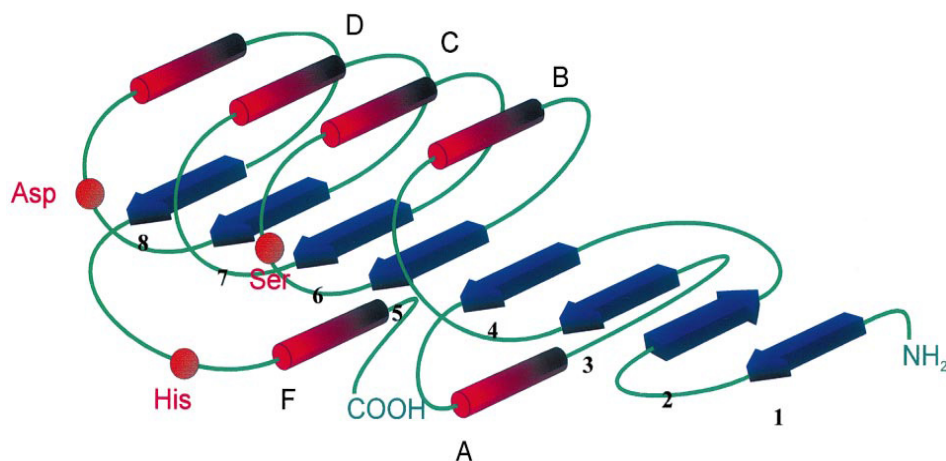


Figura 1. Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa en lipasas. Las flechas de color azul (1-8) representan estructuras secundarias en lámina β , y los cilindros de color rojo (A-F) las hélices α de la estructura. Los círculos de color rojo indican la disposición relativa de los aminoácidos de la triada catalítica (Bornscheuer, 2002).

Al estudiar la secuencia de aminoácidos de la triada catalítica se puede observar que existe una cierta variación en la identidad de los mismos pero que en todos los casos está formada por un residuo nucleófilo (generalmente una serina), otro ácido y una histidina. A pesar de esta variación, los residuos siempre aparecen en este orden en la secuencia primaria de la proteína y se mantiene una topología similar en todos los miembros del grupo. Esta similitud en la disposición tridimensional, a pesar de la pobre homología en la secuencia, no se observa en otras enzimas con triada catalítica por lo que es considerado como otro rasgo característico de las lipasas. Algunos autores indican que el plegamiento α/β y la disposición de los aminoácidos de la triada catalítica son los únicos rasgos estructurales comunes que se encuentran en todas las lipasas pertenecientes a las diferentes superfamilias (Miled *et al.*, 2000).

Estudios realizados mediante cristalografía de rayos-X han revelado que el centro activo en las lipasas es más que una simple cavidad que alberga la triada catalítica, sino que es una estructura tridimensional que a su vez contiene otras regiones que facilitan el proceso catalítico. Una de estas “subregiones” del centro activo denominada **hueco oxianiónico** ayuda en la estabilización de los intermediarios de reacción al formarse puentes de hidrógeno con los grupos amino del esqueleto de dos de los residuos de esta estructura (Pleiss *et al.*, 1998). Se pueden encontrar tres tipos de huecos oxianiónicos diferentes denominados como GX, GGGX y γ dependiendo de los aminoácidos que los forman. Otra región que aparece en el centro activo conocida como “**scissile fatty acid binding site**” es una hendidura que participa en la unión de los restos acilo que van a ser cortados de un enlace éster (Jaeger *et al.*, 1999). La superficie de esta cavidad se encuentra principalmente formada por aminoácidos hidrofóbicos que interactúan con los sustratos lipídicos. Estudios con distintos mutantes muestran que existen dos zonas diferenciadas, una para la unión del resto acilo y otra para el alcohol, que tienen una gran importancia en la especificidad de sustrato que presentan estas enzimas. Mientras que la región a la que se une el alcohol es similar en todas las lipasas estudiadas hasta el momento, el lugar de unión para la fracción ácida del éster varía de forma considerable y aporta las bases moleculares para explicar la diferente acomodación de los sustratos y, por tanto, su preferencia por los mismos (Cygler *et al.*, 1994) (Figura 2).

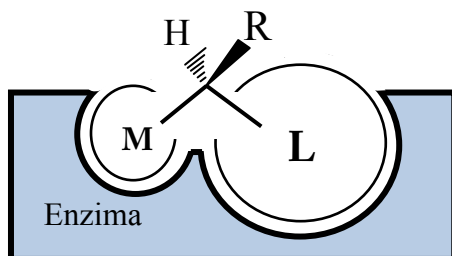


Figura 2. Esquema de la estructura del estereocentro de las lipasas a partir de la correlación entre enantioselectividad y de los sustituyentes de tamaño medio (M) y de gran tamaño (L) Regla de Kazlauskas. (Adaptación de Kazlauskas *et al.*, 1991).

A partir de los resultados de la enantioselectividad de más de 130 ésteres de distintos tamaños de sustituyentes, Kazlauskas *et al.* (1991) formularon una regla empírica que permite predecir la velocidad de reacción de alcoholes primarios y secundarios basándose en la estructura del estereocentro de las lipasas.

En la mayor parte de las lipasas estudiadas aparece adicionalmente una estructura móvil denominada “**lid**” o “**flap**” que regula el acceso del sustrato al centro activo. Este dominio anfipático de pequeño tamaño consiste en una o dos hélices α que se unen al resto de la proteína mediante segmentos flexibles que cambian de orientación por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como el triptófano 89 en *Thermomyces lanuginosus* (Holmquist *et al.*, 1993; Holmquist *et al.*, 1994; Fojan *et al.*, 2000). Estos cambios conformacionales, que permiten o impiden el acceso de los sustratos al centro activo, dan lugar a dos formas que coexisten en equilibrio denominadas como **abierta** y **cerrada** (Figura 3) (Brzozowski *et al.*, 2000).

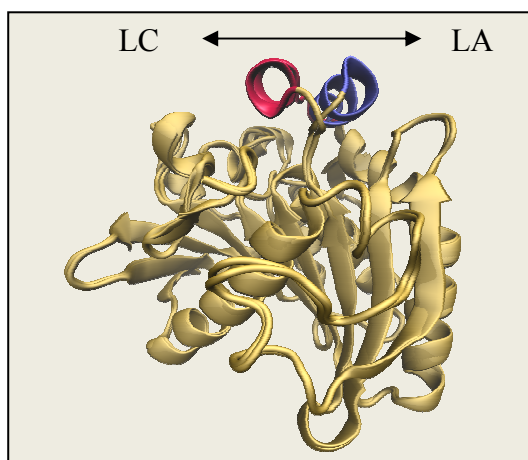


Figura 3. Equilibrio de desplazamiento del “lid” entre las conformaciones cerrada (LC rojo) y abierta (LA azul) para la lipasa de *T. lanuginosus* (códigos PDB: 1DT3 y 1EIN).

La presencia de estas regiones móviles son la base estructural que permite explicar un fenómeno característico de las lipasas denominado **activación interfacial** en el que la enzima experimenta una hiperactivación en presencia de interfases (Sarda

y Desnuelle, 1958; Verger, 1997). Los cambios conformacionales del “lid” pueden afectar no solamente a la exposición del centro activo, sino que también puede verse modificada la disposición de sus aminoácidos. En las lipasas el hueco oxianiónico puede encontrarse preformado en la conformación cerrada o por el contrario adquirir su disposición definitiva tras la modificación geométrica producida durante el desplazamiento del “lid”.

Una característica de las lipasas reside en que han evolucionado adaptándose a la particularidad de actuar en la **interfase lípido-agua** que forman sus sustratos naturales insolubles de forma que cuando estos aparecen en forma de agregados moleculares las lipasas se adsorben a las interfases formadas. En este microambiente, con unas condiciones físico-químicas tan complejas, tienen lugar cambios conformacionales en los que el “lid” cambia de orientación desbloqueando el centro activo quedando así accesible a los sustratos en la conformación abierta. Estos cambios se ven reflejados en un brusco incremento en la actividad debido al desplazamiento del equilibrio de la forma cerrada-inactiva a la abierta-activa. El proceso necesario para que los sustratos entren en el centro activo puede resumirse en un mecanismo general de tres pasos secuenciales (Figura 4): (1) adsorción de la lipasa a la interfase, (2) interacción entre el sustrato y la enzima induce su conformación activa y, por último, (3) el sustrato entra en contacto con el centro activo (Holmquist *et al.*, 1994).

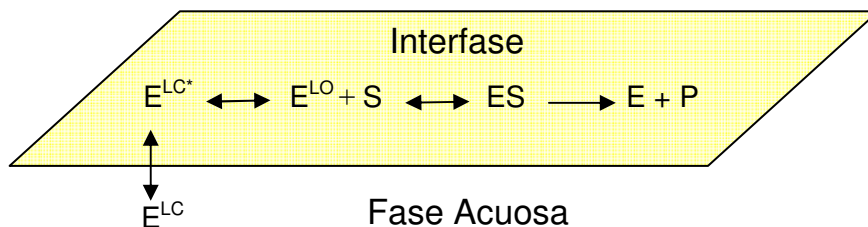


Figura 4. Modelo de actuación de las lipasas sobre sustratos agregados. E^{LC} : Enzima conformación cerrada; E^{LC*} : Enzima conformación cerrada adsorbida; E^{LO} : Enzima conformación abierta; S: Sustrato; ES: Complejo enzima-sustrato; P: Producto.

Una vez que el sustrato accede al centro activo, las lipasas catalizan la ruptura del enlace éster por una reacción de hidrólisis cuyo mecanismo catalítico es común a todas ellas (Figura 5). El proceso comienza con la desprotonación de la serina por los residuos aspártico e histidina de la triada catalítica. El carbonilo del enlace éster es atacado por la serina activada formándose un intermediario tetraédrico que queda estabilizado en el hueco oxianiónico por la formación de dos o tres puentes de hidrógeno. Tras la ruptura del enlace éster, el alcohol es liberado quedando el resto acilo unido a la enzima. Este nuevo intermediario vuelve a sufrir otro ataque donde una molécula de agua actúa como nucleófilo desprendiéndose así el producto de la reacción, de forma que la enzima puede comenzar el proceso de nuevo (Bornscheuer y Kazlauskas, 2006; Reis *et al.*, 2009).

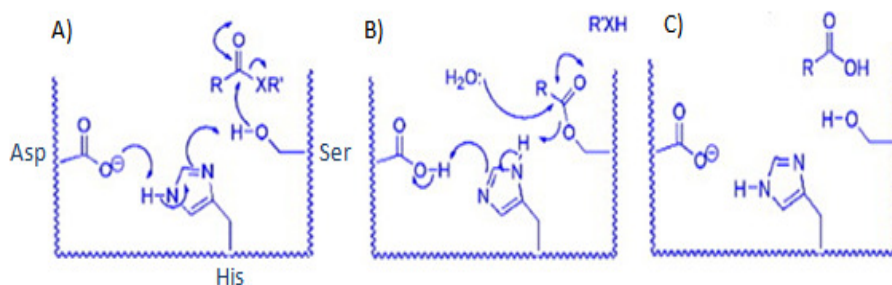


Figura 5. Mecanismo catalítico de las lipasas. A) Activación de la serina y ataque nucleofílico. B) Formación del acil intermediario y ataque del agua. C) Liberación del resto acilo. (Adaptación de Reis *et al.*, 2009).

Debido a que las lipasas han despertado un gran interés entre los investigadores y el número de enzimas descubiertas ha crecido a gran velocidad, se ha hecho necesaria una reestructuración y actualización de su clasificación. Tradicionalmente uno de los criterios de clasificación más empleados ha sido la especificidad por sus sustratos, aunque se ha comprobado que puede resultar poco práctico dado el amplio rango de moléculas sobre las que pueden actuar (Kapoor y Gupta, 2012). En la actualidad, el nivel de homología en la secuencia primaria y los criterios estructurales son dos de los criterios más empleados. El gran desarrollo de bases de datos con información sobre la secuencia de aminoácidos

permite su comparación y de esta forma establecer sus relaciones evolutivas. Estas comparaciones han permitido observar que las lipasas son un grupo de enzimas que poseen unos bajos niveles de homología en su secuencia primaria. A pesar de esta dificultad, los estudios realizados en lipasas bacterianas establecen que estas pueden ser clasificadas en 6 grandes familias en función de su grado de homología (Arpigny y Jaeger, 1999; Jaeger *et al.*, 1999). Otro criterio de clasificación se centra en que a pesar de esta baja similaridad en la secuencia, las lipasas muestran una alta similaridad estructural. Al comparar la geometría y las propiedades físico-químicas del sitio de unión de los ácidos grasos las lipasas pueden ser clasificadas en tres grupos en función de la forma, tamaño y profundidad del centro activo (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las lipasas en función de las características del centro activo y del “lid” (Pleiss *et al.*, 1998).

	Centro activo	Presencia de “lid”
Familia <i>Rhizomucor</i> (RML), <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Thermomyces</i>	Hendidura hidrofóbica cerca de la superficie	En la superficie cubriendo el centro activo
<i>Candida rugosa</i> (CRL)	Centro activo en la parte más interna de una estructura en forma de túnel	De gran tamaño y complejo consistente en hélices α cortas y largas
<i>Candida antarctica</i> -B (CALB), <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas</i>	Forma de embudo elíptico cercano a la superficie	“Lid” de pequeño tamaño y elíptico (CALB) o de gran tamaño con una estructura hélice-giro-hélice (<i>Burkholderia</i>)

La disposición y forma de los distintos tipos de centros activos y “lids” detallados en la Tabla 1 aparecen representados en la Figura 6 (Gutiérrez-Ayesta *et al.*, 2007). Estas características junto a la presencia de “lid” determinan en gran medida la preferencia por los sustratos de los distintos grupos de lipasas.

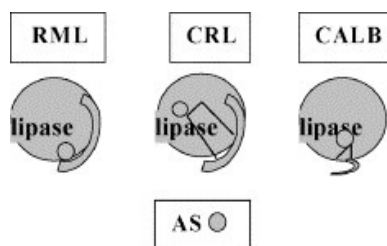


Figura 6. Esquema de la forma y localización de los distintos centros activos y “lid” de las lipasas. RML: Lipasa de *Rhizomucor miehei*; CRL: Lipasa de *C. rugosa*; CALB: Lipasa B de *C. antarctica*; AS: Active site. (Gutiérrez-Ayesta *et al.*, 2007).

1.2. Versatilidad y especificidad de las lipasas

De forma generalizada se suele emplear el término **versatilidad catalítica** para englobar la flexibilidad en cuanto a los sustratos, reacciones y medios en los que puede actuar una enzima (Hult y Berglund, 2007). En lipasas es posible encontrar una moderada especificidad junto con una elevada versatilidad coexistiendo en un mismo centro activo, reflejo de su origen evolutivo a partir de una forma multifuncional que hace que una misma enzima pueda catalizar diferentes reacciones y que acepte distintos sustratos dependiendo del entorno (Jensen, 1976; Khersonsky *et al.*, 2006). Las distintas formas de versatilidad catalítica se encuentran frecuentemente combinadas y ligadas entre sí de forma que la habilidad para catalizar distintas reacciones está estrechamente relacionada con la capacidad para admitir sustratos con grupos funcionales alternativos así como con el medio de reacción en el que se encuentra dicha enzima.

Las lipasas, como ya se ha comentado en los apartados precedentes, son un conjunto de enzimas heterogéneo que se pueden englobar en dos grandes subgrupos: lipasas o “**true lipases**” (E.C. 3.1.1.1) y **esterasas** o carboxil esterazas (E.C. 3.1.1.3). Tradicionalmente la distinción entre lipasas y esterazas se ha basado en la solubilidad de los sustratos sobre los que actúan. En la naturaleza las “true lipases” preferentemente emplean como sustrato triglicéridos formados por ácidos grasos de

cadena larga, mientras que las carboxil esterases actúan sobre sustratos solubles en agua formados por ácidos grasos de cadena corta (Tabla 2). No obstante, en muchos casos no existe una línea clara que delimite la pertenencia a uno u otro grupo. Muchas de las enzimas descritas como lipasas pueden actuar sobre sustratos propios de esterases, por lo que una misma especie enzimática puede tener las dos actividades lipasa y esterasa (Gilbert *et al.*, 1991).

Tabla 2. Principales características de lipasas y esterases. (Adaptación de Bornscheuer, 2002).

Características	“True lipases”	Esterasas	
Preferencia sustratos naturales	Triglicéridos de cadena media y larga	Triglicéridos de cadena corta	
Hidrofobicidad del sustrato	Alta. Agregados insolubles en agua	De alta a baja. Solubles en agua	
Presencia de “lid”/activación interfacial	Presente en la mayor parte de los casos	No	
Estabilidad solventes	Generalmente alta	De alta a baja	
Características del centro activo	“Scissile fatty binding site”	Amplio y de mayor tamaño que en esterases	De pequeño tamaño y estrecho
	pH óptimo	8	6
	Hueco oxianiónico	Principalmente tipo GX	Principalmente tipo GGGX

Aunque de forma general tanto las lipasas como las esterases son catalíticamente activas frente a un gran número de sustratos diferentes, estas enzimas presentan preferencias en su utilización. Las lipasas y esterases con acilselectividad hidrolizan de forma preferente aquellos ésteres que en su composición portan ácidos grasos con unas determinadas características de longitud y número de insaturaciones. En general las lipasas no presentan una buena discriminación entre ácidos grasos saturados/insaturados o cadena larga/media (Gaskin *et al.*, 2001). Hasta el momento no se han encontrado lipasas tan estrictas que solo admitan un grupo

concreto de ácidos grasos, y aunque existen preferencias en sustratos utilizan, las moléculas que cumplen ciertos requerimientos pueden reaccionar con la enzima.

Además, lipasas y esterases comparten una estructura muy similar que hace que resulte complicado realizar una clasificación únicamente en función de sus características estructurales. Todas las lipasas y esterases tienen en común que su estructura básica está formada por el plegamiento α/β hidrolasa en el que la geometría catalítica se encuentra muy conservada evolutivamente. A pesar de esto, se han observado diferencias en la profundidad, forma y propiedades físico-químicas del lugar de unión al sustrato (Pleiss *et al.*, 1998) (Tabla 2). Son estas divergencias las que dan lugar a las distintas preferencias por los sustratos.

Diversos estudios muestran que algunas características estructurales como el tamaño y la geometría del hueco oxianiónico o la presencia de “lid” tienen un rol activo en la selectividad (Secundo *et al.*, 2006). En función de la secuencia de aminoácidos que forman el hueco oxianiónico, se han identificado dos grupos principales denominados como GX y GGGX (Pleiss *et al.*, 2000). En las lipasas donde el hueco oxianiónico tiene una estructura tipo GX aparece una mayor predilección por sustratos de cadena media y larga, mientras que las esterases en las que el hueco es del tipo GGGX catalizan preferentemente sustratos de cadena corta. Esta preferencia de las esterases por los sustratos de cadena corta es el reflejo de su estructura donde la forma, el pequeño tamaño del lugar de unión de los restos acilo y la naturaleza de los aminoácidos que los forman favorece un ajuste óptimo de la fracción ácida de los ésteres de cadena corta (Tabla 2). El mayor tamaño del lugar de unión encontrado en las lipasas permite la entrada de sustratos con una cadena carbonada de mayor longitud (Pleiss *et al.*, 1998). También, a pesar de poseer un punto isoeléctrico (pI) similar, algunos estudios indican que lipasas y esterases pueden presentar diferencias por la carga electrostática del centro activo. En las lipasas su máxima actividad se encuentra

asociada a pHs alcalinos entorno a 8 mientras que en esterasas el pH óptimo se encuentra alrededor de 6 (Neves Petersen *et al.*, 2001) (Tabla 2).

En la caracterización enzimática para la hidrólisis de ésteres solubles en agua, se encuentra también un comportamiento cinético diferenciado entre lipasas y esterasas. Las esterasas despliegan su máxima capacidad hidrolítica cuando actúan sobre sustratos solubles en agua a concentraciones por debajo del límite de solubilidad, sin que se observen efectos significativos al exceder este límite. En las “true lipases” una vez superado este punto de transición entre emulsiones y soluciones, se produce un drástico incremento de la actividad o **activación interfacial** (Sarda y Desnuelle, 1958). En consecuencia, las lipasas exhiben una cinética tipo sigmoide mientras que en esterasas el comportamiento es hiperbólico, típico de una cinética de Michaelis-Menten (Figura 7).

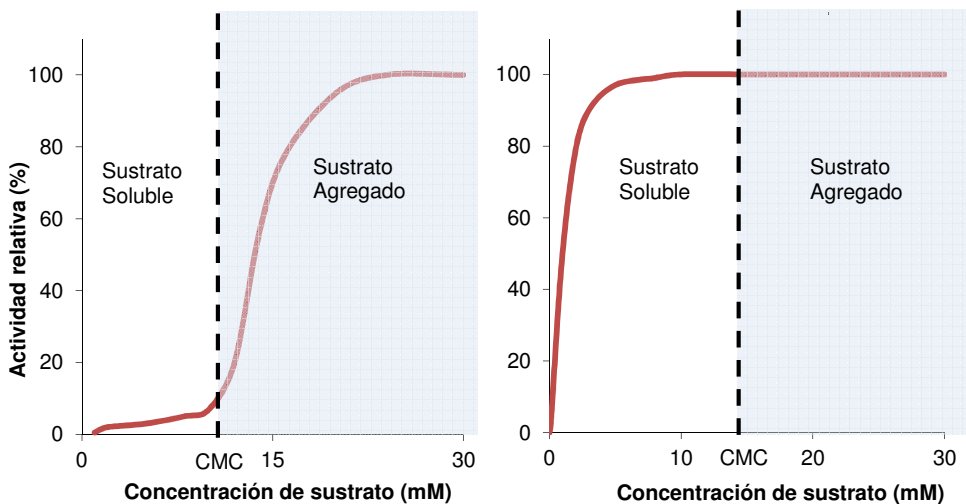


Figura 7. Comportamiento cinético en función de la concentración de sustrato de lipasas (izquierda) y esterasas (derecha). CMC: Concentración micelar crítica; Limite de solubilidad (- - -).

Este comportamiento cinético es utilizado como criterio a seguir a la hora de diferenciar entre “true lipases” y esterasas (Winkler *et al.*, 1990). La presencia del “lid” es un rasgo

estructural estrechamente asociado al fenómeno de activación interfacial y característico de las “true lipases”, sin embargo, en esterasas no se encuentran este tipo de estructuras ni exhiben activación interfacial. No obstante, las lipasas de algunos organismos escapan a este criterio de clasificación dado que o no presentan “lid” o es de un tamaño muy reducido o incluso encontrando esta estructura no exhiben una clara activación interfacial (Chahinian *et al.*, 2002). A pesar de esto, estas enzimas son catalogadas como lipasas por actuar sobre sustratos insolubles.

En las reacciones de hidrólisis de triglicéridos las lipasas también presentan determinadas preferencias por la posición de los ácidos grasos lo que se denomina **regioselectividad**. En función de la regioselectividad las lipasas pueden dividirse en dos grandes grupos: i) lipasas 1,3 específicas y ii) lipasas no específicas. Las lipasas llamadas 1,3 específicas hidrolizan el enlace éster cuando se encuentra en las posiciones primarias del glicerol (Figura 8). Esta selectividad por las posiciones 1,3 no es absoluta en todos los casos y, aunque presente una preferencia por las posiciones indicadas, también se producen rupturas del éster en posición Sn-2. Hasta el momento no se han encontrado enzimas que corten únicamente en posición 2, y la aparición de los 1,3-diglicéridos parece ser debida a procesos de acil migración desde la posición central al extremo hidroxilo libre a partir de 1,2-diglicéridos.

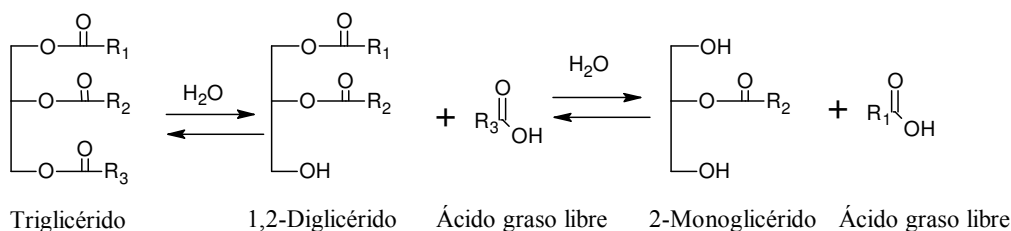


Figura 8. Hidrólisis de triglicéridos por lipasas 1,3 específicas.

Las lipasas no específicas son aquellas que catalizan la ruptura total del triglicérido actuando en todos los grupos hidroxilo hasta obtener glicerol y ácidos grasos libres como producto final. En

este tipo de lipasas tanto los diglicéridos como los monoglicéridos son solamente intermediarios de la reacción que se hidrolizan rápidamente, y no se acumulan en grandes cantidades (Figura 9).

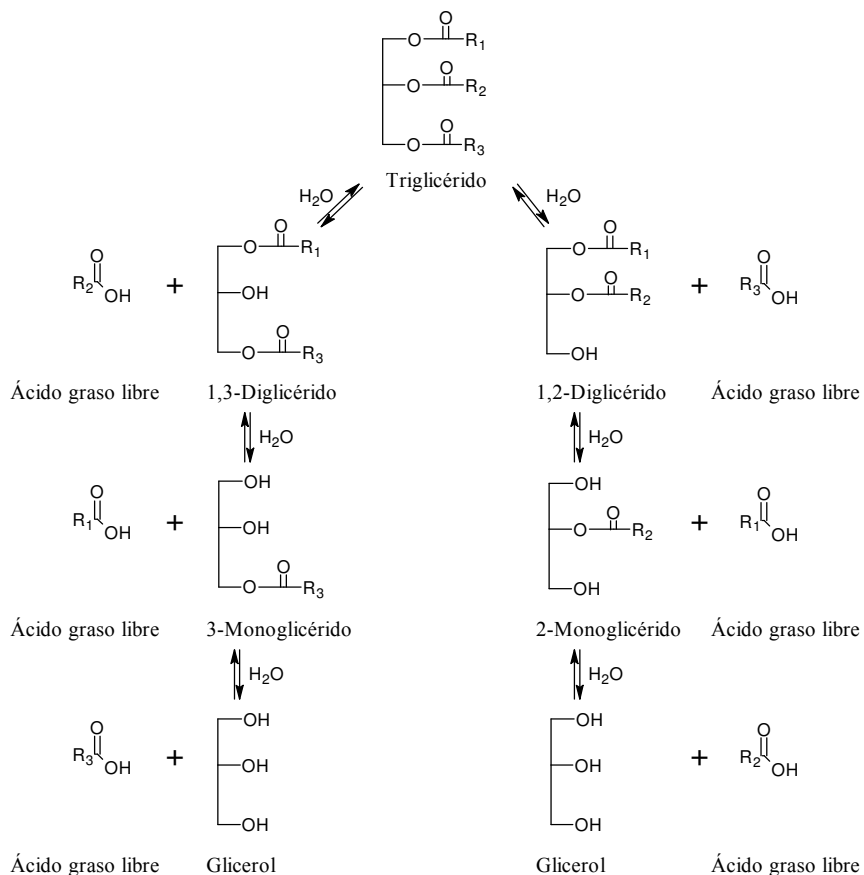


Figura 9. Hidrólisis de triglicéridos por lipasas no específicas.

Por último indicar que, algunas lipasas presentan la capacidad de discriminar entre los distintos isómeros de una mezcla racémica (formas enantioméricas R y S). Esta estereoselectividad de algunas lipasas resulta de gran interés en las industrias química y farmacéutica (Blaser *et al.*, 2013).

1.3. Reacciones catalizadas por lipasas. Medios de reacción

La actividad característica de las lipasas es la hidrólisis de triglicéridos aunque también son capaces de hidrolizar los enlaces éster presentes en otras moléculas como fosfolípidos, acilglicósidos o incluso sustratos artificiales como *p*-nitrofenil esteres de ácidos grasos (Bornscheuer y Kazlauskas, 2006). En todos los casos el mecanismo hidrolítico es común a todas las lipasas, donde el agua es un sustrato de la reacción que actúa como nucleófilo rompiendo el enlace éster, aunque la naturaleza de las moléculas sobre las que actúa sea diferente.

Además de las reacciones de hidrólisis de grasas, las lipasas pueden catalizar esterificaciones y transesterificaciones (Tabla 3). El mecanismo catalítico general en esterificación es similar al que tiene lugar en las reacciones de hidrólisis. Se mantiene la formación de intermediarios tetraédricos donde el agua es sustituida como agente nucleófilo por otras moléculas como pueden ser los alcoholes. Dependiendo de los sustratos, las reacciones de transesterificación se pueden clasificar a su vez en reacciones de alcoholólisis, acidólisis, interesterificación y aminólisis (Tabla 3).

En la alcoholólisis un éster reacciona con un alcohol dando como resultado la liberación del resto alcohólico que antes formaba parte del éster. En la interesterificación de las grasas dos triglicéridos intercambian sus restos acilo dando lugar a nuevos triglicéridos en los que se ha variado su composición en ácidos grasos. Se denominan reacciones de acidólisis a aquellas en las que el enlace éster es atacado por un ácido graso libre (AGL) liberándose la fracción ácida del éster. Por último, en las reacciones de aminólisis la ruptura del enlace éster tiene lugar por el ataque nucleofílico de una amina formándose una amida (Tabla 3).

Tabla 3. Reacciones generales catalizadas por las lipasas.

1. Hidrólisis $R_1COOR_2 + H_2O \longrightarrow R_1COOH + R_2OH$
2. Esterificación: $R_1COOH + R_2OH \longrightarrow R_1COOR_2 + H_2O$
3. Transesterificación:
a. Alcohólisis: $R_1COOR_2 + R_3OH \longrightarrow R_1COOR_3 + R_2OH$
b. Acidólisis: $R_1COOR_2 + R_3COOH \longrightarrow R_3COOR_2 + R_1COOH$
c. Interesterificación: $R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \longrightarrow R_1COOR_4 + R_3COOR_2$
d. Aminólisis: $R_1COOR_2 + R_3NH_2 \longrightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$

Las lipasas también pueden llevar a cabo reacciones de síntesis en otros medios no convencionales como pueden ser los medios “free-solvent”, los fluidos supercríticos y los líquidos iónicos. El tipo de reacción preferente catalizada por las lipasas viene determinada en gran medida por el medio de reacción y mientras que en ambientes acuosos predominan los procesos de hidrólisis, en ambientes con baja actividad de agua predominan las reacciones inversas de esterificación o transesterificación (Kapoor y Gupta, 2012).

Existen varias razones por las que llevar a cabo reacciones enzimáticas en medios orgánicos representa una ventaja. Una de las principales es que, en muchos casos, el sustrato posee una escasa solubilidad en agua lo que dificulta o imposibilita su conversión en el producto de interés. Muchos compuestos orgánicos son altamente hidrofóbicos y no se disuelven en agua por lo que las reacciones tienen lugar en sistemas bifásicos. En estas situaciones los solventes apolares resultan más apropiados dado que proveen a la enzima de un mejor microambiente en el que actuar.

El medio de reacción además de afectar a los sustratos, altera algunas de las propiedades de las lipasas como puede ser su conformación, termoestabilidad o su especificidad. Las interacciones entre el solvente orgánico y la enzima afectan a su integridad estructural sin que esto signifique necesariamente un desplegamiento de la proteína y, por tanto, la pérdida de la actividad. Diversos estudios indican que en los medios anhidros no se produce una gran distorsión en la estructura nativa de la proteína y que los centros activos tampoco sufren cambios drásticos aunque si tienen lugar cambios en la posición de las cadenas laterales de algunos aminoácidos que lo forman (Halling *et al.*, 1990; Burke *et al.*, 1993). Aunque la estructura proteica permanezca intacta en su conjunto, los medios orgánicos provocan cambios conformacionales que favorecen el reemplazamiento del agua por otro nucleófilo como puede ser un alcohol o una amina de forma que se catalizan preferentemente reacciones de síntesis frente a las de hidrólisis. Por otro lado, las nuevas fuerzas generadas dan lugar a conformaciones más restringidas que limitan la movilidad proteica lo que puede en algunos casos acarrear una pérdida en la capacidad catalítica. La mayor rigidez conformacional explica la restricción en la especificidad de los sustratos que la proteína enzimática puede aceptar respecto a los medios acuosos, dado que una menor movilidad implica una menor capacidad de acomodar distintos sustratos (Broos *et al.*, 1995). Esta misma rigidez puede ser la responsable del efecto positivo de los solventes orgánicos sobre la estabilidad térmica, protegiendo la estructura de cambios que supongan la pérdida de la actividad.

No obstante, aunque se hable de los disolventes orgánicos como medios anhidros, existe una cierta cantidad de agua presente que se distribuye por todo el sistema incluyendo el medio de reacción, la enzima, el sustrato y el soporte. Este agua denominada agua conformacional se encuentra fuertemente unida a la proteína recubriéndola y ayuda al mantenimiento de la conformación catalíticamente activa, contribuyendo a proporcionar una mayor estabilidad y actividad (Halling, 1984; Zaks y Klibanov, 1988).

Parte de los efectos que los solventes orgánicos tienen sobre la actividad enzimática son indirectos al actuar sobre el grado de hidratación de las lipasas. Dada la gran influencia que el solvente tiene sobre la enzima y su capacidad para la producción de determinados compuestos, es esencial la elección de un solvente adecuado que maximice la reacción de interés frente al resto y con una mínima inactivación de la enzima.

Algunos investigadores indican que el estudio de las reacciones que las lipasas pueden llevar a cabo en ambientes anhidros resulta especialmente interesante dado que es, en estas condiciones tan especiales, donde su versatilidad adquiere su máxima expresión. Bajo ciertas condiciones las lipasas pueden llevar a cabo transformaciones químicas empleando grupos funcionales inusuales e incluso mediante mecanismos que pueden diferir del empleado en reacciones tradicionales (Bornscheuer y Kazlauskas, 2006; Kapoor y Gupta, 2012).

Entre estas reacciones atípicas se incluyen la formación de enlaces carbono-carbono, carbono-heteroátomo, heteroátomo-heteroátomo, reacciones de oxidación o lactonización (Busto *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Tabla 4. Posibles reacciones de lipasas en medios orgánicos.

1. Lactonización	3. Formación de C-heteroátomos
2. Formación de enlaces C-C	4. Procesos de oxidación
a. Adición aldólica	5. Síntesis de heterociclos
b. Adición de Michael	
c. Reacción de Manning	

1.4. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas

Las lipasas son un grupo de enzimas con un enorme potencial biotecnológico, capaces de actuar sobre una gran variedad de sustratos. Mientras que otras enzimas muestran una nula o muy

reducida actividad en solventes orgánicos, las lipasas poseen una elevada estabilidad en medios anhidros por lo que pueden ser empleadas en la síntesis de compuestos orgánicos con una baja solubilidad en agua. Por otro lado, las lipasas no emplean costosos cofactores, y pueden ser obtenidas a partir de una gran diversidad de microorganismos (Tabla 5) que las secretan al medio facilitando y abaratando su producción (Sharma *et al.*, 2001; Bora *et al.*, 2013).

Todo ello conlleva que estas enzimas se empleen o tengan potencial para ser aplicadas en sectores muy diversos (Casas-Godoy *et al.*, 2012) (Tabla 6). Actualmente la **industria alimentaria** es uno de los principales campos de aplicación de las lipasas en la obtención de distintos productos como lípidos estructurados, aditivos, emulsionantes o aromas. Otra forma de utilización de las lipasas es su adición directa sobre un alimento como en la maduración de quesos donde su acción puede acortar notablemente el proceso sin que se produzcan pérdidas significativas en el aroma o sabor (Yilmaz *et al.*, 2005). Para este propósito, las características bioquímicas de algunos preparados resultan especialmente apropiadas. Así, la esterasa Lp_3505 obtenida de *Lactobacillus plantarum* presenta unos altos niveles de actividad a pH ácidos y baja temperatura (5 °C) tolerando concentraciones altas de sal (Esteban-Torres, 2014).

En la **industria farmacéutica** el uso de lipasas es una alternativa a los catalizadores inorgánicos por su especificidad y moderadas condiciones de reacción. La capacidad de las lipasas para resolver mezclas racémicas puede emplearse en la obtención de fármacos ópticamente puros como antidepresivos, antiinflamatorios no esteroideos o medicamentos para el tratamiento del Parkinson (De Gonzalo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Gotor-Fernández *et al.*, 2006; Borowiecki *et al.*, 2014). Por otra parte, mediante la esterificación de algunos compuestos se pueden obtener derivados con propiedades mejoradas (Matsumoto *et al.*, 2012).

Tabla 5. Lipasas de origen microbiano.

Fuente	Organismo	Características de interés	Referencia
Hongos filamentosos	<i>Rhizomucor miehei</i>	1,3 moderadamente selectiva. Preferencia por cadena media	Vaysse <i>et al.</i> (2002)
	<i>Mucor javanicus</i>	1,3 moderadamente selectiva	Hideko <i>et al.</i> (1975)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ligeramente 1,3 selectiva	Fernández-Lafuente (2010)
	<i>Aspergillus niger</i>	pH óptimo 1,5	Mhetras <i>et al.</i> (2009)
	<i>Penicillium camembertii</i>	Alta preferencia por mono y diglicéridos	Isobe <i>et al.</i> (1992)
Levaduras	<i>Candida antarctica</i> A	No selectiva. Termoestable	Kirk y Christensen (2002)
	<i>Candida antarctica</i> B	1,3 específica. Preferencia por cadena corta. Enantioselectiva	Uppenberg <i>et al.</i> (1994)
	<i>Candida rugosa</i>	No regio selectiva. Poca actividad frente a PUFAs	Schmitt <i>et al.</i> (2002)
	<i>Geotrichum candidum</i> I	Preferencia por ácidos grasos cis- Δ 9	Holmquist <i>et al.</i> (1997)
Bacterias Gram +	<i>Bacillus licheniformes</i>	pH óptimo 10. T óptima 70 °C	Bora (2014)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Activa a temperatura 5 °C	Esteban-Torres <i>et al.</i> (2014)
Actinomicetos	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Preferencia por cadena media y larga. pH óptimo 10	Côté y Shareck (2008)
Bacterias Gram -	<i>Burkholderia cepacia</i>	Ligeramente 1,3 selectiva. Preferencia por cadena larga	Lanser <i>et al.</i> (2002)
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Condiciones óptimas pH 9 y 50 °C. Preferencia por cadena larga	Castellar <i>et al.</i> , 1996
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Preferencia por cadena corta	Chakraborty y Paulraj (2009)

Tabla 6. Algunas aplicaciones industriales de las lipasas.

Industria	Reacción	Aplicación	Referencia
Industria alimentaria	Transesterificación de aceites	Producción de lípidos estructurados	Han <i>et al.</i> (1999)
	Transesterificación	Obtención de análogos de leche materna	Şahin <i>et al.</i> (2006)
	Hidrólisis grasas lácteas	Maduración de quesos y producción de aromas	Esteban-Torres <i>et al.</i> (2014)
	Transesterificación	Producción “shortenings” y mejora características de los alimentos	Ming <i>et al.</i> (1998)
	Glicerólisis de aceites y grasas	Obtención de surfactantes y emulsionantes	Yang <i>et al.</i> (2005)
	Acilación de azúcares	Obtención de surfactantes y emulsionantes	Ward <i>et al.</i> (1997)
Industria química y farmacéutica	Resolución de mezclas racémicas	Obtención de fármacos y compuestos orgánicos ópticamente puros	Gotor-Fernández <i>et al.</i> (2006) De Gonzalo <i>et al.</i> (2001)
Limpieza	Hidrólisis de grasas	Eliminación de manchas y descontaminación	Hasan <i>et al.</i> (2010)
Industria cosmética	Hidrólisis de grasas	Obtención de ácidos grasos para champús y dentífricos	Murty <i>et al.</i> (2002)
	Transesterificación	Producción de emolientes	Nieguth <i>et al.</i> (2011)
Petroquímica	Transesterificación de grasas	Producción de biodiesel	Noureddini <i>et al.</i> (2005)
Industria papelera	Hidrólisis de compuestos hidrofóbicos	Eliminación de las resinas de la madera	Bajpai (1999)

La termoestabilidad y la capacidad de actuar a pHs alcalinos y en presencia de detergentes hacen que algunas lipasas sean especialmente idóneas para la **formulación de productos de limpieza**. La capacidad de degradación de lípidos hace que estas enzimas sean un buen aditivo en la limpieza de manchas de aceites

y grasas (Hasan *et al.*, 2010). Algunos productos específicos para la limpieza de tejidos sensibles también pueden incorporar lipasas que son activas a bajas temperaturas (Suresh Kumar *et al.*, 2009).

Esta capacidad hidrolítica es aprovechada también por la **industria papelera** en la eliminación de las resinas de la madera, de forma que sin emplear compuestos tóxicos se mejora la calidad del papel en un proceso respetuoso con el medio ambiente (Bajpai, 1999).

Las lipasas pueden utilizarse en la producción de jabones y otros productos de higiene personal en la **industria cosmética** (Murty *et al.*, 2002). Compuestos como el miristil miristato o el isopropil miristato, empleados como emolientes en estos productos, pueden sintetizarse mediante reacciones de esterificación en medio orgánico catalizadas por lipasas (Verma *et al.*, 2008; Nieguth *et al.*, 2011).

El **biodiesel** es un combustible producido por la esterificación (transesterificación) de distintas grasas con alcoholes de cadena corta dando lugar a ésteres alquílicos de ácidos grasos que son utilizados en motores de compresión-ignición. Este proceso puede ser también catalizado por lipasas en distintos medios de reacción (Noureddini *et al.*, 2005).

1.4.1. Interés en la inmovilización de lipasas

La inmovilización de enzimas es, por razones tecnológicas y económicas, una de las principales técnicas a estudiar para su aplicación industrial. La pérdida de enzima durante el proceso supone un grave problema, por lo que su inmovilización posibilita la reutilización facilitando además la recuperación de los productos, abaratando los costes del proceso e incrementando su viabilidad económica. Por otro lado, la inmovilización conlleva una serie de ventajas adicionales que pueden resultar de gran interés como el incremento de la estabilidad térmica y química del

biocatalizador. Algunas técnicas de inmovilización provocan la formación de enlaces que estabilizan y dan mayor rigidez a la estructura proteica protegiéndola frente a cambios conformacionales. Esta estabilización de la enzima puede ser el motivo por el que en determinadas condiciones las formas inmovilizadas presentan una mayor estabilidad térmica que la forma en solución, aunque también pueden conllevar pérdidas de actividad.

A pesar de que las lipasas se mantienen activas en medios orgánicos y de que poseen en su superficie un número relativamente alto de aminoácidos hidrofóbicos, estas enzimas son insolubles en la mayor parte de estos solventes orgánicos. Bajo estas condiciones, las lipasas tienden a agregarse quedando en una fase sólida lo que provoca problemas derivados de la limitación en la transferencia de masa (Adlercreutz *et al.*, 2013). La baja estabilidad y capacidad catalítica de las enzimas en medios orgánicos hace que desde un punto de vista práctico, la inmovilización sea una buena estrategia para solventar este problema. La inmovilización permite que la enzima esté dispersa por el medio de reacción y, de esta manera, queden accesibles un mayor número de centros activos viéndose favorecida la transferencia entre sustratos y productos. Por otra parte, la localización de las lipasas sobre un soporte insoluble limita la desactivación por la exposición a agentes químicos como el propio solvente o determinados reactivos y subproductos. Un ejemplo se presenta en la acilación de alcoholes con ésteres vinílicos donde como subproducto de la reacción se genera acetaldehído que es un potente desestabilizador de algunas lipasas. La inmovilización de lipasa de *C. rugosa* previene frente a la desactivación por este compuesto (Weber *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1997).

La estabilización de la enzima en una conformación determinada junto a los cambios en su microambiente debidos a la inmovilización puede afectar de forma significativa su especificidad (Rodrigues *et al.*, 2013). La adsorción de la lipasas

P. cepacia sobre polipropileno poroso modifica drásticamente la acilpreferencia de la enzima y mientras que la forma libre presenta una mayor actividad conforme se incrementa la longitud de ácidos graso, el inmovilizado muestra una mayor actividad hacia sustratos más cortos (Pencreac'h *et al.*, 1997).

Aunque en algunos casos como en la formulación de detergentes las lipasas se emplean sin inmovilizar, en la mayor parte de aplicaciones industriales se requiere que la enzima se encuentre inmovilizada en un soporte. Existe un gran número de estudios acerca de la asociación de lipasas a distintos soportes para diversas aplicaciones siendo las técnicas más empleadas la adsorción o precipitación sobre materiales hidrofóbicos, la unión covalente y el atrapamiento en geles o en materiales sol-gel, así como la formación de agregados enzimáticos entrecruzados (AEE) (Tabla 7).

Las características del soporte es un factor que determina en gran medida la viabilidad de la aplicación por lo que es imprescindible la elección del material y método de inmovilización más apropiados. Se han empleado y emplean una gran variedad de soportes como polímeros sintéticos y naturales, hidrogeles, soportes inorgánicos o partículas magnéticas para aplicaciones muy diversas (Tabla 7). Un buen soporte de inmovilización debe tener una serie de características generales que permitan su uso industrial como una buena resistencia mecánica, bajo coste, inerte, biocompatible, tamaño de partícula adecuado, fácil de activar o una hidrofiliidad acorde con el proceso que se desea realizar.

Tabla 7. Aplicaciones de lipasas inmovilizadas en distintos soportes.

Organismo	Soporte	Aplicación	Referencia
<i>R. miehei</i>	Celite	Producción de “shortenings”	Ming <i>et al.</i> (1998)
	Resina de intercambio aniónico	SL con ratio ω -6/ ω -3 mejorado	Chopra <i>et al.</i> (2011)
<i>C. antarctica B</i>	AEE ^a	Síntesis de aromas	Hobbs <i>et al.</i> (2006)
	Nano partículas magnéticas recubiertas	Síntesis de monoglicéridos y diglicéridos	Singh y Mukhopadhyay (2014)
	Resina acrílica macroporosa	Síntesis antimicrobianos	Chiaradia <i>et al.</i> (2012)
<i>B. cepacia</i>	Atrapamiento matriz sol-gel	Hidrólisis de aceite de soja	Noureddini <i>et al.</i> (2002)
	Polipropileno microporoso	Producción análogos de leche materna	Chen <i>et al.</i> (2004)
<i>T. lanuginosus</i>	Sílice granulado	Mejora de características reológicas de grasas	Aguedo <i>et al.</i> (2008)
<i>A. oryzae</i>	Nanotubos de polianilina	Biosensores	Dhand <i>et al.</i> (2009)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Carbonato de calcio	Síntesis de aditivos industriales	Ghamgui <i>et al.</i> (2004)
<i>P. otitidis</i>	Carbón activado nanoporoso	Biorremediación, tratamiento de aguas alto contenido en grasa	Saranya <i>et al.</i> (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	AEE ^a magnéticos	Resolución de mezclas racémicas	Liu <i>et al.</i> (2015)
<i>P. fluorescens</i>	Poliestireno	Producción de biodiesel	Lima <i>et al.</i> (2015)
<i>C. rugosa</i>	Recubrimiento de microcristales	Esterificación enantioselectiva en fármacos	Huang <i>et al.</i> (2015)
<i>C. cylindracea</i>	Adsorción sobre sílica gel	Producción de aromas	Gilles <i>et al.</i> (1987)

^a AEE: Agregados enzimáticos entrecruzados.

2. Lípidos funcionales

Existe una corriente creciente en la sociedad preocupada por sus hábitos dietéticos que demanda alimentos de una mejor calidad nutricional. Los **alimentos funcionales** nacen para cubrir esta demanda del mercado de forma que sin sustituir las bases de una dieta sana, estos sean incluidos y corrijan algunos de los desequilibrios derivados del ritmo de vida actual. Dentro de la amplia variedad de alimentos funcionales, que podemos encontrar en el mercado, los alimentos enriquecidos son uno de los productos que mayor aceptación tienen. A este grupo pertenecen zumos a los que se les ha añadido vitaminas, cereales con un mayor contenido en fibra, o leches enriquecidas en calcio o en **ácidos grasos esenciales (lípidos funcionales)**. En algunos casos este enriquecimiento, considerado beneficioso para la salud, es posible con la simple adición del compuesto sobre la matriz alimentaria a enriquecer. Pero en el caso de los ácidos grasos, al suplir la falta de un ácido graso en un alimento mediante su incorporación en forma libre surgen problemas como la acidificación del medio o la aparición de olores y sabores no deseados. Una forma de solventar esta problemática consiste en proveer estos ácidos grasos esterificados como triglicéridos. En este sentido, la síntesis de triglicéridos se dirige a la modificación de la composición y distribución de ácidos grasos para conseguir determinadas características físico-químicas y/o nutricionales.

2.1. Destino metabólico de los lípidos. Beneficios sobre la salud humana

Las grasas son una mezcla de lípidos, más o menos compleja, cuyo componente principal son los triglicéridos. Estas moléculas constituyen la principal forma de reserva energética en los animales pero cumplen muchas otras funciones como son la protección de órganos, el aislamiento térmico, además de jugar

un papel importante en la regulación endocrina. Los triglicéridos están formados por la unión de un glicerol mediante enlaces éster a tres ácidos grasos, donde la longitud y número de insaturaciones del ácido graso determinan las características físicas, químicas y nutricionales del triglicérido.

En función del número de dobles enlaces que poseen, los ácidos grasos se clasifican como saturados (“Saturated Fatty Acids”, SFA), monoinsaturados (“Monounsaturated Fatty Acids”, MUFA) y poliinsaturados (“Polyunsaturated Fatty Acids”, PUFAs). Los SFA como el mirístico (C14) y esteárico (C18) son muy abundantes en productos de origen animal aunque determinados aceites vegetales como el de palma contienen un alto contenido en láurico (C12) y palmítico (C16). Además de ser incorporados a través de la dieta, los SFA también provienen de la síntesis endógena a partir de acetyl-CoA como resultado de un exceso en la ingesta de hidratos de carbono. Los MUFA poseen un único doble enlace en la cadena carbonada que en la mayor parte de los casos se encuentra entre los carbonos C9 y C10 en configuración *cis*. Son especialmente abundantes en algunos aceites vegetales y, aunque cuantitativamente el oleico (C18:1) es el ácido graso más importante en nuestra dieta, los MUFA no son esenciales dado que el cuerpo humano puede sintetizarlos.

Las grasas ingeridas son digeridas principalmente en el intestino delgado, aunque las lipasas lingual y gástrica comienzan la hidrólisis de los triglicéridos formados por ácidos grasos de cadena corta y media. Una vez que los lípidos se encuentran en el intestino delgado (duodeno) son emulsionados por las sales biliares de forma que las micelas generadas favorecen la hidrólisis de los triglicéridos por la lipasa pancreática. La estructura asimétrica de los triglicéridos implica que la localización de los ácidos grasos esterificados en el esqueleto de glicerol no es equivalente. Esto determina que las posiciones identificadas como Sn-1 y Sn-3 sean susceptibles de

ser atacadas por las lipasas intestinales mientras que la posición central permanece esterificada. Como resultado se liberan dos ácidos grasos y un 2-monoglicérido, que son absorbidos de distinta forma por los enterocitos del intestino delgado. Los 2-monoglicéridos generados por la acción de las lipasas en el intestino son absorbidos de forma más eficiente que los ácidos grasos libres, y una vez en el organismo son reesterificados como triglicéridos y transportados por el sistema linfático (Figura 10).

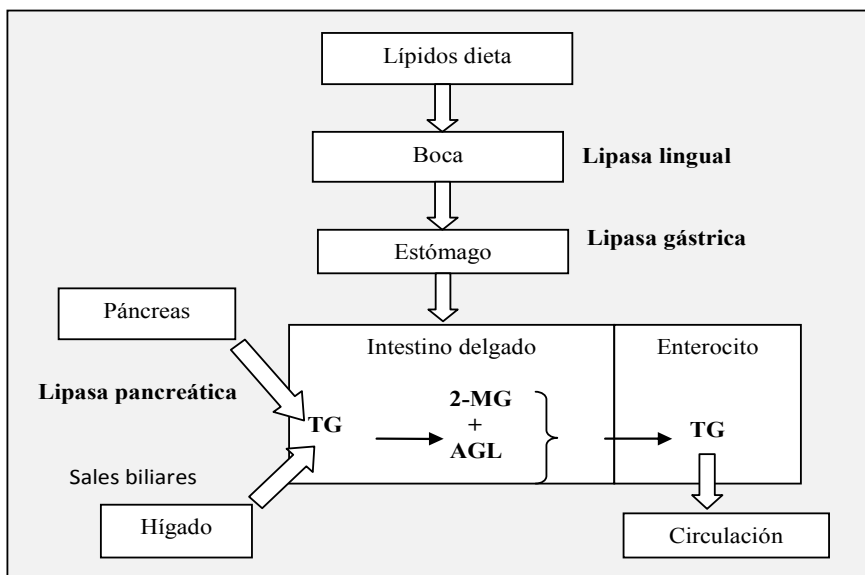


Figura 10. Esquema del proceso digestivo de los triglicéridos. TG: Triglicéridos; MG: Monoglicéridos; AGL: Ácidos grasos libres.

En gran medida, el destino metabólico prioritario de un ácido graso absorbido viene determinado por la longitud de la cadena. Los ácidos grasos de cadena larga son principalmente reconvertidos en triglicéridos y transportados por la sangre en forma de lipoproteínas, para ser utilizados en la producción de energía o para ser almacenados. Los ácidos grasos de cadena media son absorbidos directamente y se transportan vía porta al hígado unidos a albúmina donde serán oxidados para la obtención de energía de forma rápida. Por tanto, una vez en el interior del organismo mientras que los ácidos grasos de cadena

media y corta son preferentemente β -oxidados, los de cadena larga pueden seguir esta ruta degradativa o ser esterificados en forma de triglicéridos para incorporarse a lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL (“Very Low Density Lipoproteins”). Los PUFAs de cadena larga tienen como destino preferente su incorporación a las membranas plasmáticas como fosfolípidos, donde aportan fluidez y participan en la transducción de señales. Por otro lado, son precursores de hormonas y mediadores bioquímicos importantes como las prostaglandinas y eicosanoides. Este tipo de moléculas, entre otros efectos, participan en la regulación del flujo de sangre hacia distintos órganos, en la coagulación, controlan el transporte de sustancias y juegan un papel relevante en la modulación de la respuesta inmune a través de distintas rutas actuando tanto como proinflamatorios como antiinflamatorios (Figura 11).

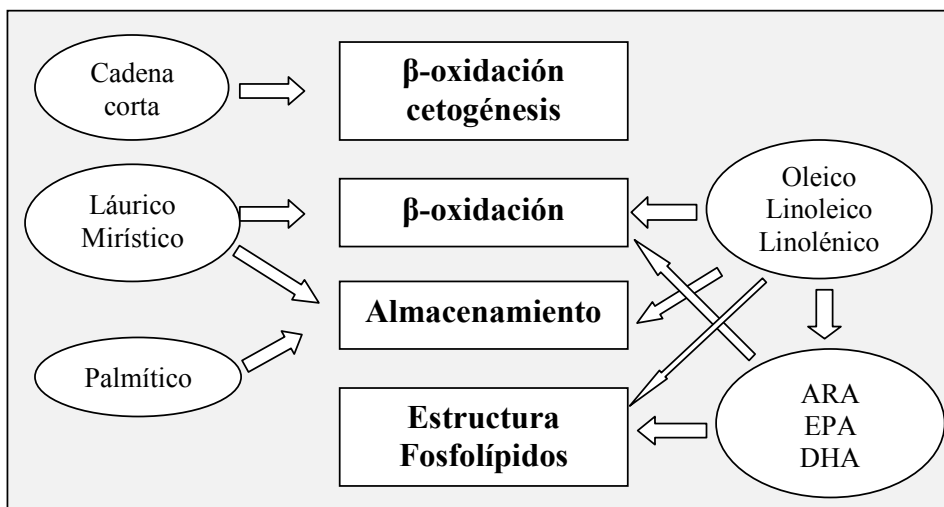


Figura 11. Destino metabólico preferente de los principales ácidos grasos. ARA: ácido araquidónico; EPA: eicosapentaenoico; DHA: ácido docosaheptaenoico.

Dado que no todos los ácidos grasos tienen el mismo papel metabólico, es importante que la dieta tenga una composición relativa apropiada para el mantenimiento de un buen estado de salud. Existen evidencias que relacionan la ingesta de grasas saturadas con el aumento en los niveles de colesterol lo que

incrementa el riesgo cardiovascular. Estos efectos no son iguales para todas las grasas saturadas, y mientras que los ácidos mirístico, láurico y palmítico provocan incrementos del colesterol total y VLDL, los ácidos grasos de menos de diez carbonos y el ácido esteárico parece que no producen un incremento significativo. Los ácidos grasos *trans* al igual que los SFA incrementan las concentraciones de colesterol LDL (“Low Density Lipoproteins” o lipoproteínas de baja densidad), junto con un descenso de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (“High Density Lipoproteins” o HDL), alterando de forma más importante el ratio LDL/HDL. Aunque si el consumo de MUFA es insuficiente el organismo es capaz de sintetizarlos, diversos estudios clínicos han demostrado los beneficios de su ingesta sobre la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares. En las dietas en las que se sustituye el consumo de ácidos grasos saturados por el de monoinsaturados tiene como consecuencia una reducción en la cantidad de colesterol total y LDL sin que se aprecien cambios significativos en la cantidad de colesterol HDL. Paralelamente, el consumo de este tipo de grasa posee un efecto protector sobre la oxidación del colesterol LDL, uno de los factores que mayor influencia tienen en la formación de placas ateromatosas.

Expertos en nutrición insisten en la necesidad de emplear dietas que contengan un perfil lipídico adecuado que aseguren un correcto desarrollo, evitando aquellas que presentan desequilibrios tanto en la cantidad como en la calidad de las grasas ingeridas. Según la Fundación Española de la Nutrición (FEN) y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), los hábitos alimentarios de los españoles presentan un perfil calórico desequilibrado dado que el consumo de grasas supera los niveles recomendados y, además, hay una contribución excesiva de los SFA (Varela Moreiras, 2013).

El estilo de vida actual ha hecho que los hábitos nutricionales hayan variado notablemente en las últimas décadas abandonando

la dieta tradicional mediterránea hacia una alimentación en la que la comida rápida y los platos precocinados han ganado terreno a los alimentos tradicionales mucho más saludables. Estos hábitos alimentarios poco saludables son un problema global con graves consecuencias para la salud de la población que, en algunos casos, se encuentra más relacionado con el tipo de grasa que se consume que con la cantidad total. La baja calidad de la grasa de estos alimentos se debe principalmente a su alto contenido en grasas saturadas y en ácidos grasos *trans*. Los SFA son más difíciles de metabolizar que los insaturados y tienden a acumularse originando problemas de salud como son el sobrepeso, mayor riesgo cardiovascular e hipercolesterolemia. El consumo de productos de bollería entre cuyos ingredientes aparecen “shortenings” obtenidos por hidrogenación parcial de aceites, conlleva un aumento en la cantidad de grasas *trans* ingeridas con el consiguiente perjuicio para la salud. Este consumo de ácidos grasos *trans* se relaciona con el incremento del riesgo de sufrir enfermedades coronarias por agravamiento de algunas patologías de base (Ascherio *et al.*, 1994).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/WHO) publicó una serie de recomendaciones con el fin de asesorar sobre el consumo de aceites y grasas. Según estas recomendaciones de la FAO, en un adulto la grasa ingerida debe aportar entre un 15 y un 35% de su consumo energético asegurándose unas proporciones adecuadas de los distintos grupos de ácidos grasos (FAO, 2010). Según aconseja la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) el consumo de MUFA debe ser el mayoritario en la dieta, constituyendo entre el 15 y el 20% de la energía total mientras que los PUFAs no deben superar el 6% del contenido calórico, manteniendo un equilibrio ω -6 y ω -3 de entre 4:1 y 10:1.

2.1.1. Ácidos grasos poliinsaturados-PUFAs

Los PUFAs son ácidos grasos que contienen dos o más dobles enlaces generalmente no conjugados. En función de la posición en la que se encuentra el último doble enlace respecto al metilo terminal, los PUFAs se clasifican en ácidos grasos ω -3 y ω -6 siendo, los ácidos eicosapentaenoico (20:5) o EPA y docosahexaenoico (22:6) o DHA los más representativos para la serie ω -3 y el ácido linoleico (18:2) para la ω -6. El ácido linolénico (C18:3) es un ácido graso ω -3, cuando es el isómero α , y ω -6 cuando es el isómero γ . Los ácidos α -linolénico y linoleico son **ácidos grasos esenciales** que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano debido a la carencia de enzimas capaces de introducir dobles enlaces más allá del carbono 9. Esto hace que deban ser incorporados en la dieta principalmente a través de pescados y aceites vegetales.

La mayor parte de los dobles enlaces que encontramos en los ácidos grasos insaturados se encuentran en configuración *cis* y solo una pequeña parte lo están en posición *trans*. Estos últimos pueden tener un origen natural como los producidos en el rumen por acción la bacteriana, pero la mayor parte son producto de modificaciones de los alimentos durante su procesado. A pesar de presentar dobles enlaces, los ácidos grasos insaturados que presentan esta conformación exhiben características similares a los SFA.

Aunque algunos aspectos de los mecanismos de acción metabólica de los PUFAs no están completamente aclarados, sus efectos no son equivalentes y los eicosanoides derivados de los ácidos grasos ω -3 y ω -6 poseen actividades biológicas distintas participando, incluso, en procesos fisiológicos contrapuestos (Lunn *et al.*, 2006). Los eicosanoides que provienen de la serie ω -6 como el araquidónico poseen un potente efecto proinflamatorio mientras que los derivados de ácidos grasos ω -3 poseen efectos claramente antiinflamatorios. En la síntesis de

estos mediadores, los ácidos grasos ω -6 y ω -3 compiten por los mismos centros activos de las mismas enzimas de forma que ácidos grasos como el EPA y el DHA desplazan al ácido araquidónico interfiriendo en la síntesis de los eicosanoides proinflamatorios y dando lugar a otros derivados con efectos antagónicos (Calder, 2006; Sijben y Calder, 2007). Algunos estudios sugieren una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares en países cuyas dietas se caracterizan por un desequilibrio en el ratio ω -6/ ω -3 consecuencia del elevado consumo de aceites de semilla (Lands, 2009). Por consiguiente es fundamental mantener un equilibrio entre los ácidos ω -6 y ω -3 en la dieta de entre 4:1 y 10:1. Diversos estudios indican que el consumo habitual de PUFAs ω -3 contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares debido a que disminuyen la aparición de arritmias, mejoran el perfil lipídico, y modulan los procesos inflamatorios (Murnaghan, 1981; De Caterina *et al.*, 2003).

Al contrario que los SFA, la adición *in vitro* de PUFAs ω -3 incrementa el umbral para las **arritmias** al prevenir la sobrecarga de calcio en los miocitos estabilizando la actividad eléctrica durante los periodos de estrés (McLennan *et al.*, 1992; Leaf y Kang, 1997). Los PUFAs también participan en la normalización del **perfil lipídico** y mientras que el efecto reductor de los triglicéridos parece ser más acusado en la serie ω -3, los ω -6 poseen un mayor efecto hipocolesterolémico reduciendo la concentración de colesterol total y LDL sin influir en los niveles de HDL (Mensink y Katan, 1992). La **inflamación** es un mecanismo clave en la aparición de ateromas y de la progresión de las enfermedades cardiovasculares. El efecto antiinflamatorio de los PUFAs ω -3 se debe tanto a la disminución de la infiltración y adhesión de los monocitos a las células endoteliales como a la producción de mediadores con actividad antiinflamatoria.

Diversas enfermedades en el hombre se caracterizan por una respuesta inflamatoria descontrolada mediada por la formación de eicosanoides y citocinas. Algunos de estos desórdenes como la enfermedad de Crohn con un claro componente inflamatorio se han visto paulatinamente incrementados en las sociedades occidentales, hecho que diversos autores relacionan con el aumento en el consumo de ácidos grasos ω -6 y el descenso en ω -3 de las dietas actuales (Shoda *et al.*, 1996). Así, la ingesta de PUFAs ω -3 puede reducir tanto el riesgo de accidente cardiovascular como la sintomatología de ciertos desórdenes inflamatorios como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis o artritis reumatoide.

El **ácido α -linolénico (ALA)** es un ácido graso esencial que se requiere para la síntesis de otros ácidos grasos (EPA y DHA) y otros compuestos derivados de interés metabólico. Los datos aportados por distintos estudios indican que la suplementación de la dieta con ALA no siempre conlleva un incremento en los niveles de ácidos grasos ω -3 de mayor longitud de cadena y grado de insaturación (Brenna *et al.*, 2009). La alimentación con altas dosis de ALA durante periodos prolongados incrementa el contenido de EPA en el torrente sanguíneo y en la leche materna, mientras que no se aprecian variaciones significativas en el contenido en DHA (Burdge y Calder, 2005). Posiblemente debido al efecto regulador de los estrógenos, esta conversión en ω -3 PUFAs de cadena larga a partir de ALA es mayor en mujeres que en hombres cuya tasa de β -oxidación es mayor comparativamente.

Recientemente el estudio del metabolismo del ALA ha generado un mayor interés más allá de su posible papel como precursor de DHA y EPA. El ácido α -linolénico promueve diversos efectos positivos sobre la salud humana por su capacidad para competir con los ácidos ω -6 por las mismas enzimas interfiriendo en la producción de prostaglandinas proinflamatorias, así como por el efecto directo sobre

determinados canales iónicos y receptores nucleares (Barceló-Coblijn y Murphy, 2009). Los estudios epidemiológicos indican que en poblaciones en las que por su dieta tradicional los niveles de plasma contienen un alto contenido en ALA, el riesgo de padecer enfermedades coronarias es bajo, posiblemente por su actividad antiarrítmica al bloquear determinados canales iónicos. El mecanismo de actuación de otros ω -3 como EPA y DHA es diferente y se basa en el descenso de los niveles de expresión génica (gen KV 1.5), mientras que el ALA actúa a concentraciones fisiológicas bloqueando dichos canales sin alterar su expresión (Guizy *et al.*, 2008). Por otro lado, y aunque no existen datos en seres humanos, los estudios realizados en animales muestran que dietas ricas en ALA pueden disminuir los niveles plasmáticos de colesterol LDL, y por tanto el riesgo de desarrollar ateromas, efecto que se ve potenciado por su capacidad antiinflamatoria. La actividad antiinflamatoria del ALA puede ser mayor que la encontrada en DHA y EPA debido a que actúa tanto produciendo mediadores antiinflamatorios como evitando la síntesis de prostaglandinas proinflamatorias por competición con sus precursores. En conjunto estos efectos contribuyen a la posible acción protectora del ALA frente al riesgo de sufrir infartos detectado en estudios epidemiológicos realizados en poblaciones con un alto consumo en este ácido graso esencial.

Por último, estudios recientes indican que el ácido α -linolénico posee propiedades neuroprotectoras frente a ataques isquémicos, derivadas de su efecto elevador en el factor neurotrófico derivado del cerebro, incrementando la neurogénesis y su sinapsis (Blondeau *et al.*, 2009; Blondeau *et al.*, 2015).

2.1.2. Estabilidad oxidativa

En las condiciones normales de almacenamiento, los ácidos grasos insaturados especialmente los PUFAs no son estables y

sufren una serie de transformaciones que deterioran algunas de sus propiedades. En los alimentos, los procesos de oxidación lipídica tanto enzimática (vía lipooxigenasa), como no enzimática (autooxidación) disminuyen su calidad organoléptica y nutricional. Los productos derivados de la oxidación son en muchos casos compuestos con olores y sabores desagradables que provocan un alto grado de rechazo en el consumidor además de reducir la vida útil del producto.

En la autooxidación, los lípidos reaccionan con el oxígeno molecular en un proceso complejo en el que se ven involucradas diversas reacciones que aunque consecutivas, tienen lugar simultáneamente. La velocidad de autooxidación se ve influenciada por distintos factores como la presencia de compuestos antioxidantes o prooxidantes, la naturaleza del medio, la composición en ácidos grasos del aceite o las condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, cantidad de agua).

La oxidación de los ácidos grasos se inicia por la formación de una serie de radicales libres intermediarios bastante estables capaces de extraer átomos de hidrógeno de algunos carbonos especialmente susceptibles. El proceso de reacción en cadena se pueden dividir en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 12).

En la fase de **iniciación** tiene lugar la formación de los radicales libres de ácidos grasos con una baja producción de hidroperóxidos y consumo de oxígeno. Tras la fase de iniciación y una vez que se ha alcanzado una cierta concentración de radicales libres, tiene lugar la fase de **propagación** donde los radicales de ácidos grasos generados reaccionan con el oxígeno molecular dando lugar a nuevos radicales e hidroperóxidos lipídicos por un proceso autopropagado que puede repetirse numerosas veces. Por tanto, en esta fase el proceso de oxidación va paralelo al consumo de oxígeno. Por último, en la fase de **terminación** la reacción entre los radicales generados en las

fases anteriores y la descomposición de los hidroperóxidos da lugar a la formación de compuestos estables tanto volátiles como no volátiles que disminuyen notablemente la aceptación del alimento por parte del consumidor. Entre los compuestos generados aparecen polímeros, epóxidos, furanos, cetonas, aldehídos y ácidos cuya estructura dependerá del ácido graso de partida. Estos productos de oxidación, además de dar lugar a sabores y olores indeseables, propios de los aceites enranciados, alteran algunas características físicas como son el color, viscosidad o la capacidad para formar espumas.

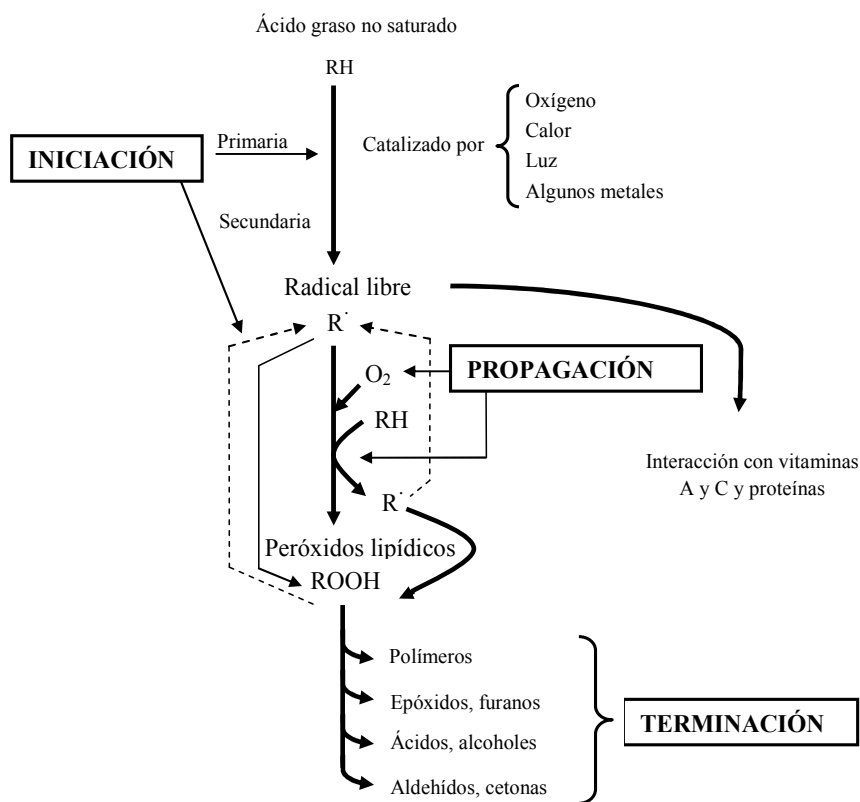


Figura 12. Reacciones de oxidación de lípidos (Cheftel y Besancon, 1999).

Dada la complejidad en el número de reacciones y compuestos involucrados en el proceso de oxidación lipídica se han puesto a punto distintas metodologías para la determinación del grado de oxidación de un alimento aunque ninguna de estas

pruebas vale por sí misma para determinar todos los compuestos presentes. Cada metodología aporta información sobre lo que ocurre en una parte del proceso y por ejemplo, la prueba del índice de peróxidos (o IP), se limita a las primeras etapas de la oxidación por lo que en grasas muy oxidadas encontramos unos valores de IP bajos a pesar de detectarse el olor característico a rancio. Esto es debido a que tras alcanzar un máximo en su concentración en las primeras fases, los hidroperóxidos se descomponen paulatinamente dando lugar a los productos responsables de los olores característicos a rancio.

2.2. Lípidos estructurados

Los **lípidos estructurados (SL)** son aceites y grasas diseñados acorde a unos requerimientos deseados, lo que hace que resulten altamente versátiles y con un alto potencial de aplicación con fines muy variados siendo los triglicéridos estructurados (TS) los que mayor desarrollo han tenido hasta el momento. Estos TS son moléculas sintetizadas de forma dirigida para que su composición y distribución en ácidos grasos se ajuste a unas características **nutricionales** y/o **físico-químicas** determinadas. En este trabajo se empleará el término genérico SL.

2.2.1. Reformulación de triglicéridos para la mejora de sus características nutricionales

Uno de los principales objetivos que se persigue con la reformulación de triglicéridos es la mejora de las características nutricionales de las grasas y aceites incrementando el contenido en determinados ácidos grasos. Los PUFAs se encuentran de forma natural en algunos aceites vegetales y de pescado pero su longitud y localización en el triglicérido hacen que sean incorporados de una forma poco eficiente.

Los lípidos denominados genéricamente como **MLM**, buscan integrar una mejor disponibilidad de ácidos grasos esenciales de cadena larga junto con un reducido contenido calórico. Para ello, se formulan triglicéridos en cuyas posiciones externas portan ácidos grasos de cadena media (M) y en la posición central un ácido graso de cadena larga (L), principalmente PUFAs. Los M son hidrolizados rápidamente por la lipasa pancreática 1,3 específica dando lugar a 2-monoglicéridos con ácidos grasos de cadena larga que son absorbidos más fácilmente que cuando están en forma libre (Mu y Porsgaard, 2005; Porsgaard *et al.*, 2005). Al estudiar la incorporación de ácido linoleico se comprobó que realmente su absorción es significativamente mayor cuando estos L se encuentran en lípidos tipo MLM que cuando lo hacen en LLL o LML. Los M absorbidos son transportados principalmente por la vena porta por lo que solo una pequeña proporción es encontrada en la linfa, mientras que la cantidad de L es claramente superior, indicando un distinto destino metabólico en función de la longitud de su cadena (Ikeda *et al.*, 1991). Por tanto, la disposición y el tipo de ácidos grasos de los lípidos MLM favorecen la absorción e integración en la vía metabólica apropiada. Esto mejora la incorporación de los PUFAs respecto al uso de mezclas físicas de aceites donde la disposición al azar de ácidos grasos hace que se mantenga el patrón y velocidad de absorción propia de cada ácido graso. Estas propiedades hacen que las formulaciones MLM hayan sido empleadas en el tratamiento de deficiencias en la absorción derivadas de una insuficiencia pancreática con buenos resultados (Straarup y Hoy, 2000).

Así mismo, los lípidos MLM han ido ganado importancia en otros tipos de nutrición como es la alimentación parenteral por la mejora que supone en la ganancia de peso y el balance de nitrógeno. El uso de lípidos en la nutrición parenteral es una parte esencial, pero la composición de los mismos ha ido variando (Munroe *et al.*, 2011). Inicialmente se empleaban L para posteriormente ser parcialmente reemplazados por el uso de

M dado que su incorporación a la mitocondria es independiente de la carnitina y son empleados exclusivamente para la producción de energía. Una alimentación que exclusivamente se componga de M causa un déficit en el nivel de ácidos grasos esenciales además de provocar acidosis metabólica y desórdenes neurológicos. Por este motivo es necesaria una administración conjunta con L que generalmente se hace en forma de mezcla de aceites. Con los preparados MLM se consigue una administración conjunta de ambos ácidos grasos de una forma más controlada reduciendo las concentraciones de M y de cuerpos cetónicos en el plasma (Nordenstrom *et al.*, 1995; Rubin *et al.*, 2000).

El uso de SL que contengan PUFAs ω -3 ha demostrado tener potencial terapéutico al ayudar a inhibir una respuesta inflamatoria exagerada o mejorar el perfil lipídico mediante la normalización del **balance de ácidos grasos ω -6/ ω -3**. Estudios realizados en individuos sometidos a cirugía abdominal mostraban que en aquellos pacientes alimentados con SL, se producía una reducción de las prostaglandinas proinflamatorias así como una mejora en las funciones renal, hepática e inmune (Swails *et al.*, 1997). Algunos estudios indican que la disposición de los PUFAs en los SL puede incrementar los efectos beneficiosos de estos ácidos grasos sobre la salud. Así, en ratas alimentadas con aceite de cáscara de arroz rico en ω -3 PUFAs sus niveles de colesterol se veían reducidos en un 10% respecto al control. En aquellos animales en los que se incorporó este tipo de ácidos grasos en forma de SL, el descenso en los niveles de colesterol fue un 19% más acusado que en las ratas alimentadas con aceites naturales cuya distribución de PUFAs no estaba dirigida (Chopra y Sambaiah, 2009).

Mediante síntesis dirigida es posible formular triglicéridos con un perfil determinado y cuya distribución no se encuentra muy extendida en la naturaleza como es en la **leche materna**. El contenido lipídico de la leche materna es bajo y está constituido

mayoritariamente por triglicéridos cuyas posiciones externas están ocupadas por ácidos grasos insaturados y en la central portan ácido palmítico. Esta estructura especial, que no se encuentra en otras leches, facilita la digestión y absorción de nutrientes en el recién nacido. La alimentación de lactantes con sustitutos de leches maternas cuyos triglicéridos no poseen el perfil adecuado provoca problemas en la absorción del calcio y problemas de estreñimiento. En el mercado existen preparados comerciales como BetapolTM, que emplean enzimas en la obtención de SL con un perfil lipídico más cercano al encontrado en las leches maternas. En las nuevas formulaciones se incluyen PUFAs debido a que favorecen el desarrollo cerebral del bebé (Şahín *et al.*, 2006).

2.2.2. Reformulación de triglicéridos para la mejora de sus características físico-químicas

Las grasas animales han sido empleadas históricamente como mejorantes (“shortenings”) en la producción de alimentos, por su plasticidad, aroma y sabor. Estas grasas están siendo sustituidas por aceites vegetales como el de semillas de algodón debido a los excedentes de producción y a su menor coste. No obstante, el alto número de dobles enlaces de estos aceites dan lugar a una consistencia excesivamente fluida. Mediante la hidrogenación parcial es posible obtener un producto con la consistencia semisólida requerida y con una mejor estabilidad oxidativa. Pero como resultado de la hidrogenación parcial algunos dobles enlaces se isomerizan a la conformación *trans* reduciendo la calidad nutricional de estos productos.

La modificación de la composición de los ácidos grasos para la mejora de las características físico-químicas de aceites y grasas mediante la aplicación de enzimas es una metodología alternativa al uso de procesos químicos que generan grasas *trans*. Aunque uno de los aceites empleados en la preparación de margarinas es la estearina de palma su contenido en ácidos

grasos insaturados no le provee de la textura y plasticidad requerida en este tipo de productos. Mediante la transesterificación catalizada por lipasas con distintas proporciones de estearina de palma y otros aceites vegetales es posible controlar el grado de fluidez (Lai *et al.*, 1998; Ming *et al.*, 1998). Empleando esta metodología, se han obtenido “shortenings” con perfiles de temperatura de fusión y curvas de cristalización similares a los encontrados en preparados comerciales obtenidos por hidrogenación parcial de aceites vegetales pero sin la aparición de ácidos grasos *trans* (Jennings *et al.*, 2010).

2.3. Síntesis enzimática de lípidos estructurados

La producción de lípidos estructurados puede llevarse a cabo mediante métodos químicos y enzimáticos (lipasas) empleando en cada caso diferentes metodologías dependiendo del tipo de molécula a sintetizar. En el proceso tradicional de **síntesis química** se requieren temperaturas y presiones elevadas que, en muchos casos, conllevan la degradación de algunos de los compuestos presentes en la mezcla de reacción. Por otro lado, la síntesis química no se puede emplear en la obtención de triglicéridos con una distribución específica de sus ácidos grasos debido a que no existe una especificidad posicional en estas reacciones químicas.

Adicionalmente, la oxidación lipídica que se produce con esta metodología reduce notablemente la calidad organoléptica ya que los productos secundarios de la oxidación son los responsables del característico olor a rancio de las grasas expuestas a condiciones poco apropiadas (Dacaranhe y Terao, 2001). Pero este deterioro no solamente afecta a la calidad sensorial del producto sino que, además, puede tener consecuencias perjudiciales para la salud. Según indican diversos estudios algunos productos resultantes de la peroxidación lipídica tienen un efecto opuesto al PUFAs

inicialmente añadidos ya que son potencialmente aterogénicos (Arab-Tehrany *et al.*, 2012). Estos productos de degradación, en muchos casos, deben ser eliminados lo que supone costes adicionales que hacen que el proceso resulte menos rentable. Junto a esto, las reacciones químicas son aceleradas mediante catalizadores inorgánicos como alquilatos metálicos que también deben ser eliminados del producto final.

La **síntesis enzimática** posee un considerable potencial en la modificación de grasas mediante reacciones de transesterificación en medios con baja actividad de agua. Por su especificidad, los métodos basados en el uso de lipasas son los más empleados en la obtención de SL con una estereoquímica definida y con unas características nutricionales y/o organolépticas mejoradas. Estas metodologías resultan especialmente adecuadas cuando se trabaja con aceites con elevado número de PUFAs susceptibles de ser oxidados ya que las lipasas actúan en condiciones de reacción moderadas.

Dentro de las metodologías de transesterificación enzimática más empleadas en la producción de SL se encuentran las reacciones de interesterificación, acidólisis y los procesos en dos pasos, que implican una reacción de alcoholólisis y una esterificación posterior.

En las reacciones de **interesterificación**, una lipasa lleva a cabo el intercambio de los ácidos grasos entre dos triglicéridos dando lugar a un producto con sus ácidos grasos reorganizados. Mediante este tipo de reacciones es posible modificar algunas de las propiedades naturales de los aceites, como la temperatura de fusión o el patrón de cristalización, sin la formación de ácidos grasos *trans* resultado de los procesos de hidrogenación parcial. Mediante la interesterificación entre grasas deshidratadas de origen lácteo y aceites con alto contenido en PUFAs, con el preparado Lipozyme TL-IM, se mejoraban las propiedades reológicas del producto dando lugar a grasas semisólidas

fácilmente extensibles (Aguedo *et al.*, 2008). Esta metodología también se puede emplear para la obtención de triglicéridos con un perfil de ácidos grasos determinado como son los análogos de leche materna (Criado *et al.*, 2008; Ilyasoglu, 2013).

La **acidólisis** es el método más simple y directo para la síntesis de SL con lipasas 1,3 específicas. En las reacciones de acidólisis la modificación en la composición del triglicérido se lleva a cabo mediante el intercambio de sus restos acilo con ácidos grasos libres. La reactividad de los ácidos grasos depende en gran medida del origen de la lipasa y puede variar con la actividad de agua, la naturaleza de solvente empleado como medio de reacción o la naturaleza de la molécula. Esta reacción, que se ajusta al modelo Ping-Pong Bi-Bi, puede dividirse en dos etapas consecutivas: hidrólisis de un resto acilo del triglicérido y la esterificación de un AGL en la posición libre (Martinelle y Hult, 1995; García *et al.*, 1999). La mayor parte de los trabajos se centran en el estudio de las distintas variables del proceso, pero el estudio de los mecanismos de reacción, los ratios y constantes cinéticas es esencial para el entendimiento de la reacción y poder diseñar de forma racional reactores que maximicen la producción de SL (Camacho *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2010; Palla *et al.*, 2014).

Las reacciones de acidólisis han sido empleadas en la síntesis de lípidos estructurados enriquecidos en ALA empleando diversos aceites de partida como el de cáscara de arroz. Este aceite es una fuente muy importante de compuestos fenólicos pero su contenido en ácidos ω -3 es prácticamente nulo por lo que su balance entre ácidos ω -6 y ω -3 resulta poco adecuado. Mediante acidólisis enzimática con Lipozyme IM 60 es posible corregir este desequilibrio al enriquecerlo en ALA obteniendo un aceite con un ratio ω -6/ ω -3 más apropiado manteniendo las ventajas nutricionales iniciales (Chopra *et al.*, 2011).

En algunos casos, estos métodos directos de interesterificación y acidólisis no pueden ser empleados, como en la obtención de lípidos MLM, cuando los PUFAs se encuentran en las posiciones externas. Junto a esto, los procesos de acilmigración dan lugar a una reducción de la eficiencia de los procesos. Para superar estos problemas se han propuesto distintas alternativas que implican **procesos en 2 pasos**. En un primer paso, a partir de aceites ricos en los ácidos grasos funcionales, se obtienen los 2-monoglicéridos mediante reacciones de alcoholólisis con lipasas 1,3 específicas. En el segundo paso, se esterifican los nuevos ácidos grasos a incorporar en los grupos hidroxilo libres empleando nuevamente una lipasa 1,3 específica (Wongsakul *et al.*, 2004). Siguiendo esta metodología Irimescu *et al.* (2001) alcanzaron una conversión del 71% empleando etilcaprato en la esterificación de 2-monoglicéridos con aceite de bonito como fuente de PUFAs. Los resultados de Muñío *et al.* (2009), indican que los mejores resultados se obtenían empleando distintas enzimas en cada paso, Novozym 435 para etanolólisis y la lipasa de *R. oryzae* inmovilizada sobre Accurel MP1000 (Lipase D) para la reacción de esterificación. Procedimientos similares han sido descritos para la producción de otros SL con una distribución definida como el 1,3-dioleil-2-palmitoil glicerol, triglicérido mayoritario en los análogos de leche materna (Chen *et al.*, 2004).

Actualmente, uno de los retos en la síntesis de lípidos estructurados mediante el empleo de enzimas, es el paso a una **producción a gran escala**. Mientras que la obtención mediante transesterificación química resulta más sencilla y barata a la hora de trasladarse del laboratorio a un proceso a gran escala, los procesos controlados por enzimas presentan mayores dificultades (Akoh y Moussata, 2002). La eliminación de los ácidos grasos libres, el coste relativamente alto de las enzimas y su desactivación durante el proceso son los principales problemas de los biorreactores. Uno de los aspectos fundamentales para que los procesos enzimáticos a gran escala

resulten económicamente viables es la inmovilización de la enzima sobre un soporte adecuado que permita su reutilización el mayor número de veces posible. Así, las lipasa D (*R. oryzae*) y Rd (*R. delemar*) inmovilizadas sobre polipropileno (Accurel MP 1000) pueden emplearse en estos procesos al permanecer estables durante una semana en las condiciones de operación y, tres semanas, en condiciones de almacenaje (Hita *et al.*, 2007).

Las reacciones de acilmigración reducen en algunos casos de forma significativa la eficiencia del proceso al descomponer los SL previamente formados. En la producción a gran escala en sistemas en discontinuo, los altos ratios sustrato/enzima requieren de largos tiempos de reacción para alcanzar el equilibrio lo que afecta a la acilmigración. En los sistemas en continuo en los que la enzima está inmovilizada en el interior de una columna la migración se ve reducida. Autores como González Moreno *et al.* (2004) indican que los mejores resultados se obtienen en el procesado en continuo para reacciones de acidólisis.

3. Referencias

- Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media (2013) *Chemical Society Reviews*, 42 (15), pp. 6406-6436.
- Aguedo, M., Hanon, E., Danthine, S., Paquot, M., Lognay, G., Thomas, A., Vandenbol, M., Thonart, P., Wathelet, J.-P., Blecker, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (5), pp. 1757-1765.
- Akoh, C.C., Moussata, C.O. Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids (2001) *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (1), pp. 25-30.
- Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desobry, S., Linder, M. Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (2012) *Trends in Food Science and Technology*, 25 (1), pp. 24-33.
- Arpigny, J.L., Jaeger, K.-E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties (1999) *Biochemical Journal*, 343 (1), pp. 177-183.
- Ascherio, A., Hennekens, C.H., Buring, J.E., Master, C., Stampfer, M.J., Willett, W.C. Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction (1994) *Circulation*, 89 (1), pp. 94-101.
- Bajpai, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry (1999) *Biotechnology Progress*, 15 (2), pp. 147-157.
- Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels (2009) *Progress in Lipid Research*, 48 (6), pp. 355-374
- Blaser, H.-U. Chirality and its implications for the pharmaceutical industry (2013) *Rendiconti Lincei*, 24 (3), pp. 213-216.
- Blondeau, N., Lipsky, R.H., Bourourou, M., Duncan, M.W., Gorelick, P.B., Marini, A.M. Alpha-linolenic acid: An omega-3 fatty acid with neuroprotective properties - Ready for use in the stroke clinic (2015) *BioMed Research International*, art. no. 519830.
- Blondeau, N., Nguemini, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X.Z., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.-C., Marini, A.M.S., Heurteaux, C. Subchronic alpha-linolenic acid treatment

- enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: A versatile potential therapy for stroke (2009) *Neuropsychopharmacology*, 34 (12), pp. 2548-2559.
- Bora, L. Purification and characterization of highly alkaline lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 2465: And study of its detergent compatibility and applicability (2014) *Journal of Surfactants and Detergents*, 17 (5), pp. 889-898.
- Bora, L., Gohain, D., Das, R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases (2013) *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88 (11), pp. 1959-1970.
- Bornscheuer, U.T. Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis (2002) *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (1), pp. 73-81.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways (2004) *Angewandte Chemie - International Edition*, 43 (45), pp. 6032-6040.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations* (2006) Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Borowiecki, P., Paprocki, D., Dranka, M. First chemoenzymatic stereodivergent synthesis of both enantiomers of promethazine and ethopropazine (2014) *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10, pp. 3038-3055.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase (1990) *Nature*, 343 (6260), pp. 767-770.
- Brenna, J.T., Salem Jr., N., Sinclair, A.J., Cunnane, S.C. α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans (2009) *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80 (2-3), pp. 85-91
- Broos, J., Visser, A.J.W.G., Engbersen, J.F.J., Verboom, W., Van Hoek, A., Reinhoudt, D.N. Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility (1995) *Journal of the American Chemical Society*, 117 (51), pp. 12657-12663.

- Brzozowski, A.M., Savage, H., Verma, C.S., Turkenburg, J.P., Lawson, D.M., Svendsen, A., Patkar, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase (2000) *Biochemistry*, 39 (49), pp. 15071-15082.
- Burdge, G.C., Calder, P.C. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults (2005) *Reproduction Nutrition Development*, 45 (5), pp. 581-597.
- Burke, P.A., Griffin, R.G., Klibanov, A.M. Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of solvent dependence of tyrosyl ring motion in an enzyme (1993) *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (1), pp. 87-94.
- Busto, E., Gotor-Fernández, V., Gotor, V. Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis (2010) *Chemical Society Reviews*, 39 (11), pp. 4504-4523.
- Calder, P.C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases (2006) *American Journal of Clinical Nutrition*, 83 (6), pp. 1505S-1519S.
- Camacho Paez, B., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., Esteban Cerdán, L., Molina Grima, E. Kinetics of lipase-catalysed interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids (2003) *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78 (4), pp. 461-470.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., Marty, A. Lipases: An overview (2012) *Methods in Molecular Biology*, 861, pp. 3-30.
- Castellar, M.R., Taipa, M.A., Cabral, J.M.S. Kinetic and stability characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase and its comparison with *Pseudomonas glumae* lipase (1996) *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 61 (3), pp. 299-314.
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.-., Comeau, L.-., Sarda, L. Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 2002;37(7):653-62.
- Chakraborty, K., Paulraj, R. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421 (2009) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9), pp. 3859-3866.
- Cheftel, J.C. y Besancon, P. Introducción a la Bioquímica y a la Tecnología de los Alimentos (1999) Acribia, Zaragoza

- Chen, M.-L., Vali, S.R., Lin, J.-Y., Ju, Y.-H. Synthesis of the structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol from palm oil (2004) *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81 (6), pp. 525-532.
- Chiaradia, V., Paroul, N., Cansian, R.L., Júnior, C.V., Detofol, M.R., Lerin, L.A., Oliveira, J.V., Oliveira, D. Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system (2012) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168 (4), pp. 742-751.
- Chopra, R., Rastogi, N.K., Sambaiah, K. Enrichment of rice bran oil with α -linolenic acid by enzymatic acidolysis: optimization of parameters by response surface methodology (2011) *Food and Bioprocess Technology*, 4 (7), pp. 1153-1163.
- Chopra, R., Sambaiah, K. Effects of rice bran oil enriched with n-3 PUFA on liver and serum lipids in rats (2009) *Lipids*, 44 (1), pp. 37-46.
- Côté, A., Shareck, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2) (2008) *Enzyme and Microbial Technology*, 42 (5), pp. 381-388.
- Criado, M., Hernández-Martín, E., López-Hernández, A., Otero, C. Enzymatic interesterification of olive oil with fully hydrogenated palm oil: Characterization of fats (2008) *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (8), pp. 714-724.
- Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R.J., Schrag, J.D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A.N., Gupta, A.K. A structural basis for the chiral preferences of lipases (1994) *Journal of the American Chemical Society*, 116 (8), pp. 3180-3186.
- Dacaranhe, C.D., Terao, J. Effect of phosphatidic acid and phosphatidylserine on lipid oxidation in beef homogenate during storage and in emulsified sardine oil (2001) *Journal of Food Science*, 66 (3), pp. 422-427.
- De Caterina, R., Madonna, R., Zucchi, R., La Rovere, M.T. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids: From epidemiology to bedside (2003) *American Heart Journal*, 146 (3), pp. 420-430.
- De Gonzalo, G., Brieva, R., Sánchez, V.M., Bayod, M., Gotor, V. Enzymatic resolution of trans-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidines, key intermediates in the synthesis of (-)-Paroxetine (2001) *Journal of Organic Chemistry*, 66 (26), pp. 8947-8953.

- Dhand, C., Solanki, Pratima, R., Sood, K.N., Datta, M., Malhotra, B.D. Polyaniline nanotubes for impedimetric triglyceride detection (2009) *Electrochemistry Communications*, 11 (7), pp. 1482-1486.
- Esteban-Torres, M., Santamaría, L., De las Rivas, B., Muñoz, R. Characterisation of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese ripening (2014) *International Dairy Journal*, 39 (2), pp. 312-315.
- FAO/WHO. The Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. FAO Food and Nutrition Paper 91. (2010) Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.
- Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst (2010) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62 (3-4), pp. 197-212.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N, Petersen, S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach (2000) *Biochimie*, 82 (11), pp. 1033-1041.
- García, T., Sanchez, N., Martinez, M., Aracil, J. Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach (1999) *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (7), pp.
- Gaskin, D.J.H., Romojaro, A., Turner, N.A., Jenkins, J., Vulfson, E.N. Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis (2001) *Biotechnology and Bioengineering*, 73 (6), pp. 433-441.
- Ghamgui, H., Karra-Chaâbouni, M., Gargouri, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system (2004) *Enzyme and Microbial Technology*, 35 (4), pp. 355-363.
- Gilbert, E.J., Drozd, J.W., and Jones, C. W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*. 1991, 137, 2215–2221
- Gillies, B., Yamazaki, H., Armstrong, D.W. Production of flavor esters by immobilized lipase (1987) *Biotechnology Letters*, 9 (10), pp. 709-714.
- González Moreno, P.A., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., Camacho Páez, B., Molina Grima, E. Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: Analysis of three different operation modes (2004) *Biotechnology Progress*, 20 (4), pp. 1044-1052.

- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals (2006) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40 (3-4), pp. 111-120.
- Guizy, M., David, M., Arias, C., Zhang, L., Cofán, M., Ruiz-Gutiérrez, V., Ros, E., Lillo, M.P., Martens, J.R., Valenzuela, C. Modulation of the atrial specific Kv1.5 channel by the n-3 polyunsaturated fatty acid, α -linolenic acid (2008) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44 (2), pp. 323-335.
- Gutiérrez-Ayesta, C., Carelli, A.A., Ferreira, M.L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids (2007) *Enzyme and Microbial Technology*, 41 (1-2), pp. 35-43.
- Halling, P.J. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems (1984) *Enzyme and Microbial Technology*, 6 (11), pp. 513-516.
- Halling, P.J. High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents (1990) *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1040 (2), pp. 225-228.
- Han, J.J., Iwasaki, Y., Yamane, T. Monitoring of lipase-catalyzed transesterification between eicosapentaenoic acid ethyl ester and tricaprilyn by silver ion high-performance liquid chromatography and high-temperature gas chromatography (1999) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (1), pp. 31-39.
- Hasan, F., Shah, A.A., Javed, S., Hameed, A. Enzymes used in detergents: Lipases (2010) *African Journal of Biotechnology*, 9 (31), pp. 4836-4844.
- Hideko, I., Harumi, O., Hiroh, I., Setsuzo, T. Studies on lipase from *Mucor javanicus*. I. Purification and properties (1975) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 388 (3), pp. 413-422.
- Hita, E., Robles, A., Camacho, B., Ramírez, A., Esteban, L., Jiménez, M.J., Muñío, M.M., González, P.A., Molina, E. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases (2007) *Process Biochemistry*, 42 (3), pp. 415-422.
- Hobbs, H.R., Kondor, B., Stephenson, P., Sheldon, R.A., Thomas, N.R., Poliakov, M. Continuous kinetic resolution catalysed by cross-linked enzyme aggregates, 'CLEAs', in supercritical CO₂ (2006) *Green Chemistry*, 8 (9), pp. 816-821.

- Holmquist, M., Martinelle, M., Clausen, I.G., Patkar, S., Svendsen, A., Hult, K. Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase is important for efficient hydrolysis of tributyrin (1994) *Lipids*, 29 (9), pp. 599-603.
- Holmquist, M., Norin, M., Hult, K. The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase (1993) *Lipids*, 28 (8), pp. 721-726.
- Holmquist, M., Tessier, D.C., Cygler, M. Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II (1997) *Biochemistry*, 36 (48), pp. 15019-15025.
- Huang, S., Li, X., Xu, L., Ke, C., Zhang, R., Yan, Y. Protein-coated microcrystals from *Candida rugosa* lipase: its immobilization, characterization, and application in resolution of racemic ibuprofen (2015) *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 12 pp. Article in Press.
- Hult, K., Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications (2007) *Trends in Biotechnology*, 25 (5), pp. 231-238.
- Ikeda, I., Tomari, Y., Sugano, M., Watanabe, S., Nagata, J. Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats (1991) *Lipids*, 26 (5), pp. 369-373.
- Ilyasoglu, H. Production of human fat milk analogue containing α -linolenic acid by solvent-free enzymatic interesterification (2013) *LWT - Food Science and Technology*, 54 (1), pp. 179-185.
- Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T. Two-step enzymatic synthesis of docosaehaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols (2001) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (7), pp. 743-748.
- Isobe, K., Nokihara, K., Yamaguchi, S., Mase, T., Schmid, R.D. Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* (1992) *European Journal of Biochemistry*, 203 (1-2), pp. 233-237.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases (1999) *Annual Review of Microbiology*, 53, pp. 315-351.
- Jennings, B.H., Akoh, C.C. Trans-free plastic shortenings prepared with palm stearin and rice bran oil structured lipid (2010) *JAOCS*,

- Journal of the American Oil Chemists' Society, 87 (4), pp. 411-417.
- Jensen, R.A. Enzyme recruitment in evolution of new function. (1976) Annual Review of Microbiology, 30, pp. 409-425.
- Kapoor, M., Gupta, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications (2012) Process Biochemistry, 47 (4), pp. 555-569.
- Kazlauskas, R.J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis (2005) Current Opinion in Chemical Biology, 9 (2), pp. 195-201.
- Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N.E., Rappaport, A.T., Cuccia, L.A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa* (1991) Journal of Organic Chemistry, 56 (8), pp. 2656-2665.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C., Tawfik, D.S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects (2006) Current Opinion in Chemical Biology, 10 (5), pp. 498-508.
- Kirk, O., Christensen, M.W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin (2002) Organic Process Research and Development, 6 (4), pp. 446-451.
- Lai, O.M., Ghazali, H.M., Chong, C.L. Effect of enzymatic transesterification on the melting points of palm stearin-sunflower oil mixtures (1998) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 75 (7), pp. 881-886.
- Lands, B. Planning primary prevention of coronary disease (2009) Current Atherosclerosis Reports, 11 (4), pp. 272-280.
- Lanser, A.C., Manthey, L.K., Hou, C.T. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein (2002) Current Microbiology, 44 (5), pp. 336-340.
- Leaf, A., Kang, J.X. Dietary n-3 fatty acids in the prevention of lethal cardiac arrhythmias (1997) Current Opinion in Lipidology, 8 (1), pp. 4-6.
- Lima, L.N., Oliveira, G.C., Rojas, M.J., Castro, H.F., Da Rós, P.C.M., Mendes, A.A., Giordano, R.L.C., Tardioli, P.W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems (2015) Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 42 (4), pp. 523-535.

- Liu, Y., Guo, C., Liu, C.-Z. Novel magnetic cross-linked lipase aggregates for improving the resolution of (R,S)-2-octanol (2015) *Chirality*, 27 (3), pp. 199-204.
- Lunn, J., Theobald, H.E. The health effects of dietary unsaturated fatty acids (2006) *Nutrition Bulletin*, 31 (3), pp. 178-224.
- Martinelle, M., Hult, K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B (1995) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1251 (2), pp. 191-197.
- Matsumoto, Y., Kaihatsu, K., Nishino, K., Ogawa, M., Kato, N., Yamaguchi, A. Antibacterial and antifungal activities of new acylated derivatives of epigallocatechin gallate (2012) *Frontiers in Microbiology*, 3 (FEB), art. no. Article 53.
- McLennan, P.L., Bridle, T.M., Abeywardena, M.Y., Charnock, J.S. Dietary lipid modulation of ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey (1992) *American Heart Journal*, 123 (6), pp. 1555-1561.
- Mensink, R.P., Katan, M.B. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: A meta- analysis of 27 trials (1992) *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 12 (8), pp. 911-919.
- Mhetras, N.C., Bastawde, K.B., Gokhale, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207 (2009) *Bioresource Technology*, 100 (3), pp. 1486-1490.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Rivière, M., Carrière, F., De Caro, A., Cambillau, C., Verger, R. Digestive lipases: From three-dimensional structure of physiology (2000) *Biochimie*, 82 (11), pp. 973-986.
- Ming, L.O., Ghazali, H.M., Let, C.C. Effect of enzymatic transesterification on the fluidity of palm stearin-palm kernel olein mixtures (1998) *Food Chemistry*, 63 (2), pp. 155-159.
- Mu, H., Porsgaard, T. The metabolism of structured triacylglycerols (2005) *Progress in Lipid Research*, 44 (6), pp. 430-448.
- Muñío, M.D.M., Robles, A., Esteban, L., González, P.A., Molina, E. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols (2009) *Process Biochemistry*, 44 (7), pp. 723-730.
- Munroe, C., Frantz, D., Martindale, R.G., McClave, S.A. The optimal lipid formulation in enteral feeding in critical illness: Clinical

- update and review of the literature (2011) *Current Gastroenterology Reports*, 13 (4), pp. 368-375.
- Murnaghan, M.F. Effect of fatty acids on the ventricular arrhythmia threshold in the isolated heart of the rabbit (1981) *British Journal of Pharmacology*, 73 (4), pp. 909-915.
- Murty, V.R., Bhat, J., Muniswaran, P.K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review (2002) *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7 (2), pp. 57-66.
- Neves Petersen, M.T., Fojan, P., Petersen, S.B. How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution (2001) *Journal of Biotechnology*, 85 (2), pp. 115-147.
- Nieguth, R., Eckstein, M., Wiemann, L.O., Thum, O., Ansorge-Schumacher, M.B. Enabling industrial biocatalytic processes by application of silicone-coated enzyme preparations (2011) *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353 (13), pp. 2522-2528.
- Nordenstrom, J., Thorne, A., Olivecrona, T. Metabolic effects of infusion of a structured-triglyceride emulsion in healthy subjects (1995) *Nutrition*, 11 (3), pp. 269-274.
- Noureddini, H., Gao, X., Joshi, S., Wagner, P.R. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase by sol-gel entrapment and its application in the hydrolysis of soybean oil (2002) *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (1), pp. 33-40.
- Noureddini, H., Gao, X., Philkana, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil (2005) *Bioresource Technology*, 96 (7), pp. 769-777.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. The α/β hydrolase fold (1992) *Protein Engineering*, 5 (3), pp. 197-211.
- Pacheco, C., Crapiste, G.H., Carrín, M.E. Lipase-catalyzed acidolysis of sunflower oil: Kinetic behavior (2010) *Journal of Food Engineering*, 98 (4), pp. 492-497.
- Palla, C.A., Carrín, M.E. Kinetics modeling of the acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases for production of structured lipids from sunflower oil (2014) *Biochemical Engineering Journal*, 90, pp. 184-194
- Pencreac'h, G., Leullier, M., Baratti, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* (1997) *Biotechnology and Bioengineering*, 56 (2), pp. 181-189.

- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site (1998) *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1-2), pp. 67-80.
- Pleiss, J., Scheib, H., Schmid, R.D. The His gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs (2000) *Biochimie*, 82 (11), pp. 1043-1052.
- Porsgaard, T., Xu, X., Göttische, J., Mu, H. Differences in the intramolecular structure of structured oils do not affect pancreatic lipase activity in vitro or the absorption by rats of (n-3) fatty acids (2005) *Journal of Nutrition*, 135 (7), pp. 1705-1711.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. Lipases at interfaces: A review (2009) *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148 (C), pp. 237-250.
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Fernández-Lafuente, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization (2013) *Chemical Society Reviews*, 42 (15), pp. 6290-6307.
- Rubin, M., Moser, A., Vaserberg, N., Greig, F., Levy, Y., Spivak, H., Ziv, Y., Lelcuk, S. Structured triacylglycerol emulsion, containing both medium- and long-chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: A double-blind randomized cross-over study (2000) *Nutrition*, 16 (2), pp. 95-100.
- Şahin, N., Akoh, C.C., Karaalí, A. Human milk fat substitutes containing omega-3 fatty acids (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (10), pp. 3717-3722.
- Saranya, P., Ramani, K., Sekaran, G. Biocatalytic approach on the treatment of edible oil refinery wastewater (2014) *RSC Advances*, 4 (21), pp. 10680-10692.
- Sarda, L., Desnuelle, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions (1958) *Biochimica et Biophysica Acta*, 159, p. 285.
- Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R.D., Pleiss, J. Blocking the tunnel: Engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity (2002) *Protein Engineering*, 15 (7), pp. 595-601.
- Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K.-E., Puls, M., Eggert, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity (2006) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39 (1-4), pp. 166-170.

- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases (2001) *Biotechnology Advances*, 19 (8), pp. 627-662.
- Shoda, R., Matsueda, K., Yamato, S., Umeda, N. Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: Increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan (1996) *American Journal of Clinical Nutrition*, 63 (5), pp. 741-745.
- Sijben, J.W.C., Calder, P.C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease (2007) *Proceedings of the Nutrition Society*, 66 (2), pp. 237-259.
- Singh, A.K., Mukhopadhyay, M. Immobilization of *Candida antarctica* lipase onto cellulose acetate-coated Fe₂O₃ nanoparticles for glycerolysis of olive oil (2014) *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31 (7), pp. 1225-1232.
- Straarup, E.M., Hoy, C.-E. Structured lipids improve fat absorption in normal and malabsorbing rats (2000) *Journal of Nutrition*, 130 (11), pp. 2802-2808.
- Suresh Kumar, S., Kumar, L., Sahai, V., Gupta, R. A thiol-activated lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Detergent compatibility and presoak formulation for oil removal from soiled cloth at ambient temperature (2009) *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (3), pp. 427-432.
- Swails, W.S., Kenler, A.S., Driscoll, D.F., Demichele, S.J., Babineau, T.J., Utsunamiya, T., Chavali, S., Forse, R.A., Bistrain, B.R. Effect of a fish oil structured lipid-based diet on prostaglandin release from mononuclear cells in cancer patients after surgery (1997) *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 21 (5), pp. 266-274.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica* (1994) *Structure*, 2 (4), pp. 293-308.
- Varela Moreiras, G. (Coord) Libro Blanco de la Nutrición en España (2013) Fundación Española de la Nutrición (FEN), Madrid.
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., Dubreucq, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium (2002) *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (5), pp. 648-655.

- Verger, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts (1997) *Trends in Biotechnology*, 15 (1), pp. 32-38.
- Verma, M.L., Chauhan, G.S., Kanwar, S.S. Enzymatic synthesis of isopropyl myristate using immobilized lipase from *Bacillus cereus* MTCC 8372 (2008) *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55 (3), pp. 327-342.
- Ward, O.P., Fang, J., Li, Z. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid (1997) *Enzyme and Microbial Technology*, 20 (1), pp. 52-56.
- Weber, H.K., Stecher, H., Faber, K. Sensitivity of microbial lipases to acetaldehyde formed by acyl-transfer reactions from vinyl esters (1995) *Biotechnology Letters*, 17 (8), pp. 803-808.
- Weber, H.K., Zuegg, J., Faber, K., Pleiss, J. Molecular reasons for lipase-sensitivity against acetaldehyde (1997) *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 3 (1-4), pp. 131-138.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W. Structure of human pancreatic lipase (1990) *Nature*, 343 (6260), pp. 771-774.
- Wongsakul, S., H-Kittikuna, A., Bornscheuer, U.T. Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Triacylglycerides from 1,3-Diacylglycerides (2004) *JAOCs*, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81 (2), pp. 151-155.
- Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., Xu, X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), pp. 1475-1481.
- Yilmaz, G., Ayar, A., Akin, N. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese (2005) *Journal of Food Engineering*, 69 (3), pp. 269-274.
- Zaks, A., Klibanov, A.M. The effect of water on enzyme action in organic media. (1988) *Journal of Biological Chemistry*, 263 (17), pp. 8017-8021.
- Zhang, H.Y., Wang, X., Ching, C.B., Wu, J.C. Experimental optimization of enzymic kinetic resolution of racemic flurbiprofen (2005) *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42 (1), pp. 67-71.

Abreviaturas

AEE	Agregados enzimáticos entrecruzados
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGL	Ácido graso libre
ALA	Ácido esencial α -linolénico
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO/WHO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FEN	Fundación Española de la Nutrición
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IP	Prueba del índice de peróxidos
L	Ácidos grasos de cadena larga
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
M	Ácidos grasos de cadena media
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SFA	Ácidos grasos saturados
SL	Lípidos estructurados
TS	Triglicéridos estructurados
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Listado de figuras

- Figura 1 Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa en lipasas. Las fechas de color azul (1-8) representan estructuras secundarias en lámina β , y los cilindros de color rojo (A-F) las hélices α de la estructura. Los círculos de color rojo indican la disposición relativa de los aminoácidos de la triada catalítica (Bornscheuer, 2002) 13
- Figura 2 Esquema de la estructura del estereocentro de las lipasas a partir de la correlación entre enantioselectividad y de los sustituyentes de tamaño medio (M) y de gran tamaño (L) Regla de Kazlauskas. (Adaptación de Kazlauskas *et al.*, 1991) 14
- Figura 3 Equilibrio de desplazamiento del “lid” entre las conformaciones cerrada (LC amarillo) y abierta (LA rojo) para la lipasa de *T. lanuginosus* (códigos PDB 1GT6 y 1DT3)..... 15
- Figura 4 Modelo de actuación de las lipasas sobre sustratos agregados. E^{LC}: Enzima conformación cerrada; E^{LC*}: Enzima conformación cerrada adsorbida; E^{LO}: Enzima conformación abierta; S: Sustrato; ES: Complejo enzima-sustrato; P: Producto..... 16
- Figura 5 Mecanismo catalítico de las lipasas. A) Activación de la serina y ataque nucleofílico. B) Formación del acil intermediario y ataque del agua. C) Liberación del resto acilo. (Adaptación de Reis *et al.*, 2009)..... 17

Figura 6	Esquema de la forma y localización de los distintos centros activos y “lid” de las lipasas. RML: Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> ; CRL: Lipasa de <i>C. rugosa</i> ; CALB: Lipasa B de <i>C. antarctica</i> ; AS: Active site. (Gutiérrez-Ayesta <i>et al.</i> , 2007).....	19
Figura 7	Comportamiento cinético en función de la concentración de sustrato de lipasas (izquierda) y estererasas (derecha). CMC: Concentración micelar crítica; Limite de solubilidad (- - -)	22
Figura 8	Hidrólisis de triglicéridos por lipasas 1,3 específicas.....	23
Figura 9	Hidrólisis de triglicéridos por lipasas no específicas.....	24
Figura 10	Esquema del proceso digestivo de los triglicéridos. TG: Triglicéridos; MG: Monoglicéridos; AGL: Ácidos grasos libres.....	38
Figura 11	Destino metabólico preferente de los principales ácidos grasos. ARA: ácido araquidónico; EPA: eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.....	39
Figura 12	Reacciones de oxidación de lípidos (Cheftel y Besancon, 1999)	47

Listado de tablas

Tabla 1	Clasificación de las lipasas en función de las características del centro activo y del “lid” (Pleiss <i>et al.</i> , 1998).....	18
Tabla 2	Principales características de lipasas y esterases. (Adaptación de Bornscheuer, 2002).....	20
Tabla 3	Reacciones generales catalizadas por las lipasas	26
Tabla 4	Posibles reacciones de lipasas en medios orgánicos	28
Tabla 5	Lipasas de origen microbiano	30
Tabla 6	Algunas aplicaciones industriales de las lipasas.....	31
Tabla 7	Aplicaciones de lipasas inmovilizadas en distintos soportes.....	35

**Estudio cinético de
lipasas comerciales
libres e inmovilizadas.
Reacciones de hidrólisis**

**H
CAPÍTULO**

Capítulo II Estudio cinético de lipasas comerciales libres e inmovilizadas. Reacciones de hidrólisis

Resumen	81
1. Introducción	82
1.1. Preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas	82
1.2. Metodologías de evaluación de la actividad lipasa en reacciones de hidrólisis.....	86
2. Objetivos.....	92
3. Materiales y métodos	93
3.1. Preparados enzimáticos.....	93
3.2. Determinación espectrofotométrica de la actividad lipasa	94
3.2.1. Reactivos	94
3.2.2. Determinación de la actividad lipasa mediante un método espectrofotométrico cinético	94
3.2.2.1. Protocolo experimental	94
3.2.2.2. Recta de calibrado	95
3.2.3. Determinación de la actividad lipasa mediante un método espectrofotométrico a punto final	96
3.2.3.1. Protocolo experimental	96
3.2.3.2. Recta de calibrado	97
3.3. Determinación de la actividad lipasa mediante pH-stat	98
3.3.1. Reactivos	98
3.3.2. Protocolo experimental.....	99
4. Resultados y discusión	100
4.1. Desarrollo de un nuevo método espectrofotométrico a punto final	100

4.1.1. Efecto de distintos emulsionantes sobre la actividad lipasa	101
4.1.2. Estudio de la eficiencia de distintos tratamientos físico-químicos en la detención de la actividad lipasa	104
4.2. Estudio cinético la actividad hidrolítica frente a ésteres de <i>p</i> NP	107
4.2.1. Lipasas de la familia <i>Candida antarctica</i> B (CALB)	108
4.2.2. Lipasas de la familia <i>Rhizomucor</i> (RML)	114
4.3. Estudio de la actividad hidrolítica frente a triglicéridos.....	122
5. Conclusiones.....	125
6. Referencias	127
Abreviaturas	135
Listado de figuras	137
Listado de tablas	139

Capítulo II

Estudio cinético de lipasas comerciales libres e inmovilizadas. Reacciones de hidrólisis

Resumen

La versatilidad catalítica de las lipasas hace que no exista un protocolo estándar para la determinación de su actividad. Para la evaluación de la actividad hidrolítica, la medida espectrofotométrica con ésteres de *p*-nitrofenol (*p*NP) y de valoración de productos de reacción (pH-stat) son los más ampliamente utilizados. Las técnicas basadas en *p*NP ésteres son sencillas y rápidas pero, la baja solubilidad de los sustratos, genera una turbidez que interfiere en la medida. En este capítulo se desarrolló una nueva metodología de medida, basada en la solución Marmur (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1). Con este método se procedió a la caracterización de diez preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas, obteniéndose una alta reproducibilidad en los ensayos. Se comprobó también su eficiencia en la detención de la reacción enzimática en comparación con otros procedimientos en los que se aplican reactivos químicos (iones, bases o quelantes) o físicos (tratamientos térmicos). El estudio con distintos emulsionantes determinó que la goma arábica provocaba un efecto más homogéneo y mayores niveles de actividad para todos los preparados enzimáticos, excepto Lipase PS. Para esta lipasa la mezcla de Tritón X-100 (0,4%) y goma arábica (0,1%) era la más efectiva. De los estudios de caracterización se determinó que las enzimas de la familia *Rhizomucor* tenían un comportamiento de “true lipases”, destacando Lipolase por sus altos niveles de actividad. La adición de Tritón modificaba el comportamiento cinético y preferencia por los sustratos de Lipolase, Palatase y Lipozyme RM-IM. En los preparados de la familia CALB se encontraron grandes diferencias; mientras que Novozym 435 se comportaba como una esterasa, Lipase PS, PS-DI y PS-CI actuaban de forma preferente sobre ésteres de cadena larga. Por último, los ensayos de determinación de la actividad hidrolítica frente a triglicéridos, mediante pH-stat, mostraron que la mayor parte de las lipasas objeto de estudio presentaban una mayor preferencia por gliceriltriocanoato.

1. Introducción

En el mercado existe una gran variedad de preparados comerciales de lipasas tanto libres como inmovilizadas con diferentes características. Sus orígenes son muy diversos, y aunque por su fácil producción y gran diversidad la mayor parte provienen de hongos y bacterias, algunas lipasas comercializadas provienen de otros organismos como es el caso de la lipasa pancreática porcina o la lipasa de germen de trigo. Estas lipasas pueden catalizar un gran número de reacciones en la que su especificidad, niveles de actividad y condiciones de reacción varían enormemente (Capítulo I). También la presencia de iones o emulsionantes afectan de forma muy diferente a las distintas lipasas ejerciendo su acción tanto directa, al interaccionar con la propia proteína, como indirectamente sobre los sustratos.

Dada la gran variedad de lipasas disponibles y los comportamientos tan diversos que muestran frente a condiciones y reactivos, se procedió en primer lugar al desarrollo de un método rápido, sencillo y reproducible de evaluación de la actividad hidrolítica. Una vez optimizado el nuevo método de medida, se aplicó en la determinación de los parámetros cinéticos y especificidad de sustrato de los distintos preparados comerciales objeto de estudio.

1.1. Preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas

Se seleccionaron diez de los preparados enzimáticos comerciales libres e inmovilizados más ampliamente descritos en trabajos de investigación y aplicados en procesos industriales en base a su origen, especificidad y características del centro activo (Tabla 1).

Las lipasas de *Penicillium camembertii*, *Mucor javanicus*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger* y *Candida antarctica* B tienen un origen fúngico y, únicamente, la lipasa de *Burkholderia cepacia* tiene un origen bacteriano.

Tabla 1. Relación de preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas.

Organismo	Lipasas	Soporte	Casa comercial
<i>Penicillium camembertii</i>	Lipase G	-	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	-	Amano
<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatase	-	Novozymes
	Lipozyme RM-IM	Resina de intercambio aniónico	Novozymes
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Lipolase	-	Novozymes
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	-	Amano
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435	Resina acrílica macroporosa	Novozymes
<i>Burkholderia cepacia</i>	Lipase PS	-	Amano
	Lipase PS-DI	Tierra diatomeas	Amano
	Lipase PS-CI	Cerámica	Amano

Por otro lado, en función de la estructura de su centro activo estas enzimas se pueden separar en 2 grupos diferenciados. El primero de ellos lo forman aquellas lipasas cuyo centro activo se localiza en una hendidura en la superficie de la proteína característico de la familia de *Rhizomucor* (Capítulo I apdo. 1.1). A este primer grupo pertenecen Lipase A, M, G y Lipolase. Un segundo grupo lo constituyen aquellas enzimas cuyo centro activo tiene una estructura similar a un embudo como la lipasa de *C. antarctica* B o *B. cepacia*.

Hasta el momento la estructura en tres dimensiones de las lipasas de *A. niger* y *M. javanicus* no ha sido resuelta debido a las dificultades que presenta su cristalización. A pesar de esta falta de estudios detallados, en base a estudios bioinformáticos se ha podido simular la estructura tridimensional de la lipasa de *A. niger* y determinar algunos rasgos como es la presencia de “lid”, así como de varios puntos de glicosilación (Shu *et al.*, 2009). Esta lipasa es una enzima extracelular glicosilada con un peso aproximado de 35,5 kDa con especificidad por las posiciones 1 y 3 del triglicérido (Namboodiri y Chattopadhyaya, 2000). La lipasa de *M. javanicus* tiene un peso molecular de 21 kDa y al igual que la lipasas de *A. niger* es 1,3 regioselectiva (Hideko *et al.*, 1975).

Los estudios de las secuencias y de la estructura 3D enmarcan a la lipasa de *P. camembertii* dentro de la familia de *Rhizomucor*. Esta enzima presenta una alta homología en la secuencia con la lipasa de *T. lanuginosus* a pesar de lo cual, algunas de sus características bioquímicas como es la termoestabilidad son muy diferentes de ésta (Li y Zong, 2010). Está formada por una sola cadena polipeptídica de 276 aminoácidos, con 2 puentes disulfuro muy conservados. De forma generalizada se indica que esta enzima posee una alta 1,3 regioselectividad actuando de forma preferente sobre ácidos grasos de cadena larga (Yamaguchi y Mase, 1991). Algunas cepas de este hongo como la U-150 presentan una preferencia especial dado que es capaz de actuar frente a mono y diglicéridos pero no sobre triglicéridos (Isobe *et al.*, 1992).

Las lipasas de *R. miehei* y de *T. lanuginosus* son dos de las lipasas más empleadas y mejor caracterizadas del mercado. La lipasa de *R. miehei* o RML (antes denominada *Mucor miehei*) es una enzima extracelular de 31 kDa, cuyo punto isoeléctrico es de 3,8 y que posee 3 enlaces disulfuro que en su presentación comercial está expresada en *A. oryzae* (Rodrigues y Fernández-Lafuente, 2010). La proteína presenta un “lid” helicoidal formado por 15 aminoácidos que regulan el acceso al centro activo. RML

posee una regioselectividad moderada, atacando preferentemente las posiciones 1 y 3, esterificadas con ácidos grasos de cadena media (Pleiss *et al.*, 1998; Vaysse *et al.*, 2002; Nalder *et al.*, 2014). Una de las formas inmovilizadas comercializadas de la lipasa de *Rhizomucor*, Lipozyme RM-IM, tienen como soporte la resina insoluble Duolite. Este soporte es un copolímero de estireno y divinil benceno funcionalizado con amonio cuaternario que actúa como un intercambiador aniónico.

La lipasa B de *C. antarctica* (CALB) posee un centro activo más estrecho y profundo que el de otras lipasas donde el “lid” lo constituye una hélice corta que no cubre la entrada al centro activo por lo que esta enzima no exhibe activación interfacial (Trodler y Pleiss, 2008). El lugar de unión al sustrato se localiza en la parte inferior de una estructura abrupta con forma de embudo elíptico en el que la serina catalíticamente activa se dispone en la parte inferior en una estructura estrecha y profunda de unos 9,5x4,5 Å de anchura y 12 de profundidad (Uppenberg *et al.*, 1994). CALB es una enzima más activa frente a ácidos grasos de cadena corta de forma que su actividad decrece conforme aumenta la longitud de la cadena carbonada (Pleiss *et al.*, 1998). El incremento en el tamaño del sustrato dificulta el ajuste óptimo de los sustratos debido a los impedimentos estéricos lo que reduce la probabilidad de formación de los productos. En este estudio se empleó la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa (Novozym 435). El soporte empleado es una resina polimérica hidrofóbica denominada Lewatit VP OC 1600 que algunos estudios indican que puede alterar la selectividad respecto a la inmovilización sobre otros soportes hidrofóbicos (Cabrera *et al.*, 2009).

Inicialmente el microorganismo de origen de Lipase PS fue clasificado como *Pseudomonas cepacia* pero posteriormente, esta bacteria fue reasignada al género *Burkholderia*, por lo que en algunos artículos aparece referenciadas con esta antigua denominación. La lipasa de *B. cepacia* pertenece al grupo I.2 de la

familia de las *Pseudomonas*, grupo que comparte una similaridad alta en su secuencia de aminoácidos y en su estructura tridimensional (código PDB:3LIP) (Messaoudi *et al.*, 2010). Al igual que CALB, la serina de la triada catalítica se localiza en la parte inferior del centro activo en forma de embudo aunque en *Burkholderia* la anchura es mayor. Los aminoácidos alrededor del centro activo que forman las paredes de esta estructura son principalmente hidrofóbicos. En la parte derecha aparece el “lid” de gran tamaño (unos 40 residuos) y formado por un motivo hélice-giro-hélice (Schrag *et al.*, 1997; Barbe *et al.*, 2009). Esta enzima posee muchos rasgos comunes con otras enzimas del mismo grupo como es la existencia de un centro de unión para el calcio. Aunque existen algunas divergencias en cuanto a las preferencias de esta enzima, Lipase PS está considerada como una enzima no regioselectiva y con una marcada actividad lipasa principalmente frente a ésteres de cadena larga (Lanser *et al.*, 2002; Vaysse *et al.*, 2002). En este trabajo, se ha estudiado esta enzima tanto en forma libre como inmovilizada sobre tierras diatomeas y polvo de cerámica. La tierra diatomea o Celite, es un soporte muy adecuado para la inmovilización dado que es un material inerte altamente poroso compuesto principalmente por óxido de silicio (SiO_2) y otros óxidos inorgánicos al que las enzimas se pueden anclar fácilmente por adsorción (Chang *et al.*, 2007). Los soportes cerámicos son materiales microporosos con morfología esférica en cuyo centro aparece una cavidad con una elevada resistencia química a los solventes orgánicos (Osuna y Rivero, 2012).

1.2. Metodologías de evaluación de la actividad lipasa en reacciones de hidrólisis

La obtención de datos cuantitativos fiables es esencial para comparar la actividad lipasa de los distintos preparados enzimáticos, pero hay que ser cuidadoso a la hora de analizar los resultados dado que existe una gran diversidad de métodos de

medida. La variedad de reacciones que las lipasas pueden llevar a cabo y los sustratos sobre los que actúan hace que no exista un protocolo estándar para la determinación de la actividad lipasa. En la Tabla 2 se incluye una relación de las diferentes metodologías empleadas para evaluar la actividad de estas enzimas.

Tabla 2. Métodos de evaluación de la actividad lipasa.

Reacción	Medio	Sustrato	Método
Hidrólisis	Acuoso	Triglicéridos	Valoración (pH stat)
		Ésteres de <i>p</i> NP	Espectrofotométrico
Esterificación	Orgánico	Acilgliceroles	Valoración
	“Free-solvent”		
	Fluidos supercríticos		
Resolución de mezclas racémicas	Acuoso	Mezcla de isómero ópticos	Cromatografía (GC/HPLC)
	Orgánico		

En función del objetivo del estudio se emplean distintas metodologías, siendo las basadas en técnicas espectrofotométricas o de valoración de productos de reacción (pH-stat) los más ampliamente utilizados en reacciones de hidrólisis. La metodología de **pH-stat** se basa en la valoración continua de los ácidos grasos liberados en la hidrólisis de los triglicéridos mediante su neutralización con una base como NaOH (Gupta *et al.*, 2003). Como alternativa al empleo de triglicéridos puros se emplea aceite de oliva como sustrato debido al menor coste. Sin embargo, esta metodología tiene una serie de inconvenientes que hacen que no se pueda llevar a cabo en determinadas condiciones. Estos ensayos pueden tener una buena sensibilidad, sin embargo a pHs menores de 7 la ionización parcial de los ácidos grasos libres reduce mucho la precisión llegando a resultar inviable su

utilización. Los problemas de sensibilidad son considerablemente importantes cuando los niveles iniciales de actividad son bajos lo que hace que en estudios cinéticos para la determinación de las constantes michaelianas el uso de estos ensayos conlleve un error experimental relativamente alto (Martín *et al.*, 1994). Otra de las desventajas que presenta esta metodología es el excesivo tiempo que lleva la realización, lo que hace que no sea un método útil si se ha de trabajar con un número elevado de muestras. A este respecto, la cuantificación espectrofotométrica es una de las alternativas más ampliamente implantadas debido a la simplicidad y rapidez.

En la **medida espectrofotométrica** una de las alternativas más utilizada es la cuantificación de la actividad usando como sustrato **ésteres de *p*-nitrofenol (*p*NP)**. Los ésteres de cadena corta como el *p*NP-butirato (*p*NPB), se emplean para la determinación de la actividad esterasa, mientras que los de mayor longitud como el *p*NP-palmitato (*p*NPP) son sustratos para la actividad lipasa. El *p*NP es una molécula incolora cuando se encuentra esterificada pero en su forma libre posee un color amarillo a pH alcalino con un máximo de absorción a 410 nm que permite monitorizar su liberación como resultado de la acción de la enzima.

La medida espectrofotométrica mediante **ensayos cinéticos** se ve limitada por las interferencias debidas a la turbidez del medio. La solubilidad de los sustratos depende en gran medida de la longitud del ácido graso de los *p*NP-ésteres. En la determinación de las constantes michaelianas, se observó que los ésteres de cadena corta eran solubles en el medio de reacción, mientras que el bajo límite de solubilidad del *p*NP-palmitato y *p*NP-decanoato (*p*NPD) interfería en la medida dando lugar a una gran dispersión en los resultados con una baja reproducibilidad (Pencreac'h *et al.*, 1997; Palacios *et al.*, 2014).

La realización de **ensayos a punto final** supone una ventaja en cuanto al número de muestras que se pueden analizar y el mayor

rango de concentraciones de estudio. No obstante, en este tipo de ensayos resulta esencial ser capaz de bloquear la actividad de la enzima para evitar el incremento de la intensidad en el color una vez finalizada la reacción. En la literatura han sido descritas diferentes estrategias para detener la actividad lipasa después de finalizado el tiempo de incubación. Estos ensayos a punto final se basan en la adición de reactivos como trishidroxiaminometano, NaOH, 1-propanol, Na₂CO₃, ZnSO₄, o tratamientos térmicos como inmersión en hielo o calentamiento.

Adicionalmente, las lipasas tienen en común que su acción tiene lugar en la interfase entre el medio acuoso y el sustrato hidrófobo por lo que su actividad depende de la concentración interfacial del sustrato. La acción de las lipasas es, por tanto, muy dependiente de la presentación en la que se encuentra el sustrato, y de la calidad de la interfase. Esta particularidad supone una complicación a la hora de estudiar las constantes cinéticas de la forma en la que lo hace la enzimología clásica basada en el empleo de sustratos solubles. Es necesaria la formación de **interfases homogéneas** que minimicen los problemas derivados de la heterogeneidad en la presentación del sustrato (Verger, 1997).

Para la solubilización en el medio acuoso de los sustratos hidrofóbicos de las lipasas es frecuente el uso de detergentes y surfactantes. En presencia de detergentes como Tritón X-100 las vesículas lipídicas forman agregados Tritón-lípido que en exceso del detergente frecuentemente forman micelas. Estas son bastante más pequeñas que las vesículas por lo que los lípidos incorporados en las micelas mezcla se considera que están solubilizados por el detergente (London y Brown, 2000).

La presencia de emulsionantes y surfactantes en el medio de reacción puede afectar de forma significativa a la actividad de las lipasas. Su acción se ejerce tanto al actuar directamente sobre la propia enzima o, como ya se ha indicado, a través de los cambios que provoca en la forma en la que se presentan los sustratos y, por

tanto, en la forma en la que interaccionan con la enzima (Biasutti *et al.*, 2008). Su acción directa es muy dependiente de la naturaleza del emulsionante y de la enzima, lo que da lugar a que sus efectos vayan desde un incremento de la actividad hasta la completa inhibición de la enzima.

Uno de los mecanismos por los que los emulsionantes actúan directamente sobre las lipasas es la modificación del equilibrio entre las conformaciones al estabilizar la forma abierta. Algunos emulsionantes pueden incrementar la actividad de las lipasas debido a que son capaces de romper los agregados lipasa-lipasa (Palomo *et al.*, 2003). Aunque de forma general los emulsionantes empleados se cree que no presentan efectos negativos sobre la estabilidad de la enzima, potencialmente existe el riesgo de que este tipo de aditivos provoque la desnaturalización proteica y por tanto una pérdida de la actividad (Castro-Ochoa *et al.*, 2005). La unión de la enzima al detergente puede inducir la exposición de zonas hidrofóbicas que inicialmente se encontraban en la parte interna de la estructura provocando la desnaturalización proteica. Por otro lado, la estructura de algunos emulsionantes hace que puedan dar lugar a una inhibición de la enzima por competición con el sustrato por el centro activo (Reis *et al.*, 2009).

La goma arábica es un emulsionante sistemáticamente utilizado en la medida de la actividad lipasa con triglicéridos de cadena larga y media. Su uso se encuentra altamente extendido debido a que es un agente estabilizante de las emulsiones que se asume que no interfiere en el ensayo (Zhao *et al.*, 2008; Brabcová *et al.*, 2010).

En la Tabla 3 se incluye una relación de condiciones de reacción empleando *p*NP-palmitato donde se puede apreciar la enorme diversidad de metodologías de detención y condiciones de reacción (emulsionantes, pH, T y t).

Tabla 3. Revisión de las distintas técnicas/agentes de detección empleadas en los ensayos enzimáticos de lipasas a punto final usando *p*NP-palmitato como sustrato.

Agente emulsionante	Condiciones de reacción (pH, T, t)	Método de detención de la reacción	Referencias
Tritón X-100 y goma arábica	6,5; 40 °C; 5 min	2% THAM ^b (1:1) ^a	Mayordomo <i>et al.</i> (2000)
Tritón X-100	7,0; 37 °C; 1 h	1-propanol (1:1) ^a	Yang <i>et al.</i> (2002)
Ninguno	4,4-9,2; 20-55 °C; 5 min	0,25 M Na ₂ CO ₃ (1:1) ^a	Chiou y Wu (2004) Ye <i>et al.</i> (2005) Ozmen <i>et al.</i> (2009) Huang <i>et al.</i> (2009)
Ninguno	5,0-7,5; 20-55 °C; 15 min	0,25 M Na ₂ CO ₃ (2.5:1) ^a	Ozyilmaz (2009)
Tritón X-100 y goma arábica	5; 0-9,5; 30-70 °C; 5 min	0,25 M Na ₂ CO ₃ (1:1) ^a	Ozcan <i>et al.</i> (2009)
Tritón X-100 y goma arábica	7,0; 37 °C; 5 min	0,10 M Na ₂ CO ₃ (volumen sin especificar)	Yi <i>et al.</i> (2009)
Tritón X-100	8,0; 55 °C; 30 min	0,1 M ZnSO ₄ (1:40) ^a en hielo 5 min	Yoo <i>et al.</i> (2011)
Ninguno	7.5; 35 °C, 5 min	Etanol 96% (1:10) ^a	Hlavsová <i>et al.</i> (2009)
Tritón X-100 y goma arábica	8,0; 37-60 °C; 10 min	Introducir el tubo de reacción en hielo	Singh <i>et al.</i> (2009) Ji <i>et al.</i> (2009)
Deoxicolato de sodio y goma arábica	8,0; 37 °C; 15 min	No especifica	Gopinath <i>et al.</i> (2002) Salihu <i>et al.</i> (2011)
Tritón X-100 y goma arábica	8,5; 55 °C; 10 min	No especifica	Pahujani <i>et al.</i> (2008)
Ninguno	8,5; 45 °C; 20 min	Etanol:acetona (1:1) 1 ml en frío	Kanwar <i>et al.</i> (2005)

^a Ratio del agente de detención:Volumen del medio de reacción

^b THAM: Trishidroxiaminometano

2. Objetivos

El objetivo de este capítulo se centró en el estudio de la capacidad hidrolítica y caracterización bioquímica de distintas lipasas comerciales para su selección y posterior aplicación en la síntesis enzimática de lípidos estructurados (Capítulo III) y de monoglicéridos (Capítulo IV). Para ello, se fijaron los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar una nueva metodología de medida espectrofotométrica de la actividad hidrolítica reproducible, rápida y sencilla.
 - Determinar el efecto de distintos emulsionantes sobre la actividad hidrolítica de lipasas con distinto origen y estructura.
 - Comparar la efectividad de la nueva metodología a punto final, desarrollada en este trabajo, frente a otros procedimientos (reactivos químicos y tratamiento térmico) de detención de la actividad enzimática.
2. Caracterizar diferentes preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas en base a sus niveles de actividad hidrolítica y especificidad de sustrato.
 - Determinar los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) y la eficacia catalítica con sustratos artificiales (*p*NP ésteres).
 - Determinar la actividad hidrolítica frente a triglicéridos (aceites comerciales).

3. Materiales y métodos

3.1. Preparados enzimáticos

En las Tablas 4 y 5 se indican las concentraciones (enzimas libres) y cantidades (enzimas inmovilizadas) empleadas en los diferentes ensayos de hidrólisis, respectivamente el origen y casa comercial de estas lipasas ha sido previamente detallado en la Tabla 1. Las disoluciones enzimáticas se prepararon en los medios de reacción R.1 de los ensayos espectrofotométricos y del método de valoración pH-stat respectivamente.

Tabla 4. Concentración de enzima (mg/ml) de lipasas libres en los ensayos de determinación de la actividad hidrolítica.

Lipasa (mg/ml)	Ensayo cinético		Ensayo a punto final		pH-stat
	Goma	Goma + Tritón	Goma	Goma + Tritón	
Lipase G	30,00	--	15,00	--	25,00
Lipase M	0,60	--	1,50	--	25,00
Palatase	1,20	1,20	5,80	5,80	11,60
Lipolase	0,02	4,00	0,04	48,00	0,002
Lipase A	5,00	--	1,50	--	25,00
Lipase PS	0,03	0,05	0,06	0,06	2,00

Tabla 5. Cantidad de enzima (mg) de lipasas inmovilizadas en los ensayos de determinación de la actividad hidrolítica.

Lipasa (mg)	Ensayo cinético		Ensayo a punto final		pH-stat
	Goma	Goma + Tritón	Goma	Goma + Tritón	
Lipozyme RM-IM	5,00	30,00	2,00	20,00	30,00
Novozym 435	2,50	0,25	10,00	10,00	50,00
Lipase PS-DI	0,05	0,05	0,05	0,05	5,00
Lipase PS-CI	0,25	0,10	0,25	0,25	3,50

3.2. Determinación espectrofotométrica de la actividad lipasa

La base de esta metodología es la cuantificación espectrofotométrica a 410 nm de la cantidad de *p*-nitrofenol liberado como resultado de la acción de la lipasa sobre *p*-nitrofenil ésteres.

3.2.1. Reactivos

- R.1 Tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, conteniendo 0,1% (w/v) de goma arábica: mezclar 250 ml de una disolución de trishidroxiaminometano (THAM) 0,2 M, con 279 ml de una disolución de HCl 0,1 M. Añadir 0,1% (w/v) de goma arábica. En los ensayos que lo requieran se adicionará un 0,4% (w/v) de Tritón X-100. Ajustar a pH 8,0. Enrasar a 1 l con agua miliQ.
- R.2 *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato y *p*-nitrofenil palmitato: pesar la cantidad de *p*NP éster (Sigma-Aldrich) correspondiente para cada ensayo y disolver 2-propanol para obtener una rango de concentraciones de entre 0,1 mM y 4 mM en el volumen final de reacción.
- R.3 Solución patrón de *p*-nitrofenol 1000 ppm: pesar 100 mg de *p*-nitrofenol, disolver en tampón Tris-HCl (R.1) y enrasar a 100 ml.
- R.4 Disolución de cloroformo y alcohol isoamílico (Marmur) (24:1): añadir 10 ml de alcohol isoamílico en un matraz aforado y enrasar hasta 250 ml con cloroformo.

3.2.2. Determinación de la actividad lipasa mediante un método espectrofotométrico cinético

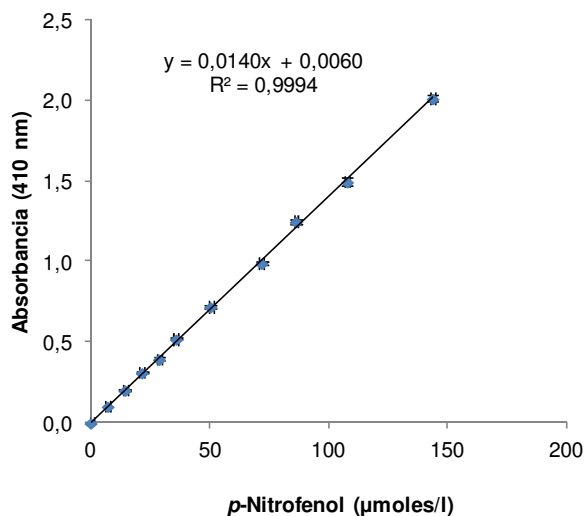
3.2.2.1. Protocolo experimental

La actividad hidrolítica de las lipasas mediante un método cinético se midió en emulsiones de *p*NPB. Para las enzimas libres,

se mezclaron 3,5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1) en el que se mezclaba 0,1 ml de la disolución enzimática a la concentración indicada (Tabla 4). Para las enzimas inmovilizadas, en un volumen de 3,6 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1) se adicionó la cantidad de cada preparado comercial indicada en la Tabla 5. Esta mezcla se calentaba en baño termostatzado a 40 °C con agitación a 240 rpm (NewBrunswick Scientific) durante 2 min para alcanzar un pre-equilibrio. La reacción se iniciaba mediante la adición de 0,4 ml de una solución de *p*NPB (R.2) en 2-propanol, midiendo la absorbancia a 410 nm de forma continua durante 5 min en un espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpec™ Plus). La actividad se calculaba a partir de la pendiente de la recta (absorbancia frente a tiempo) empleando únicamente el tramo lineal de la misma. Para cada muestra, el ensayo se realizó por triplicado incluyendo un duplicado de los correspondientes blancos sin adicionar enzima. Una unidad de actividad (U) se definía como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de *p*NP por minuto en las condiciones descritas anteriormente.

3.2.2.2. Recta de calibrado

La recta de calibrado se realizó a partir de una solución estándar de *p*-nitrofenol 1000 ppm (R.3). A partir de ésta se prepararon diluciones para obtener concentraciones entre 0 y 150 μmoles/l de *p*-nitrofenol en matraces de 10 ml que se enrasaban con tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1) (Figura 1). Cada concentración de *p*-nitrofenol se realizó por triplicado midiendo la absorbancia (ABS) a 410 nm. En todos los casos la desviación entre las réplicas fue menor al 1%.



[pNP] ($\mu\text{moles/l}$)	ABS (410 nm)
0	0,000
7	0,104
14	0,204
22	0,312
29	0,395
36	0,520
50	0,721
72	0,991
86	1,248
108	1,495
144	2,011

Figura 1. Recta de calibrado de *p*-nitrofenol.

3.2.3. Determinación de la actividad lipasa mediante un método espectrofotométrico a punto final

3.2.3.1. Protocolo experimental

La actividad hidrolítica de la lipasa mediante un método a punto final se midió en emulsiones de *p*NPP y *p*NPD. Para las enzimas libres, el ensayo se realizó en un volumen de 3,5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1) en el que se mezclaba 0,1 ml de la disolución enzimática (Tabla 4). Para las enzimas inmovilizadas, un volumen de 3,6 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1) se mezclaba con la cantidad correspondiente de cada preparado comercial (Tabla 5). Esta mezcla se calentaba en baño termostatzado a 40 °C con agitación a 240 rpm (NewBrunswick Scientific) durante 2 min para alcanzar un pre-equilibrio. La reacción se iniciaba mediante la adición de 0,4 ml de una solución del sustrato (*p*NPP/*p*NPD) (R.2) en 2-propanol. Transcurridos los 5 min de tiempo de reacción, se añadían 1,5 ml de solución Marmur (R.4) y se enfriaban en hielo para detener la reacción enzimática. A continuación, se centrifugaban las muestras a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada

(Beckman). Finalmente, en el sobrenadante obtenido se evaluaba la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpec™ Plus). Para cada muestra el ensayo se realizó por triplicado incluyendo un duplicado de los correspondientes blancos en los que el ensayo se realizaba sin adicionar enzima. Una unidad de actividad (U) se definía como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de *p*NP por minuto en las condiciones descritas anteriormente.

3.2.3.2. Recta de calibrado

La recta de calibrado se realizó a partir de una solución estándar de *p*-nitrofenol 1000 ppm (R.3), de la que se prepararon diluciones por triplicado para obtener concentraciones entre 0 y 323 μmoles/l de *p*-nitrofenol en matraces de 10 ml que se enrasaban con tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (R.1). Posteriormente, se añadían 4 ml de cada dilución y 1,5 ml de Marmur (R.5) en un tubo de ensayo y se centrifugaba a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Finalmente, se medía la absorbancia a 410 nm en el sobrenadante (Figura 2).

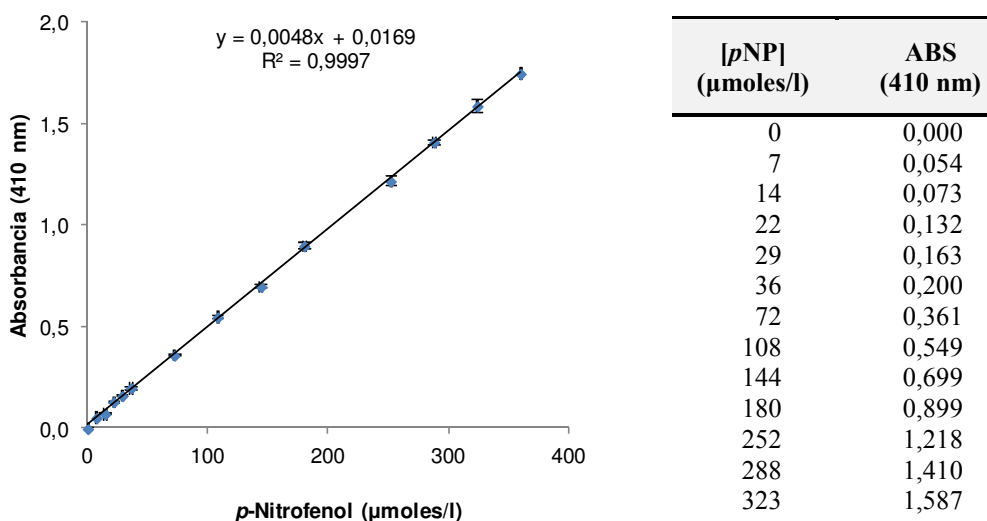


Figura 2. Recta de calibrado de *p*-nitrofenol tratado con la solución Marmur.

3.3. Determinación de la actividad lipasa mediante pH-stat

Esta metodología se basaba en la velocidad con la que una enzima es capaz de hidrolizar los triglicéridos a pH 8 liberando ácidos grasos como producto de la reacción. Los ácidos grasos libres formados se valoraban con una solución de hidróxido de sodio y su consumo se registraba en función del tiempo.

3.3.1. Reactivos

- R.1 Tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 con 2% de goma arábica y 0,3% de CaCl_2 : mezclar 250 ml de una disolución de trishidroximetilaminometano 0,2 M, con 279 ml de una disolución de HCl 0,1 M. Añadir 20 g goma arábica y 0,2 ml de CaCl_2 al 22%. Ajustar a pH 8,0. Enrasar a 1 l con agua miliQ.
- R.2 CaCl_2 al 22%: pesar 22 g de CaCl_2 , disolver en 50 ml agua miliQ y enrasar a 100 ml.
- R.3 Solución valorante de NaOH 0,05 N: pesar 2 g de NaOH y disolver en un litro de agua miliQ. Esta solución debe ser normalizada mediante su valoración por triplicado con ftalato ácido de potasio como patrón primario.
- R.4 Ftalato ácido de potasio (0,05 M): pesar 1,0211 g de ftalato ácido de potasio, disolver en 50 ml con agua miliQ y enrasar a 100 ml.
- R.5 Emulsión de sustratos: pesar la cantidad de triglicérido (gliceriltriocanoato, gliceriltridecanoato y gliceriltrioleato) o aceite comercial de consumo alimenticio (soja, girasol, oliva y lino) correspondiente para cada ensayo y añadir tampón de reacción hasta 28,1 ml. Homogenizar (Ultraturrax) a 12000 rpm durante 1,5 min hasta conseguir una emulsión estable.

3.3.2. Protocolo experimental

La actividad hidrolítica se midió usando como sustrato distintas emulsiones de triglicéridos así como aceites comerciales (R.5) siguiendo el protocolo descrito por Soumanou *et al.* (1997) con ligeras modificaciones en los volúmenes de reacción. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 30 ml de la emulsión de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 con un 2% de goma arábiga (R.1) junto con la cantidad requerida de sustrato (R.5) para obtener un rango de concentraciones entre 1 y 40 mM. La emulsión obtenida era mantenida en agitación constante en el vaso de reacción termostatzado mientras era precalentada a 40 °C durante 5 min, transcurrido el cual se adicionaban 0,4 ml de la solución de CaCl₂ (R.2) y se reajustaba el pH a 8. La reacción se iniciaba mediante la adición de 1 ml de la solución de enzima libre (Tabla 4), y en caso de ser un preparado comercial inmovilizado se añadía la cantidad indicada en la Tabla 5.

Los ácidos grasos liberados por la acción de la lipasa se cuantificaba mediante la valoración con NaOH 0,05 N (R.3) utilizando un valorador automático (Titrino 801 Metrohm) manteniendo un pH constante de 8. A partir de la pendiente de la recta de valoración (ml de NaOH frente a tiempo) se determina la actividad de la enzima según se indica en la siguiente ecuación.

$$U/g \text{ de enzima} = \frac{\text{pendiente} * \text{normalidad} * 60 * 1000}{\text{Volumen E (ml)} * \text{Concentración de E (mg/ml)}}$$

Las unidades de actividad enzimática (U) vienen expresadas como la cantidad enzima que libera 1 μmol de ácido graso libre por minuto en las condiciones de ensayo especificadas.

4. Resultados y discusión

4.1. Desarrollo de un nuevo método espectrofotométrico a punto final

En el estudio de las lipasas, determinar la capacidad hidrolítica es un aspecto importante a la hora de caracterizar un preparado enzimático. Para ello, es necesario disponer de una metodología de medida reproducible que permita la modificación de algunas de las condiciones de reacción como temperatura, pH o tiempo. En bibliografía se describen una gran variedad de metodologías diferenciadas, siendo los métodos espectrofotométricos basados en el uso de *p*NP-ésteres una de las más empleadas por su simplicidad y rapidez. No obstante, la turbidez del medio debida a los problemas de solubilidad de los sustratos de mayor longitud de cadena supone una de las grandes limitaciones. Para superar este inconveniente se ha propuesto, en este trabajo, el empleo de una nueva metodología de medida basada en el empleo de la solución Marmur, una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) capaz de detener la reacción y eliminar la turbidez del medio de reacción.

Para la evaluación de la actividad hidrolítica de lipasas con *p*NP-ésteres es imprescindible incluir en la mezcla de reacción un agente emulsionante que asegure una buena dispersión de los sustratos. A este respecto, se procedió, en primer lugar, al estudio del efecto de diferentes emulsionantes y mezclas de emulsionantes sobre la actividad enzimática aplicando la solución Marmur. Una vez, seleccionado/s el/los emulsionantes más efectivos, se comparó la eficacia del nuevo método espectrofotométrico a punto final con otros procedimientos físico-químicos de la detención de la actividad enzimática.

4.1.1. Efecto de distintos emulsionantes sobre la actividad lipasa

Múltiples estudios indican que dependiendo del origen de la lipasa, la adición de emulsionantes tiene unos efectos muy diversos sobre la actividad enzimática, esto hace necesario determinar que emulsionante resulta más apropiado para cada enzima en particular. Los efectos de los diferentes emulsionantes sobre la actividad enzimática son dependientes de su naturaleza y sus propiedades físicas (Mine *et al.*, 2000; Mine *et al.*, 2001). Por ello, se seleccionaron siete emulsionantes de los más utilizados en la bibliografía revisada. Se ensayó de forma individual el efecto de goma arábica, Tritón X-100, SDS (dodecilsulfato de sodio), Tween 80 y colato de sodio, así como la mezcla de goma arábica y Tritón X-100 (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de distintos emulsionantes sobre la actividad hidrolítica de lipasas de distinto origen.

Emulsionantes	Actividad relativa (%) ^a					
	Lipolase	Lipase PS	Lipase M	Lipase A	Palatase	Lipase G
Goma arábica 0,1%	100±2,5	59,3±1,0	100±1,2	100± 2,2	100± 1,0	100± 1,8
Tritón 0,4% + goma 0,1%	0,1±0,0	100±3,0	0,3±0,23	0,0 ± 0,0	19,2± 0,6	16,2± 4,0
Tritón 0,1% + goma 0,1%	0,7±0,3	76,7±2,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,8±0,1	0,0 ± 0,0
Tritón 0,1%	0,0±0,0	50,2±0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,4± 0,3	0,0 ± 0,0
Colato de sodio 0,1%	37,4±1,2	22,3±0,7	46,5± 0,8	0,8± 0,8	70,5± 2.1	63,9± 5,5
SDS 0,1%	21,0±0,9	30,5±0,2	59,4± 2,1	0,0 ± 0,0	13,5± 0,3	0,0 ± 0,0
Tween 80 0,1%	0,0 ± 0,0	19,9±0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	17,9± 0,7	0,0 ± 0,0

^a 100%: máxima actividad obtenida para cada preparado enzimático

En los resultados recogidos en la Tabla 6 se confirma el distinto efecto de los emulsionantes según la enzima. Las actividades de Lipolase, Lipase M y Lipase G se encontraban muy

reducidas o totalmente inhibidas por la mayor parte de los emulsionantes empleados. Un caso especial es el de Lipase A dado que no se detectaron niveles de actividad apreciables con ninguno de los emulsionantes salvo en presencia de **goma arábica**. Por contra, Lipase PS resulta ser especialmente tolerante al efecto de los distintos emulsionantes empleados.

La adición de **Tritón X-100** como agente emulsionante ejercía un efecto claramente negativo sobre la actividad de las enzimas de *A. niger* (Lipase A), *T. lanuginosus* (Lipolase), *M. javanicus* (Lipase M) y *P. camembertii* (Lipase G) inhibiéndolas por completo (Tabla 6). En el caso de la lipasa de *B. cepacia* (Lipase PS) y *R. miehei* (Palatase), este tensioactivo provocaba un importante efecto sobre los niveles de actividad con una reducción del 49,8 y 95,6%, respectivamente. Este efecto negativo del Tritón X-100 se veía reducido si en el medio de reacción se añadía una pequeña cantidad de goma arábica, por lo que este emulsionante parecía presentar un efecto protector frente a las consecuencias negativas del empleo de Tritón. Algunos autores indican que la goma arábica puede retrasar la formación de micelas lo que hace que la concentración micelar crítica (CMC) con Tritón sea más alta y por eso aumente la actividad (Acharya y Madhusudhana, 2002). Si el Tritón X-100 se adiciona a una concentración muy superior a la CMC éste puede recubrir el sustrato de forma muy intensa y debido a esta encapsulación quedar inaccesible para la enzima (Lai y O'Connor, 2000).

Estos resultados muestran una aparente discrepancia con otros trabajos que sugieren una activación por este detergente (Fernández-Lorente *et al.*, 2007). Otras investigaciones indican que un rasgo general de los surfactantes es que el efecto activador es dependiente de la concentración empleada y, una vez superado un valor alrededor de la CMC, estos mismos compuestos provocan la inhibición de la enzima (Helistö y Korpela, 1998; Mogensen *et al.*, 2005). Las concentraciones a las que los detergentes pasan de ser activadores a ser inhibidores dependen del compuesto y la

enzima, así como del sustrato empleado en el ensayo (Fernández-Lorente *et al.*, 2007). Las concentraciones a las cuales se realizaron los ensayos de ésta Tesis doctoral, exceden la CMC del Tritón X-100 que es del 0,015%, por lo que se confirmaría el efecto inhibitor a altas concentraciones encontrado por otros autores (Helistö y Korpela, 1998).

De los emulsionantes ensayados el detergente **Tween-80** era el que tenía los efectos más negativos, produciendo la total inhibición de todas las enzimas excepto de Palatase y Lipase PS que veían reducida su actividad a un 17,9 y 19,9%, respectivamente.

El **SDS** es otro detergente que reducía de forma significativa los niveles de actividad de las enzimas estudiadas. Este detergente es comúnmente empleado para la desnaturalización de proteínas para su posterior separación por técnicas de electroforesis. En este sentido, diversos autores indican la pérdida de actividad de muchas enzimas al añadir SDS en el medio de reacción (Schomaecker *et al.*, 1988). En el caso de las lipasas, además, la estructura similar de este detergente con los sustratos de las lipasas puede dar lugar a una competición por el centro activo de la enzima y, por tanto, una reducción en la actividad. En esta línea, se ha encontrado una excelente correspondencia entre la longitud de la cadena carbonada y el efecto activador o inhibitor ejercido sobre la lipasa de *T. lanuginosus* cuando los detergentes presentan el mismo grupo de cabeza (Mogensen *et al.*, 2005). El efecto que los emulsionantes pueden tener sobre el sistema es diferente en función del sustrato empleado, afectando a la estabilidad de las micelas (Acharya y Madhusudhana, 2002; Biasutti *et al.*, 2008). Pero la naturaleza de la lipasa es también un factor importante que determina el efecto de los emulsionantes. De forma general, acorde con nuestros resultados, otros autores han encontrado que el SDS inhibe la actividad de algunas lipasas (Bravcová *et al.*, 2010). No obstante, en algunos casos, como en el de las lipasas LipA y LipB del organismo termoalcalófilo

Thermosyntropha lipolytica este detergente incrementaba la eficacia catalítica al aumentar la V_{\max} y disminuir la K_m (Salameh y Wiegel, 2010).

De los resultados obtenidos, la **goma arábica** es el emulsionante que tenía un efecto más homogéneo y con el cual se obtenían los mayores valores de actividad, excepto para Lipase PS en cuyo caso fue una mezcla de un 0,4% de Tritón X-100 y un 0,1% de goma arábica.

4.1.2. Estudio de la eficiencia de distintos tratamientos físico-químicos en la detención de la actividad lipasa

En este bloque de experiencias se determinó la eficiencia de distintos tratamientos de detención de la actividad hidrolítica de las lipasas. Para ello, tras una revisión bibliográfica en la que se seleccionaron los métodos más ampliamente utilizados (Tabla 3), se compararon dichos métodos con la nueva metodología desarrollada en esta Tesis basada en el uso de la solución Marmur. Entre los tratamientos empleados para la detención de la reacción se encuentran tanto métodos físicos (enfriamiento a 0 °C o calentamiento a 100 °C) de la solución como la adición de distintos compuestos químicos (iones, bases o quelantes).

Los ensayos realizados con los **reactivos químicos** NaOH, THAM y Na_2CO_3 mostraron que estos reactivos causaban una severa degradación del *p*NP-palmitato (sustrato de la reacción) y, por tanto, su uso fue descartado. Algunos iones como Cu^{2+} o Zn^{2+} , indicados en la bibliografía como agentes bloqueantes de la actividad lipasa, interferían de forma muy significativa en la medida espectrofotométrica o no causaban una detención efectiva de la reacción, por lo que también se desestimó su empleo en posteriores ensayos.

La mezcla de acetona-etanol utilizada para precipitar las enzimas utilizada por autores como Kanwar *et al.* (2005) no resultó ser efectiva ni para el preparado Lipolase ni para Lipase

PS (Figura 3). De hecho, los resultados obtenidos muestran que la mezcla acetona-etanol incrementó la actividad de ambas lipasas. Resultados similares fueron presentados por Zaman *et al.* (2006), donde el pretratamiento de la lipasa de *Chromobacterium viscosum* con acetona incrementó la interacción entre el sustrato hidrofóbico y el centro activo de la enzima, provocando el cambio conformacional de la forma cerrada a la abierta. La mezcla de acetona-etanol en frío incluso provocaba un mayor incremento en los valores de absorbancia en ambas lipasas debido a la reducción en la solubilidad del sustrato.

La mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico, empleada en el método propuesto en esta Tesis doctoral para la desnaturalización de la enzima, es comúnmente aplicada como reactivo en investigación biológica. Los ensayos llevados a cabo por la adición de la solución Marmur y la eliminación del precipitado por centrifugación, mostró mínimas variaciones en el tiempo y una alta reproducibilidad en los resultados de ambas lipasas (Figura 3) (Palacios *et al.*, 2014).

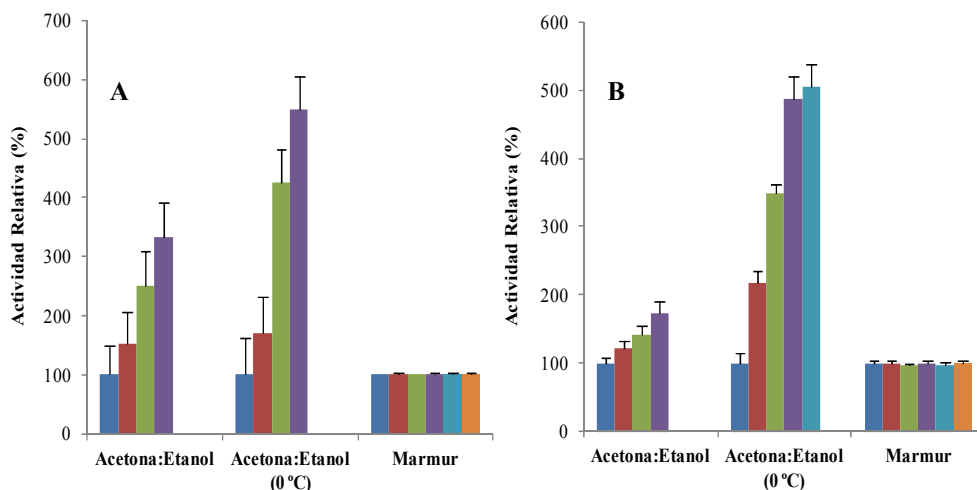


Figura 3. Eficiencia de la detección de la actividad lipasa con *p*NPP como sustrato por la adición de acetona:etanol, acetona:etanol 0 °C y solución Marmur. A) Lipase PS; B) Lipolase. (■) 0 min, (■) 5 min, (■) 10 min, (■) 20 min, (■) 30 min y (■) 40 min.

Así mismo, se estudió la eficiencia de los **tratamientos físicos** en el bloqueo de la reacción enzimática. Para ello, se evaluó la cantidad de *p*NP liberado por la enzima en el tiempo tras ser sumergida la mezcla de reacción en hielo. Por otro lado, se determinó la capacidad de inactivación de la enzima mediante su inmersión en agua hirviendo durante 5 min evaluando la actividad residual después del tratamiento a distintos tiempos. La Figura 4, muestra que el enfriamiento no conseguía detener la reacción enzimática. De hecho, la actividad lipasa detectada después de 15 min de enfriamiento fue notablemente superior a la encontrada a los 5 min, siendo de un 419 y un 387% para las lipasas de Lipolase y Lipase PS, respectivamente. Además, la menor solubilidad del sustrato por el enfriamiento de las muestras provocaba una turbidez que debería ser eliminada. Por tanto, el enfriamiento introduciendo la mezcla de reacción en hielo no puede ser utilizado para detener la reacción en un método espectrofotométrico a punto final. Así, Mayordomo *et al.* (2000) en su estudio sobre la cinética de *Aspergillus nidulans* WG312 observaron que aunque la temperatura óptima fue de 40 °C, incluso a 0 °C la lipasa conservaba el 30% de su actividad relativa.

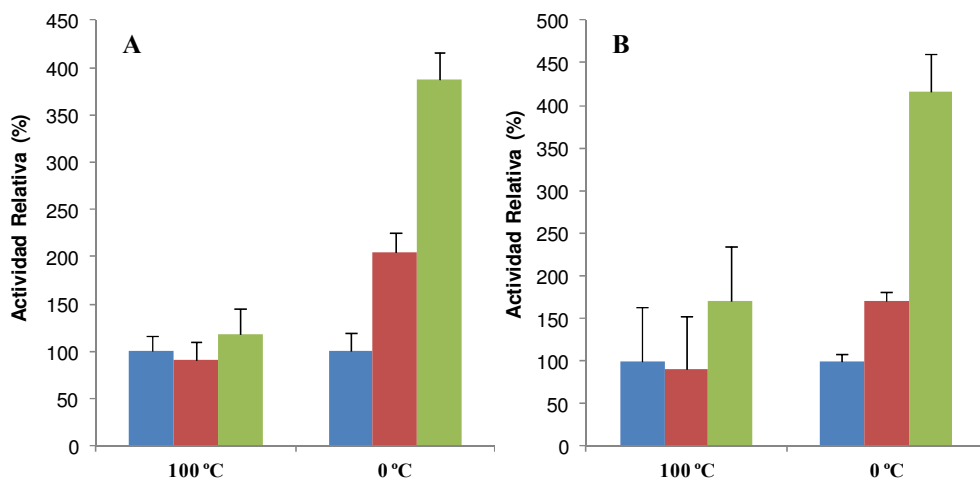


Figura 4. Eficiencia del tiempo de tratamiento térmico sobre la detención de la actividad lipasa con *p*NPP como sustrato. Actividad relativa calculada tomando como 100% de actividad el tratamiento a 5 min. A) Lipase PS; B) Lipolase. Tratamientos de (■) 5 min, (■) 10 min y (■) 15 min.

Por otro lado, al examinar los resultados de la eficiencia de la detención mediante calor se observaba que podía ser un tratamiento efectivo para bloquear la reacción catalizada por Lipase PS pero no para Lipolase (Figura 4). Como efecto secundario del tratamiento térmico se observaba una elevada degradación en el sustrato, hecho que se veía incrementado en *p*NP ésteres cuya cadena carbonada es de menor tamaño, como en el caso de *p*NP-decanoato.

4.2. Estudio cinético de la actividad hidrolítica frente a ésteres de *p*NP

Para un análisis de la especificidad de las lipasas comerciales se llevó a cabo un estudio de la preferencia por distintos *p*NP ésteres (*p*NPB, *p*NPD y *p*NPP). Los resultados de este estudio se presentan organizados en función de la anatomía del centro activo dando lugar a dos grupos diferenciados. Por un lado, las lipasas de la familia de CALB cuyo centro activo tiene forma de embudo elíptico y se localiza cerca de la superficie. En este grupo se estudiaron las lipasas de Novozym 435, Lipase PS, Lipase PS-DI y Lipase PS-CI. En un segundo grupo se estudiaron las lipasas Palatase, Lipozyme RM-IM, Lipolase, Lipase M, Lipase A y Lipase G, cuyo centro activo es una hendidura hidrofóbica cerca de la superficie característico de la familia de *Rhizomucor*.

Adicionalmente se analizó el efecto del detergente Tritón X-100 sobre los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , excepto para las lipasas Lipase A, M y G dado que este compuesto anulaba por completo la acción catalítica de estas enzimas (Tabla 6).

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se determinaron a partir de los valores de velocidad obtenidos a concentraciones crecientes de sustrato. Una de las principales premisas en las que se basa el modelo clásico de Michaelis-Menten, es que la reacción enzimática tiene lugar en un medio isotrópico, criterio que no se cumple en las reacciones catalizadas por las lipasas. Por esta

razón, en todos los casos en los que se habla de parámetros cinéticos son parámetros aparentes, término empleado por Pencreac'h y Baratti (1996). El cálculo se realizó mediante la linealización de Hanes-Woolf (S/V vs S), obteniéndose en todos los casos un coeficiente de correlación (R^2) superior al 95%.

4.2.1. Lipasas de la familia *Candida antarctica* B (CALB)

Se procedió al estudio cinético de la lipasa bacteriana de *B. cepacia* (Lipase PS) tanto libre como inmovilizada (PS-DI y PS-CI) y de la lipasa B del hongo *C. antarctica* inmovilizada sobre resina acrílica (Novozym 435).

Los resultados indicaban que **Lipase PS** era una enzima que presentaba una mayor actividad hidrolítica siendo más activa para *p*NP-palmitato y *p*NP-decanoato (Tabla 7). No obstante, los niveles de actividad de este preparado frente a *p*NP-butirato en presencia de Tritón X-100 eran muy elevados, siendo junto con Lipolase de la familia de *Rhizomucor* (apdo. 4.2.2.) las dos enzimas que mayor actividad presentaban para este sustrato de todos los preparados comerciales estudiados

Lipase PS presentaba una afinidad muy alta tanto por *p*NP-decanoato como por *p*NP-palmitato estando completamente saturada a concentraciones muy bajas de sustrato. Como puede apreciarse en la Tabla 7, la eficacia catalítica para el *p*NP-palmitato era casi 2 veces más alta que para *p*NP-decanoato dado que aunque los valores de K_m eran similares (0,1 mM), la V_{max} para *p*NP-palmitato (33,14 U/mg de enzima) era mayor que para *p*NP-decanoato (19,25 U/mg de enzima). Esta preferencia por los sustratos de cadena larga frente a cadena media o corta, fue también observada por Pencreac'h *et al.* (1997), donde la máxima actividad tenía lugar cuando la enzima actuaba sobre C16.

En la Figura 5, puede observarse que la adición de Tritón X-100 modificaba la actividad pero no cambiaba la preferencia general de la enzima. El efecto del detergente sobre la actividad

era diferente en función de la longitud de la cadena del sustrato. Así, cuando la lipasa hidrolizaba *p*NP-butirato los mayores niveles de actividad se encontraban en ausencia de Tritón X-100.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de Lipase PS, Lipase PS-DI, Lipase PS-CI y Novozym 435.

Sustrato	Parámetros cinéticos	Lipase PS	Lipase PS-CI	Lipase PS-DI	Novozym 435
<i>p</i> NPB	K_m (mM)	1,12	0,25	0,67	0,80
	V_{max} (U/mg)	10,69	0,65	2,81	0,05
	V_{max}/K_m	9,57	2,63	4,18	0,06
<i>p</i> NPB + Tritón	K_m (mM)	nd	No satura	No satura	0,50
	V_{max} (U/mg)	nd	No satura	No satura	0,24
	V_{max}/K_m	nd	No satura	No satura	0,48
<i>p</i> NPD	K_m (mM)	0,10	0,20	0,14	0,15
	V_{max} (U/mg)	19,25	0,92	8,07	0,00
	V_{max}/K_m	190,60	4,71	58,53	0,03
<i>p</i> NPD + Tritón	K_m (mM)	0,57	1,96	0,10	0,56
	V_{max} (U/mg)	30,20	26,57	7,85	0,06
	V_{max}/K_m	52,98	13,55	75,59	0,10
<i>p</i> NPP	K_m (mM)	0,09	0,63	0,19	0,21
	V_{max} (U/mg)	33,14	2,23	20,96	0,00
	V_{max}/K_m	364,68	3,55	112,46	0,02
<i>p</i> NPBP + Tritón	K_m (mM)	0,38	2,74	0,40	0,12
	V_{max} (U/mg)	58,70	51,89	40,47	$2,2510^{-03}$
	V_{max}/K_m	154,93	18,97	101,70	0,02

nd: no determinada

Por contra, con *p*NP-decanoato la actividad se mantenía en unos niveles similares en presencia y ausencia del detergente y cuando lo hacía sobre *p*NP-palmitato el Tritón activaba la acción de la enzima. El Tritón, por tanto, incrementaba la actividad cuando el ácido graso es de tamaño medio o largo aunque reducía su afinidad como queda plasmado en los valores de K_m (Tabla 7).

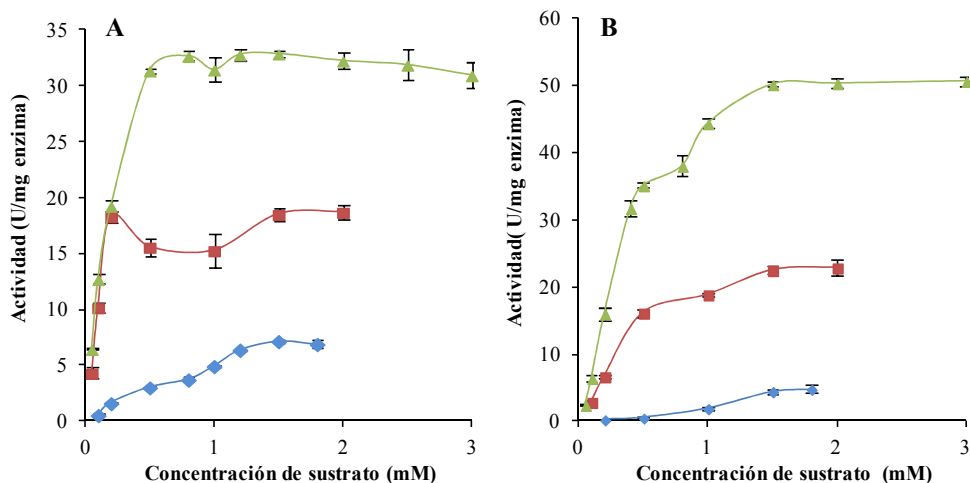


Figura 5. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de pNP-ésteres con Lipase PS. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%. (◆) pNP-butirato, (■) pNP-decanoato y (▲) pNP-palmitato

La inmovilización de la lipasa de *B. cepacia* sobre tierra de diatomeas (PS-DI) o cerámica (PS-CI) no alteraba la acilselectividad aunque sí que se veía modificado el comportamiento cinético (Figura 6). No obstante, la naturaleza del soporte de inmovilización influye de forma muy importante en los cambios en la especificidad de las enzimas. Así, Pencreac'h *et al.* (1997) observaron que la inmovilización de Lipase PS sobre polipropileno alteraba su preferencia por los sustratos al desplegar su máxima actividad frente a ésteres de cadena corta mientras que la forma libre actuaba de forma preferente sobre ácidos grasos de cadena larga.

Por otra parte, al igual que ocurría en la forma libre de la enzima, la actividad de los inmovilizados se veía incrementada por la presencia de un 0,4% de Tritón X-100, alterándose ambos parámetros cinéticos. Estos cambios no son iguales para los dos soportes, ya que mientras que el comportamiento cinético de PS-DI era similar al encontrado en la forma libre, en PS-CI tenía lugar un comportamiento muy diferenciado.

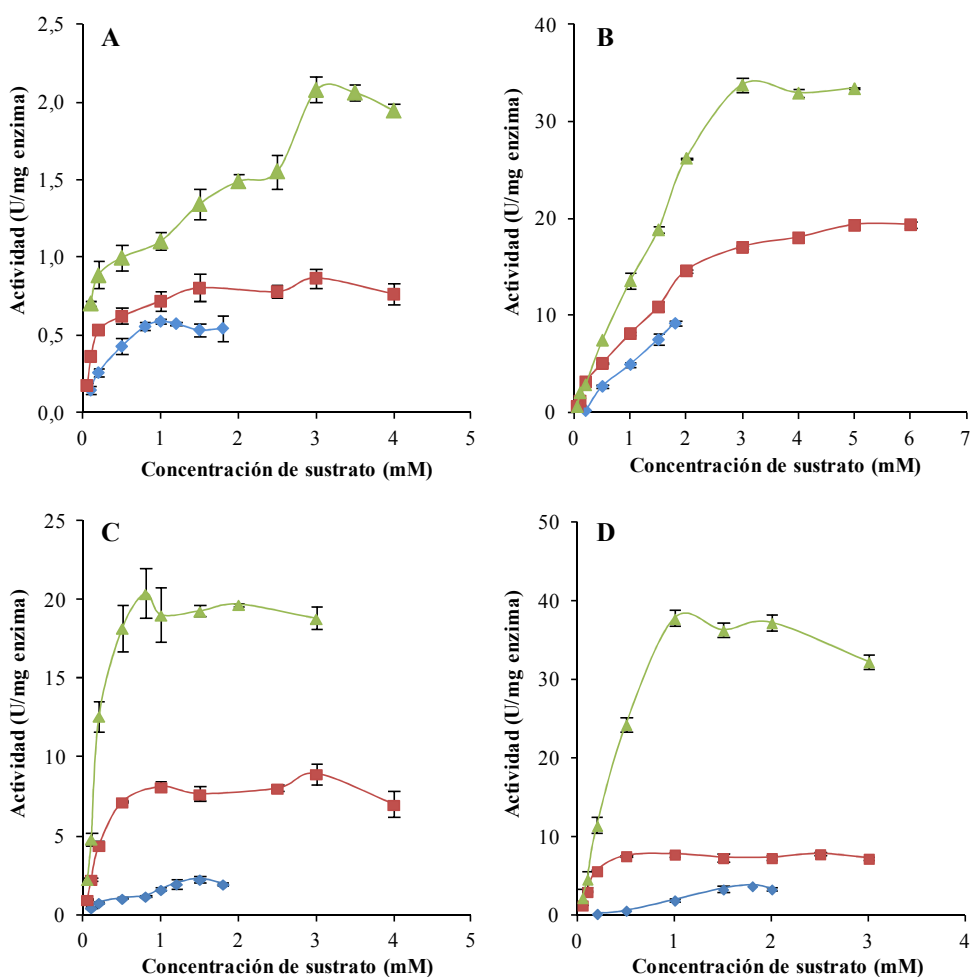


Figura 6. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de *p*NP-ésteres con A) Lipase PS-CI sin Tritón X-100; B) Lipase PS-CI con Tritón X-100 al 0,4%; C) Lipase PS-DI sin Tritón X-100; D) Lipase PS-DI con Tritón X-100 al 0,4%. (♦) *p*NP-butirato, (■) *p*NP-decanoato y (▲) *p*NP-palmitato.

Como se ve reflejado en los valores de K_m , la inmovilización sobre cerámica (PS-CI) provocaba grandes cambios en la afinidad de la enzima por los sustratos de tamaño medio y largo, siendo este aumento más acusado cuando los ensayos se realizaban en presencia de Tritón (Tabla 7). Las razones que pueden explicar este efecto se basan en: a) cambios conformacionales resultado de la inmovilización que den lugar a impedimentos estéricos que

dificulten el acceso al centro activo o una mayor rigidez de la estructura y b) modificaciones en el microambiente de la enzima debido al soporte que tengan como consecuencia cambios en la partición dando lugar a una menor concentración de sustrato. Osuna y Rivero (2012) indicaban que los soportes cerámicos eran capaces de retener el ácido láurico y sus ésteres, así como otros elementos como calcio, fósforo o cloro. La mayor retención de los sustratos por el soporte podía tener como consecuencia una caída en la afinidad de la enzima, hecho que se vería incrementado al aumentar la solubilidad del sustrato que se adherirá en mayor medida a la cerámica por interacciones hidrofóbicas. Conforme se incrementa la longitud de la cadena carbonada y se volvía más apolar, las interacciones con el soporte serían más fuertes por lo que la afinidad de la enzima se vería más afectada.

Los resultados de **Novozym 435** mostraban que cuando el sustrato era soluble en agua, la enzima catalizaba eficientemente la hidrólisis del enlace éster y, por contra, su actividad se reducía drásticamente al actuar frente a sustratos insolubles o poco solubles (Figura 7).

En los ensayos realizados con *p*NP-butirato no se observaba un incremento abrupto en la actividad al exceder el límite de solubilidad del sustrato. Por lo tanto, según los criterios de preferencia de sustratos y de hiperactivación en presencia de interfases, esta enzima comercial debería ser considerada una esterasa. En la misma línea otros autores indican que CALB muestra una marcada preferencia por ácidos grasos de cadena corta y media frente a los de cadena larga, en los que no se aprecia activación interfacial (Martinelle *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2002).

Esta enzima posee un centro activo más estrecho y profundo que el de otras lipasas (Pleiss *et al.*, 1998). Esta anatomía especial puede dificultar o impedir la entrada de sustratos de gran tamaño. Por otro lado, CALB presenta una hélice corta de 5 aminoácidos

identificada como una estructura análoga al “lid” que por su escasa longitud no intervendría de forma activa en la regulación del centro activo de la enzima y, por tanto, esta enzima no exhibiría activación interfacial.

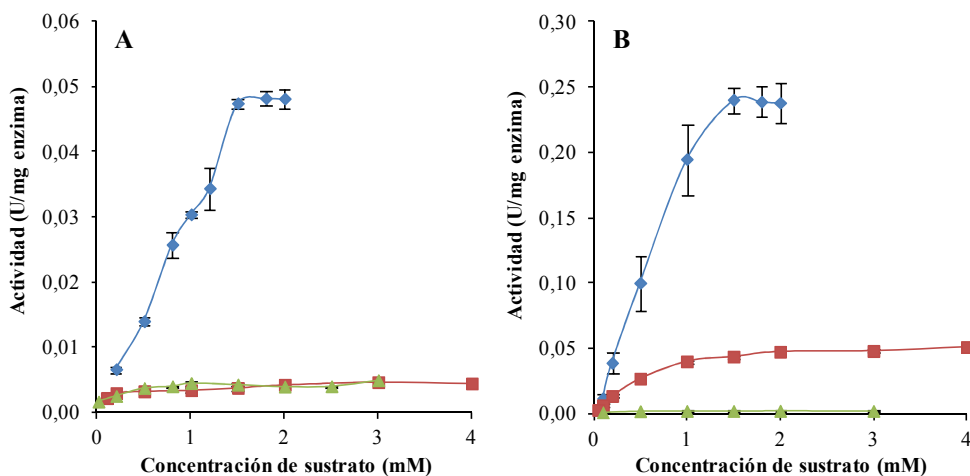


Figura 7. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de *pNP*-ésteres con Novozym 435. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%. (●) *pNP*-butirato, (■) *pNP*-decanoato y (▲) *pNP*-palmitato

Los ensayos realizados con Tritón X-100 mostraban que aunque ni el comportamiento ni la preferencia por el *pNP*-butirato como sustrato se modificaban de forma sustancial, sí que existían diferencias en los niveles de actividad. Estos efectos eran dependientes del sustrato sobre el que actuaba Novozym 435 (Figura 7). Al actuar sobre *pNP*-butirato el efecto del Tritón X-100 era notable, viéndose incrementada la actividad casi 5 veces respecto al ensayo sin emulsionante a una concentración saturante de sustrato de 1,8 mM. Para el *pNP*-decanoato este incremento era incluso mayor, la actividad de la enzima en condiciones de saturación era 10 veces mayor en presencia de Tritón X-100 (Tabla 7). En cambio, el efecto sobre el *pNP*-palmitato era casi inapreciable, observándose únicamente una ligera disminución. En estas condiciones de reacción los ésteres de *pNP* de 10 y 4 carbonos, eran los sustratos preferentes de esta enzima, mientras que en ausencia de Tritón no se apreciaban

diferencias significativas entre los niveles de actividad para C10 y C16. El Tritón X-100 puede favorecer la solubilidad del *p*NP-decanoato retrasando la aparición de interfases, por lo que la enzima puede actuar de forma más eficaz. Es lógico, por tanto, pensar que el efecto sólo sea apreciable en los sustratos indicados y no en *p*NP-palmitato dado que el centro activo de CALB se encuentra en un lugar de difícil acceso para sustratos de cadena larga y la mejora en la solubilidad no va a tener ningún efecto.

En resumen, de las experiencias realizadas en relación a la acción del emulsionante sobre la actividad de los preparados comerciales de *B. cepacia* (PS, PS-CI y PS-DI) y *C. antarctica* (Novozym 435) se deduce que los efectos del detergente dependen del origen de la lipasa y del sustrato sobre el que actúa. Estos resultados coinciden con las observaciones descritas por otros autores que indicaron como las micelas de Tritón X-100 desestabilizaban la lipasa de *Staphylococcus aureus* y, por contra, estabilizaban la de *Staphylococcus hyicus* (Simons *et al.*, 1997).

4.2.2. Lipasas de la familia *Rhizomucor* (RML)

Las lipasas seleccionadas pertenecientes a la familia de *Rhizomucor*, Lipase A (*A. niger*), Lipase M (*M. javanicus*), Lipase G (*P. camembertii*), Palatase (*R. miehei*), Lipolase (*T. lanuginosus*) y Lipozyme RM-IM (*R. miehei* inmovilizada sobre Duolite), poseen, como ya se ha indicado anteriormente, un alto grado de homología tanto en la secuencia como en la estructura de su centro activo lo que explica su similar comportamiento cinético. No obstante, al comparar los resultados obtenidos en este bloque de experiencias se pueden establecer 3 grupos diferenciados en base a su preferencia por los sustratos y sus niveles de actividad: un primer grupo formado por Lipase A y Lipase M, un segundo grupo con Palatase, Lipozyme RM-IM y Lipolase y por último, Lipase G.

En la Tabla 8 se detallan los valores de los parámetros cinéticos de las enzimas de la familia de *Rhizomucor* Lipase A, M y G. En este caso los valores de K_m y V_{max} con *p*NP-butirato como sustrato, no pudieron ser determinados mediante ninguna de las linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de Lipase A, Lipase G y Lipase M.

Sustrato	Parámetros cinéticos	Lipase A	Lipase M	Lipase G
<i>p</i> NPB	K_m (mM)	nd	nd	nd
	V_{max} (U/mg)	nd	nd	nd
	V_{max}/K_m	nd	nd	nd
<i>p</i> NPD	K_m (mM)	0,19	0,19	0,18
	V_{max} (U/mg)	1,45	1,49	0,01
	V_{max}/K_m	7,45	7,78	0,03
<i>p</i> NPP	K_m (mM)	0,75	0,17	0,67
	V_{max} (U/mg)	1,58	1,91	0,03
	V_{max}/K_m	2,11	11,22	0,04

nd: no determinada

Los preparados enzimáticos **Lipase M** y **Lipase A** hidrolizaban el *p*NP-palmitato y *p*NP-decanoato de forma más eficiente que el sustrato soluble *p*NP-butirato (Figura 8). Para los sustratos palmitato y decanoato, ambos preparados mostraban valores similares de actividad aunque la menor afinidad de Lipase A hacia palmitato (K_m 0,79 mM) hacía que la eficiencia catalítica fuese inferior.

En algunos estudios se indica que la lipasa de *A. niger* presenta una alta tendencia a autoasociarse formando agregados diméricos con menor actividad que la forma disociada (Tombs y Blake, 1982). Estos agregados se formarían cuando una lipasa en su conformación abierta expone áreas hidrofóbicas alrededor del centro activo de forma que pueden interaccionar con los de otra molécula cercana. Esta tendencia a la agregación, que aparecería

incluso en soluciones diluidas, provoca problemas en la caracterización bioquímica por los cambios de estabilidad, actividad y selectividad del dímero respecto al monómero (Palomo *et al.*, 2003).

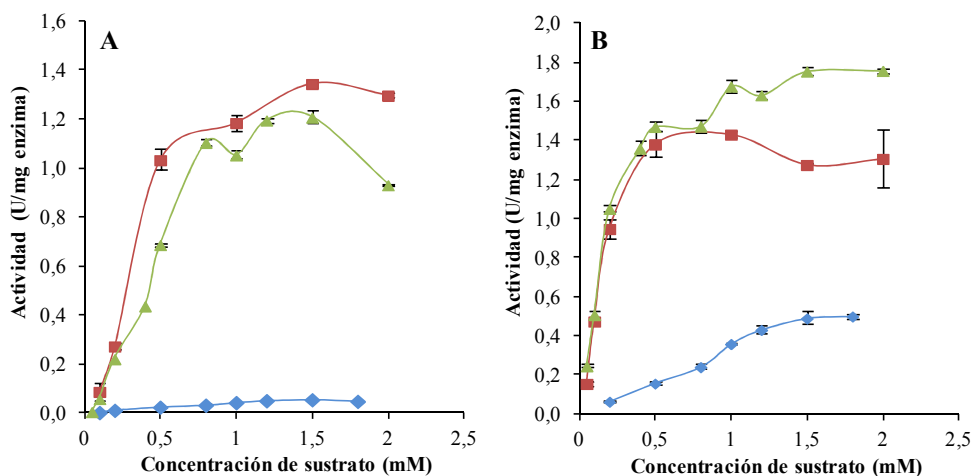


Figura 8. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de *pNP*-ésteres con A) Lipase A; B) Lipase M. (♦) *pNP*-butirato, (■) *pNP*-decanoato y (▲) *pNP*-palmitato.

En otras lipasas con esta tendencia a la formación de dímeros como las de *C. rugosa*, *T. lanuginosus* y *R. miehei*, se observó que al incrementar la concentración de enzima disminuía la actividad específica. Esta dimerización tendría lugar cuando el sustrato es totalmente soluble y, por tanto, en presencia del sustrato en forma de gotas en dispersión se disminuye en gran medida esta asociación (Palomo *et al.*, 2003). Estos resultados explican que una lipasa con una alta tendencia a la agregación como es Lipase A, presente una actividad muy superior en sustratos que forman interfaces frente a sustratos totalmente solubles. En los dímeros pueden producirse también cambios en la selectividad dado que el centro activo estaría parcialmente bloqueado, limitando así la entrada de los sustratos.

Como puede observarse en la Figura 9, Lipase G mostraba una mayor actividad por *pNP*-palmitato que por *pNP*-decanoato o

*p*NP-butirato aunque en todos los casos los niveles de actividad son los más bajos de todos los preparados enzimáticos ensayados, presentando un comportamiento diferenciado con Lipase A y M.

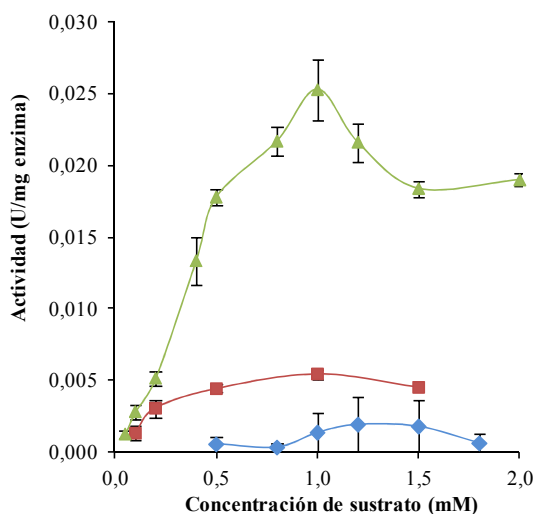


Figura 9. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de *p*NP-ésteres con Lipase G. (●) *p*NP-butirato, (■) *p*NP-decanoato y (▲) *p*NP-palmitato.

Los preparados comerciales **Palatase** y **Lipolase** presentaban niveles de actividad muy diferentes y un comportamiento cinético similar característico de las “true lipases”, con una preferencia por sustratos de cadena media y larga así como la hiperactivación en presencia de interfases.

Excepto para Lipozyme RM-IM en presencia de un 0,4% de Tritón X-100, los valores de K_m y V_{max} con *p*NP-butirato como sustrato, no pudieron ser determinados mediante ninguna de las linealizaciones de la ecuación de Michaelis-Menten (Tabla 9).

Como se observa en la Figura 10, aunque los niveles de actividad de Lipolase son superiores, ambas lipasas poseían una acilselectividad muy similar mostrando una menor actividad para los sustratos de cadena corta (C4), y una preferencia por los sustratos de cadena media (C10) frente a los de cadena larga

(C16). Estos resultados son acordes con los encontrados en bibliografía (Gaskin *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001; Mogensen *et al.*, 2005).

Tabla 9. Parámetros cinéticos de Lipolase, Palatase y Lipozyme RM-IM.

Sustrato	Parámetros cinéticos	Lipolase	Palatase	Lipozyme RM-IM
pNPB	K_m (mM)	Sigmoide	Sigmoide	nd
	V_{max} (U/mg)	Sigmoide	Sigmoide	nd
	V_{max}/K_m	Sigmoide	Sigmoide	nd
pNPB + Tritón	K_m (mM)	No satura	No satura	0,95
	V_{max} (U/mg)	No satura	No satura	$1,11 \cdot 10^{-03}$
	V_{max}/K_m	No satura	No satura	$1,16 \cdot 10^{-03}$
pNPD	K_m (mM)	0,16	1,04	0,48
	V_{max} (U/mg)	93,38	1,99	0,06
	V_{max}/K_m	568,38	1,91	0,13
pNPD + Tritón	K_m (mM)	0,44	0,23	1,93
	V_{max} (U/mg)	0,10	0,10	$3,5 \cdot 10^{-03}$
	V_{max}/K_m	0,22	0,42	$1,8 \cdot 10^{-03}$
pNPP	K_m (mM)	0,19	0,37	0,07
	V_{max} (U/mg)	62,93	0,97	0,07
	V_{max}/K_m	339,34	2,62	0,96
pNPP + Tritón	K_m (mM)	0,58	0,47	0,45
	V_{max} (U/mg)	0,11	0,24	$1,8 \cdot 10^{-03}$
	V_{max}/K_m	0,19	0,51	$4,1 \cdot 10^{-03}$

nd: no determinada

Al examinar la actividad de estos dos preparados se observaba que a bajas concentraciones de sustrato las lipasas no presentaban diferencias a la hora de hidrolizar *pNP*-decanoato o *pNP*-palmitato. Aunque la afinidad de la lipasa de *T. lanuginosus* (Lipolase) por ambos sustratos era similar (K_m 0,16 y 0,19 mM, respectivamente), la V_{max} para *pNP*-decanoato era 1,5 veces

superior que para *p*NP-palmitato por lo que su eficiencia catalítica era mayor para este sustrato (Tabla 9). El preparado Palatase se saturaba entorno a una concentración 1 mM, cuando se empleaba *p*NP-palmitato mientras que cuando el sustrato era *p*NP-decanoato, la actividad se incrementaba hasta alcanzar la saturación entorno a una concentración de 2 mM.

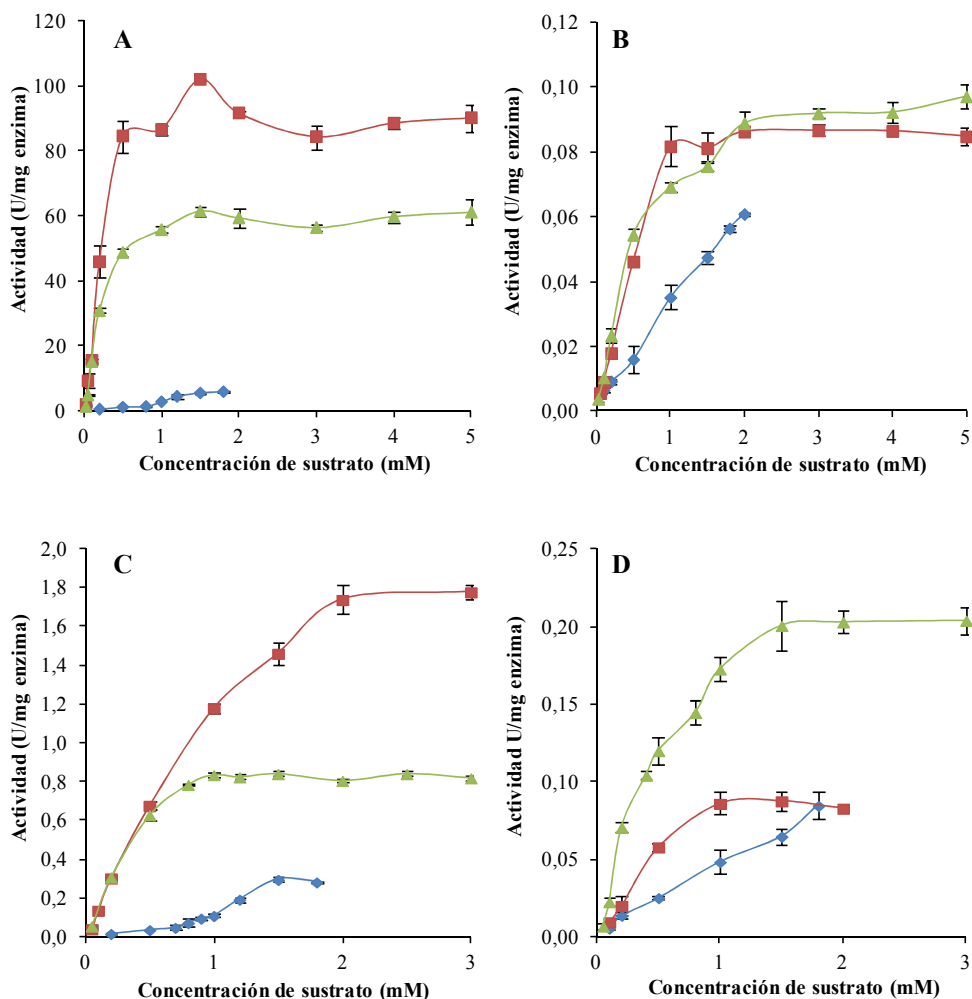


Figura 10. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de *p*NP-ésteres A) Lipolase sin Tritón X-100; B) Lipolase con Tritón X-100 al 0,4%; C) Palatase sin Tritón X-100; D) Palatase con Tritón X-100 al 0,4%. (♦) *p*NP-butyrate, (■) *p*NP-decanoato y (▲) *p*NP-palmitato.

Los estudios sobre la estructura tridimensional de las lipasas revelan que la presencia de “lid” es rasgo común entre aquellas enzimas que exhiben una hiperactivación en presencia de emulsiones. La cinética de hidrólisis de *p*NP-butirato para las lipasas Palatase y Lipolase se ajustaba a un modelo sigmoideo desviándose del modelo hiperbólico típico (Figura 11).

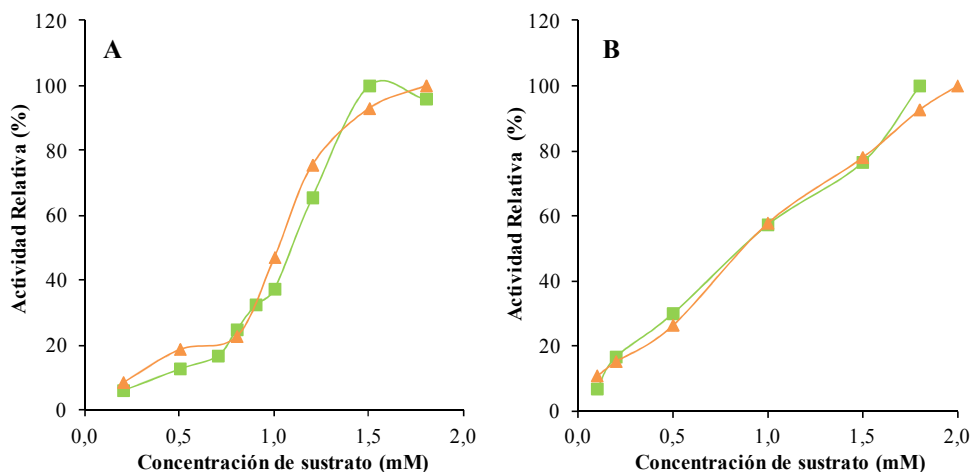


Figura 11. Efecto de la concentración de *p*NP-butirato sobre la actividad hidrolítica. A) Comportamiento sin Tritón X-100; B) Comportamiento con Tritón X-100 al 0,4%. Palatase (■) y Lipolase (▲).

Este comportamiento indicaba que tenía lugar una activación interfacial en la que la lipasa cambiaba de una conformación cerrada que impide el acceso de los sustratos a una forma abierta catalíticamente activa. Resultados similares han sido observados por otros autores empleando sustratos de características análogas a los *p*NP-ésteres donde en entorno al límite de solubilidad del sustrato (0,69 mM) se produce este salto abrupto de la actividad (Martinelle *et al.*, 1995; Nini *et al.*, 2001).

El comportamiento de ambas enzimas se veía alterado por la adición de Tritón X-100 como puede observarse en las Figuras 9 y 10. Este detergente inhibía drásticamente la actividad hidrolítica de ambas enzimas afectando tanto a la V_{\max} como a la afinidad por los sustratos (Tabla 9). Al realizar los ensayos con *p*NP-butirato

en presencia de este detergente, la hiperactivación entorno al límite de solubilidad del sustrato desaparecía posiblemente debido a que el Tritón X-100 retrasaba la aparición de agregados moleculares. La afinidad de la enzima Lipolase para *p*NP-decanoato y *p*NP-palmitato se veía reducida alrededor de 3 veces, mientras que las V_{\max} se veían reducidas 1000 y 500 veces, respectivamente. Al comparar las eficacias catalíticas se observa que en ausencia de Tritón, ésta era 1,7 veces mayor para *p*NP-decanoato que para *p*NP-palmitato, mientras que al añadir el detergente los valores eran prácticamente iguales, por lo que ya no exhibía preferencia por uno u otro sustrato. Igualmente la acilselectividad de Palatase se veía afectada al catalizar de forma preferente los sustratos de cadena larga frente a los de cadena media.

La inmovilización de la lipasa de *R. miehei* sobre la resina de intercambio Duolite ES 562 (**Lipozyme RM-IM**) provocaba cambios tanto en la cinética como en la acilselectividad de la enzima (Figura 12). Mientras que en la forma libre (Palatase) la mayor eficacia catalítica se encontraba en la hidrólisis de *p*NP-decanoato, en la forma inmovilizada los mayores valores de V_{\max}/K_m aparecían con *p*NP-palmitato (Tabla 9). Resultados similares han sido encontrados por Hüge-Jensen *et al.* (1988), indicando que la inmovilización en este soporte de la lipasa de *R. miehei* alteraba su acilselectividad.

Aunque en presencia de Tritón X-100 los niveles de actividad seguían siendo menores, la inhibición debida a este detergente era menor que en la enzima libre. El Tritón afectaba también de forma diferenciada a los parámetros cinéticos dependiendo de si la enzima se encontraba libre o inmovilizada, pasando de tener una mayor eficacia catalítica para el *p*NP-palmitato a no presentar una especial eficacia. La gran afinidad de Lipozyme RM-IM por *p*NP-palmitato (K_m 0,07 mM) hacía que la lipasa se saturase a concentraciones muy bajas de sustrato. Por esta razón, aunque las V_{\max} para *p*NP-palmitato y *p*NP-decanoato eran similares, la

eficacia catalítica era claramente mayor para el primero de ellos (casi 9 veces superior) (Tabla 9).

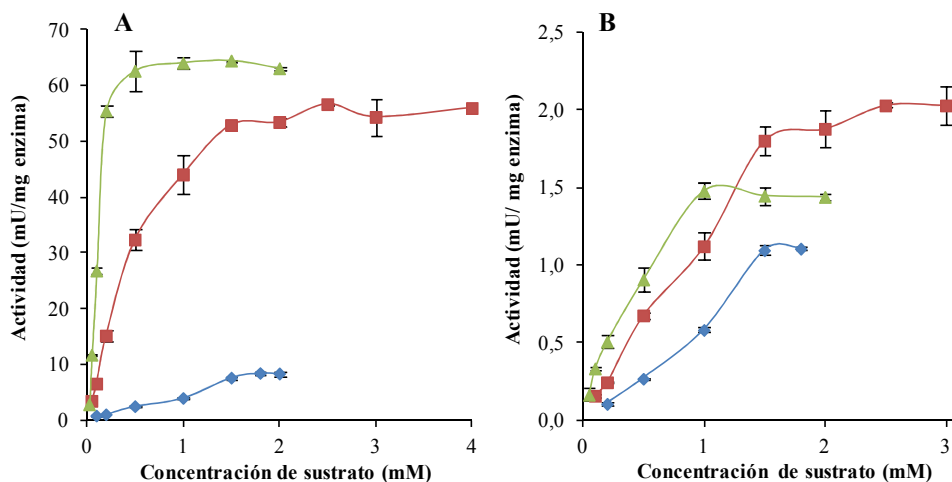


Figura 12. Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de pNP-ésteres con Lipozyme RM-IM. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%. (●) pNP-butirato, (■) pNP-decanoato y (▲) pNP-palmitato

De forma similar a como tenía lugar en las formas libres de *R. miehei* y de *T. lanuginosus*, el Tritón X-100 provocaba también que los comportamientos cinéticos para la enzima inmovilizada fueran más parecidos para los tres sustratos, reduciéndose las diferencias en los niveles de actividad. Por tanto, en presencia de este detergente no se apreciaba una preferencia clara por ninguna de las tres longitudes de cadena empleadas.

4.3. Estudio de la actividad hidrolítica frente a triglicéridos

Como parte del estudio de la capacidad hidrolítica de las lipasas anteriormente seleccionadas se procedió a la evaluación de su actividad frente a triglicéridos y su posible aplicación en la hidrólisis de distintos aceites comerciales. Para establecer las posibles acilselectividades de cada una de las enzimas, se ensayó la actividad lipasa mediante la metodología del pH-stat frente a tres triglicéridos de distinta longitud de cadena (gliceril

trioctanoato, gliceril decanoato y gliceril trioleato) a una concentración saturante de 40 mM.

De todos los preparados enzimáticos ensayados, únicamente en el caso de Lipase G no se detectó actividad para ninguno de los triglicéridos. Estos resultados coinciden con experiencias previas en las que se indicaba que esta enzima solamente actuaba sobre diglicéridos y monoglicéridos (Isobe *et al.*, 1992). Por otro lado, Lipolase presentaba una actividad extraordinariamente alta para los tres sustratos empleados, siendo hasta 5000 veces más alta que la actividad de Lipase PS, la siguiente enzima más activa (Figura 13). Además, se comprobó que todas las enzimas presentaban una mayor actividad frente al gliceril trioctanoato, excepto Lipase A, Lipase PS-CI y Novozym 435.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en las hidrólisis de ésteres sintéticos se puede observar que en algunos casos cambiaban los patrones de preferencia. Mientras que para Lipase M, Palatase y Lipolase se mantenían los patrones de acilselectividad para sustratos de cadena media frente a los de cadena larga, aquellas lipasas que frente a *p*NP-palmitato desplegaban su máxima actividad en los ensayos con el pH-stat esta preferencia se veía modificada. Tanto en Lipase PS como en PS-DI y Lipozyme RM-IM, se producía una mayor liberación de ácidos grasos conforme disminuye la longitud de su cadena, mientras que en PS-CI no se encontraban diferencias apreciables. Algunos estudios indican que no existe una perfecta correlación entre la hidrólisis de *p*NP-ésteres y triglicéridos (Vorderwülbecke *et al.*, 1992). Así, las lipasas que hidrolizan el triglicérido trioleína siempre actúan sobre *p*NP-palmitato y *p*NP-butilato, mientras que enzimas que pueden hidrolizar estos sustratos artificiales no siempre son activas frente a triglicéridos. El preparado Novozym 435 poseía unos niveles muy bajos de actividad para los tres sustratos evaluados, datos que se correlacionan con los observados para los ésteres de *p*NP y con la estructura de su centro activo (Figura 13).

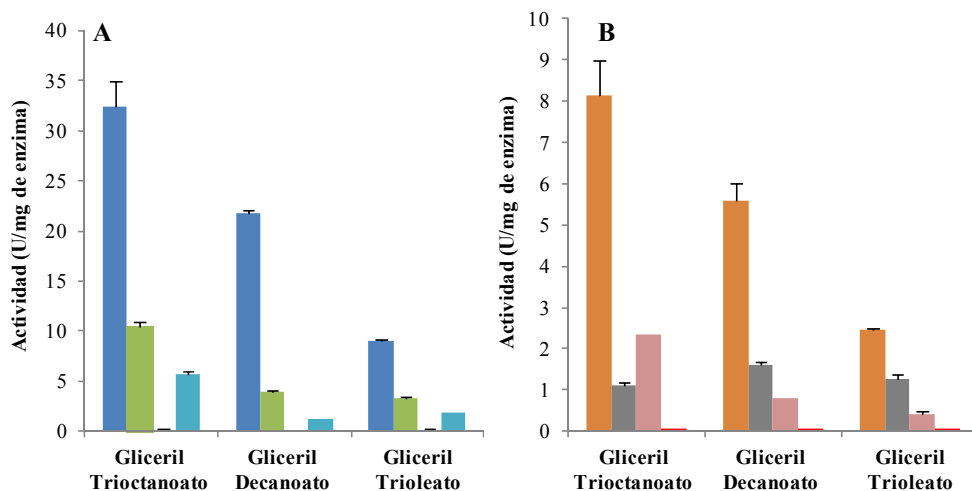


Figura 13. Evaluación de la actividad hidrolítica frente a distintos triglicéridos. A) Enzimas libres; Lipase PS (■), Palatase (■), Lipase A (■), Lipase M (■); B) Enzimas inmovilizadas: Lipase PS-DI (■), Lipase PS-CI (■), Lipozyme RM-IM (■) y Novozym 435(■).

Por último, se llevó a cabo un estudio de la capacidad hidrolítica de las lipasas objeto de estudio sobre distintos aceites comerciales de calidad alimentaria: soja, girasol, oliva y lino. Los resultados que se detallan en la Tabla 10 confirman la elevada efectividad del preparado comercial Lipolase.

Tabla 10. Actividad hidrolítica de distintas lipasas sobre aceites.

Lipasa	Actividad (U/mg de enzima)			
	Soja	Girasol	Oliva	Lino
Palatase	7,1	6,9	8,5	6,8
Lipozyme RM-IM	0,9	0,9	1	0,6
Lipase M	3,6	3,3	4,6	3,1
Lipase A	0,2	0,1	1,3	0,3
Lipolase	56890,7	51320,8	78791	57999,9
Lipase PS	29,4	29,8	30,9	28,9
Lipase PS-DI	8,7	7,6	5,4	8,3
Lipase PS-CI	0,8	0,5	0,6	0,7
Novozym 435	0,1	0,1	0	0,2

5. Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio de la capacidad hidrolítica y comportamiento cinético de las lipasas comerciales, libres y asociadas a soportes de inmovilización, permite concluir que:

- La nueva metodología propuesta, basada en la adición de la solución Marmur, era altamente reproducible y presentaba una gran eficacia en la detención de la actividad enzimática, ensayos a punto final, en comparación con otros procedimientos físico-químicos.
- La naturaleza y concentración de emulsionantes provocaba distintos efectos sobre la actividad hidrolítica de las lipasas. La goma arábica era el surfactante más efectivo sobre los niveles de actividad enzimática y el menos dependiente de la fuente microbiana de la enzima y de su forma libre o inmovilizada.
- Las enzimas de la familia CALB presentaban comportamientos cinéticos diferenciados. Novozym 435 mostraba una clara preferencia por los ésteres con ácidos grasos de cadena corta, por lo que podría ser catalogada como esterasa, mientras que las lipasas de *B. cepacia* (Lipase PS, PS-DI y PS-CI) actuaban de forma preferente sobre ésteres de cadena larga, por lo que se podrían considerar como “true lipases”.
- Las enzimas de la familia *Rhizomucor* presentaban un comportamiento cinético característico de “true lipases”. La adición del detergente Tritón X-100 modificaba este comportamiento en los preparados Lipolase, Palatase y Lipozyme RM-IM.

- En la hidrólisis de triglicéridos se obtenía una mayor capacidad hidrolítica al disminuir la longitud de los ácidos grasos, excepto para los preparados enzimáticos Lipase A, Lipase PS-CI y Novozym 435. Estos resultados junto con los obtenidos en la hidrólisis de *p*NP-ésteres indican que no existe correlación en la acilselectividad de las lipasas entre estos dos tipos de sustratos.

6. Referencias

- Acharya, P., Madhusudhana Rao, N. Anomalous ester hydrolysis in mixed micelles of *p*-nitrophenyloleate-Triton X-100 in the presence of guanidinium chloride: Implications in lipase assays (2002) *Langmuir*, 18 (8), pp. 3018-3026.
- Barbe, S., Lafaquière, V., Guieysse, D., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., André, I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations (2009) *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 77 (3), pp. 509-523.
- Biasutti, M.A., Abuin, E.B., Silber, J.J., Correa, N.M., Lissi, E.A. Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants (2008) *Advances in Colloid and Interface Science*, 136 (1-2), pp. 1-24.
- Brabcová, J., Zarevúcka, M., Macková, M. Differences in hydrolytic abilities of two crude lipases from *Geotrichum candidum* 4013 (2010) *Yeast*, 27 (12), pp. 1029-1038.
- Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisán, J.M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4), pp. 171-176.
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Oliart Ros, R. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (2005) *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (6), pp. 648-654.
- Chang, S.-F., Chang, S.-W., Yen, Y.-H., Shieh, C.-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM (2007) *Applied Clay Science*, 37 (1-2), pp. 67-73.
- Chiou, S.-H., Wu, W.-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups (2004) *Biomaterials*, 25 (2), pp. 197-204.
- Fernández-Lorente, G., Palomo, J.M., Cabrera, Z., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium (2007) *Biotechnology and Bioengineering*, 97 (2), pp. 242-250.

- Gaskin, D.J.H., Romojaro, A., Turner, N.A., Jenkins, J., Vulfson, E.N. Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis (2001) *Biotechnology and Bioengineering*, 73 (6), pp. 433-441.
- Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Priya, T.L., Annadurai, G. Purification of lipase from *Cunninghamella verticillata* and optimization of enzyme activity using response surface methodology (2002) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 (5), pp. 449-458.
- Gupta, R., Rathi, P., Gupta, N., Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: An overview (2003) *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37 (1), pp. 63-71.
- Helistö, P., Korpela, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method (1998) *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (1-2), pp. 113-117.
- Hideko, I., Harumi, O., Hiroh, I., Setsuzo, T. Studies on lipase from *Mucor javanicus*. I. Purification and properties (1975) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 388 (3), pp. 413-422.
- Hlavsová, K., Zarevúcka, M., Wimmer, Z., Macková, M., Sovová, H. *Geotrichum candidum* 4013: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61 (3-4), pp. 188-193.
- Huang, X.-J., Yu, A.-G., Jiang, J., Pan, C., Qian, J.-W., Xu, Z.-K. Surface modification of nanofibrous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) membrane with biomacromolecules for lipase immobilization (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4), pp. 250-256.
- Huge-Jensen, B., Galluzzo, D.R., Jensen, R.G. Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miehei* (1988) *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (6), pp. 905-910.
- Isobe, K., Nokihara, K., Yamaguchi, S., Mase, T., Schmid, R.D. Crystallization and characterization of monoacylglycerol and diacylglycerol lipase from *Penicillium camembertii* (1992) *European Journal of Biochemistry*, 203 (1-2), pp. 233-237.
- Ji, Q., Xiao, S., He, B., Liu, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production (2010) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (3-4), pp. 264-269.
- Kanwar, S.S., Kaushal, R.K., Jawed, A., Gupta, R., Chimni, S.S. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric

- assay: A comparative study (2005) *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42 (4), pp. 233-237.
- Lai, D.T., O'Connor, C.J. Synergistic effects of surfactants on kid pregastric lipase catalyzed hydrolysis reactions (2000) *Langmuir*, 16 (1), pp. 115-121.
- Lanser, A.C., Manthey, L.K., Hou, C.T. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein (2002) *Current Microbiology*, 44 (5), pp. 336-340.
- Li, N., Zong, M.-H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications (2010) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (1-2), pp. 43-54.
- London, E., Brown, D.A. Insolubility of lipids in Triton X-100: Physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts) (2000) *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1508 (1-2), pp. 182-195.
- Martín, J.C., Bello, J.F., Burguillo, F.J., Roig, M.G. Kinetic behaviour and reaction mechanism of the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in mixed micelles with Triton X-100 catalyzed by lipase from *Candida rugosa* (1994) *Journal of Molecular Catalysis*, 93 (1), pp. 37-52.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase (1995) *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1258 (3), pp. 272-276.
- Mayordomo, I., Randez-Gil, F., Prieto, J.A. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans* (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (1), pp. 105-109.
- Messaoudi, A., Belguith, H., Gram, I., Hamida, J.B. Classification of EC 3.1.1.3 bacterial true lipases using phylogenetic analysis (2010) *African Journal of Biotechnology*, 9 (48), pp. 8243-8247.
- Mine, Y., Fukunaga, K., Maruoka, N., Nakao, K., Sugimura, Y. Preparation of detergent-lipase complexes utilizing water-soluble amphiphiles in single aqueous phase and catalysis of transesterifications in homogeneous organic solvents (2000) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (6), pp. 631-636.
- Mine, Y., Fukunaga, K., Yoshimoto, M., Nakao, K., Sugimura, Y. Modification of lipases with poly(ethylene glycol) and poly(oxyethylene) detergents and their catalytic activities in

- organic solvents (2001) *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (6), pp. 539-543.
- Mogensen, J.E., Sehgal, P., Otzen, D.E. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents (2005) *Biochemistry*, 44 (5), pp. 1719-1730.
- Nalder, T.D., Marshall, S., Pfeffer, F.M., Barrow, C.J. Characterisation of lipase fatty acid selectivity using novel omega-3 pNP-acyl esters (2014) *Journal of Functional Foods*, 6 (1), pp. 259-269.
- Namboodiri, V.M.H., Chattopadhyaya, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger* (2000) *Lipids*, 35 (5), pp. 495-502.
- Nini, L., Sarda, L., Comeau, L.-C., Boitard, E., Dubès, J.-P., Chahinian, H. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: A kinetic study (2001) *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1534 (1), pp. 34-44.
- Oh, S.-W., Gaskin, D.J.H., Young Kwon, D., Vulfson, E.N. Properties of recombinant *Rhizomucor miehei* lipase with amino acid substitutions of Phe94 in the substrate binding domain (2001) *Biotechnology Letters*, 23 (7), pp. 563-568.
- Osuna, V., Rivero, I.A. Study of the influence of microwave and conventional heating on the lipase-catalyzed esterification of lauric acid with different alcohols (2012) *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56 (2), pp. 176-182.
- Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C., Caliskan, M. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains (2009) *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (1), pp. 105-110.
- Ozmen, E.Y., Sezgin, M., Yilmaz, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4), pp. 109-114.
- Ozyilmaz, G. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56 (4), pp. 231-236.
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability (2008) *Bioresource Technology*, 99 (7), pp. 2566-2570.

- Palacios, D., Busto, M.D., Ortega, N. Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media (2014) *LWT - Food Science and Technology*, 55 (2), pp. 536-542.
- Palomo, J.M., Fuentes, M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J.M., Fernández-Lafuente, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality (2003) *Biomacromolecules*, 4 (1), pp. 1-6.
- Pedersen, N.R., Wimmer, R., Emmersen, J., Degn, P., Pedersen, L.H. Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. (2002) *Carbohydrate research*, 337 (13), pp. 1179-1184.
- Pencreac'h, G., Baratti, J.C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media (1996) *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (6), pp. 417-422.
- Pencreac'h, G., Leullier, M., Baratti, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* (1997) *Biotechnology and Bioengineering*, 56 (2), pp. 181-189.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site (1998) *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1-2), pp. 67-80.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. Lipases at interfaces: A review (2009) *Advances in Colloid and Interface Science*, 147-148 (C), pp. 237-250.
- Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification (2010) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66 (1-2), pp. 15-32.
- Salameh MA, Wiegel J. Effects of Detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkalithermophilic lipases from *Thermosyntropha lipolytica* (2010) *The Open Biochemistry Journal*, (4) pp.22-28.
- Salihu, A., Alam, M.Z., Abdulkarim, M.I., Salleh, H.M. Effect of process parameters on lipase production by *Candida cylindracea* in stirred tank bioreactor using renewable palm oil mill effluent based medium (2011) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72 (3-4), pp. 187-192.
- Schomaecker, R., Robinson, B.H., Fletcher, P.D.I. Interaction of enzymes with surfactants in aqueous solution and in water-in-oil microemulsions (1988) *Journal of the Chemical Society, Faraday*

- Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 84 (12), pp. 4203-4212.
- Schrag, J.D., Li, Y., Cygler, M., Lang, D., Burgdorf, T., Hecht, H.-J., Schmid, R., Schomburg, D., Rydel, T.J., Oliver, J.D., Strickland, L.C., Dunaway, C.M., Larson, S.B., Day, J., McPherson, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase (1997) Structure, 5 (2), pp. 187-202.
- Shu, Z., Duan, M., Yang, J., Xu, L., Yan, Y. *Aspergillus niger* lipase: Heterologous expression in *Pichia pastoris*, molecular modeling prediction and the importance of the hinge domains at both sides of the lid domain to interfacial activation (2009) Biotechnology Progress, 25 (2), pp. 409-416.
- Simons, J.-W.F.A., Boots, J.-W.P., Kats, M.P., Slotboom, A.J., Egmond, M.R., Verheij, H.M. Dissecting the catalytic mechanism of staphylococcal lipases using carbamate substrates: Chain length selectivity, interfacial activation, and cofactor dependence (1997) Biochemistry, 36 (47), pp. 14539-14550.
- Singh, M., Singh, R.S., Banerjee, U.C. Stereoselective synthesis of (R)-1-chloro-3(3,4-difluorophenoxy)-2-propanol using lipases from *Pseudomonas aeruginosa* in ionic liquid-containing system (2009) Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 56 (4), pp. 294-299.
- Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T., Menge, U., Schmid, R.D. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase 1 (1997) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 74 (4), pp. 427-433.
- Tombs, M.P., Blake, G.G. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases (1982) Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular, 700 (1), pp. 81-89.
- Trodler, P., Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents (2008) BMC Structural Biology, 8, art. no. 9, .
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica* (1994) Structure, 2 (4), pp. 293-308.
- Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G., Dubreucq, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium (2002) Enzyme and Microbial Technology, 31 (5), pp. 648-655.

- Verger, R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts (1997) *Trends in Biotechnology*, 15 (1), pp. 32-38.
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K., Erdmann, H. Comparison of lipases by different assays (1992) *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (8), pp. 631-639.
- Yamaguchi, S., Mase, T. Purification and characterization of mono- and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150 (1991) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34 (6), pp. 720-725.
- Yang, J., Koga, Y., Nakano, H., Yamane, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site (2002) *Protein Engineering*, 15 (2), pp. 147-152.
- Ye, P., Xu, Z.-K., Wang, Z.-G., Wu, J., Deng, H.-T., Seta, P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane (2005) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32 (4), pp. 115-121.
- Yi, S.-S., Noh, J.-M., Lee, Y.-S. Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa* (2009) *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1-4), pp. 123-129.
- Yoo, H.-Y., Simkhada, J.R., Cho, S.S., Park, D.H., Kim, S.W., Seong, C.N., Yoo, J.C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production (2011) *Bioresource Technology*, 102 (10), pp. 6104-6111.
- Zaman, M.M., Hayashi, Y., Talukder, M.M.R., Kawanishi, T. Activity of acetone-treated *Chromobacterium viscosum* lipase in AOT reverse micelles in the presence of low molecular weight polyethylene glycol (2006) *Biochemical Engineering Journal*, 29 (1-2), pp. 46-54.
- Zhao, L.-L., Xu, J.-H., Zhao, J., Pan, J., Wang, Z.-L. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010 (2008) *Process Biochemistry*, 43 (6), pp. 626-633.

Abreviaturas

AOT	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio
CALB	Lipasa B de <i>C. antarctica</i>
CMC	Concentración micelar crítica
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> NPB	<i>p</i> -nitrofenil butirato
<i>p</i> NPD	<i>p</i> -nitrofenil decanoato
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil palmitato
RML	Lipasa de <i>R. miehei</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
THAM	Trishidroxiaminometano

Listado de figuras

Figura 1	Recta de calibrado de <i>p</i> -nitrofenol	96
Figura 2	Recta de calibrado de <i>p</i> -nitrofenol tratado con la solución Marmur.....	97
Figura 3	Eficiencia de la detección de la actividad lipasa con <i>p</i> NPP como sustrato por la adición de acetona:etanol, acetona:etanol 0 °C y solución Marmur. A) Lipase PS; B) Lipolase	105
Figura 4	Eficiencia del tiempo de tratamiento térmico sobre la detención de la actividad lipasa con <i>p</i> NPP como sustrato.....	106
Figura 5	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con Lipase PS. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%	110
Figura 6	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con A) Lipase PS-CI sin Tritón X-100; B) Lipase PS-CI con Tritón X-100 al 0,4%; C) Lipase PS-DI sin Tritón X-100; D) Lipase PS-DI con Tritón X-100 al 0,4%	111
Figura 7	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con Novozym 435. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%	113
Figura 8	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con A) Lipase A; B) Lipase M.....	116
Figura 9	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con Lipase G	117

Figura 10	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres A) Lipolase sin Tritón X-100; B) Lipolase con Tritón X-100 al 0,4%; C) Palatase sin Tritón X-100; D) Palatase con Tritón X-100 al 0,4%.....	119
Figura 11	Efecto de la concentración de <i>p</i> NP-butirato sobre la actividad hidrolítica. A) Comportamiento sin Tritón X-100; B) Comportamiento con Tritón X-100 al 0,4%.....	120
Figura 12	Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de <i>p</i> NP-ésteres con Lipozyme RM-IM. A) Sin Tritón X-100; B) Con Tritón X-100 al 0,4%	122
Figura 13	Evaluación de la actividad hidrolítica frente a distintos triglicéridos. A) Enzimas libres; B) Enzimas inmovilizadas	124

Listado de tablas

Tabla 1	Relación de preparados comerciales de lipasas libres e inmovilizadas	83
Tabla 2	Métodos de evaluación de la actividad lipasa.....	87
Tabla 3	Revisión de las distintas técnicas/agentes de detección empleadas en los ensayos enzimáticos de lipasas a punto final usando <i>p</i> NP-palmitato como sustrato	91
Tabla 4	Concentración de enzima (mg/ml) de lipasas libres en los ensayos de determinación de la actividad hidrolítica.....	93
Tabla 5	Cantidad de enzima (mg) de lipasas inmovilizadas en los ensayos de determinación de la actividad hidrolítica	93
Tabla 6	Efecto de distintos emulsionantes sobre la actividad hidrolítica de lipasas de distinto origen	101
Tabla 7	Parámetros cinéticos de Lipase PS, Lipase PS-DI, Lipase PS-CI y Novozym 435	109
Tabla 8	Parámetros cinéticos de Lipase A, Lipase G y Lipase M.	115
Tabla 9	Parámetros cinéticos de Lipolase, Palatase y Lipozyme RM-IM	118
Tabla 10	Actividad hidrolítica de distintas lipasas sobre aceites.....	124

**Síntesis enzimática de
lípidos estructurados
enriquecidos en ácido
 α -linolénico**

Capítulo III Síntesis enzimática de lípidos estructurados enriquecidos en ácido α -linolénico

Resumen	145
1. Introducción	146
2. Objetivos.....	151
3. Material y métodos	152
3.1. Acidólisis enzimática de trioctanoato con ácido α -linolénico (ALA).....	152
3.1.1. Reactivos.....	152
3.1.2. Protocolo experimental	152
3.2. Separación de acilgliceroles y ácidos grasos libres mediante TLC.....	153
3.2.1. Reactivos	153
3.2.2. Protocolo experimental.....	153
3.3. Determinación del perfil de ácidos grasos	154
3.3.1. Reactivos	154
3.3.2. Extracción de triglicéridos.....	154
3.3.3. Derivatización de ácidos grasos	155
3.3.4. Análisis de FAMES por cromatografía de gases	156
3.3.5. Curva de calibrado	157
3.4. Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites y grasas	157
3.4.1. Reactivos	157
3.4.2. Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico	158
3.4.3. Determinación del tiempo de inducción.....	158
4. Resultados y discusión	160
4.1. Acidólisis enzimática de trioctanoato con ALA.....	162
4.1.1. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipase PS-CI.....	164

4.1.2. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipase PS-DI.....	171
4.1.3. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipozyme RM-IM.....	176
4.2. Enriquecimiento de aceite de palma con ALA	183
4.2.1. Estabilidad oxidativa de los lípidos sintetizados	186
5. Conclusiones.....	187
6. Referencias	188
Abreviaturas	191
Listado de figuras	193
Listado de tablas	197

Capítulo III

Síntesis enzimática de lípidos estructurados enriquecidos en ácido α -linolénico

Resumen

La producción de lípidos estructurados (SL) enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como el α -linolénico (ALA), ha generado un gran interés en la industria alimentaria por sus demostrados efectos saludables. En concreto, este ácido graso esencial ω -3, favorece la normalización del perfil lipídico y ayuda a modular la respuesta inflamatoria. La acidólisis enzimática catalizada por lipasas 1,3 específicas, en la que el enlace éster de un triglicérido interacciona con un ácido graso libre liberándose la fracción ácida del éster, es una de las metodologías más empleadas para la síntesis de SL por su sencillez y especificidad. En estas reacciones influyen diversos factores por lo que es fundamental una correcta elección de sus niveles de actuación. El objetivo de este trabajo se centró en el estudio de la síntesis de SL mediante acidólisis enzimática de gliceriltriocanoato (TO) y ALA con los preparados enzimáticos Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM. Se procedió a la optimización de las condiciones de reacción aplicando la metodología de superficie de respuesta. Los factores estudiados para las tres enzimas fueron la relación molar de sustratos (TO/ALA), temperatura y tiempo de reacción, siendo la variable respuesta el porcentaje de ALA incorporado en el triglicérido. Los resultados obtenidos mostraron que para los tres preparados enzimáticos la relación molar TO/ALA, era el factor más importante en el proceso, comprobándose que el incremento de la cantidad de ALA mejoraba su incorporación. En las condiciones óptimas, el porcentaje de ALA incorporado en el triglicérido fue de 26, 27 y 24%, para Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM, respectivamente. En base a las experiencias anteriores se seleccionó el preparado PS-CI y las condiciones más adecuadas de reacción para su aplicación en la acidólisis de un aceite comercial de palma y ALA. Se obtuvo un aceite altamente enriquecido en ALA (39%), si bien el producto obtenido presentaba una menor estabilidad oxidativa que el aceite de partida.

1. Introducción

La producción de los denominados **lípidos estructurados (SL)** ha despertado, en los últimos años, un gran interés en la industria alimentaria (Capítulo I apdo. 2.2.). Estos compuestos se sintetizan de forma que su composición y distribución de ácidos grasos tenga unas determinadas características físico-químicas y/o nutricionales. En concreto, una de las orientaciones en la producción de SL es el enriquecimiento en ácidos grasos ω -3 para normalizar el balance de PUFAs ω -6/ ω -3. En este sentido, se han descrito diversos trabajos centrados en la producción de lípidos con un mayor contenido en ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido linoleico conjugado (CLA) (Hamam y Shahidi, 2006; Nagachinta y Akoh, 2013; Alim *et al.*, 2008).

El **ácido α -linolénico (ALA)** es un ácido graso esencial ω -3 que el organismo puede emplear en la síntesis de otros ácidos grasos como EPA y DHA con probados efectos saludables. Algunos estudios indican que los niveles de conversión en ácidos grasos de mayor longitud de cadena y grado de insaturación son bajos, motivo por el cual el número de investigaciones que emplean ALA en la producción de SL es reducido. Actualmente el ALA ha generado un mayor interés al promover diversos efectos positivos sobre la salud humana, por su capacidad para interferir en la producción de mediadores proinflamatorios, así como por el efecto directo sobre la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad).

Entre las distintas metodologías de producción de SL mediante procesos enzimáticos con lipasas destacan las reacciones de **acidólisis** en las que el enlace éster de un triglicéridos interacciona con un ácido graso libre (AGL), liberándose la fracción ácida del éster.

Las reacciones de acidólisis se ven afectadas por diversos factores que influyen tanto en el desarrollo de la reacción como sobre la estabilidad de la enzima. Entre estos se encuentran el medio de reacción, el ratio molar triglicérido ácido/graso libre, la temperatura, el tiempo, la actividad de agua y la cantidad de enzima.

Entre los distintos **medios de reacción** se ha comprobado que los solventes orgánicos no polares como hexano o isooctano, pueden mejorar la producción de SL respecto a solventes polares como la acetona (Zhao *et al.*, 2007). No obstante, se ha observado que las interacciones entre el solvente y la enzima provocan distintos efectos como la eliminación del agua conformacional provocando la desactivación de la enzima. En este sentido, algunos autores indican que los medios “free-solvent” presentan grandes ventajas en lo que se refiere a costes y toxicidad respecto al uso de solventes orgánicos.

El **ratio molar** triglicérido ácido/graso libre (TG/AGL) es un factor muy influyente en el proceso y guarda una estrecha relación con otros factores como el tiempo de reacción, la enzima y su soporte de inmovilización, así como del medio de reacción. En las reacciones de acidólisis, las lipasas 1,3 específicas pueden incorporar máximo un 66% de ácidos grasos, motivo por el cual algunos autores indican que ratios molares ligeramente superiores a 1:2 resultan ser los más apropiados para estas reacciones con lipasas específicas (Kim *et al.*, 2001). No obstante, estos ratios pueden ser insuficientes por lo que hay investigaciones en las que se emplea un exceso del ácido graso libre, para obtener una mejora en la incorporación de los AGL por el desplazamiento del equilibrio de la reacción (Jennings y Akoh, 2001).

La **temperatura**, además de a la velocidad de catálisis, afecta a la estabilidad de la proteína. La estabilidad de las enzimas en medios orgánicos está relacionada tanto con aspectos termodinámicos (plegamiento, desnaturalización e interacciones

entre solvente y proteína) como con la hidratación proteica. La inmovilización, como ya se ha mencionado, suele tener un efecto positivo sobre la estabilidad térmica de las enzimas, por lo que las formas inmovilizadas suelen ser activas en un rango más amplio de temperaturas y la caída de la actividad por desnaturalización no suele ser tan pronunciada.

Conforme transcurre el **tiempo de reacción** la cantidad de ácidos grasos introducidos en los triglicéridos se incrementa hasta alcanzar un equilibrio en el que se obtiene la máxima cantidad de SL producidos. El tiempo en el que se alcanza el equilibrio se ve influenciado por la cantidad de enzima, la temperatura y la relación molar. Algunos estudios indican que el uso de tiempos prolongados, además de no ser útiles desde un punto de vista operativo, pueden disminuir el rendimiento del proceso al perderse parte de los SL formados debido a reacciones de acilmigración (Namal Senanayake y Shahidi, 2002; González Moreno *et al.*, 2004).

Dada la capacidad del agua tanto para unirse a la estructura proteica como para participar como sustrato, el contenido en agua juega un papel muy importante en el proceso. En las reacciones de transesterificación es necesario fijar **la actividad de agua** en valores lo más bajos posible de modo que las reacciones de hidrólisis se minimicen pero sin que la disminución del grado de hidratación de la enzima conlleve una excesiva rigidez en la estructura proteica (Valivety *et al.*, 1993; Nordblad y Adlercreutz, 2008).

Por otro lado, desde un punto de vista económico determinar la mínima **cantidad de enzima** con la que se obtienen rendimientos satisfactorios es uno de los grandes objetivos a la hora de poder trasladar un proceso desde el laboratorio hasta la producción a gran escala. Aunque el incremento de la cantidad de lipasa empleada por encima del 5% pueda suponer una mayor obtención de SL en tiempos más cortos, este incremento no siempre es

significativo lo que no justifica el uso de cantidades superiores (Zhao *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, el estudio del efecto de los distintos factores que influyen en la actividad enzimática se lleva a cabo variando cada uno de ellos mientras se mantiene constante el resto. Este tipo de estudios únicamente permiten determinar los efectos de los factores de forma individual sin obtener información acerca de las posibles interacciones que puedan tener lugar. Dada la fuerte interrelación indicada entre algunos de los factores que intervienen en las reacciones mediadas por lipasas, determinar únicamente el efecto individual de estos resulta insuficiente para establecer unas condiciones óptimas de reacción. En este sentido, es necesario caracterizar cada preparado enzimático y examinar su potencial aplicación industrial teniendo en cuenta tanto los efectos propios de cada factor como los debidos a la interacción con otras variables del proceso obteniendo una combinación apropiada de las variables y sus niveles. Desde un punto de vista económico y técnico esta optimización es un requisito imprescindible para el desarrollo de procesos más eficientes.

Para este propósito los diseños factoriales presentan grandes ventajas frente a la forma tradicional de experimentación permitiendo obtener información sobre los efectos de las variables a partir de unos resultados estadísticamente aceptables usando un reducido número de experimentaciones. Por otro lado, los diseños factoriales pueden ser ampliados si el domino empleado inicialmente no es apropiado. **La metodología de superficie de respuesta (RSM)** es una estrategia efectiva de modelado que permite encontrar las condiciones experimentales óptimas de un proceso (Myers *et al.*, 2009). Un gran número de trabajos centrados en la optimización de las condiciones de producción de SL con lipasas emplean RSM por su rapidez y menor coste (Alim *et al.*, 2008; Silroy *et al.*, 2014). La selección del diseño experimental depende, entre otros aspectos, del objetivo de la experimentación y del número de factores y niveles a estudiar. Así

mismo, el tipo de variable respuesta es elegida en función del objetivo del estudio empleándose comúnmente el porcentaje en ácidos grasos introducidos tanto totales como en posición 2, para caracterizar la composición de los SL, y el punto de fusión para determinar su consistencia física (Nascimento *et al.*, 2004; Foresti y Ferreira, 2010). Adicionalmente, puede evaluarse la estabilidad oxidativa de los productos de reacción empleando distintas metodologías como el ensayo del TBA (ácido tiobarbitúrico), índice de peróxidos o el tiempo de inducción.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo se centró en estudiar la producción de lípidos estructurados enriquecidos en ácido α -linolénico (ALA) mediante acidólisis enzimática de gliceriltrioctanoato (TO) y aceite comercial de palma en medio orgánico. La consecución de este objetivo supuso el desarrollo de los siguientes objetivos secundarios:

1. Optimización, mediante la metodología de superficie de respuesta, de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con las enzimas Lipase PS-CI, Lipase PS-DI, y Lipozyme RM-IM. Para ello, se evaluó la influencia de los factores relación molar de sustratos (TO/ALA), temperatura y tiempo sobre la capacidad de transesterificación de los preparados enzimáticos.
2. Enriquecimiento del contenido en ALA de un aceite de palma comercial. A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se seleccionó el preparado enzimático comercial y las condiciones de reacción más apropiadas para este propósito. Así mismo, se evaluó la estabilidad oxidativa del producto de la acidólisis enzimática.

3. Material y métodos

3.1. Acidólisis enzimática de trioctanoato con ácido α -linolénico (ALA)

3.1.1. Reactivos

- R.1 Gliceriltrioctanoato (TO) 0,1 mg/ml: pesar 10 mg de ácido trioctanoato (Sigma-Aldrich) y enrasar a 100 ml con n-hexano.
- R.2 Ácido α -linolénico (ALA) 0,1 mg/ml: pesar 10 mg de α -linolénico comercial (\approx 70% de pureza, 25% ácido linoleico y 5% ácido oleico) (Sigma-Aldrich) y enrasar a 100 ml con n-hexano.
- R.3 Solución saturada de cloruro de litio.
- R.4 Preparados enzimáticos comerciales Lipase PS-DI, Lipase PS-CI y Lipozyme RM-IM, cuyo origen y casa comercial han sido previamente detallados en la Tabla 1 del Capítulo II. En todos los casos se pesaron 10 mg de inmovilizado y se almacenaron en refrigeración en frascos herméticamente cerrados junto con cloruro de litio (R.3) durante 24 h para fijar su actividad de agua en 0,158.

3.1.2. Protocolo experimental

Las reacciones de acidólisis se realizaron en tubos de cristal de 10 ml, herméticamente cerrados, utilizando 100 mg de una mezcla de sustratos que contenían TO y ALA (R.1 y R.2) en diferentes relaciones molares (1:4, 1:5 y 1:6) y 3 ml de n-hexano. La reacción se iniciaba por adición de 10 mg de lipasa (R.4), previamente equilibrada su actividad de agua, siendo el 10% del total de sustrato. Las muestras se sometían a incubación con agitación orbital (200 rpm) a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C) y tiempos de reacción (12, 24 y 36 h). Las reacciones se

paraban por eliminación de la enzima mediante filtración a través de columnas de sulfato de sodio anhidro. Todas las reacciones se realizaban por triplicado incluyendo muestras control en las que no se adicionaba enzima.

Para evaluar el proceso se determinó el % de ALA incorporado en los triglicéridos definido como el número de moles de ALA introducidos en el triglicérido respecto al máximo teórico que pueden incorporarse.

3.2. Separación de acilgliceroles y ácidos grasos libres mediante TLC

3.2.1. Reactivos

- R.1 Fase móvil TLC (cromatografía de capa fina) hexano:éter dietílico:ácido acético (70:30:0,5): mezclar 70 ml de hexano, 30 ml de éter dietílico y 0,5 ml de ácido acético glacial.
- R.2 Solución hidroalcohólica de (2,7) diclorofluoresceína (Sigma).

3.2.2. Protocolo experimental

Para la separación de los diferentes componentes por TLC se cargaron 0,5 mg de muestra en la placa dejando migrar durante 30 min con una mezcla de hexano:éter dietílico:ácido acético como líquido de desarrollo (R.1). Cada componente identificado en función de su R_f característico (Figura 1) era revelado con 2,7 diclorofluoresceína (R.2), raspado y derivatizado (apdo. 3.3.3.) para su posterior cuantificación por cromatografía de gases (GC).

Esta técnica fue empleada tanto para la comprobación de la extracción de los triglicéridos (apdo. 3.3.2.) como en las pruebas iniciales de monitorización de la reacción de acidólisis.

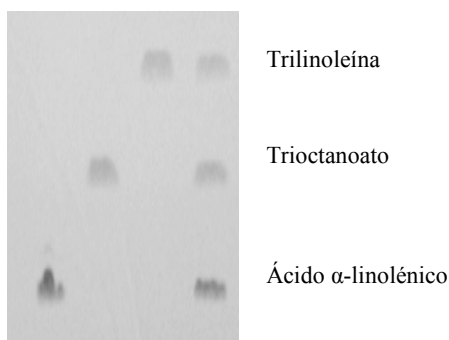


Figura 1. Separación por cromatografía de capa fina y revelado con 2,7-diclorofluoresceína de trilinoleína, TO y ALA.

3.3. Determinación del perfil de ácidos grasos

3.3.1. Reactivos

- R.1 Fenolftaleína al 0,1%: pesar 0,1 g de fenolftaleína y disolver en 100 ml de etanol.
- R.2 Solución neutralizante de KOH 0,5 N en etanol al 20% (v/v): preparar una disolución de etanol/agua al 20% (v/v), añadiendo 200 ml de etanol y enrasar con agua miliQ hasta 1 l. Pesar 28,5 g de KOH y disolver en un litro de la disolución de etanol/agua al 20% (v/v).
- R.3 Solución saturada de sal (NaCl): disolver sal en agua miliQ hasta superar el límite de solubilidad.
- R.4 Trifluoruro de boro al 10% en metanol (Sigma).
- R.5 Solución de NaOH 0,5 M en metanol.
- R.6 Ácido tridecanoico 0,1 mg/ml: pesar 10 mg de ácido tridecanoico (Sigma) y enrasar a 100 ml con n-hexano (calidad HPLC).

3.3.2. Extracción de triglicéridos

Finalizada la reacción enzimática, como paso previo a la determinación de la cantidad de ALA incorporado a los SL, era necesario la eliminación de los AGL presentes en el medio de reacción. En concreto, en este trabajo se utilizó el método descrito

por Lee y Akoh (1998) que implicaba la neutralización de los AGL y su extracción. A 3 ml de la reacción, filtrados en una columna de sulfato de sodio anhidro, se añadían 2 ml de etanol y 3 gotas de fenolftaleína como indicador (R.1). Se neutralizaron los ácidos grasos libres con KOH 0,5 N en etanol al 20% (R.2) hasta la aparición de un color rosa y se agitaba enérgicamente. Se dejaba reaccionar 20 min a 40 °C. Se añadían 5 ml de una solución saturada de sal (R.3). Se recogía la fase superior y se filtraba en una columna de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua que pudiera quedar. Se añadían 2 ml de hexano y se agitaba para reextraer los triglicéridos. Se añadían 2 ml más de una solución saturada de sal (R.3). Se volvía a recoger la fase superior y se filtraba. El hexano recogido se evaporaba en corriente de nitrógeno en baño a 50 °C. Una vez evaporado se resuspendía con hexano en los 3 ml iniciales y se comprobaba la eficiencia de la extracción mediante TLC.

3.3.3. Derivatización de ácidos grasos

La derivatización de los ácidos grasos presentes en los SL se llevó a cabo siguiendo el método modificado indicado por Alim *et al.* (2008), basado en el protocolo de metilación recomendado por la AOCS (“American Oil Chemists’ Society”) empleando trifluoruro de boro (R.4) para la producción de FAMES (ésteres metílicos de ácidos grasos). El procedimiento suponía mezclar 200 µl de los triglicéridos extraídos previamente con 100 µl de una solución de ácido tridecanoico (R.6) como patrón interno. Se añadían 1,5 ml de NaOH 0,5 M en metanol (R.5) y la mezcla se incubaba durante 10 min a 100 °C en agitación. A continuación se añadían 2 ml de BF₃ en metanol (R.4) y se incubaba a 100 °C durante 40 min agitando la mezcla de reacción para, posteriormente, enfriar hasta 40 °C y añadir 2 ml de hexano. Se agitaba enérgicamente durante 30 s e inmediatamente se añadían 5 ml de una solución saturada de sal (R.3). Se dejaba reposar y se recogía la fase superior que era filtrada en una columna de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua que pudiese quedar. Se

volvía a añadir 1 ml de hexano y se repetía el proceso de extracción de los FAMES obtenidos. El hexano recogido se evaporaba en corriente de nitrógeno y una vez evaporado se resuspendía con hexano en los 200 µl iniciales.

3.3.4. Análisis de FAMES por cromatografía de gases

En el análisis de los FAMES se empleó un cromatógrafo de gases (HP 6890 series) equipado con un detector FID (detector de ionización de llama). En cada análisis se inyectaba 1 µl de muestra obtenida tras la derivatización de los ácidos grasos. El inyector “splitless” se programó a una temperatura de 250 °C y como fase móvil se utilizó helio a una presión de 46,7 psi y un flujo de 23 ml/min. La separación se realizó mediante columna capilar Quadrex 007-23-60-0.25F (60 m x 0.25 mm x 0.2 µm, 78% cianopropil metil polixiloxano), donde el programa de temperaturas seleccionado fue de 140 °C durante los primeros 5 min, rampa de temperaturas de 4° C/min hasta 240 °C, temperatura constante de 250 °C durante 5 min. El detector estaba programado a 260 °C, y la llama con flujo de aire a 400 ml/min de hidrógeno a 40 ml/min (Figura 2).

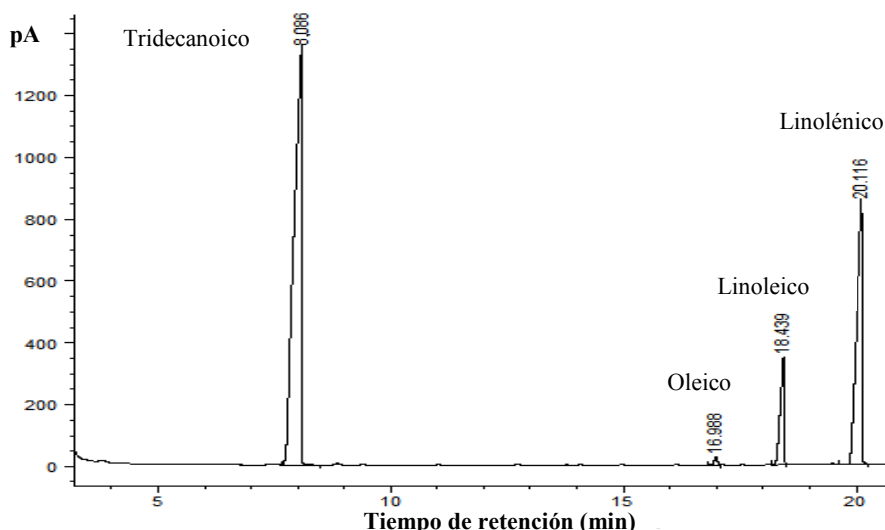


Figura 2. Cromatograma y tiempos de retención de los principales ácidos grasos del estudio.

Los FAMES fueron identificados por la comparación de los tiempos de retención con los correspondientes patrones cromatográficos (37 Component FAMES Mix, calidad analítica 10 mg/ml en cloruro de metileno, Supelco).

3.3.5. Curva de calibrado

La cuantificación del ácido α -linolénico presente en los lípidos estructurados fue realizada mediante una curva patrón de distintas cantidades de ALA junto con una cantidad fija de ácido tridecanoico como patrón interno (Figura 3).

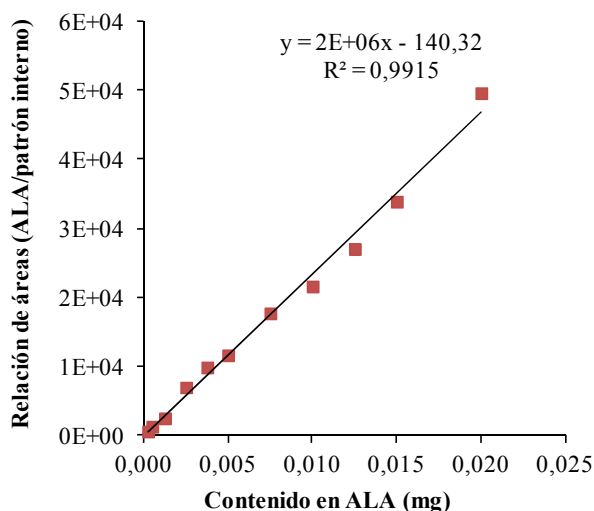


Figura 3. Curva de calibrado para el ALA con ácido tridecanoico como patrón interno.

3.4. Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites y grasas

3.4.1. Reactivos

- R.1 Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA): disolver 200 mg de TBA en 100 ml de 1-butanol.
- R.2 Muestra de aceite: pesar entre 50 y 200 mg de muestra de aceite y diluir hasta 25 ml con 1-butanol.

3.4.2. Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico

El ensayo del TBA mide los productos de oxidación secundaria (malondialdehído) de una grasa o aceite sin que sea necesario un aislamiento previo. Se basa en la reacción de condensación producida entre dos moléculas de TBA con una de malondialdehído en la que se produce un compuesto de color rojo cuya concentración se determina espectroscópicamente a 530 nm (Método Oficial AOCS Cd 19-90). Esta prueba se correlaciona bien con la evaluación sensorial de la rancidez a pesar de que mide un producto intermedio de la oxidación lipídica.

Se transferían 5 ml de cada solución (R.1 y R.2) a un tubo de ensayo hermético y la mezcla se agitaba intensamente. Los tubos de ensayo se mantenían a 95 °C durante 120 min. Una vez transcurrido el tiempo se enfriaban con agua corriente. La absorbancia se medía en una cubeta a 530 nm, usando agua destilada como referencia, en un espectrofotómetro (Bio-Rad SmartSpec™ Plus). Adicionalmente, se preparaba un blanco sin muestra.

El valor de TBA (expresado en mg) se calculaba con la siguiente fórmula, donde A es la absorbancia de la solución con muestra, B es la absorbancia del blanco y m es la masa de muestra expresada en mg.

$$\text{Valor TBA} = \frac{50 \times (A - B)}{m}$$

3.4.3. Determinación del tiempo de inducción

La medida de la estabilidad oxidativa de aceites y grasas se realizó según el método oficial AOCS Cd 12b-92 basado en la determinación del tiempo de inducción mediante un Rancimat 743 (Metrohm). La exposición a condiciones elevadas de temperatura y flujo de aire acelera la oxidación de la muestra produciéndose compuestos orgánicos volátiles y otros compuestos que son

burbujeados en un recipiente de medida con agua destilada. El tiempo que transcurre desde el inicio hasta la aparición de estos productos secundarios de la oxidación, conocido como tiempo de inducción, es un estimador de la estabilidad oxidativa de la muestra dado que superado este tiempo de inducción, en el cual la muestra permanece estable, se produce una pérdida de la calidad y/o vida útil del producto.

Los ensayos se llevaron a cabo pesando 2 g de muestra (lípidos estructurados ó aceite sin modificar) manteniendo un flujo de aire de 9 l/h y una temperatura de 110 °C, cuantificando los productos de la oxidación a través del aumento en la conductividad del agua del vaso de medida. El tiempo de inducción se determina por el punto en el que se produce el cambio en la velocidad de oxidación (Figura 4).

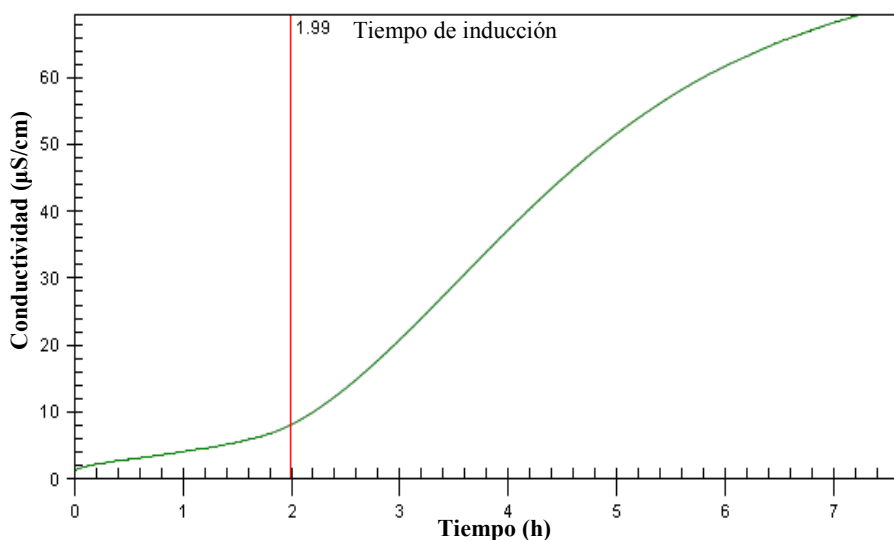


Figura 4. Gráfico del tiempo de inducción del aceite de palma.

4. Resultados y discusión

Como paso previo a la optimización de SL enriquecidos en ALA se realizó una selección de las enzimas más adecuadas teniendo en cuenta, para ello, los resultados obtenidos en el estudio sobre la capacidad hidrolítica de distintas lipasas comerciales desarrollado en el Capítulo II, junto con datos obtenidos en la bibliografía.

Lipase PS-CI y **Lipase PS-DI**, provenientes de *B. cepacia*, están inmovilizadas sobre soportes que poseen una buena estabilidad en distintos solventes orgánicos, lo que facilita que puedan ser empleados en múltiples reacciones de transesterificación en medios anhidros (Chang *et al.*, 2007; Osuna y Rivero, 2012). Además, los estudios previos realizados en el Capítulo II, mostraban que tanto PS-CI como PS-DI poseían una notable actividad hidrolítica tanto a frente a ésteres de *p*NP como a triglicéridos con diferencias en su acilselectividad. Ambas enzimas mostraban una preferencia por ésteres de *p*NP de cadena larga. Sin embargo, al actuar sobre triglicéridos con distinta longitud de cadena (gliceriltriocanoato, gliceriltridecanoato y gliceriltrioleato), Lipase PS-DI exhibía una mayor capacidad hidrolítica al reducirse la longitud del ácido graso y Lipase PS-CI no mostraba una especial preferencia por ningún sustrato.

El preparado **Lipozyme RM-IM** es uno de los más empleados en la producción de lípidos estructurados por la preferencia de la lipasa de *R. miehei* por las posiciones 1 y 3 del triglicérido. Los estudios realizados en el Capítulo II mostraban que éste preparado hidrolizaba de forma preferente ésteres de *p*NP de cadena larga mientras que cuando actuaba sobre triglicéridos, la mayor actividad se encontraba al reducir el tamaño de los ácidos grasos (gliceriltriocanoato).

Por otro lado, la lipasa de *C. antarctica* **Novozym 435** se encuentra inmovilizada sobre una resina acrílica resistente a

distintos solventes orgánicos. En el estudio de la capacidad hidrolítica (Capítulo II) se observó que éste preparado presentaba unos niveles de actividad bajos y una marcada preferencia por sustratos de cadena corta.

Los estudios de la capacidad hidrolítica realizados en el Capítulo II también indicaban que las lipasas libres **Palatase**, **Lipolase** y **Lipase PS**, que exhibían unos niveles de actividad elevados, podrían ser empleadas en la producción de SL. Por ello, se procedió a realizar un estudio preliminar de su capacidad transesterificante en medio orgánico monitorizando la reacción mediante TLC y GC. Los resultados del perfil de ácidos grasos de los triglicéridos mostraban que los tres preparados ensayados exhibían unos bajos niveles de actividad y reproducibilidad. Esto puede ser debido tanto a la baja miscibilidad observada entre las enzimas y el medio de reacción como al efecto desnaturalizante del solvente orgánico. La adición de los preparados Lipolase y Palatase (solución acuosa) sobre medio de reacción (hexano) daba lugar a la formación de un sistema heterogéneo con dos fases diferenciadas limitando el contacto entre las enzimas y el sustrato. De forma similar, el liofilizado Lipase PS mostraba una fuerte tendencia a la agregación en este solvente orgánico. Por tanto, estos tres preparados libres no fueron empleados en el estudio de la producción de SL enriquecidos en ALA mediante acidólisis enzimática.

Finalmente, y en base a las consideraciones expuestas, las enzimas seleccionadas para el estudio de producción de SL fueron los preparados comerciales inmovilizados Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme, descartando Novozym 435 por sus bajos niveles de actividad hidrolítica, así como Lipase PS, Palatase y Lipolase por su tendencia a la agregación en solventes orgánicos.

4.1. Acidólisis enzimática de trioctanoato con ALA

La optimización del proceso de producción de SL enriquecidos en ALA supuso, en primer lugar, la selección de las variables que más afectaban al proceso. Los factores y sus niveles fueron escogidos en función de la bibliografía revisada, basándose tanto en consideraciones bioquímicas como en criterios económicos y prácticos. Debido a que los preparados enzimáticos mostraron mayor actividad sobre gliceriltrioctanoato (TO) en las pruebas mediante pH-stat (Capítulo II Figura 13), se eligió este triglicérido como sustrato para la reacción de acidólisis enzimática.

Los factores relación molar de sustratos TO/ALA, temperatura y tiempo de reacción fueron estudiados a tres niveles, empleando un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras con tres repeticiones en el punto central siendo la variable respuesta el contenido de ALA (%) en los triglicéridos. Este diseño ha sido aplicado por otros autores como Hamam y Shahidi (2006) en el estudio de la reacción de acidólisis entre aceite de colza y ácidos grasos ω -3 de cadena larga con distintas lipasas. En la Tabla 1 se detallan los niveles bajo (-1) y alto (+1) así como el central (0) de cada una de los factores.

Tabla 1. Niveles de los factores en la optimización de la reacción de acidólisis enzimática de TO y ALA.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
A:Relación molar (TO/ALA)	1:4	1:5	1:6
B:Temperatura (°C)	40	50	60
C:Tiempo (h)	12	24	36

En la Tabla 2 se muestran los valores de la variable respuesta para las tres lipasas utilizadas en este trabajo (Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM) junto con las condiciones experimentales ensayadas.

A continuación, se detalla el estudio estadístico del diseño para cada uno de los preparados comerciales aplicando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI determinando la existencia de fallo de ajuste, la adecuación del modelo propuesto y la significación de sus coeficientes. Adicionalmente, se empleó la metodología RSM para la optimización del proceso y determinar las mejores condiciones de reacción permitiendo realizar un análisis del comportamiento bioquímico de las enzimas para los factores estudiados.

Tabla 2. Valores de la variable respuesta (ALA (%) en TG) en la optimización de la reacción de acidólisis para las enzimas Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM un mediante diseño 2³ central compuesto cúbico centrado en las caras.

Exp.	Factores			ALA (%) en TG		
	Relación TO/ALA	T (°C)	t (h)	Lipase PS-CI	Lipase PS-DI	Lipozyme RM-IM
1	1:4	40	12	11,33	11,81	22,55
2	1:6	40	12	17,74	21,84	23,75
3	1:4	60	12	10,93	11,67	19,55
4	1:6	60	12	14,86	13,55	22,70
5	1:4	40	36	13,52	23,51	22,14
6	1:6	40	36	21,45	17,04	23,37
7	1:4	60	36	10,46	15,32	19,37
8	1:6	60	36	15,47	17,20	21,30
9	1:4	50	24	22,14	18,96	19,80
10	1:6	50	24	24,19	20,56	22,67
11	1:5	40	24	20,27	18,47	22,27
12	1:5	60	24	12,42	17,54	22,43
13	1:5	50	12	18,73	15,47	20,88
14	1:5	50	36	19,55	15,73	20,08
15	1:5	50	24	21,82	17,32	20,93
16	1:5	50	24	21,95	16,01	20,57
17	1:5	50	24	23,12	15,74	21,10

4.1.1. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipase PS-CI

A partir de los resultados obtenidos en el diseño de experimentos propuesto para la optimización de la incorporación de ALA en trioctanoato con Lipase PS-CI (Tabla 2) se procedió al análisis del mismo. El estudio de los efectos de los factores se llevó a cabo a partir del análisis de la varianza (ANOVA). Se observó, que los datos del preparado Lipase PS-CI se ajustaban a un modelo cuadrático ya que el *p*-valor (0,1518) mostraba que no existía fallo de ajuste significativo con un nivel de confianza del 95% (Tabla 3). Además, el modelo explicaba un porcentaje muy elevado de la varianza de los datos (R^2 : 95%).

Tabla 3. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipase PS-CI.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl ^a	Razón-F	Valor-P
A: Relación Molar	64,16	1	125,16	0,0079*
B: Temperatura (°C)	40,68	1	79,36	0,0124*
C: Tiempo (h)	4,70	1	9,18	0,0938
AA	2,85	1	5,56	0,1424
AB	3,64	1	7,11	0,1166
AC	0,84	1	1,65	0,3278
BB	89,78	1	175,13	0,0057*
BC	4,15	1	8,09	0,1046
CC	24,01	1	46,84	0,0207*
Falta de ajuste	15,06	5	5,88	0,1518
Total (corr.)	348,56	16		
R^2	95,39%			

^aGl: grados de libertad.

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

Por otra parte, observando la Figura 5, se puede concluir que los residuos seguían claramente un distribución normal ya que la gráfica se aproxima a una línea recta.

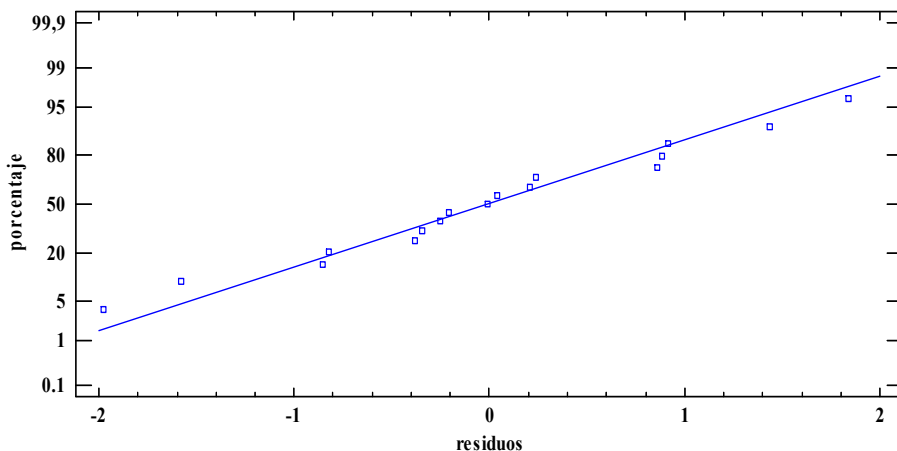


Figura 5. Gráfico de probabilidad normal de los residuos del diseño para Lipase PS-CI.

Una vez calculados los coeficientes de regresión, la ecuación que se ajusta al modelo experimental es la siguiente:

$$\text{ALA (\%)} \text{ en TG} = 22,20 + 2,53 * A - 2,02 * B + 0,69 * C + 1,03 * A^2 - 0,67 * A * B + 0,32 * A * C - 5,79 * B^2 - 0,72 * B * C - 2,99 * C^2$$

En el diagrama de Pareto se observa que los efectos principales relación molar, temperatura y tiempo de reacción (A, B, BB y CC) eran significativos pero sus interacciones no (Figura 6).

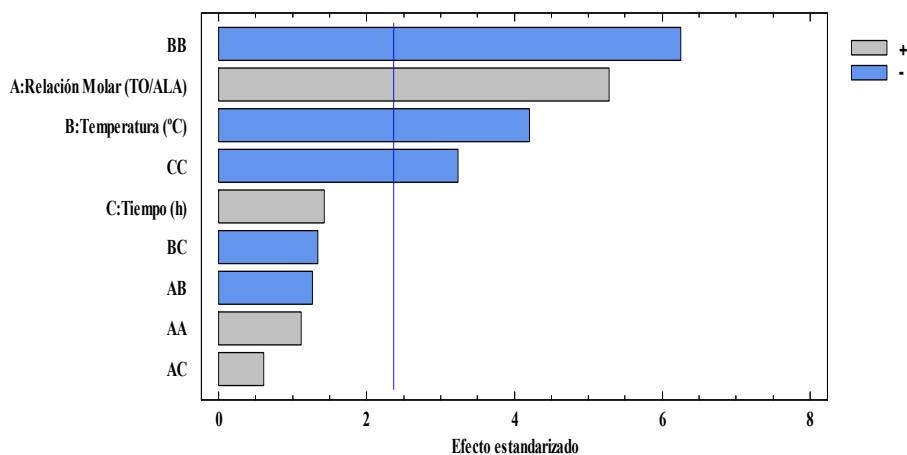


Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipase PS-CI.

Los efectos de los factores estudiados se representan en la Figura 7, observándose que un incremento de la **relación molar TO/ALA** tenía un efecto positivo sobre el % de ALA incorporado en los triglicéridos, siendo lineal en todo el dominio experimental.

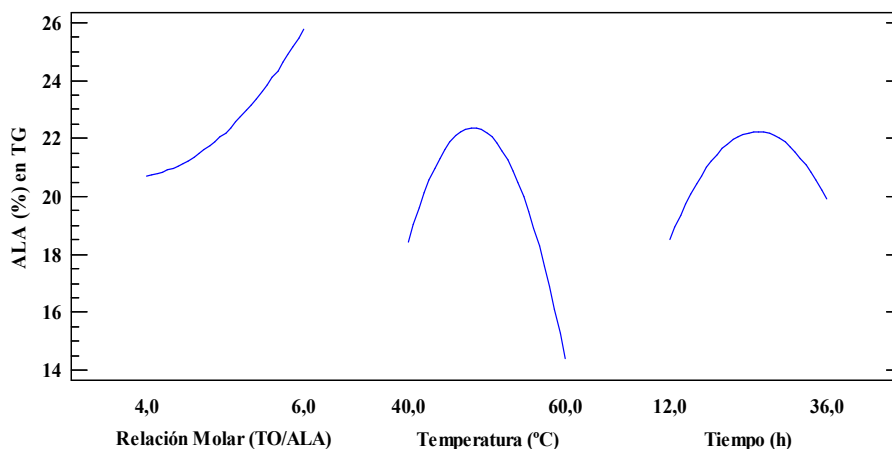


Figura 7. Gráfica de efectos principales de los factores para Lipase PS-CI.

En este estudio no se alcanzaba el estado de equilibrio en el que a partir de un ratio molar se estabilizaba la incorporación de ALA. Así, Kim *et al.* (2001) en la interesterificación de tripalmitina con ésteres etílicos de ácido linolénico conjugado observaron un comportamiento similar cuando se variaba la relación molar desde 1:1 hasta 1:5. El porcentaje de CLA incorporado se incrementaba con rapidez hasta 1:3 (TG/AGL) para hacerlo de forma más progresiva al emplear ratios superiores llegando entorno a un 60% de incorporación.

La necesidad de trabajar por encima de la relación 1:3 puede deberse a que la incorporación de la primera molécula de ácido graso resultaba relativamente sencilla, pero la incorporación de una segunda molécula era más complicada debido a impedimentos estéricos que reducían la reactividad de la enzima (Han *et al.*, 1999). La cantidad inicial de lípidos MML era bastante menor que la de MMM, sin embargo, conforme transcurría el tiempo de reacción y la cantidad de lípidos MML se incrementaba, resultaba

más sencilla la incorporación de un segundo ácido graso de cadena larga.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, a tiempos cortos con relaciones molares bajas, era introducido ácido α -linolénico, pero conforme transcurría la reacción y más ácido caprílico era liberado al medio, este podía re-esterificar de nuevo. En un punto determinado, las concentraciones de ambos ácidos grasos libres eran tales que se alcanzaba un equilibrio en el que no se observaba una modificación en la composición del triglicérido sin que se hubiesen ocupado todas las posiciones posibles por ALA. Este punto viene determinado por las concentraciones de los ácidos grasos libres en el medio de reacción y la acilselectividad de la enzima. Los tres dobles enlaces hacen que este ácido graso adquiera una forma de gancho que dificulta su incorporación en los triglicéridos (Hamam y Shahidi, 2008). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que sería posible mejorar la incorporación de ALA mediante el uso de relaciones molares superiores a 1:3, hay que considerar que los ácidos grasos que no son incorporados han de ser posteriormente eliminados, lo que supone un incremento del coste del proceso.

Al estudiar el efecto de la **temperatura** (Figura 8) se observaba un óptimo entorno a los niveles centrales del diseño. El incremento de la temperatura, desde niveles bajos hasta niveles medios, favorecía la reacción de transesterificación obteniéndose los mejores resultados a 47,5 °C con un 22,38% de ALA en los TG. Temperaturas superiores repercutían de forma negativa sobre la capacidad de la enzima para catalizar la reacción, por lo que en el extremo del dominio, el % de ALA introducido descendía hasta el 14,51%, probablemente al reducirse la estabilidad de la enzima. Un comportamiento similar fue descrito por Kim *et al.* (2001) que observaron que el preparado Lipase PS-C incrementaba su capacidad de transesterificación entre 35 y 55 °C, con un significativo descenso a temperaturas superiores.

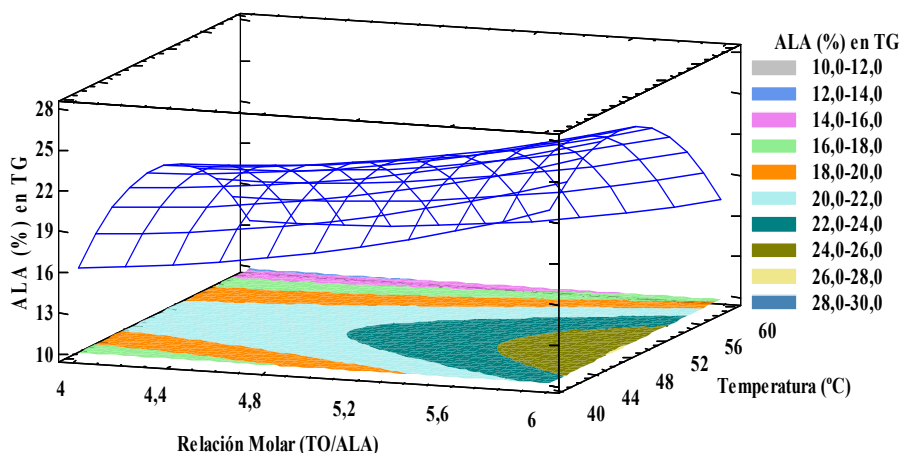


Figura 8. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Tiempo de reacción 24 h. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

En el estudio del **tiempo de reacción**, como nos indica la gráfica de efectos principales (Figura 7), se observaba un máximo local entorno al centro del diseño donde tiempos superiores a 24 h no mejoraban la incorporación de ALA, sino que incluso la disminuía ligeramente. Tiempos similares (24 h) han sido descritos por Kim *et al.* (2001) en la monitorización del tiempo de reacción en la transesterificación de tricaprilina con ésteres etílicos de CLA a relaciones molares de 1:3 utilizando la lipasa PS-C. Si bien estos autores no observaban un descenso del rendimiento de la reacción para tiempos superiores con este preparado, los ensayos realizados con otros preparados enzimáticos sí que mostraban este comportamiento. La menor incorporación de ALA observada en nuestro estudio a las 36 h pudo ser debida a que una vez alcanzado el equilibrio otras reacciones tuvieron un mayor peso en el proceso. Estas reacciones que competían con la acidólisis como la hidrólisis de los lípidos MML formados, la incorporación del ácido caprílico liberado con anterioridad o procesos de acilmigración, provocaban una liberación del ALA incorporado previamente (Han *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001).

A pesar de que los efectos de las interacciones no fueron significativos, a continuación se analizaron dichas interacciones para tener un mejor conocimiento del comportamiento de la enzima.

La Figura 9 muestra que el comportamiento de la enzima respecto a la relación molar no se modificaba al realizar los ensayos a tiempos largos o cortos. Otros estudios indican que esta **interacción relación molar-tiempo** sí que puede tener un efecto significativo en la reacción de acidólisis, y que a mayores ratios molares los tiempos requeridos para alcanzar el máximo porcentaje de incorporación son menores (Han *et al.*, 1999). En estas condiciones las reacciones de hidrólisis adquieren una mayor importancia dado que tienen lugar de forma más temprana. Por tanto, debería incrementarse linealmente y estabilizarse a un % que dependerá de la concentración en el medio de los ácidos grasos y la acilselectividad de la enzima. La caída de la actividad a tiempos largos puede deberse a que la enzima va perdiendo actividad por desnaturalización favorecida por la temperatura y el medio de reacción.

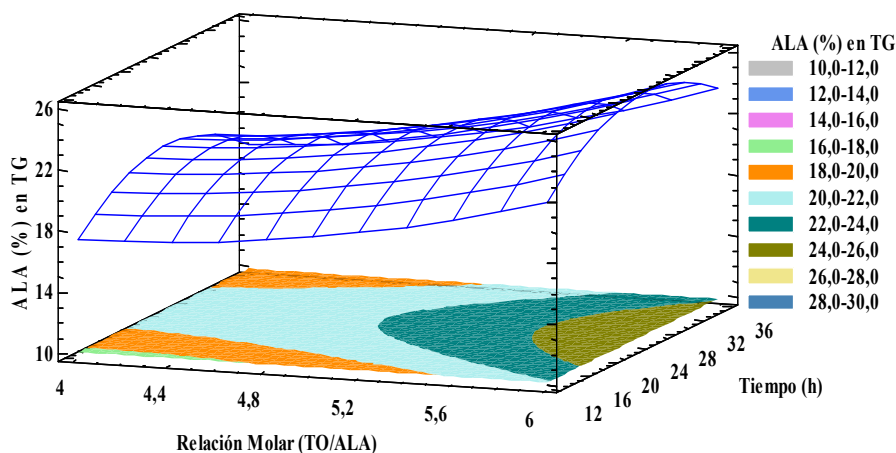


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Temperatura de reacción 50 °C. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

Como se puede apreciar en la Figura 10 de **interacción tiempo-temperatura**, el empleo de tiempos largos de reacción provocaba un descenso del ALA en TG cuando se realizaba el ensayo a temperaturas altas (60 °C) mientras que a 40 °C se observaba una estabilización del contenido en ALA. Como se ha indicado anteriormente, la temperatura tiene un efecto negativo sobre la estabilidad de la proteína enzimática lo que reduce su capacidad transesterificante. Esto da lugar a que las reacciones de hidrólisis adquieran mayor importancia reduciendo el rendimiento de la acidólisis al liberar el ALA de los SL previamente formados.

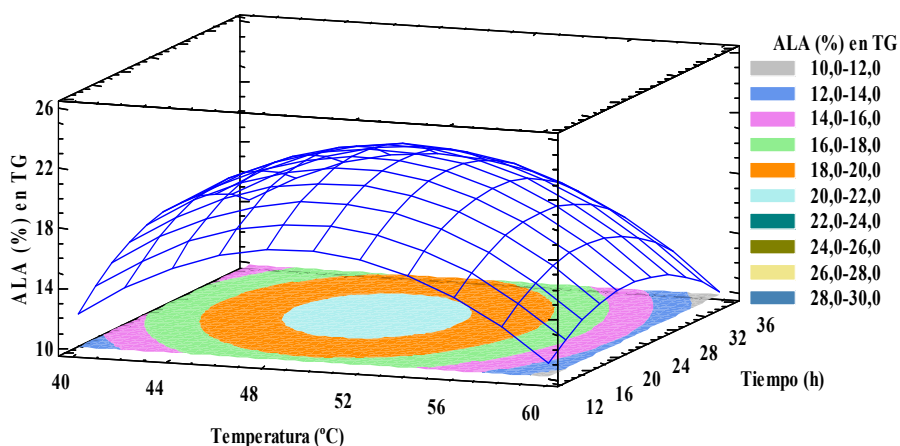


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Relación molar 1:4.

Finalmente, a través de la herramienta STATGRAPHICS Centurión XVI se determinaron las **condiciones óptimas de reacción**. Éstas se correspondían con relaciones molares altas (1:6) combinadas con temperaturas y tiempos de reacción medios (47,5 °C y 26,3 h), alcanzando un máximo teórico del 26,19% de ALA incorporado en los triglicéridos. Así mismo, como parte del estudio se procedió a la comprobación del modelo mediante el ensayo de las condiciones óptimas indicadas por RSM. Los resultados experimentales en estas condiciones fueron del 26,08% de ALA en los triglicéridos, confirmando que el modelo ajustado poseía una excelente capacidad de predicción.

4.1.2. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipase PS-DI

El diseño experimental empleado en PS-DI fue el mismo que el detallado anteriormente para la acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI (Tabla 2). A partir de los datos obtenidos se realizó el análisis de la varianza (Tabla 4), la cual indicaba que el modelo propuesto era apropiado para describir los resultados experimentales y explicaba una cantidad significativa de la varianza (R^2 : 93,4%).

Tabla 4. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipase PS-DI.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI ^a	Razón-F	Valor-P
A: Relación Molar	35,16	1	49,23	0,0197*
B: Temperatura (°C)	0,80	1	1,12	0,4014
C: Tiempo (h)	0,02	1	0,02	0,8892
AA	15,58	1	21,82	0,0429*
AB	15,50	1	21,71	0,0431
AC	71,92	1	100,70	0,0098*
BB	1,25	1	1,75	0,3164
BC	14,21	1	19,90	0,0468*
CC	7,60	1	10,64	0,0825
Falta de ajuste	8,37	4	2,93	0,2703
Total (corr.)	149,18	15		
R^2	93,43%			

^aGI: grados de libertad.

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

A pesar de la buena correlación entre los datos experimentales y los resultados predichos (Figura 11), durante la experimentación se detectó una tendencia a la agregación del inmovilizado que pudo dar lugar a restricciones difusionales.

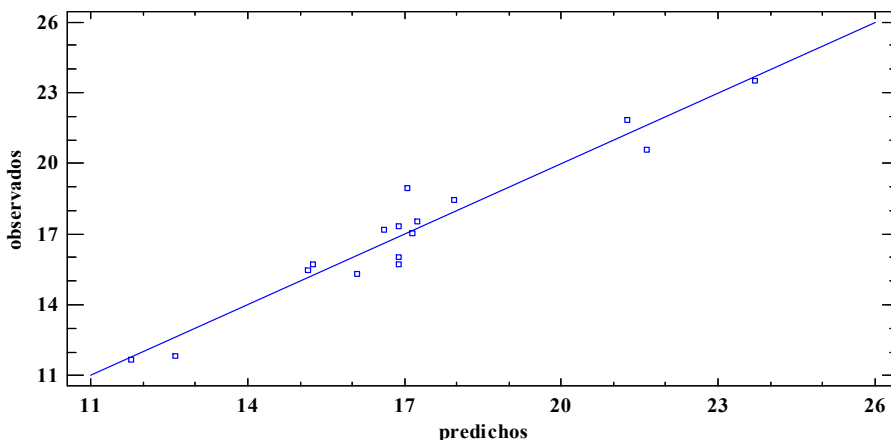


Figura 11. Gráfico de relación entre puntos experimentales y predichos por el modelo ajustado para Lipase PS-DI.

La ecuación que explicaba el comportamiento experimental era:

$$\text{ALA (\% en TG)} = 16,90 + 2,29 * A - 0,34 * B + 0,05 * C + 2,45 * A^2 + 1,77 * A * B - 3,81 * A * C + 0,69 * B^2 - 1,69 * B * C - 1,71 * C^2$$

Los efectos significativos de acuerdo a los resultados del diagrama de Pareto (Figura 12) eran la relación molar (A y A²) así como las interacciones entre los 3 factores (AC, AB y BC).

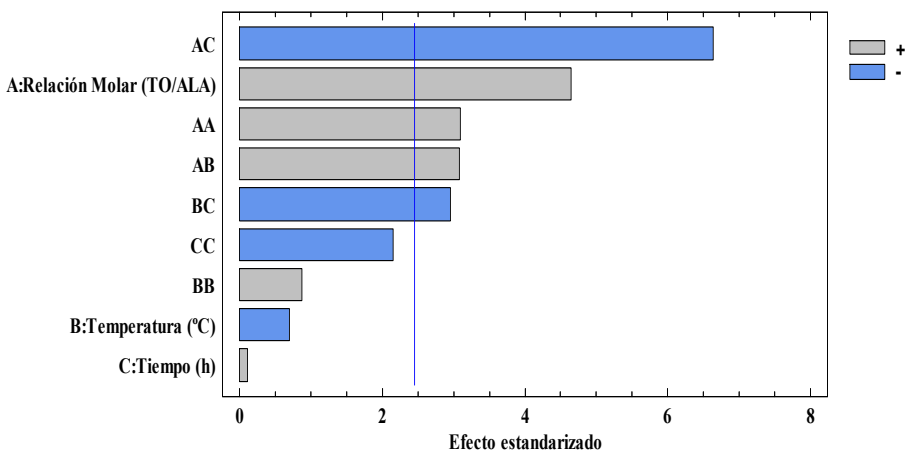


Figura 12. Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipase PS-DI.

Al estudiar los efectos de los factores se observaba que al igual que en el caso de la enzima PS-CI, el incremento de la **relación**

molar (TO/ALA) tenía un efecto principal positivo sobre la cantidad de ALA introducido en los triglicéridos (Figura 13).

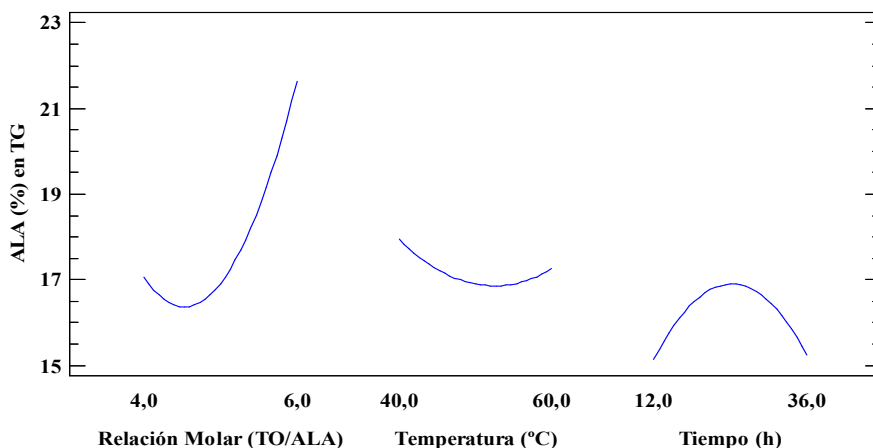


Figura 13. Gráfica de efectos principales de los factores para Lipase PS-DI.

De las interacciones entre factores la que ejercía un mayor efecto sobre la variable respuesta era la interacción relación molar-tiempo (Figura 14).

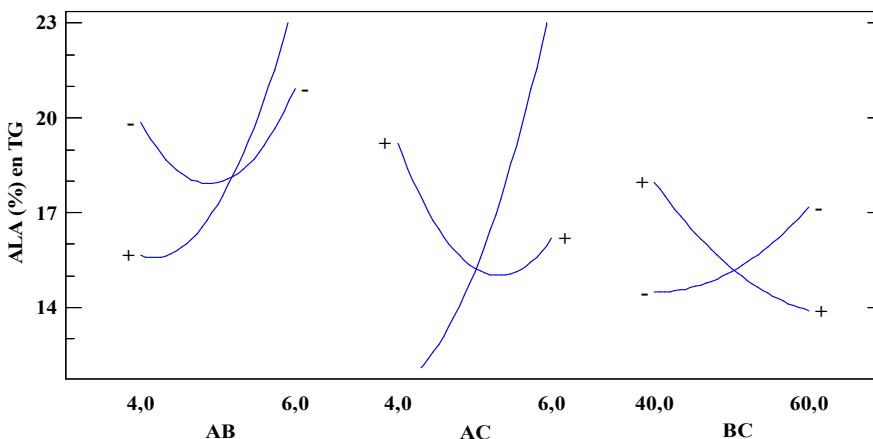


Figura 14. Gráfica de interacciones de los factores para Lipase PS-DI. Relación molar (A), temperatura (B) y tiempo (C).

En la Figura 15 de **interacción entre la relación molar y el tiempo** se observa que a relaciones molares bajas (1:4) el incremento del tiempo de reacción favorecía la introducción de

ALA en los triglicéridos, mientras que a relaciones molares mayores el incremento del tiempo no alteraba el contenido en ALA. Como indican Han *et al.* (1999), el empleo de relaciones molares altas hace que se alcance el equilibrio de la reacción de acidólisis a tiempos más cortos.

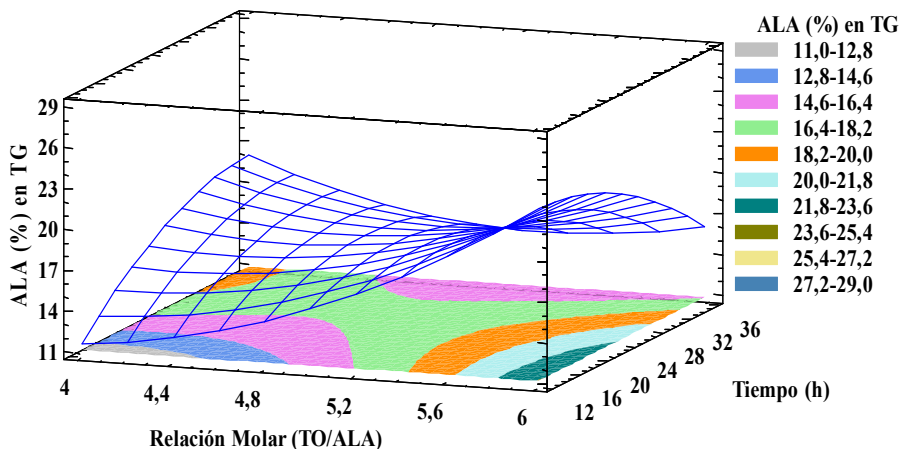


Figura 15. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Temperatura 50 °C. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

La variación de la temperatura no era un factor significativo de forma individual, sin embargo, la **interacción temperatura-tiempo** sí era un efecto activo en el modelo estandarizado (Tabla 4). En la Figura 16 puede observarse que la temperatura tenía un efecto negativo sobre la producción de SL debido a la reducción en la estabilidad de la proteína.

Mientras que a 40 °C el incremento del tiempo de reacción aumentaba rápidamente el % de ALA introducido en los triglicéridos, al trabajar a relación molar 1:4, a 60 °C el % de ALA aumentaba más lentamente debido a que existía menos enzima activa en el medio de reacción. Este efecto negativo de la temperatura sobre la capacidad transesterificante, se observó también en el estudio anterior con Lipase PS-CI. Pero mientras que en este caso la desactivación de la enzima por el efecto de la temperatura tenía lugar incluso a 40 °C, con Lipase PS-DI no se

observaba pérdida de actividad a los niveles bajos del diseño. Por tanto, es posible que la inmovilización en diatomeas le confiera a la enzima una mayor estabilidad que en el soporte cerámico. Así, Liu *et al.* (2009) observaron que la inmovilización de la lipasa de *B. cepacia* sobre óxido de sílice, no modificaba su temperatura óptima (55 °C) en relación a la enzima soluble, pero sí su tolerancia a la temperatura.

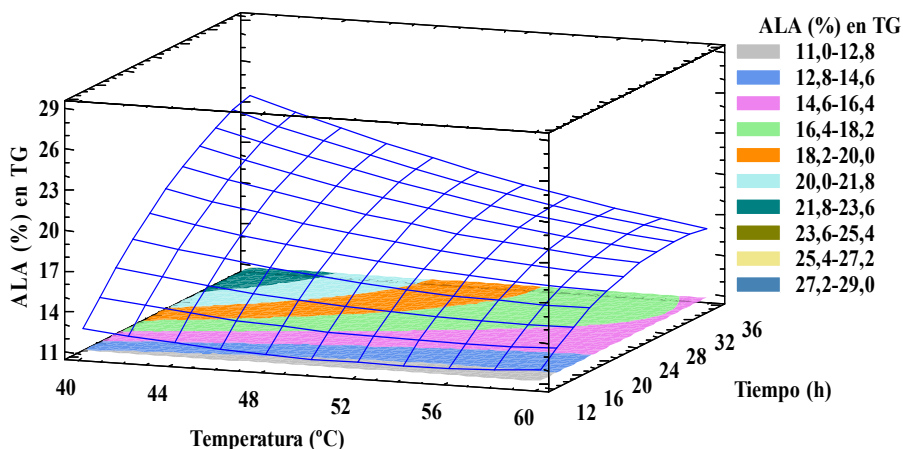


Figura 16. Gráfico de superficie de respuesta estimado para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Relación molar 1:4.

La **interacción relación molar-temperatura** también era un efecto activo en el modelo, observándose que el comportamiento de la enzima frente a la relación molar era diferente en función de la temperatura (Figura 17). A temperaturas altas de 60 °C, el comportamiento era el esperado, se incrementaba la actividad de la enzima conforme lo hacía la proporción de TO/ALA. Por el contrario, a 40 °C aparecía un mínimo en la cantidad de ALA introducido a relaciones molares cercanas a 1:5. Este comportamiento, como en el caso de la interacción temperatura-tiempo, era debido a dos procesos diferentes. Por un lado, a la pérdida de estabilidad debido a las altas temperaturas y, por otro lado, al efecto que tenía la relación molar sobre el tiempo que tardaba la enzima en alcanzar el equilibrio.

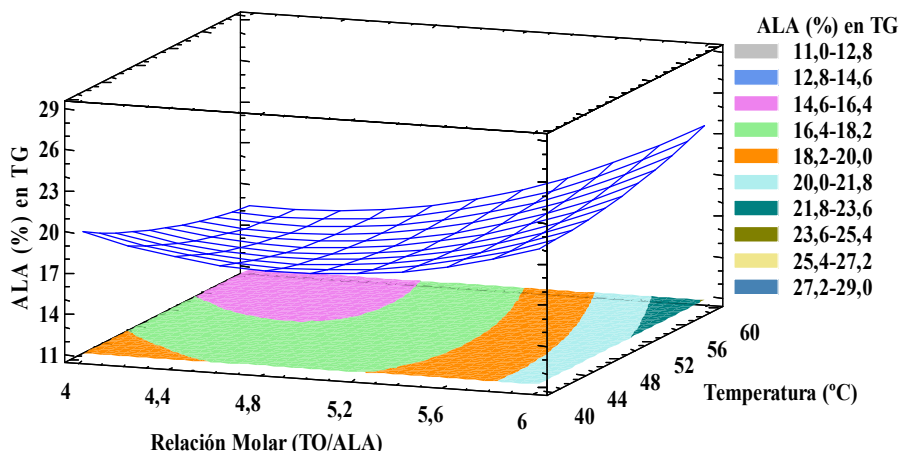


Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Tiempo de reacción 24 h. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

Mediante RSM fue posible estudiar el comportamiento de los factores y situarlos en valores que maximizaban la variable respuesta. En las **condiciones óptimas** indicadas por el diseño relación molar 1:6, temperatura 60 °C y tiempo 12 h, era posible incorporar un 27,49% de ALA en los triglicéridos.

4.1.3. Acidólisis de trioctanoato y ALA con Lipozyme RM-IM

La optimización de la producción enzimática de SL con Lipozyme RM-IM se llevó a cabo, al igual que en los casos anteriores con Lipase PS-CI y PS-DI, mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras en el que se estudió la influencia de los factores relación molar (A), temperatura (B) y tiempo (C) sobre la reacción de acidólisis.

A partir de estos resultados se realizó el análisis de la varianza (Tabla 5). El modelo cuadrático empleado para el ajuste de los datos experimentales obtenidos utilizando Lipozyme RM-IM era adecuado ($p=0,0921$) y no existía fallo de ajuste. El modelo tenía una aceptable capacidad de predicción de la respuesta (coeficiente

de correlación R^2 : 88,59%). En la Figura 18, puede observarse que los residuos seguían una distribución normal.

Tabla 5. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipozyme RM-IM.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl ^a	Razón-F	Valor-P
A: Relación Molar	10,77	1	147,12	0,0067*
B: Temperatura (°C)	7,62	1	104,07	0,0095*
C: Tiempo (h)	0,83	1	11,37	0,0778
AA	0,067	1	0,92	0,4385
AB	0,88	1	11,99	0,0743
AC	0,18	1	2,42	0,2603
BB	3,67	1	50,10	0,0194*
BC	0,08	1	1,07	0,4105
CC	0,60	1	8,17	0,1037
Falta de ajuste	2,96	4	10,10	0,0921
Total (corr.)	27,22	15		
R^2	88,59%			

^aGl: grados de libertad.

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

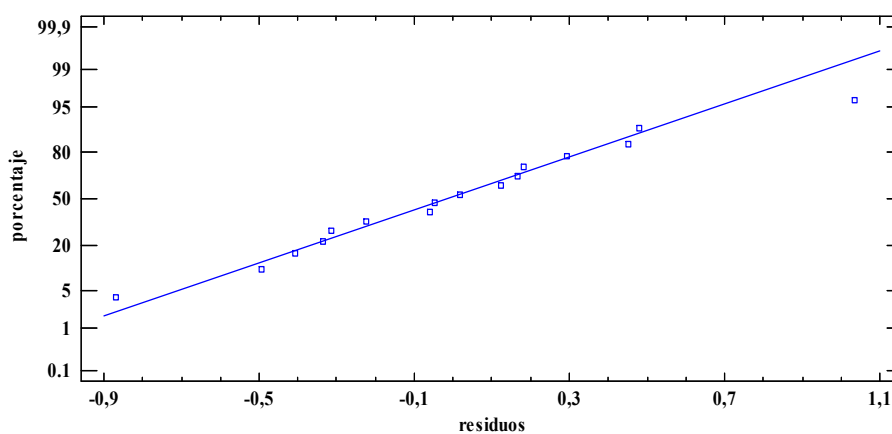


Figura 18. Gráfico de probabilidad normal de los residuos del diseño para Lipozyme RM-IM.

Una vez calculados los coeficientes de regresión, la ecuación que se ajusta al modelo experimental es la siguiente:

$$\text{ALA (\% en TG)} = 20,98 + 1,04 * A - 0,87 * B - 0,32 * C + 0,17 * A^2 + 0,33 * A * B - 0,15 * A * C + 1,29 * B^2 - 0,10 * B * C - 0,58 * C^2$$

En este diseño, como puede observarse en el diagrama Pareto, únicamente la temperatura y relación molar tenían una influencia significativa sobre la respuesta (Figura 19), y mientras que el incremento de la relación molar tenía un efecto positivo sobre la incorporación de ALA, el aumento de la temperatura influía negativamente.

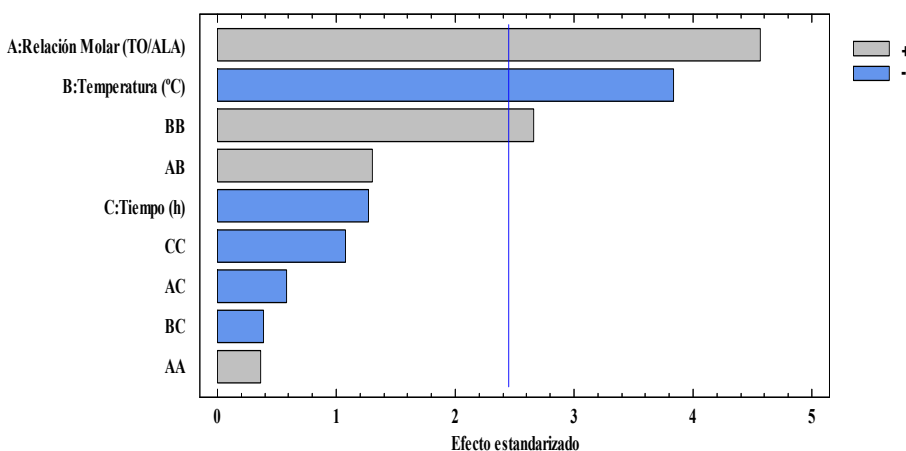


Figura 19. Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipozyme RM-IM.

En la Figura 20 se observa el efecto positivo que el incremento de la cantidad de ácidos grasos libres frente a los triglicéridos (**relación molar TO/ALA**) tenía sobre la incorporación de ALA. El soporte de inmovilización de Lipase RM-IM es una resina de intercambio aniónico de carácter básico que puede atraer los AGL, de forma que la enzima puede emplearlos dado que este material no los retiene con fuerza. Esto puede ser el motivo de que a niveles bajos de la relación TO/ALA, la enzima introduzca un alto contenido en ALA en los triglicéridos y el incremento de este ratio

no tenga un efecto positivo tan pronunciado como en los otros preparados ensayados.

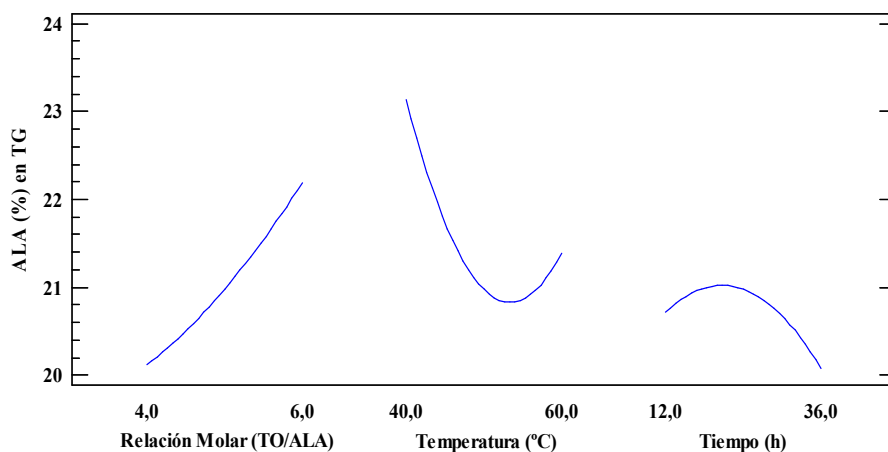


Figura 20. Gráfica de efectos principales de los factores para Lipozyme RM-IM.

Esta influencia positiva del incremento en la relación molar de sustratos observada en la Figura 21 ha sido ampliamente descrita en bibliografía, aunque dependiendo de la enzima y las condiciones de reacción existen discrepancias en los niveles en los que se obtiene el máximo rendimiento. Así, Kim *et al.* (2001) para la acidólisis de CLA con Lipozyme RM-IM, tras 24 h de reacción alcanzaban un 64,5% de incorporación, por lo que el uso de relaciones de TG/AGL superiores a 1:3 no suponía un aumento significativo debido a la especificidad de la enzima. Por contra, con la enzima no regioselectiva Novozym 435 el uso de relaciones molares mayores si incrementaba el contenido en CLA de los triglicéridos. Otros autores indican la posibilidad de trabajar a relaciones muy superiores (1:8) ya que no se había alcanzado el 66,6% de incorporación (máximo teórico) (Byung y Akoh, 2005). No obstante, a pesar de que las relaciones molares altas mejoraban la incorporación de ácidos grasos, este incremento puede no ser suficiente como para justificar su uso en un proceso de producción de lípidos estructurados (Chopra *et al.*, 2008). Los ácidos grasos libres son productos de alto valor y aquellos que no estén esterificados deben ser posteriormente eliminados en la

purificación de lípidos estructurados, incrementado los costes del proceso (Torres *et al.*, 2002).

En este caso concreto con Lipozyme RM-IM, el modelo indicaba que un incremento de la relación molar de 1:5 (70,3 g de ALA) a 1:6 (78,02 g), supondría únicamente una mejora del 2% en la incorporación de ALA.

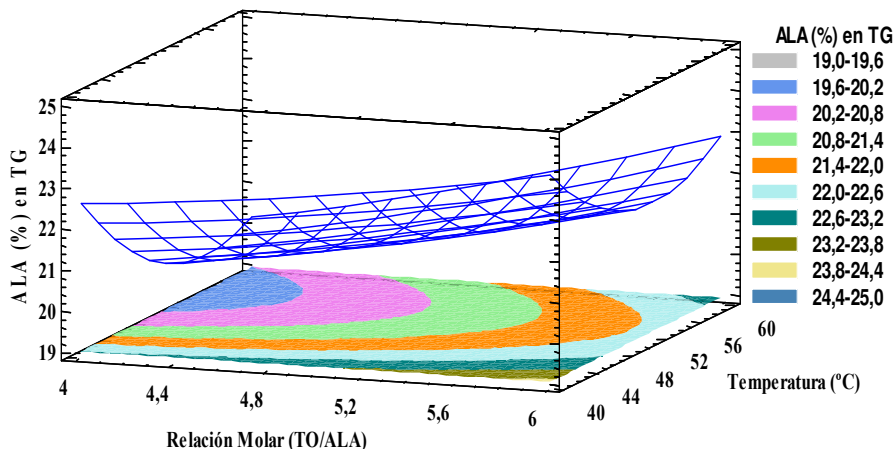


Figura 21. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Tiempo de reacción 24 h. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

El otro factor que resultó ser un efecto activo en el modelo era la **temperatura** (Tabla 5). En la Figura 22 se observa que el incremento en la temperatura disminuía el % de ALA introducido en todo el dominio experimental, aunque esta caída no era muy pronunciada. Este descenso de la actividad pudo deberse a una pérdida de la estabilidad de la enzima. Otros estudios indican que aunque la temperatura puede favorecer las reacciones de acidólisis, el % de ácidos grasos introducido no variaba de forma significativa al emplear temperaturas similares a las del presente estudio (Chopra *et al.*, 2008). Así, Kim *et al.*, (2001) observaron que para Lipozyme RM-IM, estos incrementos de la actividad se debían tanto a una mayor actividad enzimática como a procesos de acilmigración no enzimáticos.

Por otra parte, la temperatura puede ejercer un ligero efecto positivo sobre la actividad de la enzima al disminuir la viscosidad de los sustratos, efecto que tiene lugar incluso al estar disueltos en solventes orgánicos (Karabulut *et al.*, 2009). En la Figura 19 puede observarse como el contenido en ALA de los triglicéridos se ve mejorado por el incremento de la temperatura a partir de 50 °C. La menor viscosidad del medio, hace que los sustratos puedan acceder más fácilmente al centro activo de la enzima que incrementa su actividad.

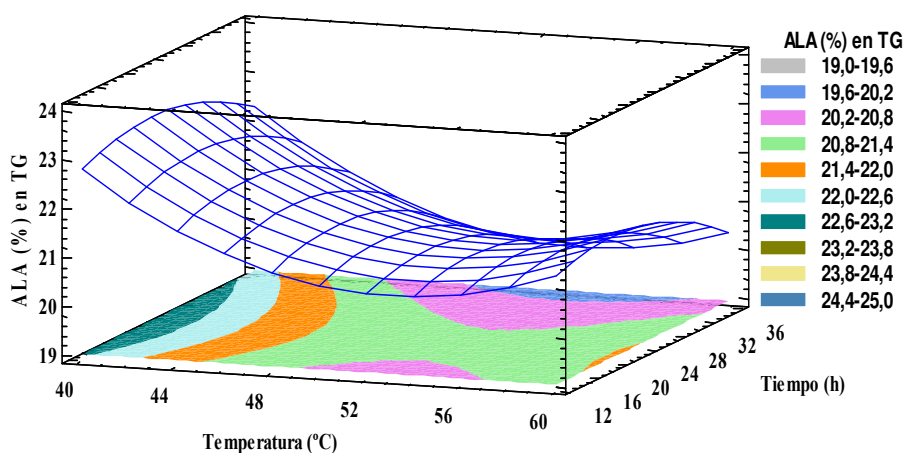


Figura 22. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Relación molar 1:5.

A pesar de que el **tiempo** de reacción no era un factor con efectos significativos sobre el modelo, es interesante evaluar el progreso de la reacción con el objeto de determinar el tiempo mínimo que rinda los mejores resultados. La Figura 23 muestra como la variación del tiempo de reacción de 12 a 36 h no suponía cambios significativos en el rendimiento de la reacción.

Jennings y Akoh, (2001) indicaban que en las primeras horas (1-8 h) de la acidólisis con Lipozyme IM 60 (lipasa de *R. miehei*), existía un rápido incremento de la cantidad de producto hasta alcanzar el máximo nivel de incorporación alrededor de las 12 h. Este tiempo en el que se llega al equilibrio puede verse reducido

por que la concentración en el entorno de la enzima es alta incluso a relaciones molares bajas debido a la atracción que provoca el soporte Duolite.

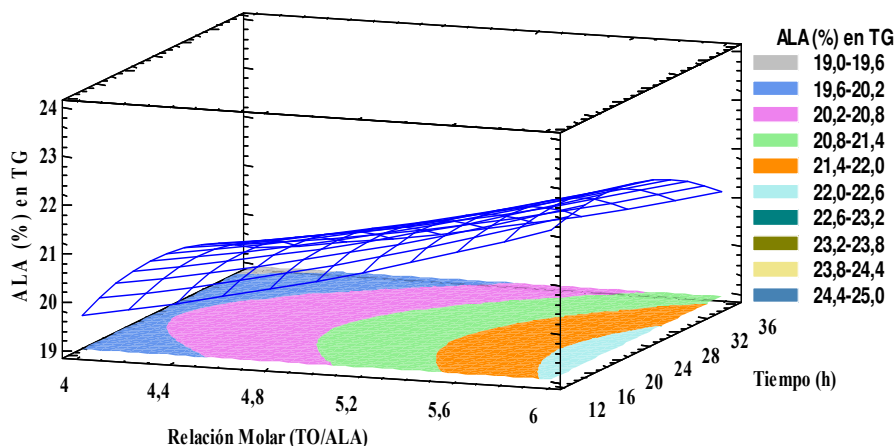


Figura 23. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Temperatura 50 °C. Las relaciones molares indicadas como 4 o 6 corresponden a las relaciones 1:4 y 1:6, respectivamente.

El estudio de la superficie de respuesta indicaba que el **óptimo** de producción de los SL enriquecidos en ALA se obtenía a relaciones molares de 1:6, temperatura 40 °C y 20,2 h de tiempo de reacción. En estas condiciones el modelo predice un 24,08% de ALA introducido en los triglicéridos.

En resumen, como puede observarse en la Tabla 6, bajo las condiciones óptimas obtenidas en las experiencias anteriores, el % de ALA introducido en los triglicéridos es similar en los tres preparados estudiados.

Al analizar las condiciones en las que obtiene una máxima producción de SL, puede observarse que para las tres enzimas la relación molar TO/ALA debe situarse en valores altos. El comportamiento para los factores temperatura y tiempo es diferente en los tres preparados. Mientras que para Lipozyme RM-IM es necesario emplear temperaturas bajas de 40 °C y

tiempos medios, las condiciones óptimas de reacción para el preparado Lipase PS-DI son de 60 °C y 12 h de reacción.

Tabla 6. Condiciones óptimas de reacción para la acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM.

	Condiciones óptimas			ALA (%) en TG
	A: TO/ALA	B: T (°C)	C: t (h)	
Lipase PS-CI	1:6	47,5	26,3	26,19
Lipase PS-DI	1:6	60	12	27,49
Lipozyme RM-IM	1:6	40	20,2	24,08

4.2. Enriquecimiento de aceite de palma con ALA

El aceite de palma empleado como material de partida es un aceite especialmente rico en ácido palmítico y oleico. Este aceite se utiliza en la elaboración de un gran número de productos como margarinas o mejorantes de panificación aunque su bajo contenido en PUFAs y su consistencia sólida hacen que tenga un uso limitado.

Debido a su alto contenido en ácidos grasos saturados, el aceite de palma tiene un punto de fusión elevado de entre 35-40 °C, por lo que el uso de temperaturas superiores puede ser necesario para un correcto funcionamiento de las enzimas. En base a los estudios realizados por Karabulut *et al.* (2009), en los que se indica que incluso disueltos en solventes orgánicos como el hexano, la reactividad de los ácidos grasos se ve afectada por la viscosidad, el empleo de temperaturas superiores a 40 °C puede estar indicado al emplear aceite de palma. No obstante, las altas temperaturas pueden también favorecer la oxidación del ALA, por lo que han de emplearse temperaturas que favorezcan la reactividad del aceite pero sin que se vea comprometida su estabilidad.

Para la acidólisis entre TO y ALA, Lipase PS-CI poseía un óptimo de 47,5 °C que resultaba más adecuado para catalizar esta reacción cuando se emplea aceite de palma que los otros preparados ensayados previamente, como Lipozyme RM-IM cuya estabilidad se veía afectada a 50 °C, o Lipase PS-DI cuyo óptimo de temperatura era de 60 °C (Tabla 6). Junto a esto, el comportamiento de Lipase PS-CI para el factor relación molar resultó también ser más apropiado que el del resto de lipasas inmovilizadas estudiadas. Con el preparado PS-CI se obtenían unos niveles de actividad aceptables a relaciones molares bajas y medias, mientras que con Lipase PS-DI se obtenían unos rendimientos claramente inferiores si no se empleaban ratios TO/ALA elevados. Dado que en la obtención de lípidos estructurados es necesario un paso final de desacidificación que elimine los ácidos grasos libres no existen ventajas económicas en el uso de un gran exceso de ácidos grasos (Chopra *et al.*, 2008). Por otro lado, el elevado coste de algunos ácidos grasos libres es otro de los motivos por los que resulta más apropiado trabajar a relaciones molares lo más bajas posible (Jennings y Akoh, 2001).

En esta parte del estudio, se situó el factor relación molar en niveles más bajos del óptimo de actuación (1:6) pero en los que se mantuviera una producción adecuada de SL enriquecidos en ALA a partir de aceite de palma. Para ello, se determinó la posibilidad de realizar los ensayos a una relación molar menor (1:5) manteniendo la temperatura en 46 °C y el tiempo en 28 h, que se obtuvo un valor experimental de 21,60% de ALA, muy cercano al 22,07% predicho por el modelo. Este valor era alto por lo que estas condiciones de reacción con una cantidad más reducida de ALA no provocaban una caída significativa de la producción de SL.

Los resultados mostraban que a medida que se incrementaba el tiempo de reacción, el porcentaje de ALA en el aceite era cada vez mayor, a la vez que se reducía principalmente el porcentaje de ácido palmítico (Figura 24). El contenido en ácido oleico también

se veía disminuido aunque no lo hacía en la misma medida que el ácido palmítico, posiblemente debido a que el preparado de ALA contiene un 5% de este ácido graso. Otro motivo por el que el descenso era menos pronunciado puede ser que el ácido oleico se encuentra esterificado en posición 2 en mayor medida que lo está el ácido palmítico, de modo que la acción de una lipasa 1,3 específica no atacaría esta posición manteniéndose su contenido. El otro ácido graso que veía incrementado su contenido en los SL sintetizados era el ácido linoleico debido a que este ácido graso constituye el 25% del preparado comercial de ALA.

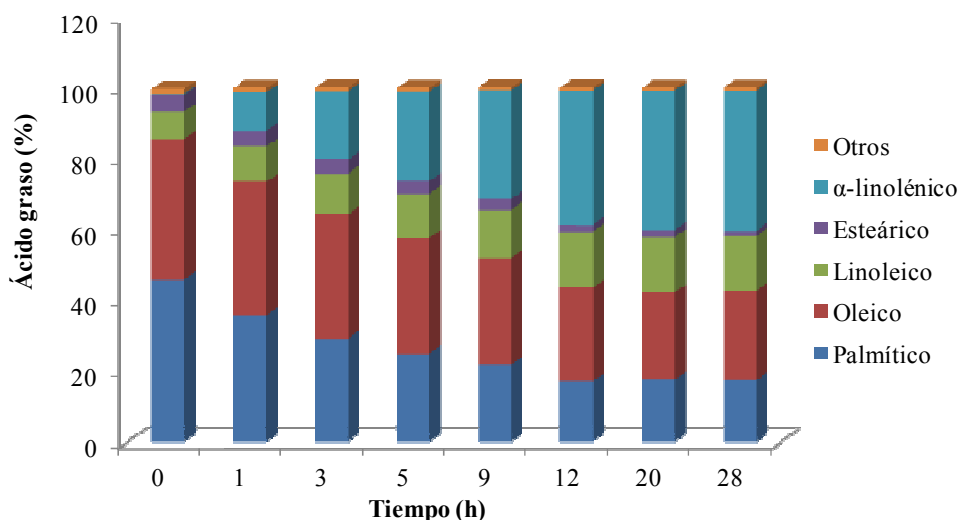


Figura 24. Efecto del tiempo de reacción en la composición de ácidos grasos (%) del producto de acidólisis entre aceite de palma y ALA con Lipase PS-CI.

Tras 12 h de reacción se alcanzaba el equilibrio de forma que la composición en ácidos grasos de los SL formados permanecía constante alcanzándose un 39 % de ALA en los triglicéridos. Dependiendo del origen y las interacciones con otros factores como el % de enzima empleado, el tiempo al cual se alcanza el equilibrio varía. Mientras que Chopra *et al.* (2008) indicaban que la lipasa de *R. miehei*, provocaba un rápido incremento en la incorporación de ácidos grasos y tiempos superiores a las 6 h no

mejoran esta incorporación, Kim *et al.* (2001) observaron que para Lipase PS-C la estabilización tenía lugar a partir de las 24 h.

4.2.1. Estabilidad oxidativa de los lípidos sintetizados

Una de las características que han de tener los SL para su posterior aplicación en la industria alimentaria es que sean estables frente a su oxidación. Los SL con un alto contenido en PUFAs pueden deteriorarse durante la producción y almacenaje dando lugar a olores y sabores característicos a rancio que causan el rechazo de los consumidores. El aceite de palma es un aceite estable frente a la oxidación debido principalmente al bajo contenido en ácidos grasos poliinsaturados y la presencia de antioxidantes naturales, como tocoferoles y carotenoides, aunque su contenido puede verse reducido durante el proceso de refinamiento. Esta estabilidad queda reflejada en los tiempos de inducción relativamente altos obtenidos (2,07 h) y en los bajos valores de TBA (0,03 mg TBA). Como consecuencia de la introducción de un alto contenido en PUFAs, más inestables frente a la oxidación, los tiempos de inducción se veían reducidos (0,25 h) y los valores para el ensayo del TBA muy incrementados (0,14 mg TBA). Parte de esta inestabilidad se puede justificar en base a que durante la reacción de acidólisis, parte de los antioxidantes naturales pueden perderse. La aplicación de antioxidantes en los lípidos estructurados podría mejorar su estabilidad (Lee y Akoh, 1998; Akoh y Moussata 2001). La adición de tocoferoles a lípidos estructurados sintetizados para la formulación de leche materna puede proteger frente a la oxidación dando lugar a productos con índices de estabilidad similares a los encontrados en la mezcla de los componentes de partida (Maduko *et al.*, 2008).

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio de la producción de SL enriquecidos en ALA, mediante acidólisis enzimática, aplicando los preparados comerciales Lipase PS-CI, Lipase-PS-DI y Lipozyme RM-IM mostraron que:

- En la acidólisis con trioctanoato (TO), la optimización de las condiciones de reacción relación molar de sustratos (TO/ALA), temperatura y tiempo mediante diseño de superficie de respuesta, conducía a una catálisis eficiente de los tres preparados enzimáticos. La relación molar de sustratos, con incremento de la concentración de ALA, era el factor más determinante.
- Para la acidólisis de un aceite de palma y ALA, el preparado comercial Lipase PS-CI resultaba ser el más propicio, ya que en los estudios previos de optimización con TO, presentaba una moderada dependencia de la relación molar de sustratos y la temperatura óptima más adecuada para esta nueva síntesis de SL (47,4 °C).
- El enriquecimiento del aceite de palma en ALA con Lipase PS-CI, con una relación molar de sustratos de 1:5 a 46 °C y un tiempo de catálisis de 12 h, daba lugar a unos altos porcentajes de incorporación (39%). No obstante, como resultado de este mayor contenido en PUFAs, la estabilidad oxidativa del producto se veía reducida.

6. Referencias

- Akoh, C.C., Moussata, C.O. Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids (2001) *JAOCs*, Journal of the American Oil Chemists' Society, 78 (1), pp. 25-30.
- Alim, M.A., Lee, J.-H., Akoh, C.C., Choi, M.-S., Jeon, M.-S., Shin, J.-A., Lee, K.-T. Enzymatic transesterification of fractionated rice bran oil with conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology (2008) *LWT - Food Science and Technology*, 41 (5), pp. 764-770.
- Byung, H.K., Akoh, C.C. Modeling of lipase-catalyzed acidolysis of sesame oil and caprylic acid by response surface methodology: Optimization of reaction conditions by considering both acyl incorporation and migration (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (20), pp. 8033-8037.
- Chang, S.-F., Chang, S.-W., Yen, Y.-H., Shieh, C.-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM (2007) *Applied Clay Science*, 37 (1-2), pp. 67-73.
- Chopra, R., Yella Reddy, S.R., Sambaiyah, K. Structured lipids from rice bran oil and stearic acid using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (2008) *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (1), pp. 32-39.
- Foresti, M.L., Ferreira, M.L. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses (2010) *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (6), pp. 419-429.
- González Moreno, P.A., Robles Medina, A., Camacho Rubio, F., Camacho Páez, B., Molina Grima, E. Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: Analysis of three different operation modes (2004) *Biotechnology Progress*, 20 (4), pp. 1044-1052.
- Hamam, F., Shahidi, F. Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin (2008) *Food Chemistry*, 106 (1), pp. 33-39.
- Hamam, F., Shahidi, F. Synthesis of structured lipids containing medium-chain and omega-3 fatty acids (2006) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (12), pp. 4390-4396.

- Han, J.J., Iwasaki, Y., Yamane, T. Monitoring of lipase-catalyzed transesterification between eicosapentaenoic acid ethyl ester and tricaprylin by silver ion high-performance liquid chromatography and high-temperature gas chromatography (1999) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (1), pp. 31-39.
- Jennings, B.H., Akoh, C.C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid (2001) *Food Chemistry*, 72 (3), pp. 273-278.
- Karabulut, I., Durmaz, G., Hayaloglu, A.A. Fatty acid selectivity of lipases during acidolysis reaction between oleic acid and monoacid triacylglycerols (2009) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21), pp. 10466-10470.
- Kim, I.-H., Yoon, C.-S., Cho, S.-H., Lee, K.-W., Chung, S.-H., Tae, B.-S. Lipase-catalyzed incorporation of conjugated linoleic acid into tricaprylin (2001) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (5), pp. 547-551.
- Lee, K.-T., Akoh, C.C. Characterization of enzymatically synthesized structured lipids containing eicosapentaenoic, docosahexaenoic, and caprylic acids (1998) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (4), pp. 495-499.
- Liu, C.-H., Lin, Y.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers (2009) *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40 (4), pp. 359-363.
- Maduko, C.O., Park, Y.W., Akoh, C.C. Characterization and oxidative stability of structured lipids: Infant milk fat analog (2008) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (3), pp. 197-204.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments* (Vol. 705). John Wiley & Sons.
- Nagachinta, S., Akoh, C.C. Production and characterization of DHA and GLA-enriched structured lipid from palm olein for infant formula use (2013) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90 (8), pp. 1141-1149.
- Namal Senanayake, S.P.J., Shahidi, F. Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (*Phoca groenlandica*) blubber oil with capric acid (2002) *Food Research International*, 35 (8), pp. 745-752.
- Nascimento, A.C., Tecelão, C.S.R., Gusmão, J.H., Da Fonseca, M.M.R., Ferreira-Dias, S. Modelling lipase-catalysed transesterification of

- fats containing n-3 fatty acids monitored by their solid fat content (2004) *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106 (9), pp. 599-612.
- Nordblad, M., Adlercreutz, P. Efficient enzymatic acrylation through transesterification at controlled water activity (2008) *Biotechnology and Bioengineering*, 99 (6), pp. 1518-1524.
- Osuna, V., Rivero, I.A. Study of the influence of microwave and conventional heating on the lipase-catalyzed esterification of lauric acid with different alcohols (2012) *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56 (2), pp. 176-182.
- Silroy, S., Sengupta, A., Bhattacharyya, D.K., Ghosh, M. Optimization of reaction parameters of acidolysis reaction between mustard oil and capric acid by using *Thermomyces lanuginosus* lipase (2014) *Journal of Food Science and Technology*, 51 (4), pp. 715-721.
- Torres, C.F., Barrios, E., Hill Jr., C.G. Lipase-catalyzed acidolysis of menhaden oil with CLA: Optimization by factorial design (2002) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79 (5), pp. 457-466
- Valivety, R.H., Halling, P.J., Macrae, A.R. Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media (1993) *Biotechnology Letters*, 15 (11), pp. 1133-1138.
- Zhao, H., Lu, Z., Bie, X., Lu, F., Liu, Z. Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent(2007) *Journal of Food Engineering*, 78 (1), pp. 41-46.

Abreviaturas

AGL	Ácido graso libre
AGL/TG	Ácido graso libre/triglicérido
ALA	Ácido α -linolénico
AOCS	"American Oil Chemists' Society"
CLA	Ácido linoleico conjugado
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	Detector de ionización de llama
GC	Cromatografía de gases
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RSM	Metodología de superficie de respuesta
SL	Lípidos estructurados
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico
TLC	Cromatografía de capa fina
TO	Gliceriltriocanoato

Listado de figuras

Figura 1	Separación por cromatografía de capa fina y revelado con 2,7-diclorofluoresceína de trilinoleína, TO y ALA.....	154
Figura 2	Cromatograma y tiempos de retención de los principales ácidos grasos del estudio.....	156
Figura 3	Curva de calibrado para el ALA con ácido tridecanoico como patrón interno.....	157
Figura 4	Gráfico del tiempo de inducción del aceite de palma.....	159
Figura 5	Gráfico de probabilidad normal de los residuos del diseño para Lipase PS-CI.....	165
Figura 6	Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipase PS-CI.....	165
Figura 7	Gráfica de efectos principales de los factores para Lipase PS-CI.....	166
Figura 8	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Tiempo de reacción 24 h.	168
Figura 9	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Temperatura de reacción 50 °C.....	169
Figura 10	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI. Relación molar 1:4.....	170

Figura 11	Gráfico de relación entre puntos experimentales y predichos por el modelo ajustado para Lipase PS-DI.....	172
Figura 12	Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipase PS-DI	172
Figura 13	Gráfica de efectos principales de los factores para Lipase PS-DI	173
Figura 14	Gráfica de interacciones de los factores para Lipase PS-DI. Relación molar (A), temperatura (B) y tiempo (C)	173
Figura 15	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Temperatura 50 °C.	174
Figura 16	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Relación molar 1:4.....	175
Figura 17.	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-DI. Tiempo de reacción 24 h	176
Figura 18	Gráfico de probabilidad normal de los residuos del diseño para Lipozyme RM-IM.....	177
Figura 19	Diagrama de Pareto estandarizado para la optimización de la incorporación de ALA en TO mediante acidólisis con Lipozyme RM-IM.....	178
Figura 20	Gráfica de efectos principales de los factores para Lipozyme RM-IM	179

Figura 21	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y la temperatura en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Tiempo de reacción 24 h.	180
Figura 22	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la temperatura y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Relación molar 1:5.....	181
Figura 23	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar y el tiempo en la reacción de acidólisis de TO y ALA con Lipozyme RM-IM. Temperatura 50 °C	182
Figura 24	Efecto del tiempo de reacción en la composición de ácidos grasos (%) del producto de acidólisis entre aceite de palma y ALA con Lipase PS-CI.....	185

Listado de tablas

Tabla 1	Niveles de los factores en la optimización de la reacción de acidólisis enzimática de TO y ALA.....	162
Tabla 2	Valores de la variable respuesta (ALA (%) en TG) en la optimización de la reacción de acidólisis para las enzimas Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM un mediante diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras	163
Tabla 3	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipase PS-CI.....	164
Tabla 4	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipase PS-DI.....	171
Tabla 5	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de acidólisis entre TO y ALA con Lipozyme RM-IM	177
Tabla 6	Condiciones óptimas de reacción para la acidólisis de TO y ALA con Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM	183

**Síntesis enzimática de
monoglicéridos
mediante glicerólisis**

**IV
CAPÍTULO**

Capítulo IV Síntesis enzimática de monoglicéridos mediante glicerólisis

Resumen	203
1. Introducción	204
1.1. Producción enzimática de monoglicéridos	205
1.1.1 Glicerólisis enzimática	207
1.2. Estabilidad oxidativa de los monoglicéridos	210
2. Objetivos	212
3. Materiales y métodos	213
3.1. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa	213
3.1.1. Reactivos	213
3.1.2. Protocolo experimental	214
3.2. Análisis de la composición en lípidos neutros mediante HPLC	214
3.3. Determinación de la estabilidad oxidativa	215
4. Resultados y discusión	216
4.1. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM	218
4.1.1. Síntesis de monoglicéridos con Lipozyme RM-IM	219
4.1.2. Estudio de la estabilidad oxidativa de los productos de glicerólisis con Lipozyme RM-IM	229
4.2. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con Lipase PS-DI	234
4.2.1. Síntesis de monoglicéridos con Lipase PS-DI	235
4.2.2. Estudio de la estabilidad oxidativa de los productos de glicerólisis con Lipase PS-DI	243
5. Conclusiones	248

6. Referencias	250
Abreviaturas	255
Listado de figuras	257
Listado de tablas	259

Capítulo IV

Síntesis enzimática de monoglicéridos mediante glicerólisis

Resumen

Los monoglicéridos, por sus propiedades emulsionantes, han adquirido un gran interés en la industria alimentaria. Su síntesis química presenta desventajas como son las elevadas temperaturas de reacción que limitan su aplicación en grasas insaturadas, y la utilización de catalizadores inorgánicos que dan lugar a reacciones colaterales. Una alternativa biotecnológica para la producción de monoglicéridos ricos en PUFAs son las reacciones de glicerólisis catalizadas por lipasas. Este Capítulo describe la reacción de glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con las enzimas comerciales Lipozyme RM-IM y Lipase PS-DI en medio “free-solvent”. Las variables estudiadas fueron la temperatura, relación glicerol/triglicéridos y concentración de enzima. La producción de monoglicéridos, frente a di y triglicéridos, para ambos preparados enzimáticos se veía favorecida a concentraciones elevadas de enzima. Sin embargo, a diferencia de lo observado para Lipase PS-DI, la tendencia a la adsorción de glicerol del soporte de inmovilización de Lipozyme RM-IM, provocaba una disminución en la síntesis de monoglicéridos al incrementar la relación glicerol/triglicéridos. En todas las condiciones ensayadas, la estabilidad oxidativa del producto de reacción era inferior al aceite de partida y estaba correlacionada con el contenido en diglicéridos. A partir del análisis de la superficie de respuesta se determinaron las condiciones óptimas de reacción que permitían obtener altas concentraciones de monoglicéridos ricos en PUFAs estables oxidativamente. La enzima Lipozyme RM-IM rendía un 20% de monoglicéridos (estabilidad oxidativa: 2,09 h de tiempo de inducción), frente al 29% que se obtenía para la enzima Lipase PS-DI, si bien, en este caso los productos de reacción presentaban una menor estabilidad oxidativa (tiempo de inducción 0,83 h).

1. Introducción

A pesar de que los **monoglicéridos** son moléculas con un gran interés industrial por sus buenas propiedades emulsionantes, su desarrollo se ha visto en parte frenado por las dificultades que presenta su producción. Tradicionalmente la obtención de monoglicéridos se lleva a cabo químicamente a partir de grasas y aceites que son sometidas a esterificación con glicerol a altas temperaturas (220-250 °C), utilizando como catalizadores compuestos inorgánicos alcalinos (Sonntag *et al.*, 1982; Bornscheuer *et al.*, 1995). Dadas las drásticas condiciones del proceso, este tipo de reacciones deben realizarse con grasas saturadas ya que la presencia de ácidos grasos insaturados da lugar a productos de oxidación y/o polímeros, que provocan la aparición de compuestos de olor, color y sabor desagradables que disminuyen la calidad del producto. Además, los catalizadores inorgánicos empleados producen reacciones colaterales, formándose compuestos indeseables que deben ser eliminados posteriormente en sucesivas etapas de purificación disminuyendo la rentabilidad del proceso e incrementando el tiempo necesario en la obtención de los monoglicéridos.

En estos procesos químicos el rendimiento medio ronda el 50% lo que, si bien, es suficiente para algunas de las aplicaciones, no lo es para su uso en la industria alimentaria. En este caso es necesario llevar a cabo procesos de purificación como puede ser la destilación molecular para llegar a una pureza en los monoglicéridos del 90% con una contaminación del 10% de diglicéridos y menos de un 1% de glicerol (Naik *et al.*, 2014).

En la búsqueda de procesos de producción de monoglicéridos que minimicen la aparición de compuestos que disminuyan la calidad del producto final, el empleo de lipasas es una buena alternativa por su alta especificidad y moderadas condiciones de reacción que permiten actuar sobre triglicéridos con un alto

contenido en ácidos grasos poliinsaturados. A continuación se describen las metodologías basadas en el uso de lipasas para la obtención de monoglicéridos, como son la hidrólisis de triglicéridos, las reacciones de esterificación y la alcoholisis (Bornscheuer *et al.*, 1995).

1.1. Producción enzimática de monoglicéridos

La mayor parte de las investigaciones sobre la **hidrólisis de triglicéridos** se centran en la liberación de ácidos grasos libres, mediante lipasas 1,3 específicas rindiendo además 2-monoglicéridos. Uno de los problemas que se presenta en este tipo de reacción es la insolubilidad de las grasas en medios acuosos. Para minimizar este problema, Holmberg y Osterberg (1988) emplearon un sistema microemulsionado con distintos surfactantes en el estudio de la hidrólisis de triglicéridos con la lipasa de *Rhizopus delemar*. Se obtuvieron rendimientos cercanos al 80% al utilizar microemulsiones formadas con bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) con isooctano como disolvente. Aunque esta metodología ofrece unos buenos resultados en la producción de monoglicéridos, para su posterior uso alimentario se requiere la eliminación del surfactante empleado.

Junto con la insolubilidad de las grasas, otro inconveniente es la degradación total de los triglicéridos hasta glicerol. Una alternativa para evitar este problema supone la inmovilización de las lipasas sobre soportes con una baja capacidad de retención de agua. A este respecto, Plou *et al.* (1996) alcanzaron una máxima producción de monoglicéridos del 67% tras 10 h de reacción con la lipasa pancreática porcina inmovilizada sobre Celite. Sin embargo, cuando el soporte de inmovilización era Eupergit C la producción se reducía al 36% tras 15 h.

Otra vía de formación de monoglicéridos se basa en **reacciones de alcoholisis** de triglicéridos utilizando lipasas 1,3 específicas. El uso de este tipo de reacciones resulta más atractivo que las

reacciones de hidrólisis por sus mayores rendimientos, junto con el hecho de que no alteran el pH del medio. Los rendimientos más altos, se deben principalmente al uso de solventes orgánicos que mejoran la solubilidad de los aceites.

Los productos resultantes de la acción de las lipasas 1,3 específicas en estas reacciones de alcoholisis son monoglicéridos con el ácido graso esterificado en la posición central. No obstante, como consecuencia de reacciones de acilmigración, aparecen 1(3)-monoglicéridos que pueden ser posteriormente hidrolizados por la propia lipasa dando lugar a glicerol libre. Estudios realizados en sistemas bifásicos hexano/agua se constató que en las primeras 24 h predominan los 2-monoglicéridos sobre los 1(3)-monoglicéridos. Conforme transcurre el tiempo, la composición de la mezcla de monoglicéridos varía hasta alcanzar un equilibrio a tiempos largos de reacción en los que predomina la forma α de cristalización que da lugar a formas finas y flexibles con un menor punto de fusión (Boswinkel *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que los α -monoglicéridos se forman por reordenamientos intramoleculares en los que no interviene la lipasa, por lo que es difícil obtener una preparación 100% pura de 2-monoglicéridos. Así, Millqvist *et al.* (1994), indican la necesidad de realizar un estudio de los solventes más apropiados para llevar a cabo este tipo de reacciones de forma que la enzima presente unos buenos niveles de actividad junto con una limitación de las reacciones de acilmigración.

Otro de los factores que puede afectar de forma más significativa al proceso es la cantidad de agua presente así como el tipo de alcohol empleado. En este sentido, aunque a actividades de agua de 0,33 la lipasa es más activa que a 0,11, dado que el agua es mejor nucleófilo que los alcoholes, algunos autores determinan que es más adecuado trabajar a a_w de 0,11 para minimizar las reacciones de hidrólisis (Millqvist *et al.*, 1994).

Las reacciones de **glicerólisis** son un grupo especial de alcoholólisis en las que se emplea el glicerol como alcohol. Esta metodología es la seleccionada y aplicada en las siguientes experiencias y cuya descripción se detalla a continuación.

1.1.1. **Glicerólisis enzimática**

Esta metodología resulta teóricamente más eficiente en la producción de monoglicéridos dado que los tres ácidos grasos presentes en el triglicérido pueden ser aprovechados, mientras que en otras reacciones de alcoholólisis los otros dos ácidos grasos, que no forman parte del monoglicérido tienen que ser eliminados posteriormente. Debido a esto, las reacciones de glicerólisis catalizadas por lipasas han sido objeto en numerosas investigaciones como un sistema de producción de monoglicéridos en condiciones moderadas de reacción. Por otro lado, mientras que en la producción de monoglicéridos vía hidrólisis o alcoholólisis es necesario emplear lipasas 1,3 específicas, las reacciones de glicerólisis pueden ser llevadas a cabo por lipasas inespecíficas que actúen en las tres posiciones del triglicérido.

Los procesos de glicerólisis son reacciones complejas en los que hay que tener en cuenta un gran número de equilibrios que dificultan la obtención del producto deseado. Dado que los mecanismos de reacción y los modelos cinéticos no están completamente dilucidados y presentan una gran dependencia de algunos factores, es necesario determinar las condiciones óptimas de reacción para la obtención del producto de interés. De forma general se acepta que el **mecanismo** de actuación de las lipasas en las reacciones de glicerólisis sigue un modelo Ping-Pong Bi-Bi el cual tiene lugar en una serie de pasos en los que se encuentran involucradas reacciones de hidrólisis y esterificación (Tan y Yin, 2005; Cheirsilp *et al.*, 2007). En este mecanismo Ping-Pong Bi-Bi intervienen dos sustratos y el producto del primero de ellos es liberado antes de la entrada del segundo sustrato. En estas reacciones, los triglicéridos presentes en un aceite se

interconvierten en presencia de glicerol en mono y en diglicéridos (Figura 1).

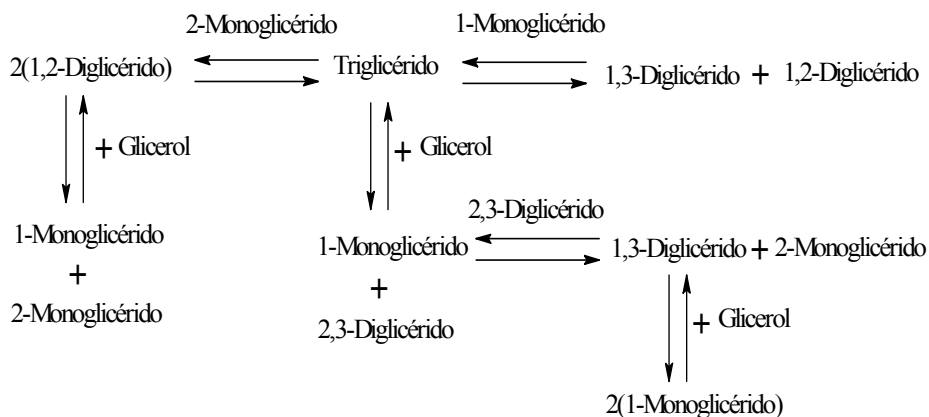


Figura 1. Diagrama de las principales reacciones de glicerólisis catalizadas por lipasas 1,3 específicas. Las especies 1,2 diglicérido y 2,3 diglicérido así como 1-monoglicéridos y 3-monoglicéridos son interconvertibles.

Junto a las reacciones propias de la glicerólisis, diferentes estudios indican que paralelamente tiene lugar otras reacciones de hidrólisis y transesterificación, entre distintos acilgliceroles, así como reorganizaciones intermoleculares que alteran las concentraciones de los distintos productos de reacción. Por ello, aunque los monoglicéridos son, en general, el producto final deseado como consecuencia de estas reacciones no son el único producto de la reacción.

Un obstáculo que limita que este tipo de reacciones puedan ser viables industrialmente es el bajo grado de conversión de los triglicéridos. El uso del glicerol como receptor de grupos acilo reduce la tasa de conversión de los triglicéridos debido a que la mezcla de reacción contiene especies con polaridades muy distintas, lo que las hace inmiscibles, planteando problemas a la hora de encontrar un medio de reacción adecuado. Por otro lado, la tendencia del glicerol a recubrir determinados preparados enzimáticos dificulta la difusión de los sustratos. En ambos casos se incrementa la resistencia a la **transferencia de materia** reduciendo la actividad de la enzima. Para solventar estos

problemas, Berger *et al.* (1992) propusieron la formación de una interfase entre el glicerol y el medio de reacción mediante su adsorción en gel de sílice que incrementa la capacidad de esterificación de las lipasas al dosificar el glicerol.

Las lipasas pueden llevar a cabo las reacciones de glicerólisis en medios muy diversos como son solventes orgánicos, mezclas de solventes, sistemas sin disolvente (“free-solvent”), fluidos supercríticos o líquidos iónicos. Un solvente apropiado favorece que se forme un sistema de reacción homogéneo al mejorar la miscibilidad de los reactantes lo que puede incrementar la velocidad de reacción. Pero los disolventes orgánicos producen un gran número de cambios en la estructura y el grado de hidratación de la enzima que pueden modificar la actividad y el comportamiento de la lipasa. La elección de un **medio de reacción** que favorezca la obtención del producto de interés es clave a la hora de determinar si el proceso puede ser viable industrialmente. Los solventes orgánicos hidrofílicos favorecen la producción de monoglicéridos mientras que en los medios más hidrofóbicos se ve favorecida la acumulación de tri y diglicéridos (Bellot *et al.*, 2001). La comparación de los sistemas “free-solvent” frente al empleo de hexano como solvente orgánico apolar indica que la mayor acumulación de monoglicéridos tiene lugar en medios en ausencia de solvente. Los sistemas en medio hexano, que emplean el glicerol preadsorbido en sílica gel, muestran velocidades de transformación de trioleína mayores, con un mayor contenido en diglicéridos (Rendón *et al.*, 2001). En sistemas en los que el glicerol está libre, el bloqueo de la enzima disminuye la velocidad de reacción al limitarse la transferencia de materia.

Otro de los factores importantes que afectan al rendimiento de la reacción de glicerólisis es la **relación molar de sustratos**. Controlando las concentraciones relativas de glicerol y aceite es posible favorecer la obtención de distintos productos. De forma teórica según la estequiometría de la reacción cuando la proporción de glicerol/triglicéridos es alta, cada triglicérido puede

reaccionar con 2 moléculas de glicerol dando lugar a 1(3)-monoglicéridos por lo que, a priori, estos ratios molares son los más apropiados para maximizar la producción de monoglicéridos. Por contra, relaciones de glicerol/triglicéridos bajas favorecen la producción de diglicéridos mediante la conversión de dos triglicéridos con un glicerol (Krüger *et al.*, 2010). Como ya se ha mencionado, debido a la gran importancia que tienen las reacciones colaterales de interesterificación e hidrólisis, el producto final de la reacción es una mezcla compleja de mono, di y triglicéridos y, en menor medida, de ácidos grasos libres junto con restos de glicerol sin reaccionar. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el glicerol no solamente participa como sustrato sino que también interactúa con la enzima y modifica tanto la polaridad como la viscosidad del medio afectando al desarrollo de la reacción.

1.2. Estabilidad oxidativa de los monoglicéridos

La oxidación lipídica es el proceso que causa mayores deterioros organolépticos y nutricionales en los aceites para el consumo humano. Además de la composición en ácidos grasos del aceite, la estabilidad oxidativa se ve influida por la presencia de diversos componentes como tocoferoles, fosfolípidos, metales, así como los productos de la hidrólisis de los triglicéridos que pueden actuar tanto como antioxidantes como prooxidantes. Los ácidos grasos libres tienen un efecto prooxidante reconocido de forma generalizada (Miyashita y Takagi, 1986). Sin embargo, el efecto que tienen los acilglicéridos parcialmente esterificados no está tan claramente definido y los distintos estudios indican que los monoglicéridos pueden tener tanto efectos prooxidantes como antioxidantes. Así, Colakoglu (2007) observó un incremento en el consumo de oxígeno en presencia de monoleína mientras que los datos obtenidos por Gomes *et al.* (2010) mostraron un marcado efecto antioxidante de los monoglicéridos en aceite de oliva purificado. Este hecho se explica en base al papel tan complejo

que tienen los monoglicéridos en el proceso de oxidación que hace que los efectos pro/antioxidantes sean dependientes tanto de la dosis como de la composición en ácidos grasos (Paradiso *et al.*, 2014). La naturaleza del aceite al que se añaden estos monoglicéridos también determina, en parte, su efecto antioxidante, siendo más significativo en aceites con un bajo grado de insaturación.

Las formas oxidadas de los monoglicéridos y diglicéridos como las de los triglicéridos disminuyen de forma muy importante la estabilidad de los aceites incluso encontrándose a muy baja concentración. Estos compuestos oxidados, se pueden formar por el tratamiento térmico del aceite, y en determinadas condiciones, pueden llegar a alcanzar concentraciones elevadas. Billek *et al.* (1978), describieron que después de un tratamiento térmico de 64 h a 180 °C tenía lugar la aparición de un 25,2% de estos compuestos.

Los productos de degradación térmica son agentes prooxidantes que reducen la estabilidad oxidativa del aceite en el que se encuentran actuando sobre la formación de compuestos volátiles y el consumo de oxígeno (Yoon *et al.*, 1988). Por tanto, para el desarrollo de procesos en los cuales el material de partida contiene una gran cantidad de ácidos grasos PUFAs es necesario trabajar en condiciones moderadas de reacción que minimicen la oxidación de los ácidos grasos.

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio se centró en la obtención de monoglicéridos mediante glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con un alto contenido en PUFAs así como la determinación de la estabilidad oxidativa de los productos. Para alcanzar este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el comportamiento bioquímico de las lipasas Lipozyme RM-IM y Lipase PS-DI en las reacciones de glicerólisis en medio “free-solvent”. A partir de estos resultados, empleando la metodología de superficie de respuesta, determinar las condiciones óptimas de reacción (temperatura, relación molar glicerol/triglicéridos y concentración de enzima) para la producción de monoglicéridos.
2. Determinar la influencia de la temperatura, la relación molar glicerol/triglicéridos y la concentración de enzima en la estabilidad oxidativa de los productos de la reacción de glicerólisis.
3. Establecer las condiciones de reacción enzimática que permitan una máxima producción de monoglicéridos minimizando la degradación oxidativa de los productos de reacción.

3. Materiales y métodos

3.1. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa

3.1.1. Reactivos

R.1 Aceite de anchoa (Denomega Nutritional Oils) con alto contenido en PUFAs (composición en Figura 2).

R.2 Glicerol (Sigma-Aldrich).

R.3 Sílice (Sigma-Aldrich).

R.4 Preparados enzimáticos comerciales (características detalladas en la Tabla 1 del Capítulo II): Lipase PS-DI y Lipase PS-CI

Se pesó de cada enzima la cantidad indicada para cada experiencia del diseño y se almacenó, en refrigeración, en frascos herméticamente cerrados junto con cloruro de litio durante 24 h para fijar su actividad de agua en 0,158.

R.5 Fase móvil HPLC.

- Componente A: Isooctano calidad HPLC (Panreac)
- Componente B: Mezcla metil terbutil éter:ácido acético (99,9:0,1). Añadir 1 ml de ácido acético y enrasar a 1l con metil terbutil éter calidad HPLC (Panreac).

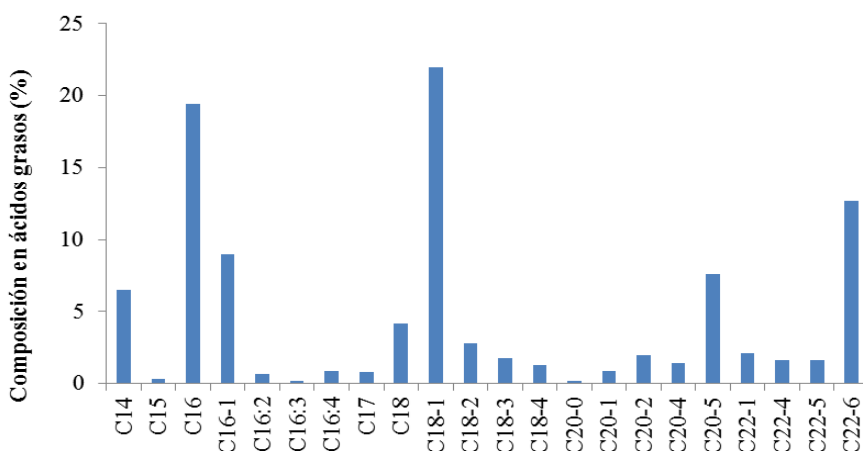


Figura 2. Composición en ácidos grasos de aceite de anchoa (Denomega Nutritional Oils).

3.1.2. Protocolo experimental

Las reacciones de glicerólisis se realizaron en tubos de cristal, utilizando como sustratos 6 g de aceite de anchoa (R.1) y diferentes cantidades de glicerol (R.2) para conseguir las relaciones molares indicadas en el diseño de experimentos (1:1, 2:1 y 3:1), calculadas en base al peso molecular del triglicérido medio (Kristensen *et al.*, 2005). El glicerol añadido a la reacción se mezcló con sílice (R.3) en una proporción 1:1, de forma que éste actúe como dosificador (Yeoh *et al.*, 2009). La reacción se iniciaba por adición de la lipasa inmovilizada, previamente equilibrada su actividad de agua (R.4), Las concentraciones de enzima utilizadas fueron 1, 5 y 9% respecto a la cantidad de triglicéridos. Las muestras se sometían a incubación con agitación orbital (200 rpm) a diferentes temperaturas (40, 50 y 60 °C) durante 4 h. Transcurrido este tiempo se procedía a la detención de la reacción por la separación de la enzima mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min.

3.2. Análisis de la composición en lípidos neutros mediante HPLC

El análisis de la composición en lípidos neutros del aceite resultante se realizó mediante HPLC-ELSD (“Evaporative Light Scattering Detector”) equipado con una columna de fase normal, Lichrospher 100 Diol 5mm, 4x250mm (MERCK). El análisis implicaba pinchar 10 µl de una disolución de 0,1 g del aceite en 50 ml de isooctano previamente desecado para su análisis. La separación se llevó a cabo aplicando un gradiente en el cual se variaba la proporción de los componentes A y B de la fase móvil (R.5). A un flujo constante de 1 ml/min, durante los 10 primeros min el 100% de la fase móvil se encontraba formada por el componente A, para progresivamente ir disminuyendo su proporción hasta que a los 30 min el 100% de la fase móvil estaba compuesto por el componente B. El detector ELSD se programó a

una temperatura de 45 °C y 3,5 bares de presión. Cada muestra se analizó por duplicado.

3.3. Determinación de la estabilidad oxidativa

Al igual que en el Capítulo III (apdo. 3.4.3.), la medida de la estabilidad oxidativa de los productos de la glicerólisis se realizó según el método oficial AOCS (“American Oil Chemists' Society”) Cd 12b-92 basado en la determinación del tiempo de inducción mediante un Rancimat 743 Metrohm.

4. Resultados y discusión

En base a los resultados previos realizados sobre la actividad hidrolítica de las lipasas comerciales (Capítulo II) y la capacidad de producción de SL enriquecidos en ALA mediante acidólisis enzimática (Capítulo III), se seleccionaron los preparados Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM para la producción de monoglicéridos ricos en PUFAs.

Los factores seleccionados fueron la temperatura (A), la relación molar de sustratos (Gli/TG) (B) y la concentración de enzima (C). Estos fueron estudiados a tres niveles diferentes: bajo (-1), medio (0) y alto (+1) (Tabla 1). Estos factores y sus niveles fueron escogidos en función de los resultados obtenidos por otros autores en estudios previos para medios “free-solvent” (Kristensen *et al.*, 2005; Yeoh *et al.*, 2009). Para este estudio se decidió fijar la actividad de agua en valores bajos (0,158) para minimizar las reacciones de hidrólisis, y el tiempo de reacción a 4 h. En la Tabla 2 se detallan las condiciones experimentales para cada una de las experiencias de este diseño experimental.

Tabla 1. Niveles de los factores en la optimización de la reacción de glicerólisis enzimática de aceite de anchoa.

Factores	Niveles		
	-1	0	+1
A: Temperatura (°C)	40	50	60
B: Relación molar (glicerol/triglicéridos)	1:1	2:1	3:1
C: Concentración de enzima (%)	1	5	9

Para cada una de las enzimas estudiadas las variables respuesta analizadas fueron:

- Composición en acilgliceroles (monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos). Su análisis permitió conocer el comportamiento bioquímico de las enzimas estudiadas y

determinar el óptimo de reacción para la producción de monoglicéridos.

- Tiempo de inducción. Esta variable permitió determinar la estabilidad oxidativa de los productos de reacción y, por tanto, conocer su potencial uso alimentario en base a la correlación con la calidad organoléptica de los aceites

Tabla 2. Diseño experimental 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras para la optimización de la glicerólisis enzimática de aceite de anchoa.

Exp.	Factores		
	Temperatura (°C)	Relación de sustratos (glicerol/triglicéridos)	Concentración de enzima (%)
1	40	1:1	1
2	60	1:1	1
3	40	3:1	1
4	60	3:1	1
5	40	1:1	9
6	60	1:1	9
7	40	3:1	9
8	60	3:1	9
9	40	2:1	5
10	60	2:1	5
11	50	1:1	5
12	50	3:1	5
13	50	2:1	1
14	50	2:1	9
15	50	2:1	5
16	50	2:1	5
17	50	2:1	5

Para cada variable respuesta se realizó el análisis estadístico del diseño mediante el programa STATGRAPHICS Centurion XVI. En cada caso se determinó la existencia de fallo de ajuste, la

adecuación del modelo propuesto así como la significación de sus coeficientes. Mediante el análisis de superficie de respuesta, se determinaron los óptimos de reacción para las variables, porcentaje de monoglicéridos y tiempo de inducción. A partir de estos resultados se establecieron para cada preparado enzimático las condiciones más apropiadas que maximizasen la producción de monoglicéridos manteniendo la estabilidad oxidativa del producto.

4.1. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM

Lipozyme RM-IM es uno de los preparados comerciales más empleados en el estudio de la modificación de grasas y aceites. Como se ha constatado en los Capítulos II y III, esta enzima muestra unos niveles de actividad altos tanto para reacciones de hidrólisis como de transesterificación (acidólisis). Los valores de las variables respuesta para cada experiencia del diseño experimental (Tabla 2) con la lipasa Lipozyme RM-IM se detallan en la Tabla 3.

En primer lugar se consideró importante obtener información sobre el desarrollo de la reacción catalizada por Lipozyme RM-IM. Para ello, se analizaron los modelos experimentales de las variables respuesta contenido en monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) y triglicéridos (TG) de la mezcla de reacción (Tabla 3). No se consideraron los ácidos grasos libres (AGL) ya que al trabajar a bajas actividades de agua las reacciones de hidrólisis son minoritarias por lo que se detectaron AGL solo en 4 de las 17 experiencias. Esta baja producción de ácidos grasos libres supone una ventaja adicional dado que en muchos casos es necesaria su eliminación antes de poder emplear estos preparados en la industria alimentaria. Uno de los principales motivos es que los ácidos grasos libres, con un gran número de dobles enlaces, se autooxidan con gran facilidad y los radicales formados promueven la oxidación de nuevas moléculas afectando de forma muy

importante a la estabilidad oxidativa y a la calidad organoléptica y nutricional del aceite (Miyashita y Takagi, 1986).

Tabla 3. Valores de las variables respuesta (productos de reacción y estabilidad oxidativa) para la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras.

Experiencia	Productos de reacción (%)				Tiempo de inducción (h)
	MG ^a	DG ^b	TG ^c	AGL ^d	
1	8,72	18,95	73,31	0,00	0,80
2	10,07	21,17	68,55	0,00	0,69
3	2,63	10,16	88,27	0,00	0,93
4	9,16	23,00	65,64	1,86	0,58
5	18,33	41,69	40,24	0,00	1,33
6	14,92	41,33	41,27	0,79	1,55
7	19,74	29,79	50,75	0,00	1,03
8	19,55	43,25	39,41	0,00	1,18
9	20,17	40,37	39,51	0,00	1,86
10	19,55	43,25	39,41	0,00	0,92
11	18,62	41,74	40,00	1,35	1,28
12	19,06	32,22	48,06	0,00	0,65
13	10,66	19,73	69,92	0,00	0,56
14	21,31	43,61	32,26	2,40	0,69
15	21,77	41,11	37,86	0,00	1,56
16	18,54	42,36	39,24	0,00	1,59
17	20,69	41,94	37,64	0,00	1,50

^aMG: monoglicéridos; ^bDG: diglicéridos; ^cTG: triglicéridos; ^dAGL: ácidos grasos libres

4.1.1. Síntesis de monoglicéridos con Lipozyme RM-IM

Los resultados obtenidos del análisis de la varianza de cada uno de los modelos para monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos se detallan en la Tabla 4. El ANOVA para los

monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos indicaba que no existía fallo de ajuste, por lo que el modelo cuadrático seleccionado parecía ser apropiado para la descripción de los resultados obtenidos. Además, las ecuaciones del modelo ajustado ofrecían una correlación adecuada entre los resultados obtenidos experimentalmente y los predichos, explicando el 99,5, el 98,71 y el 98,59% de la variabilidad para la producción de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Dado que los modelos resultaban apropiados y poseían una buena capacidad de predicción pueden ser empleados para el estudio de superficie de respuesta.

Tabla 4. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM para la producción (%) de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. A: Temperatura (°C), B: Relación Gli/TG y C: Concentración de enzima (%).

Fuente	Monoglicéridos (%)		Diglicéridos (%)		Triglicéridos (%)	
	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A	1,34	0,3713	96,35	0,0042*	142,88	0,0052*
B	0,03	0,8650	70,01	0,0057*	82,71	0,0090*
C	276,78	0,0292*	1137,64	0,0004*	2616,63	0,0003*
AA	3,16	0,2583	1,40	0,2043	4,87	0,1258
AB	8,82	0,1602	74,66	0,0054*	114,31	0,0065*
AC	16,47	0,1184	0,48	0,3898	36,47	0,0200*
BB	11,79	0,1393	45,21	0,0088*	93,86	0,0079*
BC	21,26	0,1045	1,14	0,2352	1,45	0,3000
CC	65,12	0,0601	237,64	0,0017*	451,31	0,0017*
Falta de ajuste	1,94	0,7252	24,54	0,0779	59,54	0,0605
Total (corr.)	505,04		1964,97		4334,13	
R ²	99,50%		98,71%		98,59%	

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

En el ANOVA (Tabla 4) se puede observar también que la concentración de enzima es el único factor que ejercía una influencia significativa en la formación de monoglicéridos mediante glicerólisis en medio “free-solvent” empleando la lipasa Lipozyme RM-IM. Por el contrario, en triglicéridos, excepto AA y BC, y en diglicéridos, AA, BC y AC, todos los factores resultaron ser significativos (A: Temperatura, B: Relación Gli/TG y C: Concentración de enzima).

La **concentración de enzima** tenía un efecto positivo sobre la reacción de glicerólisis al aumentar el contenido en monoglicéridos (Figura 3 A) y diglicéridos (Figura 3 B) junto con un descenso en los triglicéridos (Figura 3 C). En la producción de monoglicéridos se puede observar que el incremento de la concentración de enzima poseía una forma hiperbólica característica (Figura 3 A). Cuando la cantidad de enzima se encontraba por debajo del 5%, pequeños incrementos de ésta provocaban un gran aumento en la cantidad de monoglicéridos producidos. Resultados similares a los expuestos han sido encontrados por otros autores. Naik *et al.* (2014) observaron que este efecto positivo del incremento del biocatalizador tenía lugar hasta que se alcanzaba un nivel óptimo del 7%. Una vez sobrepasado el incremento en el % de monoglicéridos se producía de forma cada vez más moderada hasta estabilizarse con un máximo del 22,43%.

El empleo de altos % de enzima pueden provocar un descenso en la cantidad de monoglicéridos como consecuencia de las limitaciones en la transferencia de materia (Valério *et al.*, 2010). Este efecto se encuentra relacionado con que a bajas cantidades de enzima en el entorno de la proteína existe un exceso de sustrato por lo que todos los centros activos se encuentran saturados por moléculas de sustrato, dando lugar a un incremento lineal en la producción de monoglicéridos. Sin embargo, superada la cantidad óptima de enzima, dichos centros activos no quedan expuestos y

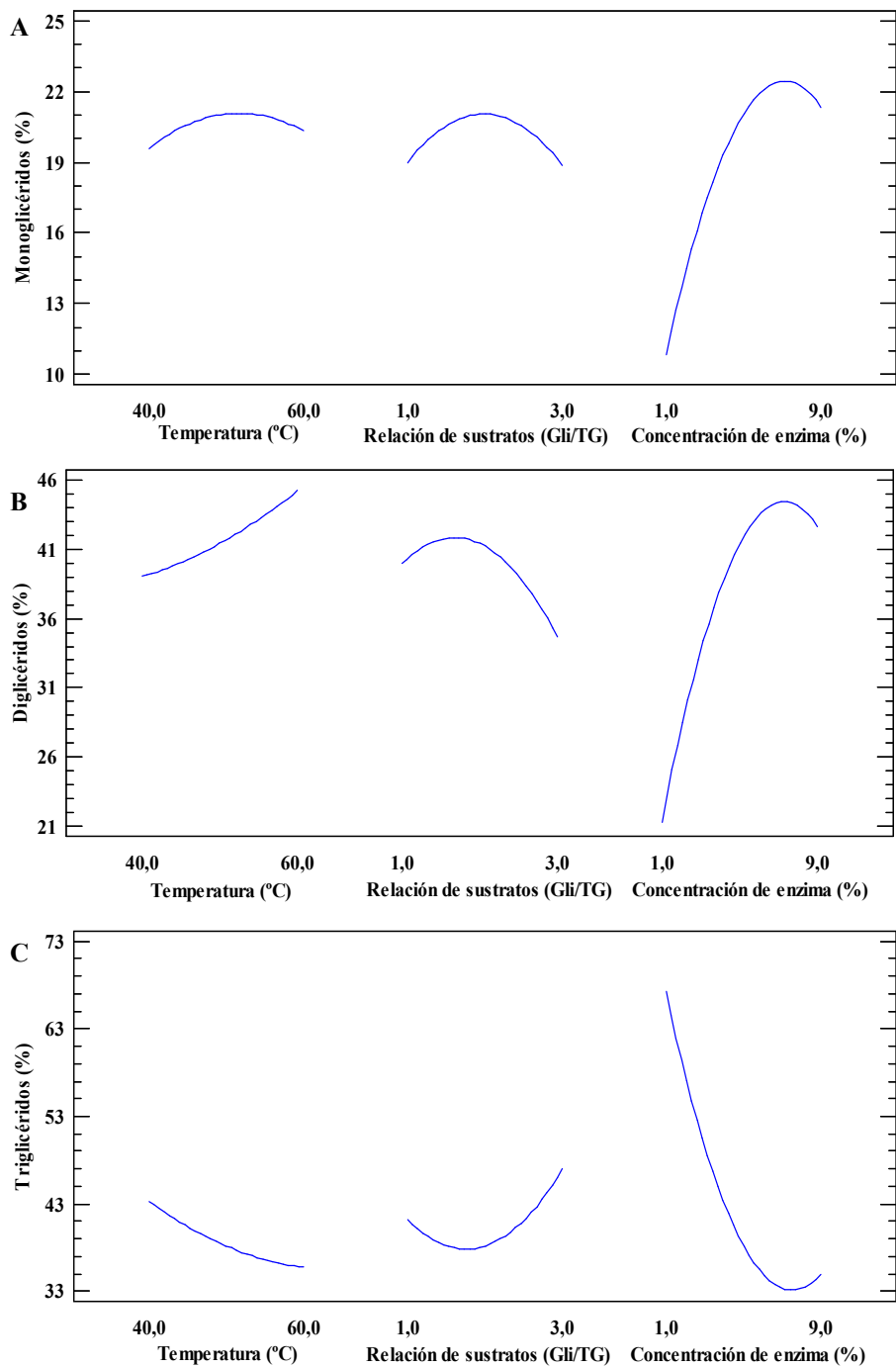


Figura 3. Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para Lipozyme RM-IM. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

accesibles a los sustratos debido a una posible agregación por la gran cantidad de inmovilizado en el medio (Ghamgui *et al.*, 2006). Esto implica que, a pesar de la elevada concentración en el medio, la cantidad de enzimas activas es menor debido al impedimento en el acceso a sus centros activos. En las reacciones de glicerólisis “free-solvent”, la densidad del medio favorece la agregación de los inmovilizados.

Una de las aproximaciones para elevar la producción de monoglicéridos se centra en la alteración del equilibrio de reacción variando la **relación de sustratos (glicerol/triglicéridos)**. Como se indica en la Figura 4 A, cuando se emplean relaciones molares de sustratos altas de 3:1 (exceso de glicerol), el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la producción de monoglicéridos, mientras que las relaciones molares más bajas 1:1 favorecen la producción de diglicéridos (Figura 4 A). En este estudio se observó un comportamiento diferente al esperado en el que los ratios más altos de Gli/TG provocaban un descenso de los monoglicéridos.

El ANOVA indicaba que este factor, relación de sustratos, no influía en la producción de monoglicéridos, pero sí era un efecto significativo para el resto de especies de acilglicerol (DG y TG) por lo que sí que influía en la reacción global de glicerólisis (Tabla 4). En la Figura 3, puede observarse como los incrementos en la relación Gli/TG provocaban aumentos en la cantidad de mono y diglicéridos (Figuras 5 A y 5 B) hasta un valor a partir del cual se observaba un descenso de esta producción que iba relacionada con el incremento en el contenido en triglicéridos lo que indica que éstos no eran utilizados como sustrato por la lipasa (Figuras 5 C). Resultados similares han sido observados por otros autores como Kristensen *et al.* (2005), que indican que este comportamiento puede ser debido a la interacción entre el soporte de inmovilización y el glicerol. En Lipozyme RM-IM, la lipasa de *R. miehei* se encuentra inmovilizada sobre una resina de

intercambio aniónico de carácter hidrofílico con una fuertemente tendencia a adherirse al glicerol (Watanabe *et al.*, 2003).

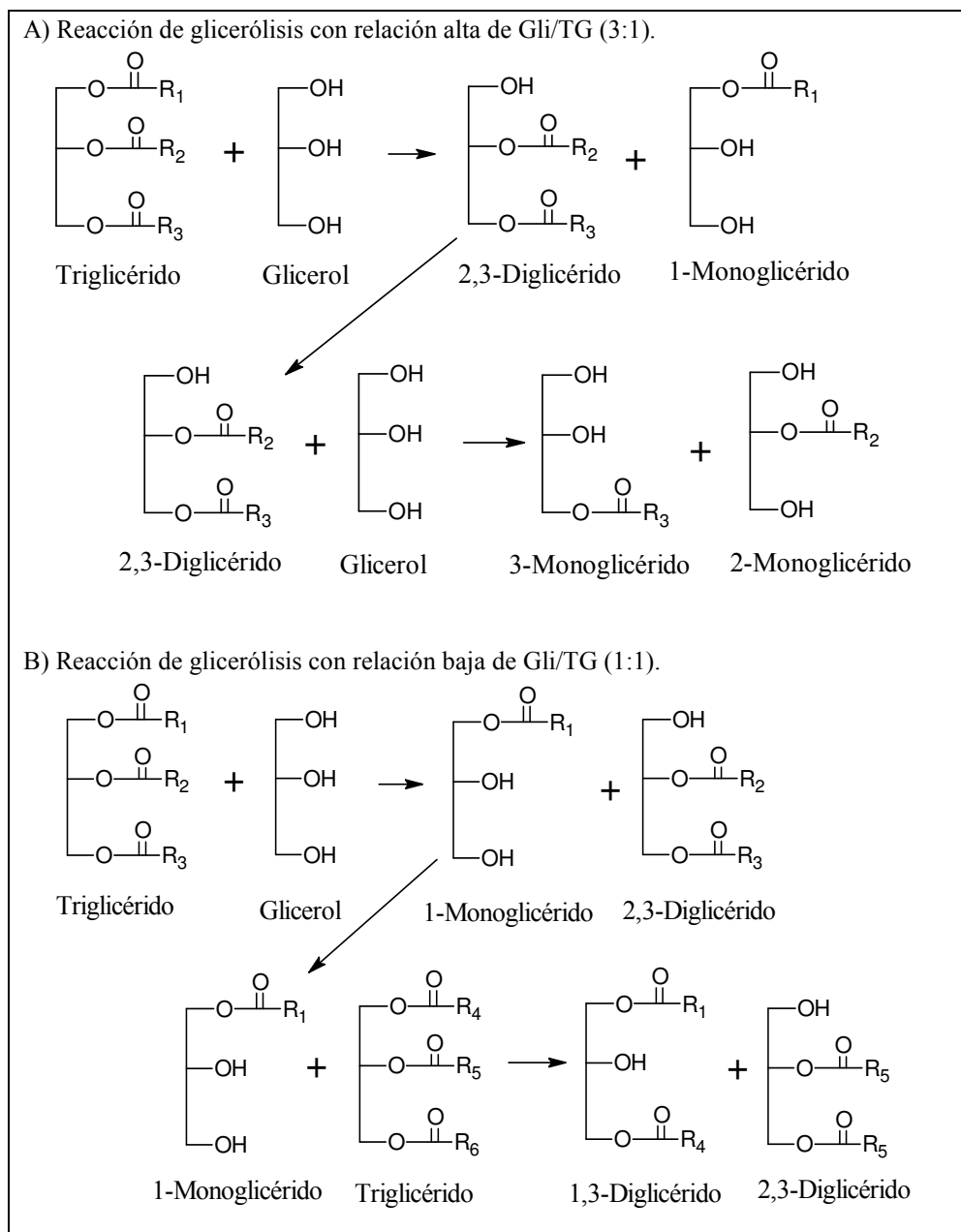


Figura 4. Desplazamiento teórico del equilibrio por variación de la relación glicerol/triglicéridos hacia: A) Formación de monoglicéridos; B) Formación de diglicéridos.

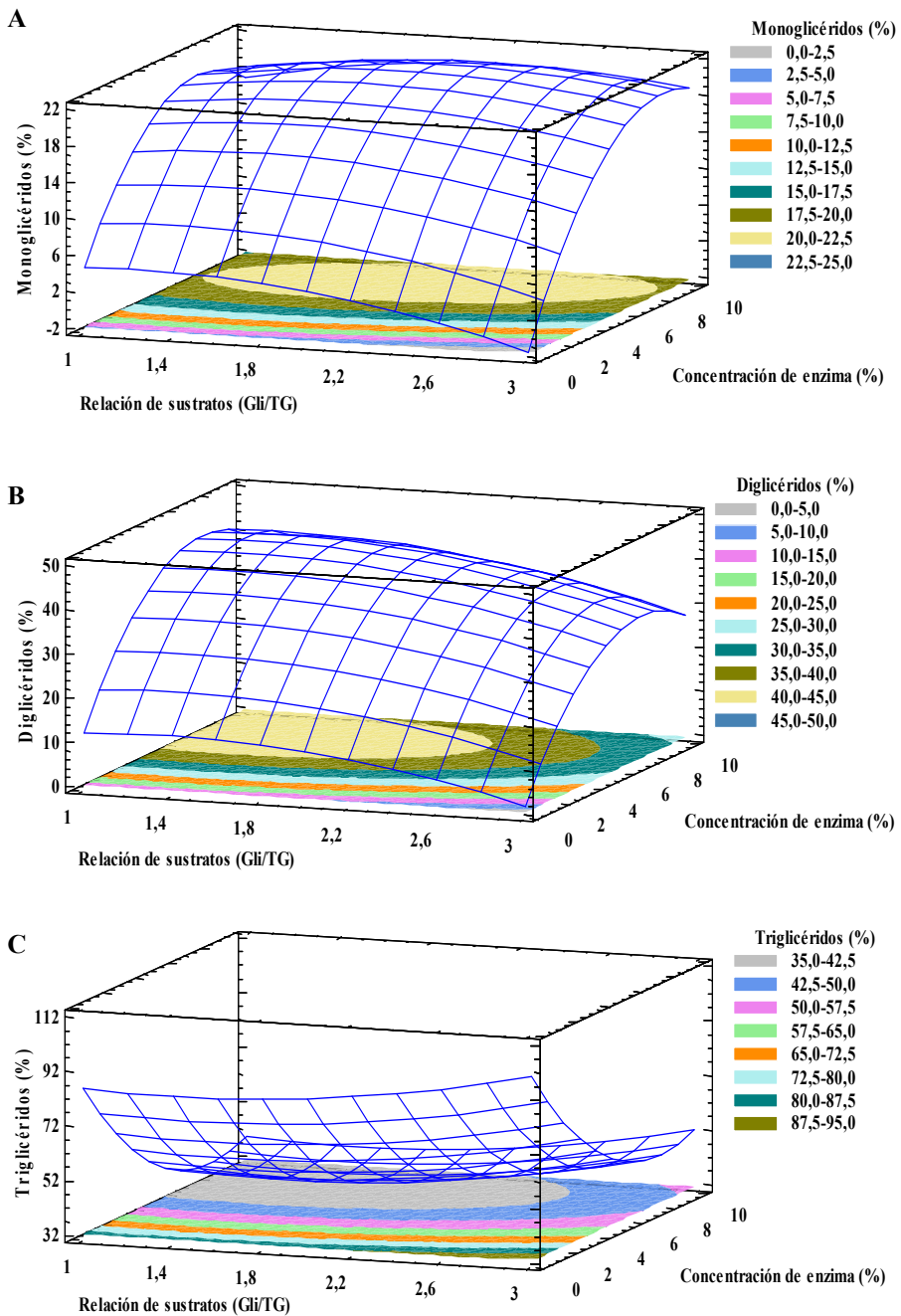


Figura 5. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la concentración de enzima en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Temperatura 50 °C. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

Esto generaría un microentorno, con una concentración muy elevada de glicerol, formando una capa límite alrededor que dificultaría el acceso de triglicéridos al centro activo limitando la transferencia de materia y saturando a la enzima de glicerol, además de favorecer su agregación. Como consecuencia, un contenido excesivo de glicerol reduciría la velocidad de reacción de la lipasa. Por tanto, el tipo de soporte es de especial importancia en las reacciones de glicerólisis. Así, las lipasas inmovilizadas sobre soportes de naturaleza más hidrofóbica pueden catalizar reacciones en presencia de glicerol libre, mientras que en aquellos más hidrofílicos no se detecta actividad si el glicerol no está adsorbido sobre una matriz que lo dosifique (Yeoh *et al.*, 2009).

En la Tabla 4 se puede observar que tanto la **temperatura** como la **interacción temperatura-relación glicerol/triglicéridos** no eran efectos activos en el modelo de producción de monoglicéridos aunque sí afectaban a la reacción general de glicerólisis como indican los resultados sobre la producción de diglicéridos y la conversión de triglicéridos (Figura 6).

La **temperatura** tenía un efecto positivo sobre la reacción al reducir el contenido en triglicéridos e incrementar el de diglicéridos. Estudios realizados por Kristensen *et al.* (2005) también indican que la producción de diglicéridos se veía favorecida por el incremento de la temperatura incluso hasta los 80 °C, aunque el rango óptimo de actuación sería entre 40 y 60 °C para minimizar la degradación térmica y poder reutilizar la enzima un mayor número de veces. En el desarrollo de procesos continuos, puede ser necesario perder parte del potencial catalítico y trabajar a temperaturas más bajas en las que la enzima posee una mayor estabilidad, en busca de un mayor número de reutilizaciones del preparado. En las reacciones de glicerólisis en medio “free-solvent”, la mezcla entre los aceites y el glicerol posee una baja miscibilidad. Junto a esto, la elevada viscosidad del medio debido al glicerol limita la difusión de los sustratos

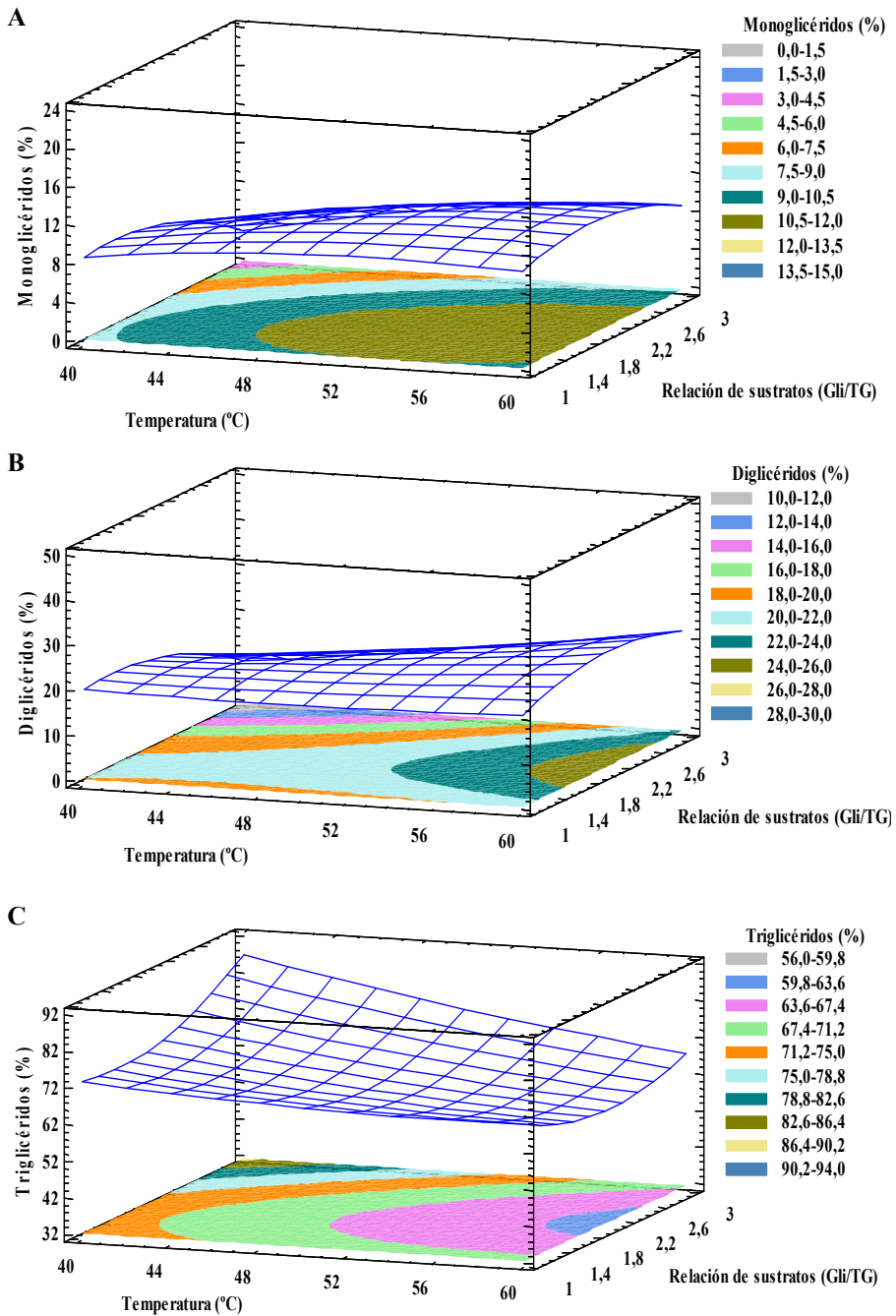


Figura 6. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Concentración de enzima 1%. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

disminuyendo el número de triglicéridos transformados en mono y diglicéridos (Zeng *et al.*, 2010). A relaciones altas de Gli/TG y temperatura baja, la viscosidad excesiva del medio dificultaba el acceso de los sustratos al centro activo de la enzima dando como resultado una reducción en conversión de los triglicéridos (Figura 6 C) en diglicéridos y monoglicéridos por parte de Lipozyme RM-IM (Figura 6 A y 6 B). Conforme se incrementaba la temperatura, la resistencia del medio a la difusión de los sustratos se veía reducida y el número de triglicéridos disminuía rápidamente como consecuencia de su transformación en monoglicéridos y diglicéridos. Por tanto el ratio óptimo glicerol/triglicéridos de la lipasa es muy dependiente de la temperatura de reacción.

A partir de los datos experimentales obtenidos del diseño experimental se procedió al cálculo del modelo de regresión que explique la producción de monoglicéridos. Una vez calculados los coeficientes de regresión, la ecuación que se ajusta al modelo experimental sería la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Monoglicéridos (\%)} = & -25,24 + 1,10 * A + 1,12 * B + 5,4 * C - 0,01 * A^2 \\ & + 0,10 * A * B - 0,04 * A * C - 2,11 * B^2 + 0,41 * B * C \\ & - 0,31 * C^2 \end{aligned}$$

El estudio de la superficie de respuesta indicaba que la **máxima producción de monoglicéridos** se conseguía mediante la siguiente combinación de los factores: temperatura de 48,8 °C, relación de glicerol/triglicéridos de 2,18 y concentración de enzima 7,32%. Bajo estas condiciones el modelo predice una máxima producción de monoglicéridos del 22,53%. Estos niveles son similares a los encontrados en la literatura, donde por ejemplo se indica que las relaciones más apropiadas para la producción de monoglicéridos se sitúan en torno a 2, y la temperaturas óptima de enzima es de 55 °C (Noureddini y Harmeier, 1998).

4.1.2. Estudio de la estabilidad oxidativa de los productos de glicerólisis con Lipozyme RM-IM

Como parte del estudio de optimización de la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con la lipasa de *R. miehei* inmovilizada (Lipozyme RM-IM) se estudió la estabilidad oxidativa de los productos. Para ello, se determinó el tiempo de inducción (ti) de los productos de reacción en las condiciones indicadas por el diseño (Tabla 2). En todas las experiencias, la estabilidad oxidativa era menor que en el aceite de partida (2,07 h), oscilando los ti entre 0,56 y 1,86 h. A partir de estos resultados se realizó un análisis de la varianza (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis con aceite de anchoa para el tiempo de inducción con la lipasa Lipozyme RM-IM.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl ^a	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura (°C)	0,00	1	0,25	0,7061
B: Relación Gli/TG	0,16	1	91,02	0,0665
C: Concentración de enzima (%)	0,49	1	273,80	0,0384*
AA	0,72	1	398,25	0,0319*
AB	0,01	1	6,67	0,2351
AC	0,09	1	47,84	0,0914
BB	0,25	1	137,89	0,0541
BC	0,06	1	33,06	0,1096
CC	0,99	1	548,73	0,0272*
Falta de ajuste	0,25	4,00	34,28	0,1256
Total (corr.)	2,46	14,00		
R ²	89,90%			

^aGl: grados de libertad

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

El análisis de la varianza mostraba que el modelo empleado para la descripción de los resultados de estabilidad oxidativa de los productos de reacción era válido y poseía una buena capacidad de predicción explicando el 89,9% de la variabilidad.

Una vez calculados los coeficientes de regresión, la ecuación que se ajusta al modelo experimental para el tiempo de inducción quedaría así:

$$\text{Tiempo de inducción (h)} = 14,811 - 0,639 * A + 1,541 * B + 0,395 * C + 0,006 * A^2 - 0,004 * A * B + 0,003 * A * C - 0,342 * B^2 - 0,21 * B * C - 0,042 * C^2$$

El diagrama de Pareto muestra que los factores concentración de enzima y la temperatura eran los únicos efectos activos en el modelo (Figura 7). Estos resultados del tiempo de inducción están relacionados tanto con la composición de los productos finales de reacción como con el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de estos compuestos.

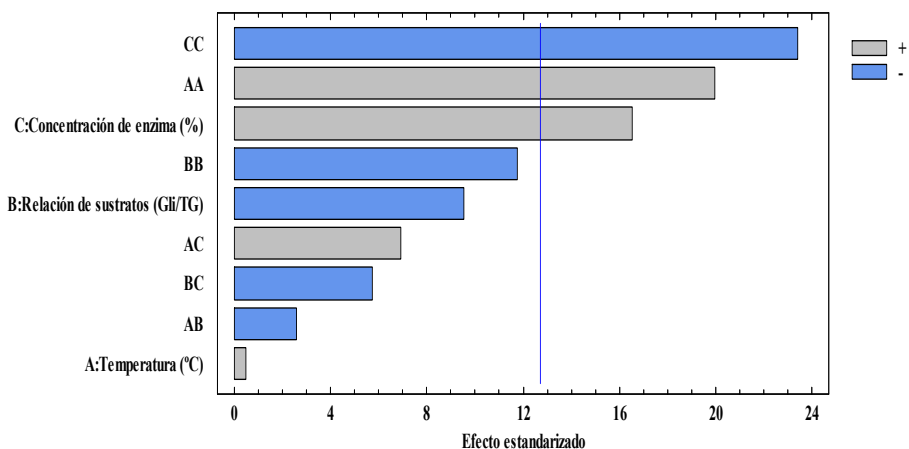


Figura 7. Diagrama de Pareto para los efectos de los factores del diseño sobre el tiempo de inducción.

Dado que la composición en acilgliceroles también puede afectar a la estabilidad del producto de reacción se procedió a realizar un estudio de las correlaciones entre los productos y el

tiempo de inducción. El estudio de las correlaciones de *Pearson* indicaba que existía una fuerte interrelación entre el tiempo de inducción y en contenido tanto en diglicéridos como en triglicéridos (Tabla 6). El contenido en diglicéridos se relacionaba positivamente con el tiempo de inducción, indicando que estos acilglicerolés mejoraban la estabilidad oxidativa del producto, mientras que el incremento en el contenido en triglicéridos estaba correlacionado negativamente con la estabilidad.

Tabla 6. Matriz de correlación con el coeficiente de *Pearson* entre las variables respuesta del diseño experimental para Lipozyme RM-IM.

	MG ^a (%)	DG ^b (%)	TG ^c (%)	ti ^d (h)
MG ^a (%)		0,9070	-0,9518	0,4121
		0,0000*	0,0000*	0,1270
DG ^b (%)	0,9070		-0,9872	0,5888
	0,0000*		0,0000*	0,0164
TG ^c (%)	-0,9518	-0,9872		-0,5199
	0,0000*	0,0000*		0,0390*
ti ^d (h)	0,4121	0,5888	-0,5199	
	0,1270	0,0164*	0,0390*	

^aMG: monoglicéridos; ^bDG: diglicéridos; ^cTG: triglicéridos; ^dti: tiempo de inducción

* Correlaciones significativas a un nivel de confianza del 95%

La concentración de enzima es el factor que mayor peso presentaba sobre la estabilidad. El incremento de este factor tenía un efecto positivo sobre la estabilidad oxidativa de los aceites pero una vez superados los valores centrales este efecto positivo desaparecía dando lugar a una pérdida de la estabilidad al aumentar este ratio (Figura 8). El efecto positivo de la concentración de enzima puede ser debido a que este factor favorece la producción de diglicéridos los cuales, como muestra la matriz de correlación, incrementaban el tiempo de inducción.

La variable **temperatura** mostraba también un fuerte comportamiento cuadrático sin que el componente lineal fuese significativo en el proceso. Este factor tenía un comportamiento

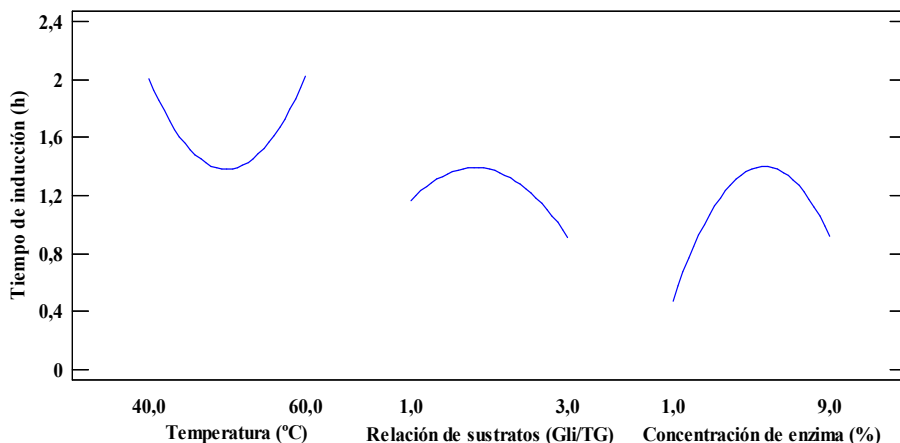


Figura 8. Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para el tiempo de inducción con Lipozyme RM-IM.

diferente al esperado ya que las temperaturas más altas suelen provocar una mayor pérdida en la estabilidad de los aceites. Por contra, el estudio de la superficie de respuesta indicaba que a partir de los 50 °C, el incremento de la temperatura daba lugar a una mejora en la estabilidad del producto (Figura 9). Esto puede ser consecuencia, nuevamente, de que este factor mejoraba la producción de diglicéridos que protegían frente a la oxidación (Figura 6). Las temperaturas empleadas en el proceso no eran tan elevadas como para producir una degradación térmica del aceite que redujera de forma notable su estabilidad.

El estudio de la superficie de respuesta indicaba que las **condiciones óptimas** que minimizaban la oxidación eran: 60 °C de temperatura, 1,76 de relación glicerol/triglicéridos y 6,12% de concentración de enzima. Con esta combinación de los factores el modelo predice un tiempo de inducción de 2,09 h. Este valor era muy similar al encontrado para el aceite de anchoa sin tratar (ti 2,07 h).

Con el objeto de encontrar unas condiciones de trabajo en las que se obtuviera una combinación adecuada de producción de monoglicéridos y estabilidad oxidativa de los productos, se

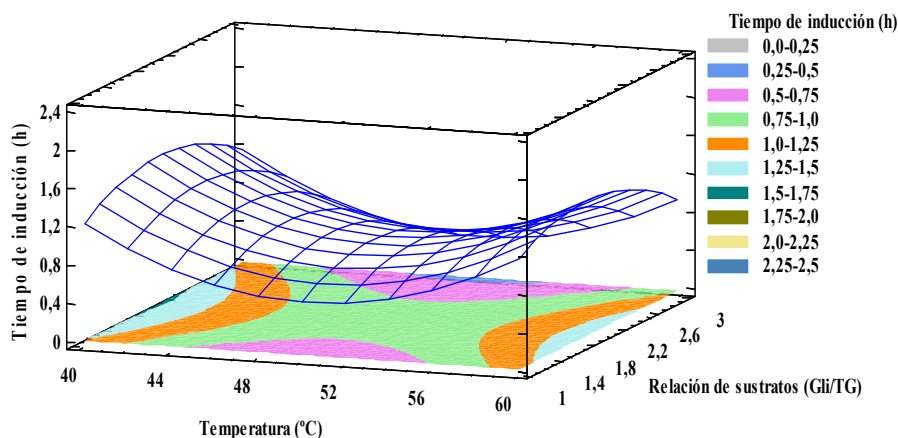


Figura 9. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Concentración de enzima 2%.

procedió al estudio de estas dos características en los óptimos de cada respuesta (Tabla 7). Los resultados indicaban que las condiciones en las que se obtenía la máxima estabilidad (2,09 h) eran las más apropiadas dado que el contenido en monoglicéridos era alto (20,52%). No obstante, la maximización de la producción de monoglicéridos reducía notablemente el tiempo de inducción (1,24 h) y únicamente se incrementaba un 2% el contenido en monoglicéridos respecto a las condiciones anteriores.

Tabla 7. Condiciones óptimas para producción de monoglicéridos mediante glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM utilizando como variables respuesta % MG y tiempo de inducción.

Optimización	Factores ^a			Respuestas	
	A	B	C	MG (%)	ti (h)
Tiempo de inducción (ti)	60	1,76	6,12	20,52	2,09
Producción MG	48,8	2,18	7,32	22,53	1,24

^a A: Temperatura (°C); B: Relación molar de sustratos (Gl/TG); C: Concentración de enzima (%)

4.2. Glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con Lipase PS-DI

Como ya se ha indicado en la síntesis de monoglicéridos con Lipozyme RM-IM (apdo. 4.1.1.), en las reacciones de glicerólisis en medio “free-solvent” el soporte al que se ancla la lipasa parece ser uno de los factores más importantes para la catálisis. Aquellos biocatalizadores inmovilizados de carácter hidrofílico presentan problemas al generar una capa de glicerol alrededor de la enzima que limita la transferencia de materia. En concreto, el soporte “tierra diatomeas” de Lipase PS-DI tiene un carácter neutro, con una hidrofobicidad mayor que otros soportes como Duolite (Lipozyme RM-IM) lo que, en principio, le convertiría en un soporte de inmovilización adecuado para llevar a cabo este tipo de reacciones.

Al igual que en el estudio anterior, se analizó la influencia de los factores temperatura, relación glicerol/triglicéridos y concentración de enzima sobre la reacción de glicerólisis mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras empleando como respuestas las concentraciones de acilgliceroles y ácidos grasos libres producidos y tiempo de inducción (Tabla 2). A continuación se muestran los resultados del diseño experimental de los productos de reacción transcurridas 4 h, así como la estabilidad oxidativa de los productos determinada mediante el tiempo de inducción (Tabla 8).

De forma similar a como ocurría en el estudio anterior con Lipozyme RM-IM, la baja actividad de agua fijada para la enzima Lipase PS-DI posiblemente haya minimizado las reacciones de hidrólisis. Como consecuencia, los niveles de ácidos grasos libres fueron indetectables en la mayor parte de experiencias realizadas impidiendo, por tanto, construir un modelo que pueda predecir su producción.

Tabla 8. Valores de las variables respuesta (productos de reacción y estabilidad oxidativa) para la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras.

Experiencia	Productos de reacción (%)				Tiempo de inducción (h)
	MG ^a	DG ^b	TG ^c	AGL ^d	
1	15,96	50,30	32,39	3,82	0,62
2	10,83	50,51	44,79	0,00	0,91
3	18,73	49,91	27,79	3,02	1,29
4	19,08	47,46	29,81	0,00	1,12
5	17,34	52,99	29,41	3,24	0,97
6	14,03	46,23	39,70	0,00	1,11
7	20,32	54,36	23,10	3,12	1,57
8	30,50	53,29	20,46	0,00	0,79
9	17,47	52,02	23,86	4,25	1,22
10	20,05	55,31	26,62	0,00	0,96
11	18,44	50,25	28,20	2,33	1,14
12	23,11	53,75	22,34	0,00	1,33
13	17,11	51,69	29,83	2,72	1,2
14	22,27	51,60	23,99	0,00	1,24
15	19,28	51,76	29,00	0,00	1,02
16	18,05	50,30	32,36	0,00	0,97
17	17,40	50,51	30,98	0,00	1,04

^a MG: monoglicéridos; ^b DG: diglicéridos; ^c TG: triglicéridos; ^d AGL: ácidos grasos libres

4.2.1. Síntesis de monoglicéridos con Lipase PS-DI

Los resultados del análisis de la varianza del diseño para mono, di y triglicéridos se detallan en la Tabla 9. El ANOVA del diseño experimental para el estudio de la producción de monoglicéridos indicaba que no existía fallo de ajuste por lo que el modelo empleado en la descripción de los resultados era válido. Así mismo, el modelo poseía una buena capacidad de predicción como

lo indicaba su coeficiente de correlación R^2 de 92,10% (Tabla 9). De igual manera los resultados del ANOVA para la producción de diglicéridos y conversión de triglicéridos muestran que no existía fallo de ajuste y que era posible explicar el 80,75 y el 83,73% de la variabilidad respectivamente.

Tabla 9. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI para la producción (%) de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. A: Temperatura (°C), B: Relación Gli/TG y C: Concentración de enzima (%).

Fuente	Monoglicéridos (%)		Diglicéridos (%)		Triglicéridos (%)	
	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P	Suma de Cuadrados	Valor-P
A	2,18	0,2620	18,23	0,0074*	61,65	0,0433*
B	123,48	0,0073*	19,60	0,0071*	260,00	0,0108*
C	51,76	0,0172*	5,37	0,0136*	78,12	0,0346*
AA	3,95	0,1728	2,38	0,0204*	0,44	0,7334
AB	44,98	0,0197*	0,06	0,1311	67,92	0,0395*
AC	16,97	0,0498*	4,49	0,0149*	5,73	0,2921
BB	1,72	0,3036	3,25	0,0175*	0,50	0,7152
BC	8,88	0,0891	6,14	0,0127*	4,46	0,3378
CC	0,22	0,6740	20,30	0,0070*	11,52	0,1822
Falta de ajuste	19,93	0,1965	27,29	0,0159	92,44	0,1391
Total (corr.)	275,434		141,76		603,26	
R^2	92,10%		80,75%		83,73%	

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

En Tabla 9 puede observarse que la relación de sustratos (B), la concentración de enzima (C) y sus interacciones con la temperatura (AB y AC) eran efectos activos en el modelo de producción de monoglicéridos. Todos ejercían un efecto positivo sobre la producción de monoglicéridos, siendo el más importante para esta reacción la relación glicerol/triglicéridos (B). En los

diglicéridos todos los efectos eran significativos excepto la interacción temperatura-relación de sustratos (AB), mientras que los efectos que influían en la producción de triglicéridos eran A, B, C y AB.

La **relación de sustratos (glicerol/triglicéridos)** era un factor cuyo efecto estaba muy relacionado con el soporte sobre el que se encuentra inmovilizada la enzima. Como ya se ha comentado, la producción de monoglicéridos teóricamente se ve favorecida por el uso de un exceso de glicerol, aunque un exceso de este compuesto puede afectar negativamente a la capacidad catalítica de las lipasas. Los resultados encontrados en este diseño para Lipase PS-DI indicaban que sí que tenía lugar este efecto positivo del incremento de la relación de glicerol/triglicéridos sobre la producción de monoglicéridos (Figura 10 A). El uso de cantidades cada vez mayores de glicerol disminuía la cantidad de diglicéridos formados hasta estabilizarse o, incluso, reducirse posiblemente por su conversión en monoglicéridos al reaccionar con más glicerol (Figura 10 B). Por su parte, la cantidad de triglicéridos disminuía por el incremento de este factor indicando que se convertían en mayor grado cuando se incrementaba el contenido en glicerol (Figura 10 C).

Este comportamiento difería significativamente del encontrado para el preparado Lipozyme RM-IM en el que, superados los valores centrales del diseño, la capacidad de la enzima para catalizar la reacción de glicerólisis se veía disminuida. Esto es resultado de las diferentes características del soporte sobre el que están inmovilizadas las enzimas, ya que mientras que en Lipozyme RM-IM el soporte tiene un carácter hidrofílico, la tierra diatomeas del preparado Lipase PS-DI son claramente más hidrofóbicas (Plou *et al.*, 1996). El soporte enzimático de Lipase PS-DI puede tener la capacidad para adsorber glicerol y dosificarlo creando un microentorno alrededor de la enzima con una concentración de glicerol que, a diferencia del soporte de Lipozyme RM-IM, no entorpece la difusión del resto de sustratos. Esto contribuye al

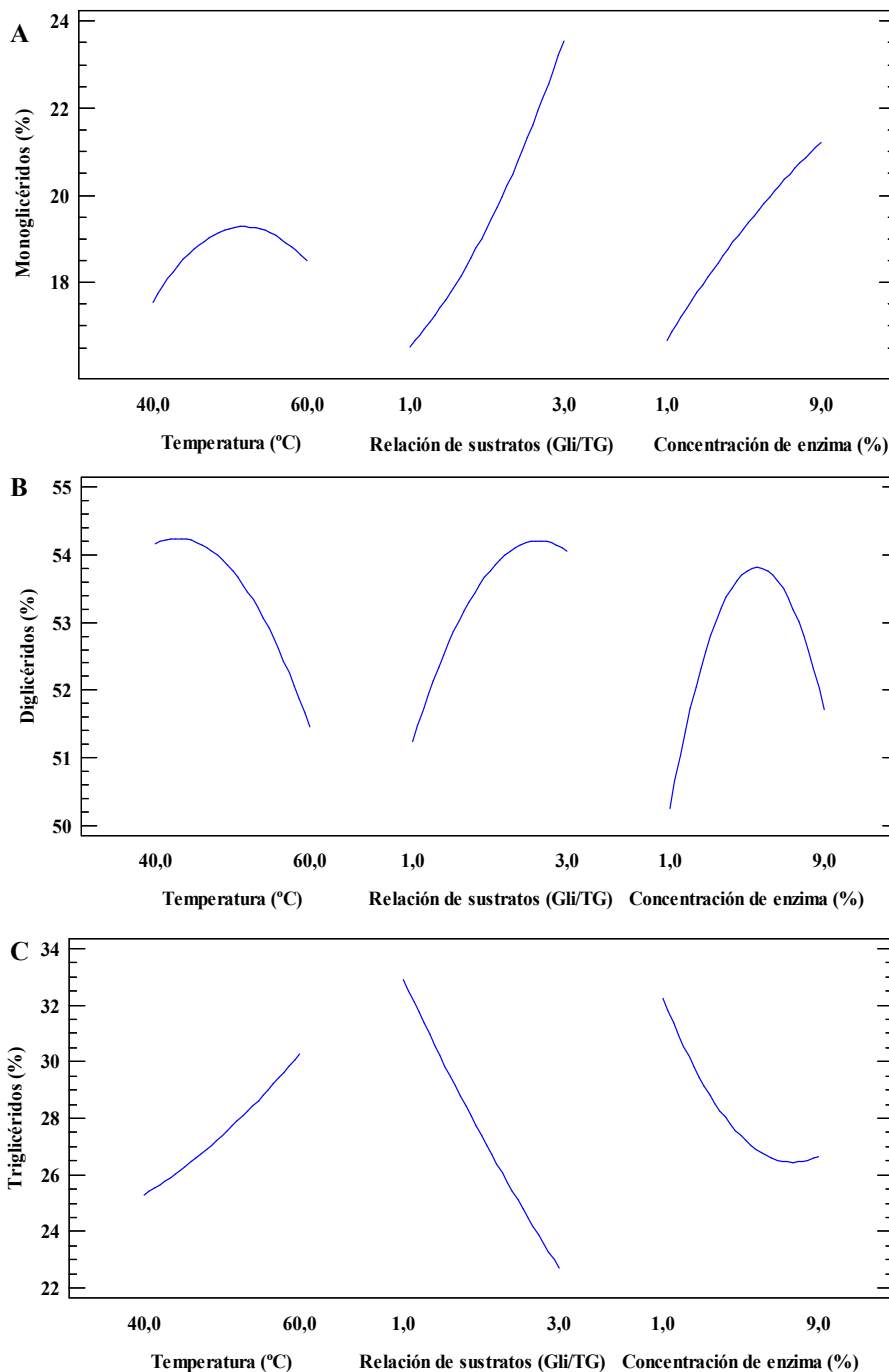


Figura 10. Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para Lipase PS-DI. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

hecho de que el preparado actuaba de forma eficaz en concentraciones altas de glicerol. En este sentido, los estudios realizados por Kristensen *et al.* (2005) demostraban que cuando en los ensayos se utilizaba Lipase PS-DI los ratios de conversión de los triglicéridos son similares, tanto si el glicerol es empleado en forma libre como preadsorbido sobre gel de sílice, debido a que el propio soporte de inmovilización actúa como matriz de dosificación del glicerol. Esta interacción entre el soporte y el glicerol, junto con la menor tendencia de este inmovilizado a agregarse, hace que el aumento de la viscosidad no tenga un efecto tan importante sobre la actividad de la enzima como cuando el soporte de inmovilización es hidrofílico como en el caso de Lipozyme RM-IM (Bornscheuer, 1995).

En la Figura 11 A, puede observarse que cuando la **concentración de enzima** se incrementaba, la cantidad de monoglicéridos producidos también se veía incrementada. Por el contrario, este efecto no se observaba en el resto de acilglicerol de la reacción, y a altas concentraciones de enzima la conversión de triglicéridos se estabilizaba y la cantidad de diglicéridos se reducía (Figuras 11 B y 11 C). Esto parece indicar que la enzima dejaba de utilizar triglicéridos como sustrato preferente, para catalizar la conversión de los diglicéridos en monoglicéridos. Si la cantidad de glicerol es suficiente las lipasas utilizan los diglicéridos como sustrato para dar lugar a 2 moléculas de monoglicéridos. Inicialmente en la reacción, la cantidad de diglicéridos como productos intermedios de la reacción es superior a la de monoglicéridos (Cheirsilp *et al.*, 2007). En este equilibrio en presencia de un exceso de glicerol, el principal producto de la reacción son los monoglicéridos. En los sistemas “free-solvent” la transferencia de materia es más lenta que en un sistema con disolvente donde los sustratos difunden con mayor facilidad por lo que el tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio es mayor. Adicionalmente, a mayor cantidad de enzima el equilibrio se alcanzará antes al no existir problemas derivados de la agregación enzimática que reduzcan el número de centros activos disponibles.

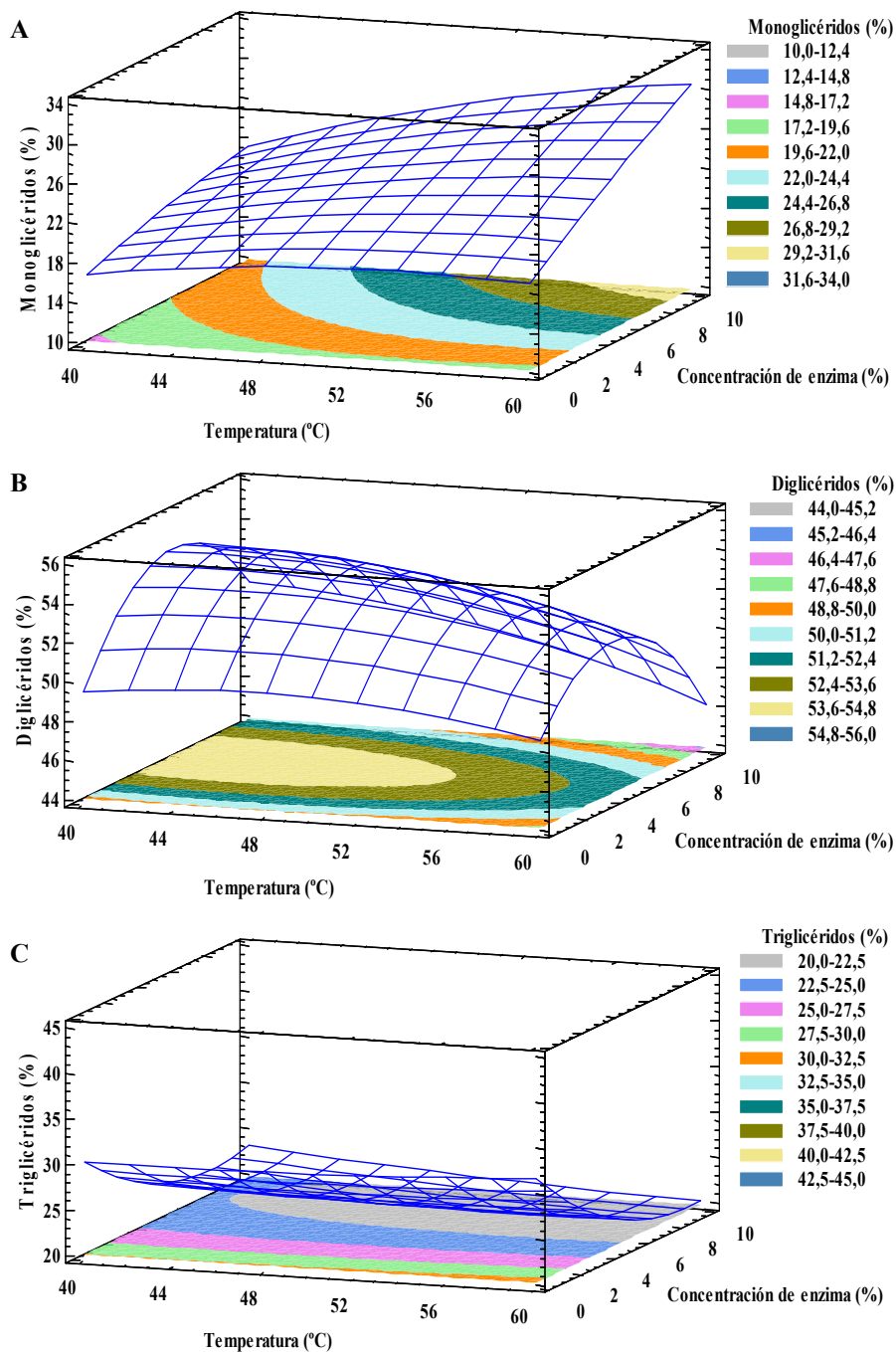


Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la concentración de enzima y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipase PS-DI. Relación molar de sustratos 3:1. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

El efecto individual de la **temperatura** no resultó significativo en el modelo calculado para los monoglicéridos, pero la **interacción relación molar de sustratos-temperatura** si era un efecto activo. En este diseño se observaba que el incremento de la temperatura tenía un efecto positivo sobre la producción de monoglicéridos hasta alcanzar un máximo entorno al centro del dominio experimental. Temperaturas superiores a los 50° C, provocan una disminución en la cantidad de monoglicéridos sintetizados (Figura 11 A). Resultados similares han sido encontrados por Nouredini y Harmeier (1998), que obtenían la máxima producción de monoglicéridos cuando los ensayos se realizan a 55 °C. Estos autores indican que la lipasa de *B. cepacia* presentaba una buena termoresistencia manteniendo unos niveles altos de actividad a temperaturas superiores a 60 °C, aunque el uso de temperaturas superiores a 50 °C disminuía su actividad por la pérdida de su conformación activa. De manera similar Pawongrat *et al.* (2007), observaron que para Lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada sobre Accurel EP-100 el rendimiento en la producción de monoglicéridos mejoraba conforme se incrementaba la temperatura hasta los 45 °C.

La interacción entre la relación molar glicerol/triglicéridos y la temperatura de reacción resultaba significativa tanto en la producción de monoglicéridos como en la conversión de triglicéridos. El efecto negativo de la temperatura puede observarse en la Figura 12 C, donde el contenido en triglicéridos se incrementaba conforme lo hacía la temperatura a relaciones de glicerol/triglicéridos de 1:1. Por el contrario, este efecto negativo de la temperatura no se observaba a relaciones mayores de 3:1, dado que el % de triglicéridos transformados permanecía constante. Este comportamiento puede deberse a un efecto protector del glicerol frente a la desnaturalización térmica de la enzima. Diversos estudios indican que el glicerol además de modificar la viscosidad del medio puede interactuar con la proteína teniendo un efecto protector afectando de forma positiva a su actividad (Ye *et al.*, 1988; Asther y Meunier, 1990).

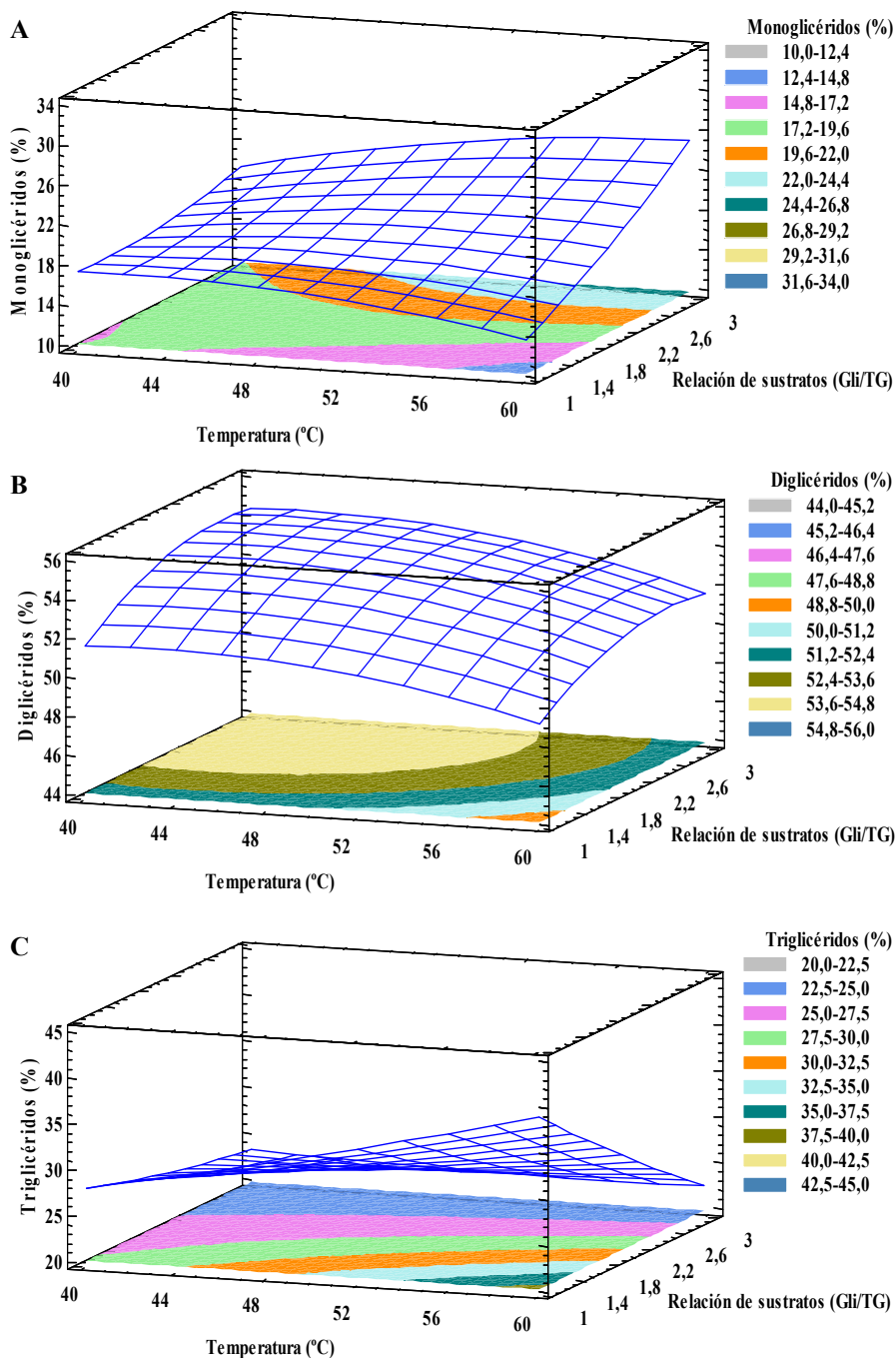


Figura 12. Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipase PS-DI. Concentración de enzima 5%. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).

Aunque las lipasas son enzimas capaces de actuar en medios orgánicos, en general su estabilidad es menor que en soluciones acuosas y son más sensibles a la desnaturalización térmica. Determinados compuestos como el glicerol estabilizan la conformación de las lipasas incrementando su resistencia térmica. Por ejemplo, en la hidrólisis del aceite de oliva en isooctano este compuesto incrementaba la vida media al actuar como agente estabilizador frente a la acción desnaturalizante de los solventes orgánicos y la temperatura (Yang y Rhee, 1991). Este efecto se ha encontrado en otros polialcoholes donde se observa que su efecto protector se ve incrementado conforme se aumenta la concentración (Noel y Combes, 2003).

A partir de los resultados del diseño se calculó la ecuación para la predicción del porcentaje de monoglicéridos producidos por Lipase PS-DI:

$$\begin{aligned} \text{Monoglicéridos (\%)} = & 14,87 + 0,60 * A + 12,86 * B - 1,60 * C - 0,01 * A^2 \\ & + 0,24 * A * B + 0,04 * A * C + 0,80 * B^2 + 0,26 * B * C \\ & - 0,02 * C^2 \end{aligned}$$

Analizando la superficie de respuesta para la **optimización** de la producción de monoglicéridos con el preparado Lipase PS-DI se determinó que los mejores resultados se obtenían situando los tres factores en los niveles más altos del dominio, alcanzando un máximo teórico de un 29,67% de monoglicéridos.

4.2.2. Estudio de la estabilidad oxidativa de los productos de glicerólisis con Lipase PS-DI

En la Tabla 8 se recogen los resultados del diseño para la estabilidad oxidativa de los productos de la reacción de glicerólisis con aceite de anchoa catalizada por Lipase PS-DI. Como en el caso anterior, el tiempo de inducción del aceite de partida fue de 2,07 h, siendo el rango de estabilidad de las experiencias realizadas de entre 0,62 y 1,57 h.

Los resultados del ANOVA para la respuesta tiempo de inducción indicaban que el modelo empleado resultaba adecuado para describir los datos observados de estabilidad oxidativa de los productos de la glicerólisis (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis con aceite de anchoa para el tiempo de inducción con la lipasa Lipase PS-DI.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl ^a	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura (°C)	0,06	1	46,80	0,0207*
B: Relación Gli/TG	0,18	1	140,19	0,0071*
C: Concentración de enzima (%)	0,03	1	22,43	0,0418*
AA	0,03	1	24,18	0,0390*
AB	0,24	1	183,12	0,0054*
AC	0,07	1	55,54	0,0175*
BB	0,00	1	2,77	0,2377
BC	0,05	1	34,62	0,0277*
CC	0,00	1	0,97	0,4286
Falta de ajuste	0,12	5	18,03	0,0534
Total (corr.)	0,78	16		
R ²	84,64%			

^aGl: grados de libertad

*Efectos activos en el modelo a un nivel de confianza del 95%

La ecuación que describe la estabilidad de los productos de la glicerólisis con Lipase PS-DI capaz de predecir el 84,64% de la varianza era:

$$\begin{aligned} \text{Tiempo de inducción (h)} = & -3,863 + 0,167 * A + 0,944 * B + 0,156 * C + 0,001 * A^2 \\ & - 0,017 * A * B - 0,002 * A * C + 0,037 * B^2 - 0,019 * B * C \\ & - 0,001 * C^2 \end{aligned}$$

Como puede observarse en el diagrama de Pareto, los 3 factores analizados en el diseño: temperatura (A), relación molar de

sustratos (B) y concentración de enzima (C) tienen un efecto significativo en el modelo (Figura 13).

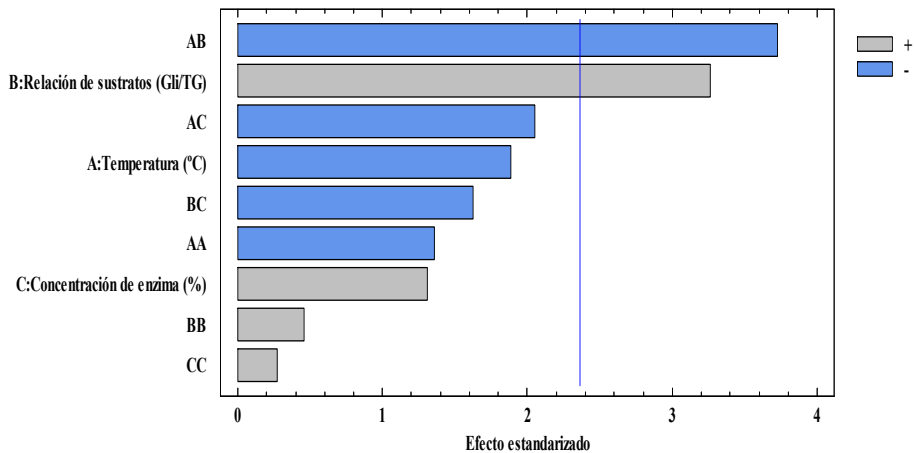


Figura 13. Diagrama de Pareto estandarizado para el tiempo de inducción de los productos de glicerólisis.

El estudio de las **correlaciones** entre los distintos productos de la reacción y el tiempo de inducción muestra que únicamente el contenido en diglicéridos parece estar relacionado positivamente con la estabilidad oxidativa (Tabla 11).

Tabla 11. Matriz de correlación con el coeficiente de *Pearson* entre las variables respuesta del diseño experimental para Lipase PS-DI.

	MG ^a (%)	DG ^b (%)	TG ^c (%)	ti ^d (h)
MG ^a (%)		0,2822	-0,8448	0,0823
DG ^b (%)	0,2822		-0,6632	0,6293
TG ^c (%)	-0,8448	-0,6632		-0,3650
ti ^d (h)	0,0823	0,6293	-0,3650	
	0,2896	0,0000*	0,7535	
	0,2896	0,0051*	0,0090*	
	0,0000*	0,0051*	0,1497	
	0,7535	0,0090*	0,1497	

^a MG: monoglicéridos; ^b DG: diglicéridos; ^c TG: triglicéridos; ^d ti: tiempo de inducción

* Correlaciones significativas a un nivel de confianza del 95%

El incremento de la **relación glicerol/triglicéridos** mejoraba la estabilidad oxidativa de los productos. Esto puede ser resultado de que los triglicéridos del aceite de partida estaban formados en gran parte por ácidos PUFAs fácilmente oxidables por el gran número de dobles enlaces que poseen, por lo que al incrementar la proporción de glicerol, que es más estable a la oxidación, el producto final ha incrementado su tiempo de inducción.

Como cabría esperar, el incremento de la **temperatura** de reacción provocaba un aumento en la inestabilidad del aceite como puede observarse al disminuir el tiempo de inducción conforme se incrementaba la temperatura (Figura 14). La temperatura da lugar a formas oxidadas de los ácidos grasos, especies con un alto poder prooxidante que reduce el tiempo de inducción.

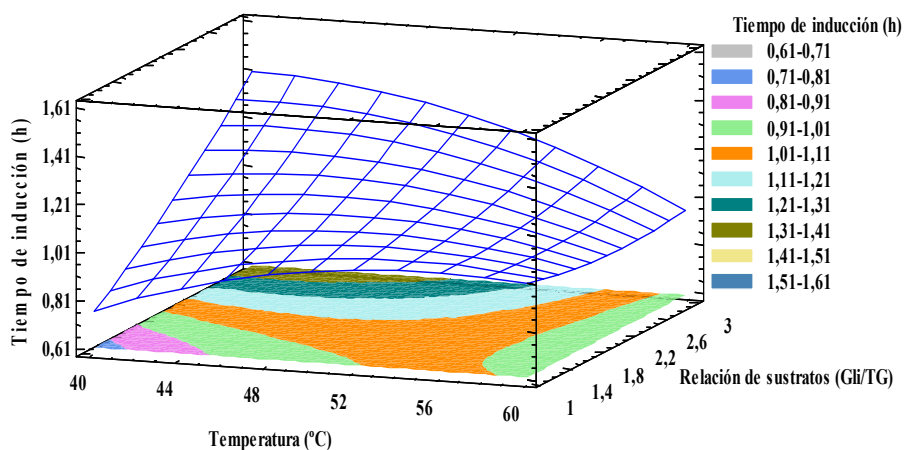


Figura 14. Gráfico de superficie de respuesta estimado para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicérolisis con Lipase PS-DI. Concentración de enzima 5%.

El estudio de los resultados del diseño indicaba que para el dominio estudiado, la **máxima estabilidad** de los productos se alcanzaba cuando se situaba la temperatura a 40 °C, la relación de glicerol/triglicéridos en 3:1 y la concentración de enzima en el 9%. Con esta combinación de los factores el modelo indicaba que el tiempo de inducción sería de de 1,53 h (Tabla 12). En este caso, la temperatura era un factor muy importante que causaba una gran

pérdida de estabilidad, por lo que es necesario fijarla en los valores más bajos posibles.

Al comparar estos resultados de estabilidad y porcentaje de monoglicéridos predichos por los modelos, puede observarse que la temperatura era el factor que marcaba la diferencia entre las dos condiciones estudiadas. Los valores bajos de temperatura permitían que el aceite mantuviese unos buenos niveles de estabilidad, pero el aumento de temperatura que provocaba el incremento de los monoglicéridos suponía la reducción del t_i a la mitad.

Tabla 12. Condiciones óptimas para producción de monoglicéridos mediante glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI utilizando como variables respuesta % MG y tiempo de inducción.

Optimización	Factores ^a			Respuestas	
	A	B	C	MG (%)	t_i (h)
Tiempo de inducción	40	3	9	21,08	1,53
Producción MG	60	3	9	29,67	0,83

^aA: Temperatura (°C); B: Relación molar de sustratos (Gl/TG); C: Concentración de enzima (%)

5. Conclusiones

En la síntesis de monoglicéridos mediante glicerólisis enzimática de aceite de anchoa con las lipasas comerciales inmovilizadas Lipozyme RM-IM y Lipase PS-DI, en medio “free-solvent”, los resultados aportados por este estudio indicaron que:

- Las lipasas Lipozyme RM-IM y Lipase PS-DI catalizaban de forma eficiente la producción de monoglicéridos aunque con un comportamiento bioquímico diferenciado debido, fundamentalmente, a las características específicas del soporte de inmovilización. Mientras que para Lipase PD-DI (soporte hidrofóbico) el incremento en el contenido en glicerol favorecía la producción de monoglicéridos, la interacción de este sustrato con el soporte hidrofílico de Lipozyme RM-IM provocaba la inhibición de la enzima.
- La producción de monoglicéridos se veía favorecida con concentraciones de enzima elevadas. No obstante, la tendencia a la agregación de Lipozyme RM-IM implicaba que se alcanzase la máxima eficiencia de la reacción con una menor carga de enzima que con Lipase PS-DI.
- La interacción entre la temperatura de reacción y el ratio Gli/TG era uno de los efectos con mayor influencia en la reacción de glicerólisis, consecuencia de la viscosidad de los medios “free-solvent”.
- Aplicando los óptimos de reacción, la producción de monoglicéridos con Lipase PS-DI era claramente superior a Lipozyme RM-IM, 29,67% frente al 22,53%, respectivamente, aunque la estabilidad de los productos de reacción era considerablemente menor.
- Del estudio comparativo de la producción de monoglicéridos y estabilidad oxidativa de los productos de reacción se obtuvieron

combinaciones diferenciadas de las condiciones de reacción en función del preparado enzimático utilizado:

- Lipase PS-DI perdía parte del potencial catalítico exhibido en las condiciones óptimas, reduciéndose hasta el 21,08%, al intentar mejorar la estabilidad del producto.
- Lipozyme RM-IM sólo reducía en un 2% la producción de monoglicéridos al optimizar las variables para la mejora de la estabilidad oxidativa, incrementándose el tiempo de inducción hasta valores similares a los del acetite sin tratar (2,08 h).

6. Referencias

- Asther, M., Meunier, J.-C. Increased thermal stability of *Bacillus licheniformis* α -amylase in the presence of various additives (1990) *Enzyme and Microbial Technology*, 12 (11), pp. 902-905.
- Bellot, J.C., Choisnard, L., Castillo, E., Marty, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase catalyzed esterification (2001) *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (4-5), pp. 362-369.
- Berger, M., Laumen, K., Schneider, M.P. Enzymatic esterification of glycerol I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols (1992) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69 (10), pp. 955-960.
- Billek, G., Guhr, G., Waibel, J. Quality assessment of used frying fats: A comparison of four methods (1978) *JAOCS*, 55 (10), pp. 728-733.
- Bornscheuer, U.T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols (1995) *Enzyme and Microbial Technology*, 17 (7), pp. 578-586.
- Boswinkel, C., Derksen, J.T.P., Van't Riet, K., Cuperus, F.P. Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength (1996) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (6), pp. 707-711.
- Cheirsilp, B., Kaewthong, W., H-Kittikun, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase (2007) *Biochemical Engineering Journal*, 35 (1), pp. 71-80.
- Colakoglu, A.S. Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron (2007) *Food Chemistry*, 101 (2), pp. 724-728.
- Ghamgui, H., Miled, N., Rebaï, A., Karra-chaâbouni, M., Gargouri, Y. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology (2006) *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (4), pp. 717-723.
- Gomes, T., Caponio, F., Bruno, G., Summo, C., Paradiso, V.M. Effects of monoacylglycerols on the oxidative stability of olive oil (2010) *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (13), pp. 2228-2232.

- Holmberg, K., Osterberg, E. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion (1988) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 65 (9), pp. 1544-1548.
- Kristensen, J.B., Xu, X., Mu, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases (2005) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 82 (5), pp. 329-334.
- Kristensen, J.B., Xu, X., Mu, H. Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis (2005) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (18), pp. 7059-7066.
- Krüger, R.L., Valério, A., Balen, M., Ninow, J.L., Oliveira, J.V., de Oliveira, D., Corazza, M.L. Improvement of mono and diacylglycerol production via enzymatic glycerolysis in tert-butanol system (2010) European Journal of Lipid Science and Technology, 112 (8), pp. 921-927.
- Millqvist, A., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides (1994) Enzyme and Microbial Technology, 16 (12), pp. 1042-1047.
- Miyashita, K., Takagi, T. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids (1986) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 63 (10), pp. 1380-1384.
- Naik, M.K., Naik, S.N., Mohanty, S. Enzymatic glycerolysis for conversion of sunflower oil to food based emulsifiers (2014) Catalysis Today, 237, pp. 145-149.
- Noel, M., Combes, D. *Rhizomucor miehei* lipase: Differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives (2003) Enzyme and Microbial Technology, 33 (2-3), pp. 299-308.
- Noureddini, H., Harmeier, S.E. Enzymatic glycerolysis of soybean oil (1998) JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 75 (10), pp. 1359-1365.
- Paradiso, V.M., Caponio, F., Bruno, G., Pasqualone, A., Summo, C., Gomes, T. Complex role of monoacylglycerols in the oxidation of vegetable oils: Different behaviors of soybean monoacylglycerols in different oils (2014) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62 (44), pp. 10776-10782.

- Pawongrat, R., Xu, X., H-Kittikun, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK (2007) *Food Chemistry*, 104 (1), pp. 251-258
- Plou, F.J., Barandiarán, M., Calvo, M.V., Ballesteros, A., Pastor, E. High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein (1996) *Enzyme and Microbial Technology*, 18 (1), pp. 66-71.
- Rendón, X., López-Munguía, A., Castillo, E. Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein (2001) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (10), pp. 1061-1066.
- Sonntag, Norman O.V. Glycerolysis of fats and methyl esters - status, review and critique. (1982) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59 (10), pp. 795a-802a.
- Tan, T., Yin, C. The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1,3 position specific lipase from *Rhizopus arrhizus* (2005) *Biochemical Engineering Journal*, 25 (1), pp. 39-45.
- Valério, A., Rovani, S., Treichel, H., De Oliveira, D., Oliveira, J.V. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems (2010) *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33 (7), pp. 805-812.
- Watanabe, T., Shimizu, M., Sugiura, M., Sato, M., Kohori, J., Yamada, N., Nakanishi, K. Optimization of Reaction Conditions for the Production of DAG Using Immobilized 1,3-Regiospecific Lipase Lipozyme RM IM (2003) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (12), pp. 1201-1207.
- Yang, D., Rhee, J.S. Stability of the lipase immobilized on DEAE-Sephadex for continuous lipid hydrolysis in organic solvent (1991) *Biotechnology Letters*, 13 (8), pp. 553-558.
- Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., Xu, X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (5), pp. 1475-1481.
- Ye, W.N., Combes, D., Monsan, P. Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase (1988) *Enzyme and Microbial Technology*, 10 (8), pp. 498-502.
- Yeoh, C.M., Choong, T.S.Y., Abdullah, L.C., Yunus, R., Siew, W.L. Influence of silica gel in production of diacylglycerol via enzymatic glycerolysis of palm olein (2009) *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (6), pp. 599-606.

- Yoon, S.H., Jung, M.Y., Min, D.B. Effects of thermally oxidized triglycerides on the oxidative stability of soybean oil (1988) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65 (10), pp. 1652-1656.
- Zeng, F.-K., Yang, B., Wang, Y.-H., Wang, W.-F., Ning, Z.-X., Li, L. Enzymatic production of monoacylglycerols with camellia oil by the glycerolysis reaction (2010) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (5), pp. 531-537.
- Zhong, N., Li, L., Xu, X., Cheong, L., Li, B., Hu, S., Zhao, X. An Efficient Binary Solvent Mixture for Monoacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis (2009) *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86 (8), pp. 783-789.
- Zhong, N., Li, L., Xu, X., Cheong, L.-Z., Zhao, X., Li, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis (2010) *Food Chemistry*, 122 (1), pp. 228-232.

Abreviaturas

AGL	Ácidos grasos libres
AOCS	"American Oil Chemists' Society"
AOT	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio
DG	Diglicéridos
ELSD	Detector de dispersión de la luz por evaporación
Gli/TG	Glicerol/triglicéridos
MG	Monoglicéridos
TG	Triglicéridos
ti	Tiempo de inducción

Listado de figuras

Figura 1	Diagrama de las principales reacciones de glicerólisis catalizadas por lipasas 1,3 específicas.	208
Figura 2	Composición en ácidos grasos de aceite de anchoa (Denomega Nutritional Oils)	213
Figura 3	Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para Lipozyme RM-IM. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).....	222
Figura 4	Desplazamiento teórico del equilibrio por variación de la relación glicerol/triglicéridos hacia: A) Formación de monoglicéridos; B) Formación de diglicéridos	224
Figura 5	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la concentración de enzima en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Temperatura 50 °C. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%)	225
Figura 6	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Concentración de enzima 1%. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).....	227
Figura 7	Diagrama de Pareto para los efectos de los factores del diseño sobre el tiempo de inducción	230
Figura 8	Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para el tiempo de inducción con Lipozyme RM-IM	232

Figura 9	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipozyme RM-IM. Concentración de enzima 2%	233
Figura 10	Gráfica de efectos principales de los factores del diseño sobre la reacción de glicerólisis para Lipase PS-DI. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).....	238
Figura 11	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la concentración de enzima y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipase PS-DI. Relación molar de sustratos 3:1. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%)	240
Figura 12	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipase PS-DI. Concentración de enzima 5%. A) monoglicéridos (%); B) diglicéridos (%); C) triglicéridos (%).....	242
Figura 13	Diagrama de Pareto estandarizado para el tiempo de inducción de los productos de glicerólisis	245
Figura 14	Gráfico de superficie de respuesta estimada para la relación molar de sustratos y la temperatura en la reacción de glicerólisis con Lipase PS-DI. Concentración de enzima 5%	462

Listado de tablas

Tabla 1	Niveles de los factores en la optimización de la reacción de glicerólisis enzimática de aceite de anchoa	216
Tabla 2	Diseño experimental 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras para la optimización de la glicerólisis enzimática de aceite de anchoa.....	217
Tabla 3	Valores de las variables respuesta (productos de reacción y estabilidad oxidativa) para la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras	219
Tabla 4	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM para la producción (%) de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. A: Temperatura (°C), B: Relación Gli/TG y C: Concentración de enzima (%)	220
Tabla 5	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis con aceite de anchoa para el tiempo de inducción con la lipasa Lipozyme RM-IM	229
Tabla 6	Matriz de correlación con el coeficiente de <i>Pearson</i> entre las variables respuesta del diseño experimental para Lipozyme RM-IM	231
Tabla 7	Condiciones óptimas para producción de monoglicéridos mediante glicerólisis de aceite de anchoa con Lipozyme RM-IM utilizando como variables respuesta % MG y tiempo de inducción.....	233

Tabla 8	Valores de las variables respuesta (productos de reacción y estabilidad oxidativa) para la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI mediante un diseño 2^3 central compuesto cúbico centrado en las caras	235
Tabla 9	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI para la producción (%) de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. A: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B: Relación Gli/TG y C: Concentración de enzima (%)	236
Tabla 10	Análisis de la varianza en la optimización de la reacción de glicerólisis con aceite de anchoa para el tiempo de inducción con la lipasa Lipase PS-DI...	244
Tabla 11	Matriz de correlación con el coeficiente de <i>Pearson</i> entre las variables respuesta del diseño experimental para Lipase PS-DI.....	245
Tabla 12	Condiciones óptimas para producción de monoglicéridos mediante glicerólisis de aceite de anchoa con Lipase PS-DI utilizando como variables respuesta % MG y tiempo de inducción.....	247

Conclusiones generales

Conclusiones

Conclusiones generales

De toda la investigación desarrollada y plasmada en esta Tesis doctoral se pueden extraer y destacar los siguientes resultados generales:

La nueva metodología propuesta para determinación de la actividad hidrolítica de lipasas, basada en la solución Marmur, supone una mejora, respecto a otras técnicas descritas en bibliografía, por su precisión, reproducibilidad y sencillez.

La caracterización bioquímica de las lipasas, objeto de estudio, ha mostrado las grandes diferencias existentes en cuanto a los niveles de actividad hidrolítica y acilselectividad entre los diversos preparados enzimáticos comerciales. Las características cinéticas de las lipasas pueden verse, a su vez, modificadas por la presencia de emulsionantes o por la naturaleza del soporte de inmovilización de la enzima.

Las lipasas inmovilizadas Lipase PS-CI, Lipase PS-DI y Lipozyme RM-IM catalizan, de forma eficaz, la producción de lípidos estructurados enriquecidos en ALA mediante reacciones de acidólisis en medio orgánico. En la optimización del proceso, tanto el origen de la enzima como las características del soporte de inmovilización determinan las condiciones de reacción. En concreto, con el preparado comercial Lipase PS-CI se obtiene un aceite de palma altamente enriquecido en ALA.

La obtención de monoglicéridos vía glicerólisis enzimática con Lipozyme RM-IM y Lipase PS-DI en medio “free-solvent” supone, por sus niveles de producción y estabilidad de los productos de reacción, una alternativa viable a la síntesis química. Al igual que en las reacciones anteriormente citadas, tanto la enzima como el soporte de inmovilización determinan las condiciones de reacción óptimas. Así, mientras el incremento de glicerol favorece la

producción de monoglicéridos con Lipase PS-DI, reduce la capacidad catalítica de Lipozyme RM-IM.

Del estudio comparativo de la producción de monoglicéridos y estabilidad oxidativa de los productos, se puede obtener una combinación adecuada de las condiciones de reacción, específica para cada preparado enzimático, que conlleve unos niveles de producción de monoglicéridos elevados manteniendo la estabilidad oxidativa del producto.

Se hace, por tanto, imprescindible, previo a cualquier aplicación biotecnológica de un preparado comercial con actividad lipasa, el estudio exhaustivo y pormenorizado de las características cinéticas, efecto de emulsionantes y condiciones optimizadas de reacción que aseguren una aplicación efectiva del biocatalizador en rendimiento y estabilidad del producto.



Tesis Doctoral
David Palacios Santamaría



Universidad de Burgos

2015