



Universidad Autónoma  
Del Estado De México



Facultad de Química  
Maestría en Ciencias Químicas

**Obtención de un Triacilglicérido Estructurado Rico en  
Ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) por Vía Enzimática**

**Tesis**

Que para obtener el título de:

**Maestro en Ciencias**

Presenta:

**I.Q. José Eduardo López Martínez**

Dirigida por:

Dr. Ramiro Baeza Jiménez

Dra. Rubí Romero Romero

Dra. Reyna Natividad Rangel

Toluca, México

Enero de 2018

## Índice

Resumen .....	5
1. Justificación .....	7
2. Hipótesis .....	8
3. Objetivos .....	9
4. Antecedentes .....	10
4.1. Alimentos funcionales .....	10
4.2. Lípidos .....	11
4.3. Lípidos estructurados .....	13
4.4. Síntesis de lípidos estructurados .....	13
4.4.1. Métodos físicos de obtención de lípidos estructurados .....	14
4.4.2. Métodos químicos de obtención de lípidos estructurados .....	14
4.4.3. Métodos enzimáticos de obtención de lípidos estructurados ....	15
4.5. Los ácidos grasos .....	15
4.5.1. Nomenclatura de los ácidos grasos .....	16
4.5.2. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) .....	17
4.6. Ácido $\gamma$ -Linolénico (GLA) .....	19
4.6.1. Importancia biológica del GLA .....	21
4.6.2. Fuentes de obtención del ácido $\gamma$ -linolénico (GLA) .....	21
4.7. Enriquecimiento de aceites vegetales en GLA .....	22
4.8. Las enzimas .....	23
4.8.1. Nomenclatura y clasificación de las enzimas .....	24
4.8.2. Estructura de las enzimas .....	25
4.8.3 Las lipasas .....	26

5. Metodología .....	31
5.1. Materiales .....	31
5.2. Metodología experimental .....	31
5.2.1. Caracterización del aceite de <i>Oenothera biennis</i> .....	31
5.2.2. Derivatización de los ácidos grasos .....	31
5.2.3. Obtención del perfil de ácidos grasos .....	32
5.2.4. Enriquecimiento enzimático en GLA del aceite de <i>Oenothera biennis</i> .....	32
5.2.5. Evaluación de la concentración de GLA .....	32
5.2.6. Separación física del aceite enriquecido .....	33
5.2.7. Preparación enzimática del triacilglicérido estructurado .....	33
5.2.8. Análisis del perfil de glicéridos .....	33
6. Discusión de Resultados .....	35
6.1. Enriquecimiento enzimático en GLA .....	35
6.1.1. Efecto de la relación molar de sustratos .....	36
6.1.2. Efecto de la temperatura .....	36
6.1.3. Efecto de la carga de enzima .....	37
6.1.4. Efecto de la carga y tiempo de adición de tamiz molecular .....	38
6.2. Separación de las fases de reacción .....	41
6.3. Preparación enzimática del triacilglicérido estructurado .....	42
6.3.1. Efecto de la carga de enzima CALB .....	43
6.3.2. Efecto de la temperatura .....	44
6.3.3. Efecto de la relación molar de sustratos .....	45
7. Conclusiones .....	52
8. Bibliografía .....	53
9. Anexos .....	59

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación de los lípidos .....	12
Figura 2. Estructura del ácido linoleico .....	16
Figura 3. Estructura del ácido linoleico con la numeración griega .....	17
Figura 4. Estructura química de los PUFA precursores de los $\omega$ -3 y $\omega$ -6. ....	18
Figura 5. Estructura química del GLA .....	19
Figura 6. Ruta metabólica de desaturación-elongación del ácido linoleico en Mamíferos .....	20
Figura 7. Estructura química de los acilglicéridos .....	27
Figura 8. Reacciones químicas catalizadas por lipasas para la modificación de grasas y aceites .....	28
Figura 9. Enriquecimiento de ácidos grasos y sus respectivos ésteres a través de hidrólisis y esterificación química .....	30
Figura 10. Efecto de la relación molar de sustratos (EPO-FA:BtOH) en el contenido en GLA .....	36
Figura 11. Efecto de la temperatura en el contenido de GLA .....	37
Figura 12. Efecto de la carga de enzima de <i>Candida rugosa</i> .....	38
Figura 13. Efecto del tiempo de adición del tamiz molecular sobre el enriquecimiento en GLA .....	39
Figura 14. Efecto de la cantidad añadida de tamiz molecular sobre el enriquecimiento en GLA .....	41
Figura 15. Cromatografía en capa fina para la separación de las fases de reacción .....	42
Figura 16. Efecto de la carga de enzima CALB .....	43
Figura 17. Efecto de la temperatura .....	45
Figura 18. Efecto de la relación molar de sustratos GLA:glicerol .....	46
Figura 19. Composición de ácido graso, mono, di y triglicéridos .....	47

## Índice de tablas

Tabla 1. Nomenclatura de los ácidos grasos más comunes .....	17
Tabla 2. Porcentaje en peso (%) de GLA en aceites vegetales .....	22
Tabla 3. Clasificación de las enzimas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan ..	24
Tabla 4. Origen y especificidad de algunas lipasas .....	29
Tabla 5. Composición en ácidos grasos (% p/p) del aceite de partida (EPO) y de los productos enriquecidos .....	35

## Anexos

Anexo 1. Artículo: “Lipase-catalysed enrichment of $\gamma$ -Linolenic Acid for the production of structured triglycerides” .....	59
Anexo 2. Constancia de presentación en congresos .....	60

## Resumen

El ácido gamma-linolénico (GLA; *cis*-6,9,12-ácido octadecatrienoico) se sintetiza a partir de ácido linoleico (LA) y es el primer precursor de ácido araquidónico (ARA). El GLA es un ácido graso esencial, cuya ausencia en la dieta es responsable de una amplia gama de afecciones tales como eccema atópico, neuropatía diabética, artritis reumatoide y trastornos cardiovasculares, reproductivos y autoinmunes. Así mismo, hay estudios que demuestran su potencial terapéutico contra cáncer, infecciones virales y osteoporosis.

Las fuentes más comunes de GLA son aceites de plantas pertenecientes a las familias Boraginaceae, Onagraceae y Saxifragaceae. *Borago officinalis* y *Echium fastuosum* son dos especies de Boraginaceae, que contienen 22.7% y 23.5% de GLA, respectivamente. Otra fuente ampliamente usada es *Evening Primrose* (*Oenothera biennis* L.). Este es un cultivo bianual de flores amarillas que florece durante la noche. Se cultiva en Norteamérica, Australia, China, y Europa. Las semillas contienen aproximadamente 15% de proteína, 43% de celulosa y lignina y 24% de aceite, que contiene principalmente los ácidos grasos LA (65-80%) y GLA (7-14%).

El presente trabajo se desarrolló en tres etapas: (1) reacciones enzimáticas de esterificación con el propósito de preparar un concentrado de GLA a partir del aceite vegetal de *Oenothera biennis* (EPO). Las variables estudiadas son: relación molar de los sustratos: ácidos grasos de EPO (EPO-FA) y 1-butanol (BtOH); carga de enzima (*Candida rugosa*); temperatura de operación y adición de tamiz molecular (diferentes tiempos y concentraciones), (2) separación física de las fases de reacción formadas en la etapa anterior: fase butil ésteres y fase rica en GLA, y (3) reacciones enzimáticas de glicerólisis para obtener un triacilglicérido estructurado rico en GLA, monitoreando relación molar de los sustratos (GLA:glicerol), carga de la enzima (*Candida antártica*, CALB) y temperatura de operación.

Los resultados muestran que en la primera etapa se incrementó el contenido de GLA hasta un 90% (% peso) y dicho concentrado se separó mediante cromatografía en capa fina (TLC), en la segunda etapa de esta tesis. Para la tercera etapa se llevaron a cabo reacciones de glicerólisis en las que se alcanzó un contenido de triglicéridos de 60% (% peso), con una composición en GLA de 49% (% peso) bajo las siguientes condiciones de reacción: relación molar de sustratos GLA:glicerol 3:1, carga de enzima CALB de 15% (con respecto a la mezcla total de sustratos), 60°C y 400 rpm.

## 1. Justificación

El gran impacto y aceptación que han tenido los alimentos funcionales y nutracéuticos por parte de los consumidores, da la pauta para seguir investigando y desarrollando estrategias para su obtención. Dada la relevancia biológica y bioquímica de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), el ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) resalta por su papel fisiológico, en el tratamiento de diabetes, ciertos tipos de cáncer y trastornos cardiovasculares, y sus potenciales usos en las formulaciones para lactantes.

Sin embargo, aun cuando las fuentes naturales de GLA son fácilmente asequibles, el contenido del mismo en dichas fuentes es muy bajo, haciendo necesario su enriquecimiento a través de procesos físicos, químicos y enzimáticos. Diversos trabajos se encuentran documentados en la literatura con el propósito de aumentar el contenido de GLA, pero en ellos podemos resaltar los siguientes aspectos negativos: 1) empleo de disolventes que no están permitidos en procesos biotecnológicos alimentarios y farmacéuticos, 2) muy bajas y altas temperaturas que cuestionarían su factibilidad técnica y económica a nivel industrial, y 3) sistemas de reacción en presencia de disolventes orgánicos.

Por lo anteriormente expuesto, esta tesis presenta un proceso biotecnológico alternativo para la obtención de un triacilglicérido estructurado rico en GLA mediante el empleo de catálisis enzimática.

## **2. Hipótesis**

La selectividad de las lipasas empleadas y las condiciones de reacción evaluadas permitirán la obtención de un triacilglicérido estructurado rico en ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA), a partir del aceite de la especie *Oenothera biennis*.



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo General**

Desarrollar un proceso enzimático selectivo para la obtención de un triacilglicérido estructurado rico en ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA).

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Enriquecer en GLA el aceite de las semillas de la especie *Oenothera biennis* mediante reacciones enzimáticas de esterificación.
- Evaluar el efecto de la adición de tamiz molecular en las reacciones de esterificación.
- Separar cromatográficamente las fases de reacción obtenidas en las reacciones de esterificación.
- Obtener triacilglicéridos estructurados con un alto contenido de GLA mediante reacciones enzimáticas de glicerólisis.

## **4. Antecedentes**

### **4.1. Alimentos funcionales**

Los avances en bioquímica de lípidos han conducido a una mejor clasificación de este importante grupo de biomoléculas y al entendimiento de sus rutas metabólicas y biosintéticas *in vivo*. Como resultado, muchos experimentos de carácter nutricional y farmacéutico se han desarrollado para evaluar las propiedades y beneficios de los diferentes grupos de lípidos sobre la salud humana (Guo *et al.*, 2005).

Esta investigación experimental ha sido fuertemente impulsada por los consumidores debido a que estos son cada vez más conscientes de la relación que existe entre una dieta balanceada y un óptimo estado de salud. Lo anterior ha llevado a la producción de alimentos funcionales o nutraceuticos, entre los cuales se incluyen alimentos que han sido fortificados, enriquecidos, modificados o mejorados (Baeza, 2013).

El papel que la alimentación tiene sobre la salud y la prevención de enfermedades en el ser humano ha sido conocido por siglos, basándose principalmente en datos epidemiológicos y conocimiento empírico. Investigaciones recientes revelan el importante papel que juega la dieta en la prevención o la ralentización de algunas enfermedades crónicas como: cáncer, diabetes y afecciones cardiovasculares. Esto ha aumentado la concientización sobre la importancia de la alimentación en el bienestar de las personas; por lo tanto y con ello en mente, se ha llevado a cabo la elaboración de planes en materia de salud pública para la prevención de enfermedades crónicas, la promoción de un envejecimiento sano y el mantenimiento de una salud óptima a lo largo de la vida (Hsieh *et al.*, 2010). Lo anterior es la base para el surgimiento de los alimentos funcionales y nutraceuticos.

Aunque el término de alimentos funcionales fue acuñado en Japón en la década de los 80's, y distintas instituciones académicas y entidades internacionales han tratado de especificarlo, aún no existe una definición oficial. Sin embargo, la Fundación del Consejo Internacional de Información Alimentaria (International Food Information Council Foundation) ha aprobado la siguiente: "alimentos que otorgan beneficios a la salud más allá de la nutrición básica" (Wang *et al.*, 2015).

Es en el año de 1989 cuando nace el concepto de alimentos nutraceuticos, derivado de las palabras nutrición y farmacéutico (Wang *et al.*, 2015). La acepción de nutraceuticos no difiere mucho de la de un alimento funcional, por lo que muchas veces se consideran equivalentes. Un nutraceutico puede definirse como cualquier sustancia que puede considerarse alimento o parte de un alimento y confiere beneficios en la salud, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades. Una serie de productos representativos de los nutraceuticos son: fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas, minerales, vitaminas y antioxidantes (Baeza, 2013).

En conclusión, existen múltiples conceptos y no hay una clara diferenciación entre alimentos funcionales y nutraceuticos. Por ello y para fines prácticos se tendrá que los alimentos funcionales y nutraceuticos son aquellos alimentos que han sido modificados con el fin de tener una influencia positiva sobre la salud y bienestar de los consumidores. Lo anterior no implica que haya buenos y malos alimentos, sino que todos pueden integrarse a una dieta saludable (Wang *et al.*, 2015).

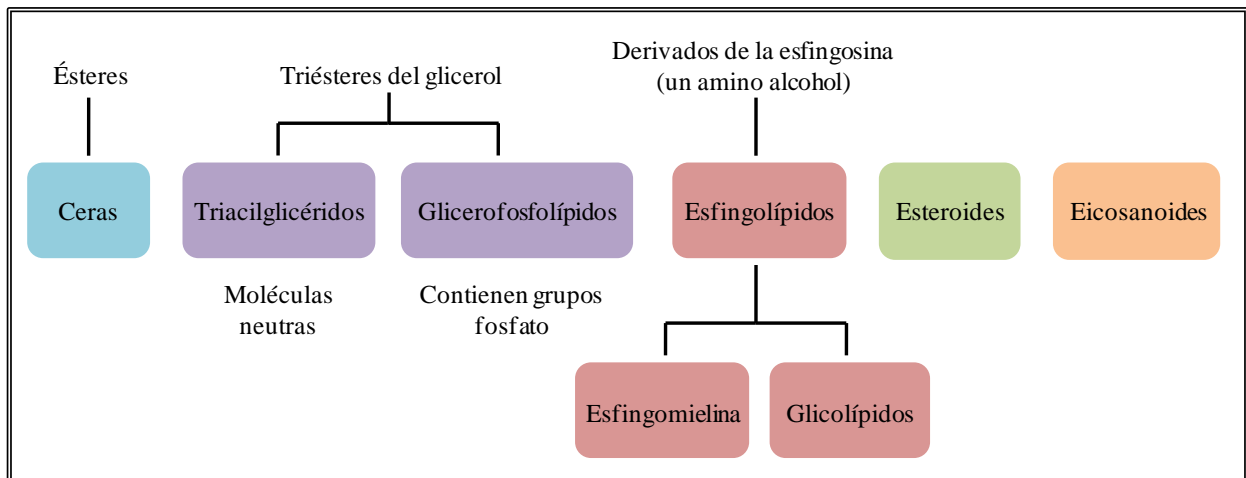
Existen tres vías principales para la obtención de alimentos funcionales y nutraceuticos: 1) modificando la composición de la materia prima; 2) modificando el proceso tecnológico y 3) modificando la composición de un alimento (Fogliano *et al.*, 2005).

## **4.2. Lípidos**

Dentro de los ingredientes naturales que aportan funcionalidad a los alimentos, los lípidos ocupan un lugar destacado por dos motivos: 1) las diversas funciones biológicas y bioquímicas que desempeñan y 2) los efectos benéficos que tienen sobre la salud humana, principalmente los PUFA (Aranceta *et al.*, 2010).

Los lípidos son moléculas de origen natural, obtenidas a partir de plantas o animales, y solubles en disolventes orgánicos no polares (McMurry *et al.*, 2010). Son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos, constituidos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, y además, en ocasiones por azufre, nitrógeno y fósforo (Ramírez, 2005).

Los lípidos desempeñan tres funciones bioquímicas fundamentales en el ser humano: 1) dentro de los adipocitos, se encargan de almacenar la energía obtenida del metabolismo de los alimentos; 2) como parte de las membranas celulares, separar los diferentes ambientes químicos dentro y fuera de las células; y 3) en el sistema endocrino, principalmente, sirven como mensajeros químicos (McMurry *et al.*, 2010). En la Figura 1 se muestra una clasificación de los lípidos.



**Figura 1.** Clasificación de los lípidos

Los triésteres del 1,2,3-propanotriol (glicerol), o también llamados triacilglicéridos (triglicéridos), enlazados con ácidos carboxílicos de cadena larga, constituyen las grasas y los aceites. Dichos ácidos en las grasas y los aceites (ácidos grasos), típicamente contienen un número par de átomos de carbono y son de cadena lineal; si los ácidos grasos son insaturados, los dobles enlaces se encuentran, por lo general y en la mayoría de los casos, en posición *cis* (Vollhardt *et al.*, 2011)

Los triacilglicéridos (TAGs) se emplean como disolventes y colorantes en los alimentos, y aportan la sensación de saciedad después de haber sido ingeridos (Vollhardt *et al.*, 2011). Su valor nutricional depende no solo de su composición de ácidos grasos, sino también de la distribución posicional de los grupos acilo a lo largo de la cadena de glicerol (Qin *et al.*, 2011).

### **4.3. Lípidos estructurados**

El término lípido estructurado se aplica a aquellos lípidos cuya estructura molecular, o composición en cuanto a ácidos grasos se refiere, ha sido modificada respecto a su estado natural, lo que les proporciona propiedades fisicoquímicas especiales y/o beneficios nutricionales. El concepto de lípido estructurado como un nuevo tipo de lípido con fines médicos y nutricionales hace que se les considere como nutracéuticos (Baeza, 2013).

Los lípidos estructurados, como constituyentes de los alimentos funcionales, se han empleado en formulaciones que buscan mantener un buen estado de salud y el tratamiento de distintas enfermedades (Akoh, 2006).

### **4.4. Síntesis de lípidos estructurados**

En décadas anteriores, la industria alimenticia se enfocaba, principalmente, en el mejoramiento de sus procesos de producción y en el incremento de la vida de anaquel de sus productos. Hoy, la calidad nutricional de los alimentos es parte esencial del desarrollo de productos alimenticios. Debido a que tanto la composición como la distribución posicional de los ácidos grasos en las grasas y los aceites convencionales no son siempre las ideales para la nutrición humana, la obtención de lípidos estructurados busca mejorar las características fisicoquímicas y los valores nutrimentales de estos (Akoh, 2006).

Las propiedades físicas y químicas de los lípidos dependen de su estructura molecular. Dicha estructura puede ser modificada por medios físicos, químicos o enzimáticos con el propósito de sintetizar especies con propiedades fisiológicas y tecnológicas que no poseen originalmente y desarrollar procesos a bajo costo y fáciles de escalar (Baeza *et al.*, 2014).

Los PUFA son susceptibles de sufrir oxidación, por ello usualmente se preservan en forma de triacilglicéridos o ésteres etílicos. Adicionalmente, se ha demostrado que los PUFA omega-3 se absorben mejor en el cuerpo humano en forma de TAGs que como ésteres etílicos (Tsao-Jen *et al.*, 2006).

#### **4.4.1. Métodos físicos de obtención de lípidos estructurados**

El fraccionamiento de TAGs se ha empleado principalmente con el propósito de mejorar la textura de las grasas. Los métodos de fraccionamiento incluyen: cristalización (en presencia o no de disolventes), extracción con fluidos supercríticos (principalmente CO<sub>2</sub>) y destilación molecular (Willis *et al.*, 1998). El inconveniente con dicho método es que permite la separación de triacilglicéridos pero no modifica la posición de los ácidos grasos en la estructura.

#### **4.4.2. Métodos químicos de obtención de lípidos estructurados**

La esterificación es la reacción química entre un ácido graso y un alcohol para producir un éster. Dicho proceso se lleva a cabo a altas temperaturas (200-250°C) en presencia de un catalizador inorgánico (metóxido de sodio). Asimismo, esta reacción química es tediosa, no selectiva, consume una gran cantidad de energía, causa la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados, y los productos obtenidos tienen que ser purificados posteriormente (Ramírez, 2005; Willis *et al.*, 1998).

Los procesos de interesterificación química se han aplicado tradicionalmente a la modificación de grasas y aceites, ya que son baratos y fáciles de llevar a cabo. Industrialmente estos procesos se llevan a cabo a temperaturas alrededor de los 200°C, pero al emplear catalizadores, como metóxido de sodio, se puede reducir la temperatura de operación hasta los 50°C. No obstante, la reacción carece de especificidad y no ofrece control respecto a la distribución posicional de los ácidos grasos en el producto final (Willis *et al.*, 1998; Baeza, 2013).

#### **4.4.3. Métodos enzimáticos de obtención de lípidos estructurados**

La modificación de grasas y aceites por medio de enzimas se lleva a cabo utilizando principalmente fosfolipasas y lipasas. Las fosfolipasas se usan para la hidrólisis de fosfolípidos (Baeza, López y García, 2014a). Por otra parte, las lipasas son capaces de llevar a cabo reacciones químicas para la modificación de grasas y aceites (Ramírez, 2005).

Las reacciones químicas catalizadas por lipasas para la modificación de grasas y aceites permiten controlar la distribución posicional de los ácidos grasos en el producto final, debido a su selectividad y regioespecificidad, y se llevan a cabo a condiciones de presión y temperatura más suaves con respecto a los métodos químicos tradicionales (Ramírez, 2005; Baeza, 2013).

De especial interés es la reacción de transesterificación vía enzimática para la modificación de lípidos, ya que es posible la incorporación de los grupos acilo de nuestro interés en una posición específica dentro de la molécula de glicerol; en contraste, la síntesis química carece de especificidad y promueve la formación de subproductos, impactando de forma negativa el rendimiento de la reacción (Khodadadi *et al.*, 2013).

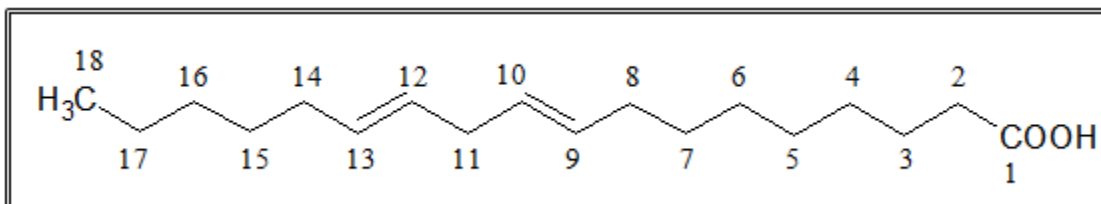
#### **4.5. Los ácidos grasos**

Los ácidos grasos constituyen los principales componentes de los fosfolípidos, triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ésteres del esteroil. Los ácidos grasos están compuestos por elementos tales como carbono, hidrógeno y oxígeno, arreglados en un esqueleto lineal de longitud variable y con un grupo carboxilo en uno de los extremos. Los ácidos grasos pueden ser saturados (sin enlaces dobles), monoinsaturados (un enlace doble) o poliinsaturados (dos o más enlaces dobles), y son esenciales desde el punto de vista energético, metabólico y estructural (Kuang, 2008).

##### **4.5.1. Nomenclatura de los ácidos grasos**

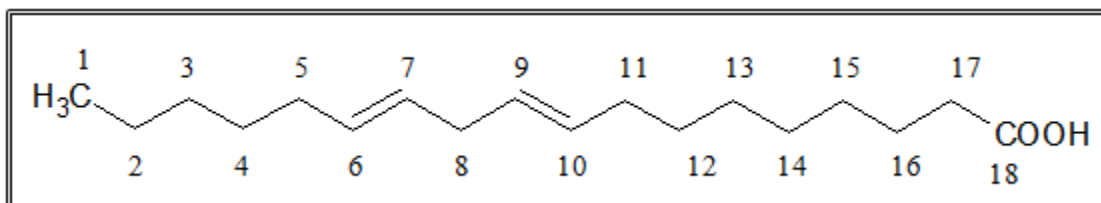
Algunos ácidos grasos reciben el nombre de acuerdo con el lugar de procedencia, por ejemplo, el ácido palmítico (proviene de la palma) y el ácido láurico (proviene del laurel). Una nomenclatura sencilla es la que especifica el largo de la cadena, es decir, el número de átomos de carbono que la componen, las insaturaciones que posee y la ubicación de estas insaturaciones. Así, 18:2( $\Delta^{9,12}$ ) representa el ácido linoleico, que posee 18 átomos de carbono y dos insaturaciones, una situada después del carbono 9 y otra después del carbono 12. Los ácidos grasos contienen dos extremos: el grupo carboxilo terminal (COOH) y el metilo terminal (-CH<sub>3</sub>);

el carbono al que se le asigna el número uno es el carbono del grupo carboxilo (Fornaguera y Gómez, 2004). En la Figura 2 se ilustra la estructura del ácido linoleico y su numeración.



**Figura 2.** Estructura del ácido linoleico

En el caso particular de los PUFA, se les ha asignado también otra nomenclatura que utiliza la numeración griega. Se considera el último carbono (extremo metilo terminal) como carbono omega ( $\omega$ ), y se hace referencia a la ubicación del último doble enlace; por ejemplo, cuando el último doble enlace se ubica inmediatamente después del tercer carbono, comenzando a contar del carbono  $\omega$ , se denomina ácido graso omega-3 ( $\omega$ -3). Para el ejemplo anterior del ácido linoleico, omega-6 ( $\omega$ -6), corresponde la representación de la Figura 3 (Fornaguera y Gómez, 2004; Kuang, 2008).



**Figura 3.** Estructura del ácido linoleico con la numeración griega

En la Tabla 1 se presenta la nomenclatura de algunos ácidos grasos más comunes.



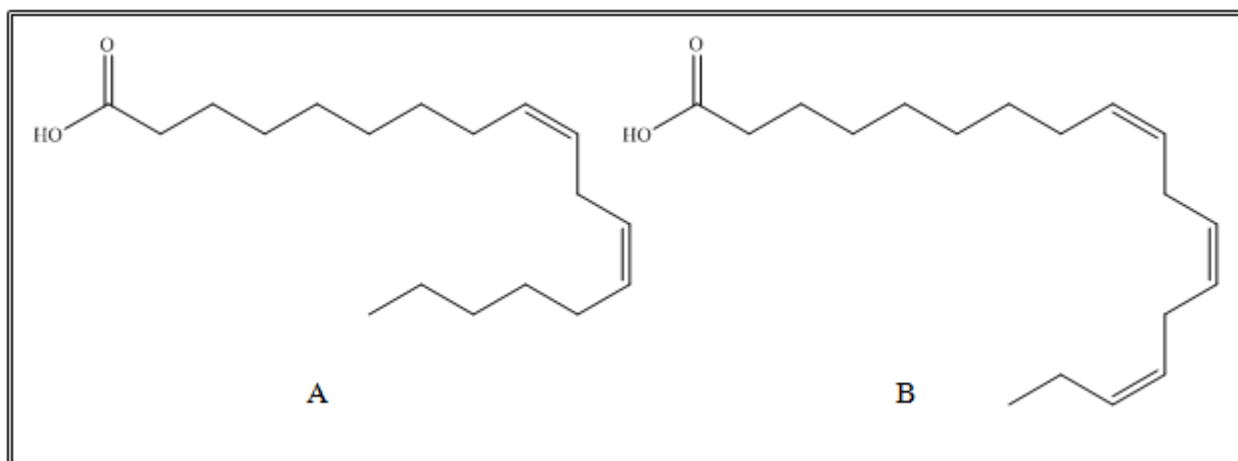
**Tabla 1.** Nomenclatura de los ácidos grasos más comunes

Nombre		Abreviación	
Común	IUPAC	Referencia al grupo carboxilo	Numeración griega
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	16:0	16:0
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18:0	18:0
Ácido oleico	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	18:1 $\Delta$ 9	18:1 $\omega$ -9 o 18:1-9
Ácido linoleico	Ácido <i>cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 $\Delta$ 9,12	18:2 $\omega$ -6 o 18:2-6
Ácido linolénico	Ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 $\Delta$ 9,12,15	18:3 $\omega$ -3 o 18:3-3

#### 4.5.2. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)

El principal grupo de ácidos grasos que suelen incorporarse en la estructura del lípido original es el de los ácidos grasos poliinsaturados PUFA, por la importancia biológica que dichos ácidos tienen.

El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, omega-3) y el ácido linoleico (LA, omega-6), son los respectivos precursores de los ácidos grasos omega-3 y omega-6, respectivamente, que están involucrados en muchos procesos metabólicos del cuerpo humano (Figura 4). Los ácidos grasos omega-3 que son producidos en el organismo a partir del ácido  $\alpha$ -linolénico son principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA); de manera similar, el ácido linoleico es empleado para la síntesis del GLA, el ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico y el ácido araquidónico (Mostfsky *et al.*, 2001; Baeza, 2013).



**Figura 4.** Estructura química de los PUFA precursores de los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. A) ácido linoleico,  $\omega$  - 6) y B) ácido  $\alpha$ -linolénico,  $\omega$  -3

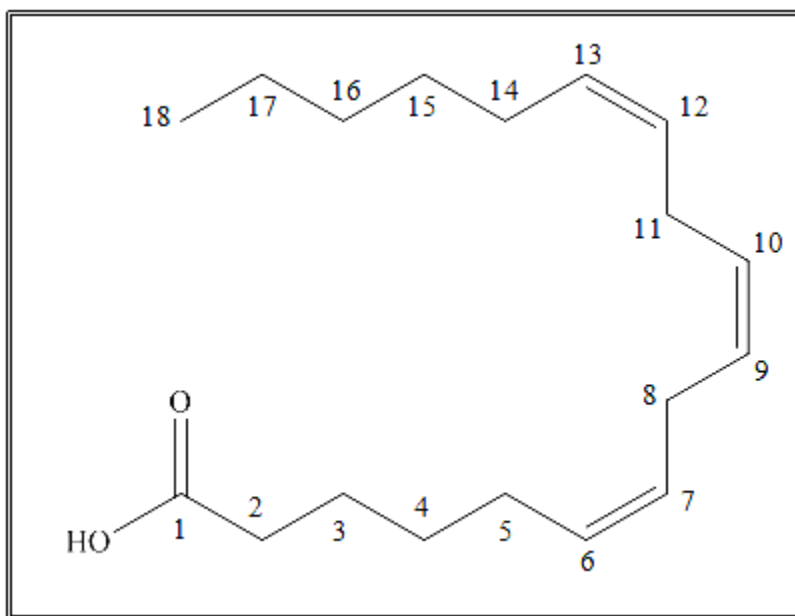
El ALA está presente en ciertos aceites vegetales, semillas, verduras de hoja verde, legumbres y frutos secos. Por su parte, el LA se encuentra en granos, carne y en las semillas de la mayoría de las plantas. Los denominados ácidos grasos esenciales, como el LA, ALA y araquidónico (ARA), son aquéllos que no pueden ser sintetizados por el organismo humano, por lo que se deben obtener a partir de la dieta (Baeza, 2013). En el cuerpo humano, los ácidos grasos esenciales están involucrados en la producción de energía, la transferencia del oxígeno del aire al torrente sanguíneo, y la producción de hemoglobina. También están implicados en el crecimiento, la división celular y el funcionamiento de los nervios. Los ácidos grasos esenciales se encuentran en el cerebro en altas concentraciones y son fundamentales para el óptimo funcionamiento del cerebro (Mostfsky *et al.*, 2001). El PUFA sobre el cual se desarrolla el presente proyecto es el ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) y a continuación se describe.

#### 4.6. Ácido $\gamma$ -Linolénico (GLA)

El ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) se aisló por vez primera a partir del aceite de la especie *Oenothera biennis* (evening primrose oil, EPO), una planta herbácea empleada por los nativos americanos para tratar las inflamaciones en el cuerpo. Su uso fue aprendido por los conquistadores europeos y ya para el siglo XVII este aceite gozaba de gran reputación y uso

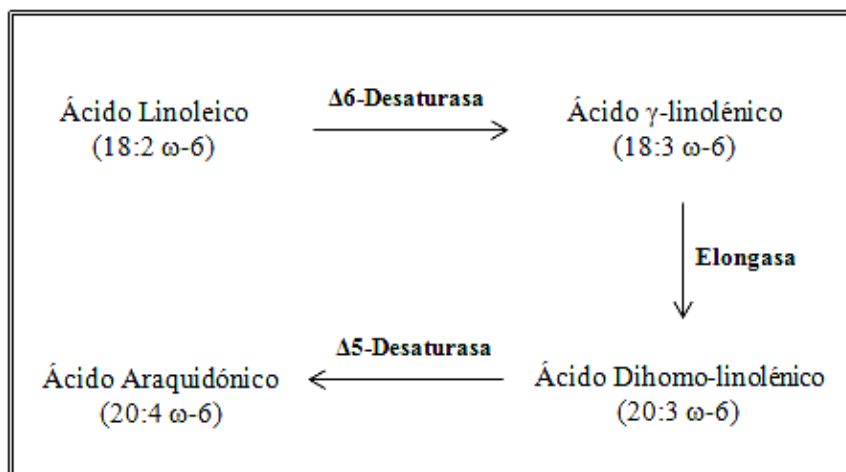
extensivo como remedio popular. Debido a la gran variedad de afecciones que trataba, se ganó el nombre del Rey del “cura-todo” (Huang y Ziboh, 2001).

El GLA (ácido *cis* 6, *cis* 9, *cis* 12-octadecatrienoico) es un PUFA de la familia de los omega-6 (Figura 5). Se encuentra escasamente en la dieta, siendo sus principales fuentes de obtención aceites vegetales como el de onagra, de borraja y de semilla de grosella negra (Gil, 2010).



**Figura 5.** Estructura química del GLA

En los mamíferos, se sintetiza a partir del ácido linoleico por la acción de la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa (Figura 6). En los lípidos de tejidos animales se encuentra en una concentración muy baja, ya que es rápidamente elongado a ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, el cual es a su vez convertido a ARA. Se piensa que la razón por la que el GLA no se acumula es que la velocidad de la reacción de conversión a GLA catalizada por la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa es la menor del proceso (Mazza, 2000). Además, la actividad de la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa en los seres humanos disminuye con el envejecimiento, altos niveles de colesterol y enfermedades como la diabetes y la hipertensión (Bello, 2012). Se ha buscado, por lo tanto, enriquecer las fuentes naturales de GLA (Mazza, 2000).



**Figura 6.** Ruta metabólica de desaturación-elongación del ácido linoleico en mamíferos

El 27 de enero de 1993, una corte de Estados Unidos establece a los aceites que contienen GLA como ingredientes alimenticios y libres de regulaciones en materia de aditivos alimenticios. Como resultado, los aceites que contienen este ácido graso alcanzaron una gran popularidad y se comenzaron a comercializar en forma de suplementos alimenticios. En vista de este creciente interés, se estima que en los Estados Unidos se ha ido desarrollando un amplio mercado de aceites que contienen GLA (Fan *et al.*, 1998).

#### 4.6.1. Importancia biológica del GLA

Se ha demostrado que en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide donde se incluye el aceite de borraja o un concentrado de GLA, se reducen los signos y síntomas de la enfermedad. Asimismo, se ha comprobado que el GLA es eficaz en el tratamiento de la neuropatía diabética, una complicación común de la diabetes mellitus, tanto insulino-dependiente como no insulino-dependiente. Hay también cada vez más evidencia que indica que el GLA y sus metabolitos juegan un importante papel en el mantenimiento de la integridad de la epidermis y por tanto en enfermedades de la piel. Además, se ha confirmado que éste ácido es particularmente eficaz como agente antitumoral en modelos experimentales y en el tratamiento de determinados cánceres como el glioma maligno del cerebro humano (Mazza, 2000).

El GLA se encuentra presente en la leche materna, así como el ARA (20:4  $\omega$ -6). Diversos estudios asocian el consumo de la leche materna durante la infancia a un menor riesgo de padecer diabetes durante la vida adulta (Owen *et al.*, 2006). Una numerosa serie de estudios sugiere que el GLA es un miembro destacable de la familia de los ácidos grasos omega-6, con relación al potencial que tiene sobre la inhibición del crecimiento de tumores y la metástasis. El GLA posee la habilidad de detener la motilidad y la capacidad invasora de las células del cáncer de colon (Fan *et al.*, 1998).

#### 4.6.2. Fuentes de obtención del ácido $\gamma$ -linolénico (GLA)

Como se mencionó en la sección anterior, la administración del GLA ha demostrado una gran efectividad en la prevención y tratamiento de diversas afecciones. Las fuentes comerciales más comunes del GLA son los aceites de origen vegetal y se muestran en la Tabla 2. Así mismo, este ácido graso también se encuentra presente en diversos microorganismos, como *Mortierella spp.*, *Mucor spp.* y cianobacterias; sin embargo, para fines alimenticios estas fuentes de obtención de GLA no son las más viables hasta el momento, ya que presentan unos costos de producción/purificación elevados y tanto olores como sabores desagradables (Huang y Ziboh, 2001).

**Tabla 2.** Porcentaje en peso (%) de GLA en aceites vegetales (Campra, 2003)

Ácidos Grasos	<i>Borago officinalis</i>	<i>Ribes nigrum</i>	<i>Oenothera biennis</i>
16:0	10.5	6.5	6.0
18:0	3.5	1.5	2.0
18:1 ( $\omega$ -9)	16.0	10.5	9.0
18:2 ( $\omega$ -6)	37.5	46.5	72.0
<b>18:3 (<math>\omega</math>-6) GLA</b>	<b>23.5</b>	<b>17.0</b>	<b>9.0</b>
18:3 ( $\omega$ -3)	-	13.0	-
18:4 ( $\omega$ -3)	-	3.0	-
20:1 ( $\omega$ -9)	4.0	0.5	-
22:1 ( $\omega$ -9)	2.0	-	-

Como se aprecia en la Tabla 2, las concentraciones de GLA presentes en aceites vegetales no son suficientes para las diversas aplicaciones que este ácido graso pudiera tener. De manera particular, el desarrollo de la investigación científica, las preparaciones farmacéuticas y los concentrados comerciales requieren contenidos más elevados, algunas veces de hasta un 90% o más (Campra, 2003). Por lo tanto, existe un creciente interés en el desarrollo de la obtención de fuentes ricas en GLA.

#### **4.7. Enriquecimiento de aceites vegetales en GLA**

Diversos métodos relacionados al enriquecimiento en GLA de aceites vegetales están documentados en la literatura. Los principales métodos incluyen: winterización, hidrólisis, cristalización, cromatografía, fraccionamiento con urea, extracción con fluidos supercríticos y esterificación, tanto química como enzimática.

A pesar de que los métodos físicos para llevar a cabo tal enriquecimiento son los más simples y convencionales, como la cristalización y el fraccionamiento con urea, sus rendimientos son muy bajos comparados con los procesos enzimáticos. El empleo de técnicas de cromatografía y extracción con fluidos supercríticos, garantiza una alta pureza de GLA pero suelen ser bastante costosas y difíciles de escalar. En cambio, los procesos enzimáticos han atraído la atención en el enriquecimiento de aceites debido a las condiciones suaves de reacción a las que operan y al ser amigables con el medio ambiente (Baeza *et al.*, 2014b).

Hills *et al.* (1990) enriquecieron, por medio de esterificación enzimática, el aceite vegetal de las semillas de *Oenothera biennis* en GLA en casi un 85% empleando la lipasa Lipozyme® y en un 83% usando la lipasa extraída de *Brassica napus L* y empleando n-hexano como disolvente de la reacción.

Rahmatullah *et al.* (1994) utilizaron la lipasa Lipozyme® para el enriquecimiento del aceite vegetal de *Borago officinalis* en GLA en un 93%, al usar n-hexano como disolvente de la reacción, y en un 70% al prescindir de n-hexano; asimismo, se enriqueció el aceite vegetal de *Oenothera biennis* en un 75% en GLA, también utilizando n-hexano.

Por otra parte, el enriquecimiento en GLA de los aceites vegetales de *Borago officinalis* y *Echium fastuosum* se llevaron a cabo en un proceso de esterificación enzimática. Para el primer aceite vegetal se obtuvo un 91% de enriquecimiento en GLA y se empleó la lipasa de *Candida rugosa*; para el segundo aceite vegetal se obtuvo un 64% de dicho PUFA al emplear la lipasa de *Mucor javanicus* (López *et al.*, 2006).

#### **4.8. Las enzimas**

La relación de las enzimas con las actividades humanas ha estado ligada durante miles de años; la fermentación del azúcar a alcohol se encuentra entre los primeros ejemplos de procesos biotecnológicos en donde intervienen enzimas. Sin embargo, solo recientemente las propiedades de las enzimas han sido comprendidas debidamente. De hecho, la investigación enzimática ha entrado en una nueva etapa debido al aporte de conocimiento de disciplinas como química de proteínas, biofísica molecular y biología molecular (Aehle, 2007).

Las enzimas son los catalizadores de los procesos biológicos. Como cualquier otro catalizador, una enzima provoca que una reacción química alcance el equilibrio químico más rápido al disminuir la energía de activación y no presenta modificación química alguna al final de la reacción; no afecta el punto de equilibrio de una reacción química y no puede llevar a cabo reacciones químicas energéticamente desfavorables (McMurry *et al.*, 2010).

##### **4.8.1. Nomenclatura y clasificación de las enzimas**

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) adoptó un esquema para la clasificación funcional sistemática y la nomenclatura de las enzimas. Las enzimas se clasifican y denominan de acuerdo con la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. Hay seis clases principales de reacciones enzimáticas (Tabla 3), además de subclases y sub-subclases. Las enzimas se nombran por medio de un código de cuatro números precedido por el prefijo E.C. (Comisión de Enzimas en inglés): el primer número indica a cuál de las 6 clases pertenece la enzima; el segundo número indica la subclase; el tercer número las sub-

subclase y el cuarto número es el número de serie de la enzima en la sub-subclase (Aehle, 2007; Primo 2007; Voet, 2007).

**Tabla 3.** Clasificación de las enzimas de acuerdo al tipo de reacción que catalizan

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
1. Oxidoreductasas	Reacciones de óxido-reducción
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4. Liasas	Eliminación de grupos para formar dobles enlaces
5. Isomerasas	Isomerización
6. Ligasas	Formación de enlaces, acoplado con hidrólisis de ATP

#### 4.8.2. Estructura de las enzimas

Las enzimas son proteínas, por lo tanto, su estructura se estudia por medio de los métodos de química de proteínas, biología molecular y biofísica molecular (Aehle, 2007). Las enzimas están formadas por cuatro estructuras: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Aehle, 2007; Ballesteros *et al.*, 2013):

**Estructura primaria.** Están formadas por L-aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y con estructura compleja. Esta estructura depende, en primer lugar, de la secuencia de aminoácidos que la constituyen y determina la distribución de los grupos químicamente activos en la estructura peptídica formando así la estructura primaria.

**Estructura secundaria.** La interacción de los distintos restos de aminoácidos por puentes de hidrógeno, entre los grupos funcionales carbonilo y amino o mediante fuerzas dipolares, proporciona una organización local bidimensional que constituye la estructura secundaria, consistente en la formación de:



- a) Hélices, estructura  $\alpha$ : en cada giro completo suele haber cuatro unidades de aminoácido.
- b) Pliegues de la cadena, estructura  $\beta$ : en la misma cadena podemos tener los dos tipos de estructuras en función de la cadena de aminoácidos.

**Estructura terciaria.** Es una estructura tridimensional y se forma a partir de las estructuras secundarias  $\alpha$  y  $\beta$ .

**Estructura cuaternaria.** La interacción entre dos o más unidades estructurales polipeptídicas de estructura terciaria definida da lugar a la estructura cuaternaria.

Las enzimas pueden presentar en su estructura, junto con el grupo proteico, un cofactor, que es otro compuesto de distinta naturaleza proteica y es clave para la formación del complejo enzima-sustrato. El cofactor puede ser un ion metálico o una coenzima (molécula orgánica). Este cofactor puede separarse de la proteína, pero se ha observado que una vez separadas las dos unidades, no muestran actividad enzimática (Aehle, 2007; Voet, 2007; Ballesteros *et al.*, 2013).

La compleja estructura de las enzimas es esencial para su acción y sirve para mantener unos determinados aminoácidos en una orientación determinada, formando los centros activos. En estos es donde se va a producir la unión con el sustrato mediante fuerzas débiles, en las que van a participar numerosos grupos vecinos, por lo que es necesario que tengan una orientación muy concreta para que la catálisis sea efectiva (Ballesteros *et al.*, 2013).

### 4.8.3 Las lipasas

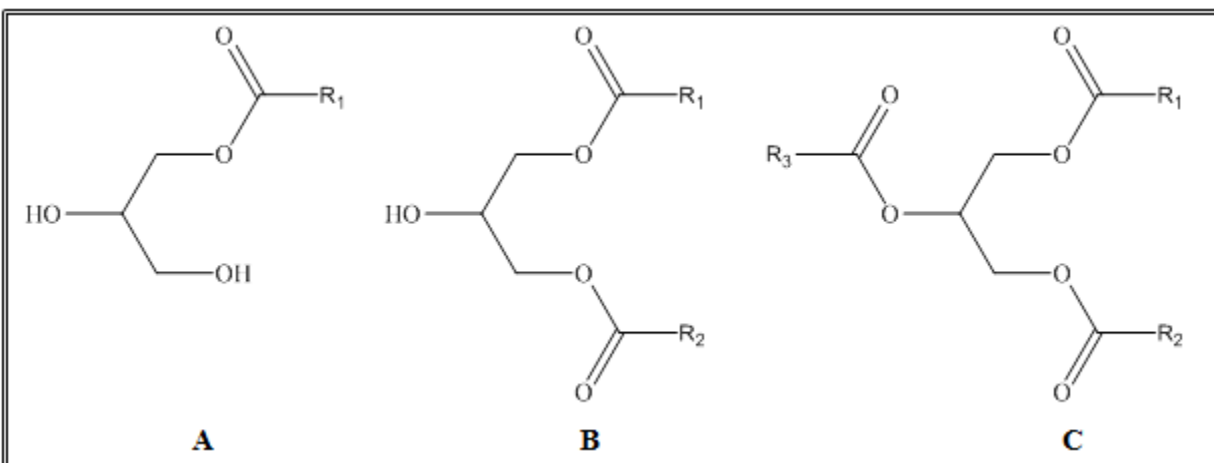
Como acaba de mencionarse, el enriquecimiento enzimático en GLA puede llevarse a cabo mediante el empleo de lipasas.

Las lipasas (EC 3.1.1.3) son enzimas que catalizan la hidrólisis de grasas y aceites. Estos últimos, están constituidos principalmente por TAGs, una molécula de glicerol esterificada en sus 3 grupos hidroxilo con ácidos grasos. Esta estructura química (Figura 7) hace a los TAGs

susceptibles a la actividad catalítica de las lipasas con la subsecuente obtención de ácidos grasos libres, DAG, MAG y glicerol (Díaz y Juárez, 2007).

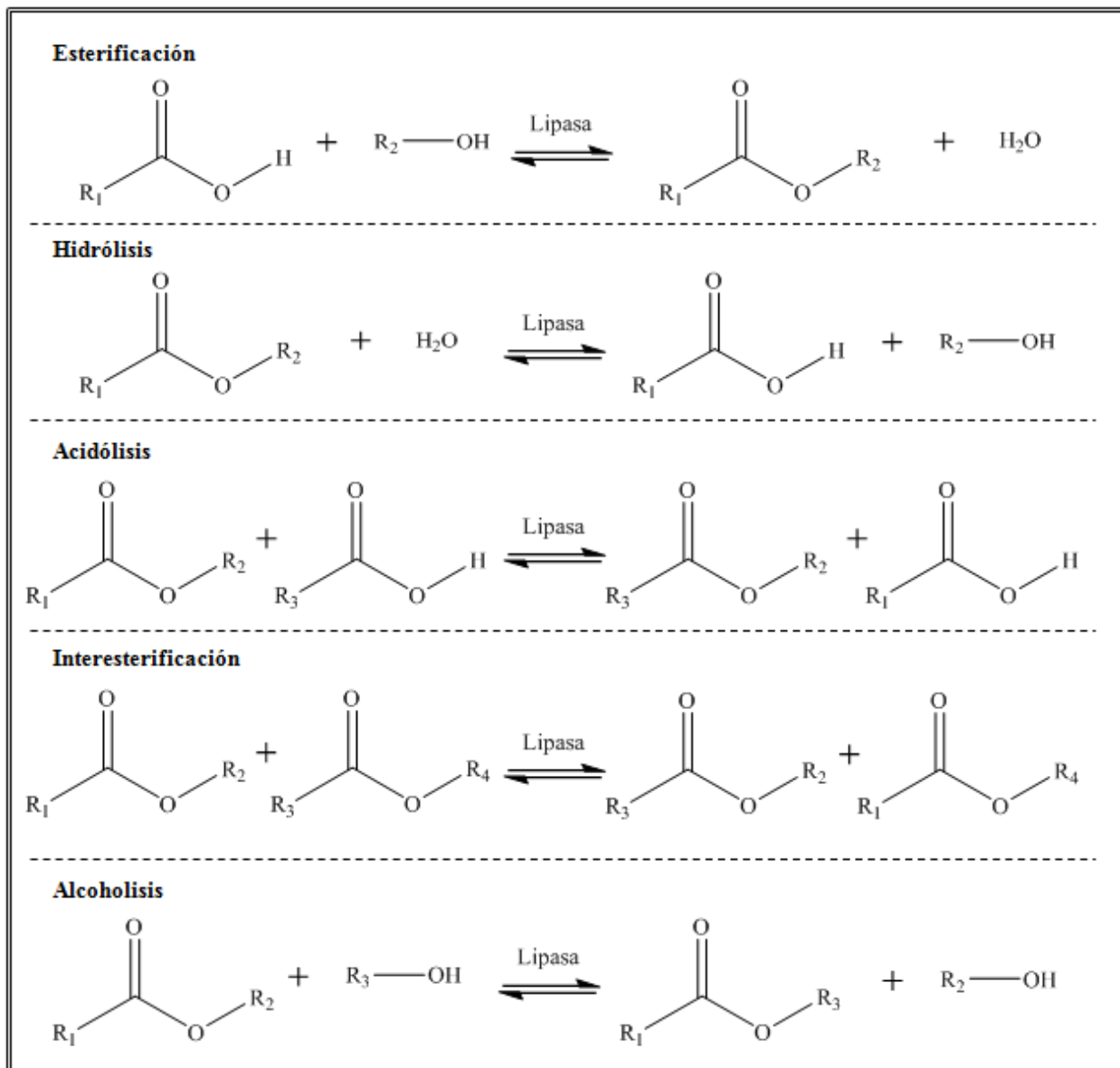
Las lipasas se encuentran entre las enzimas más empleadas en biocatálisis. Las ventajas sobresalientes que ofrecen son la amplia gama de sustratos que pueden procesar, así como las condiciones suaves de reacción en que se emplean (Cabrera *et al.*, 2009)

Estas enzimas contienen una unidad de oligopéptido helicoidal que protege el sitio activo. Dicha tapa o cubierta, tras la interacción con una interface hidrofóbica, como una gota de aceite, experimenta una serie de movimientos de tal forma que el sitio activo queda expuesto. Al fenómeno antes descrito se le denomina activación interfacial y se lleva a cabo en la interface lípido-agua del sistema; un fenómeno que se atribuye a las características estructurales únicas de esta clase de enzimas (Reetz, 2002).



**Figura 7.** Estructura química de los acilglicéridos. A) monoacilglicérido; B) diacilglicérido y C) triacilglicérido

Las lipasas se pueden dividir en tres grandes grupos de acuerdo a su capacidad para hidrolizar acilglicéridos: **a)** lipasas no específicas; **b)** lipasas específicas 1,3 y **c)** lipasas específicas para ácidos grasos. Las fuentes de obtención de lipasas son tejidos vegetales o animales pero la fuente principal es el cultivo de microorganismos. (Díaz *et al.*, 2007; Kapoor *et al.*, 2012). Las reacciones químicas que llevan a cabo las lipasas para la modificación de grasas y aceites se muestran en la Figura 8. En la Tabla 4 se muestra la especificidad de algunas enzimas.

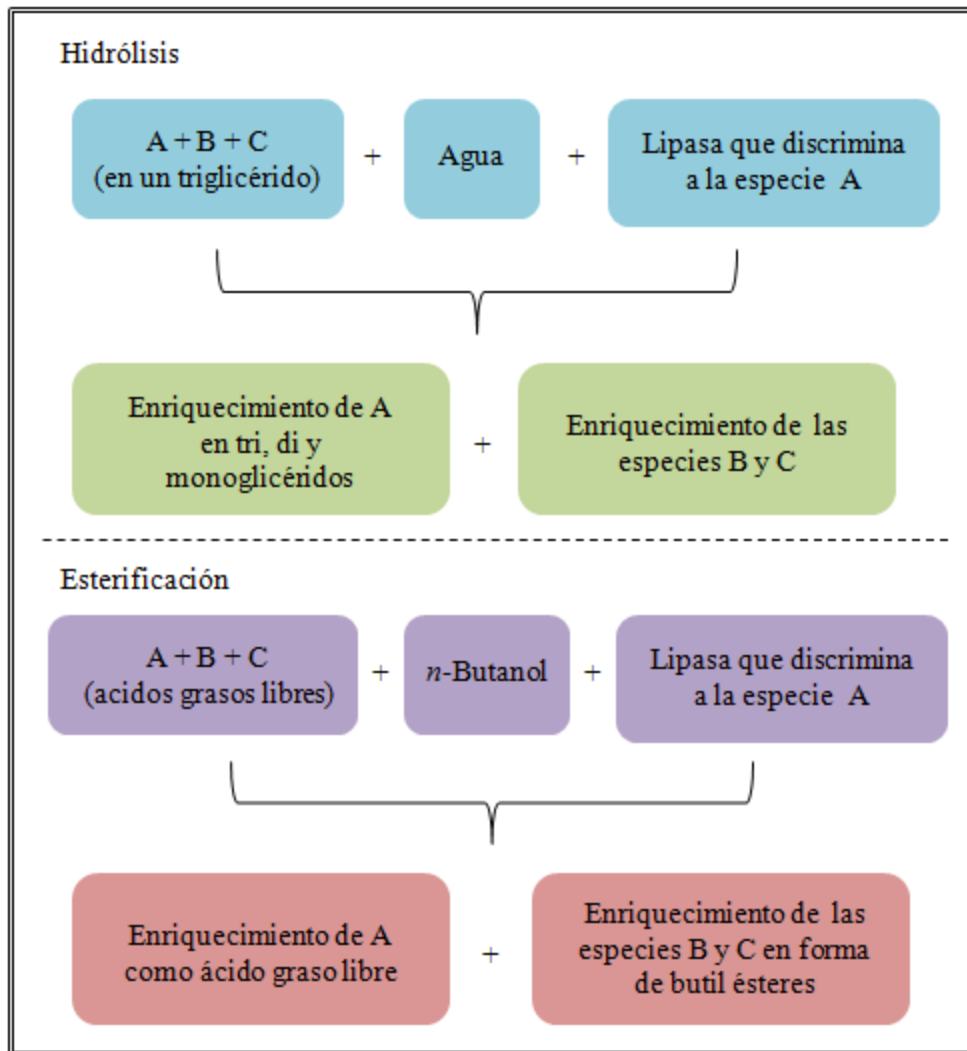


**Figura 8.** Reacciones químicas catalizadas por lipasas para la modificación de grasas y aceites  
(Ramírez, 2005)

**Tabla 4.** Origen y especificidad de algunas lipasas

Fuente de obtención	Nombre de la especie	Especificidad
Bacteriana	<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Burkholderia glumae</i> ( <i>Pseudomonas glumae</i> )	No específica
	<i>Burkholderia cepacia</i> ( <i>Pseudomonas cepacia</i> )	No específica
	<i>Pseudomonas fluorescensa</i>	No específica
Fungi	<i>Aspergillus niger</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Candida rugosa</i> ( <i>Candida cylindracea</i> )	No específica
	<i>Candida antarctica A</i>	Trans específica
	<i>Candida antarctica B</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Mucor javanicus</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Penicillium camembertii</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Rhizopus delemar</i>	1,3 Regioespecífica
Vegetal	<i>Rhizopus oryzae</i>	1,3 Regioespecífica
	<i>Brassica napus</i> (colza)	1,3 Regioespecífica
Animal	<i>Canis lupus familiaris</i> (perro)	-
	<i>Equus caballus</i> (caballo)	-
	Lipasa porcina pancreática	1,3 Regioespecífica
	Lipasa porcina humana	1,3 Regioespecífica

La capacidad de ciertas lipasas de discriminar o preferir determinados ácidos grasos o grupos acilo de los lípidos, se ha aprovechado para el enriquecimiento de ácidos grasos o sus respectivos ésteres a partir de fuentes naturales de grasas y aceites a través de procesos selectivos de hidrólisis, esterificación o interesterificación química, como se ilustra en la Figura 9 (Uwe, 2000).



**Figura 9.** Enriquecimiento de ácidos grasos y sus respectivos ésteres a través de hidrólisis y esterificación química

## **5. Metodología**

### **5.1. Materiales**

El aceite utilizado como materia prima para el desarrollo del presente trabajo de investigación es el proveniente de *Oenothera biennis* (EPO). Las enzimas empleadas son: lipasa de *Candida rugosa*, para el enriquecimiento del aceite (reacciones de esterificación); CALB (lipasa B de *Candida antarctica*), para la producción de lípidos estructurados (reacciones de glicerólisis). Los alcoholes que se emplean en las diferentes reacciones enzimáticas son etanol, butanol (BtOH) y glicerol. Todos los solventes empleados son grado cromatográfico.

### **5.2. Metodología experimental**

#### **5.2.1. Caracterización del aceite de *Oenothera biennis***

Los ácidos grasos del aceite de *Oenothera biennis* se obtienen por medio de una saponificación, de acuerdo a la metodología descrita por Kim *et al.* (2007). Para ello, 150 g de aceite de *Oenothera biennis* se añaden a una solución de hidróxido de sodio (40 g) en agua destilada (100 mL) y etanol (99%, 300 mL). La mezcla se calienta a reflujo con agitación a 500 rpm durante 1 hora. Posteriormente, se añaden 200 mL de agua a la mezcla, y las sustancias que no se saponifiquen se extraen con 300 mL de n-hexano y se desechan. La fase acuosa, que contiene los ácidos grasos saponificados, se acidifican añadiendo una solución acuosa 6 N de HCl hasta alcanzar un valor de pH de 1.0. La fase inferior, se separa y desecha por medio de un embudo de separación.

#### **5.2.2. Derivatización de los ácidos grasos**

Una vez obtenidos los ácidos grasos libres, se realiza una derivatización selectiva de estos para su análisis cualitativo y cuantitativo por medio de cromatografía de gases (GC). 200  $\mu$ L de la mezcla de ácidos grasos se colocan en un tubo de ensayo, se añaden 1 mL de solución NaOH-metanol (0.2 N) y se calienta a 60°C durante 4 h; transcurrido dicho tiempo, se atempera la

mezcla de reacción, se adicionan 2 mL de n-hexano y 200 µL de agua destilada (Miranda *et al.*, 2013).

### 5.2.3. Obtención del perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos del aceite de *Oenothera biennis* se determina por medio de cromatografía de gases (GC). La metodología que se estandarizó para desarrollar este análisis es la siguiente: se inyecta 1 µL de la mezcla de metil ésteres al cromatógrafo Varian 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, CA), que emplea una columna capilar de sílica HP-INNOWAX (Agilent Technologies) de 30 m de longitud, 320 µm de diámetro interno y 0.25 µm de tamaño de partícula. Las temperaturas del inyector y el detector se mantienen a 250°C. El horno opera con la siguiente rampa de temperatura: 160°C durante 10 min y posteriormente la temperatura se incrementa a 210°C a razón de 30°C/min. Los diferentes ácidos grasos se identifican por comparación con los tiempos de retención de los estándares (Supelco® 37 Component FAME Mix). Se emplea hexadecano como estándar interno para realizar el análisis cuantitativo.

### 5.2.4. Enriquecimiento enzimático en GLA del aceite de *Oenothera biennis*

Las reacciones enzimáticas de esterificación se llevan a cabo en reactores de vidrio de 25 mL. Antes de iniciar las reacciones, se acondiciona el reactor a la temperatura deseada. Las reacciones químicas se inician al agregar la enzima (*C. rugosa*) a la mezcla de reacción (EPO:BtOH), que se mantiene en agitación magnética constante a 400 rpm. La masa total de los sustratos es de 4 g para todos los ensayos, evaluando los siguientes parámetros de reacción: relación molar de los sustratos (EPO:BtOH; 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, y 1:12), temperatura (30, 40, 50 y 60°C) y carga de enzima (5, 10, 15 y 20%, con respecto a la mezcla total de sustratos). Se toman muestras a diferentes tiempos de reacción para monitorear el incremento en el contenido de GLA. Las reacciones se realizan y analizan por duplicado.

#### **5.2.4.1 Identificación de las fases formadas**

Las muestras tomadas durante las reacciones de esterificación se disolvieron en cloroformo (500  $\mu\text{L}$ ) y se separaron por medio de cromatografía en capa fina (TLC), empleando como fase móvil éter de petróleo:diétil éter:ácido acético (100:20:1, v/v/v) y placas de sílicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck®). Las placas se revelaron bajo luz UV a 254 nm.

Una vez separadas e identificadas las fases éster y ácido graso (rica en GLA), se procede a retirarlas de la placa cromatográfica de forma manual y se disuelven en una solución cloroformo:metanol (2:1 v/v); en el caso de la fase ácido graso se derivatiza como se describe en la sección 5.2.2. El análisis cuantitativo procederá como se describe en la sección 5.2.3.

#### **5.2.5. Separación física del aceite enriquecido**

A medida que las reacciones de esterificación ocurren, en la mezcla de reacción se tienen dos fases: los ácidos grasos que han sido esterificados y una fase rica en GLA. Por ello, es necesario recuperar esta fase rica en GLA ya que a partir de dicha fase se obtendrá el GLA necesario para poder sintetizar los TAG estructurados.

Con ese propósito, se evaluarán dos tipos de cromatografía para recuperar la fase rica en GLA: cromatografía en columna y TLC.

#### **5.2.6. Preparación enzimática del triacilglicérido estructurado**

El GLA recuperado anteriormente es el sustrato en las reacciones enzimáticas de glicerólisis, para preparar el TAG estructurado. 4 g de mezcla de los sustratos (GLA:glicerol) se ponen en contacto con la enzima CALB en reactores de 25 mL, en agitación magnética constante a 400 rpm. La masa total de los sustratos es de 4 g para todos los ensayos, evaluando los siguientes parámetros de reacción: relación molar de los sustratos (1, 2, 3 y 4 GLA/glicerol), temperatura (30, 40, 50 y 60°C) y carga de la enzima CALB (5, 10, 15 y 20%, con respecto a la



mezcla total de sustratos). Se toman muestras a diferentes tiempos de reacción para monitorear la producción de acilglicéridos. Las reacciones se realizarán y analizarán por duplicado.

#### **5.2.6.1 Análisis del perfil de glicéridos**

El perfil de glicéridos se determina por medio de cromatografía de gases (Miranda *et al.*, 2013). Las muestras colectadas durante la reacción se someten a una derivatización selectiva: a 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción se adicionan 0.5 mL de una solución 0.5 M de metóxido de sodio en metanol. Después de 5 min de reacción, se agregan 0.2 mL de agua desionizada y 2 mL de hexano. Se recuperan los metil ésteres presentes en la fase orgánica y se agrega sulfato de sodio. Se inyecta 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de metil ésteres al cromatógrafo Varian 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, CA), que emplea una columna capilar de sílica HP-INNOWAX (Agilent Technologies) de 30 m de longitud, 320  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor. Las temperaturas del inyector y el detector se mantienen a 250°C y 300°C, respectivamente. El horno opera con la siguiente rampa de temperatura: 50°C durante 2 min y posteriormente la temperatura se incrementa a 220°C a razón de 30°C/min, manteniéndose así por 25 min; finalmente, la temperatura se eleva hasta los 255°C durante 7 min. Los diferentes ácidos grasos se identifican por comparación con los tiempos de retención de los estándares (Supelco® 37 Component FAME Mix).

## 6. Discusión de Resultados

Una vez estandarizadas las metodologías descritas en la sección anterior, se procedió a obtener TAG estructurados ricos en GLA. Dicha obtención se llevó a cabo en las etapas que a continuación se discuten.

### 6.1. Enriquecimiento enzimático en GLA

Para poder preparar TAG estructurados ricos en GLA es necesario contar con una fuente que nos provea de dicho ácido graso. En este trabajo de tesis se empleó el aceite de la especie *Oenothera biennis* (evening primrose oil, EPO) que contiene 8.8% p/p de GLA. La mezcla total de los ácidos grasos libres presentes en dicho aceite se obtuvo vía saponificación y se muestra en la Tabla 5 (columna EPO). Este aceite, denominado EPO en la Tabla 5, fue sometido a reacciones de esterificación directa con BtOH catalizadas por *C. rugosa* (en forma libre). Las condiciones de operación que se evaluaron a lo largo de dichas reacciones son: relación molar de sustratos, temperatura y carga de enzima.

**Tabla 5.** Composición en ácidos grasos (% p/p) del aceite de partida (EPO) y de los concentrados enriquecidos

Ácido graso	EPO	Concentrado 1	Concentrado 2
16:0	6.24	3.66	-
18:0	1.91	2.52	-
18:1 (n-9)	6.06	-	-
18:1 (n-7)	0.63	-	-
18:2 (n-6)	76.3	23.79	10
<b>GLA</b>	<b>8.87</b>	<b>70</b>	<b>90</b>

**Concentrado 1:** es el producto obtenido bajo las siguientes condiciones: relación molar de sustratos (EPO:butanol), 30°C, 10% peso de carga enzimática (con respecto a la mezcla total de sustratos), 400 rpm y 24 h de reacción

**Concentrado 2:** es el producto obtenido bajo las siguientes condiciones: relación molar de sustratos (EPO:butanol), 30°C, 10% peso de carga enzimática (con respecto a la mezcla total de sustratos), 400 rpm, 5% peso de tamiz molecular (con respecto a la mezcla total de sustratos) adicionado a las 9 h de reacción y 12 h de reacción total.

### 6.1.1. Efecto de la relación molar de sustratos

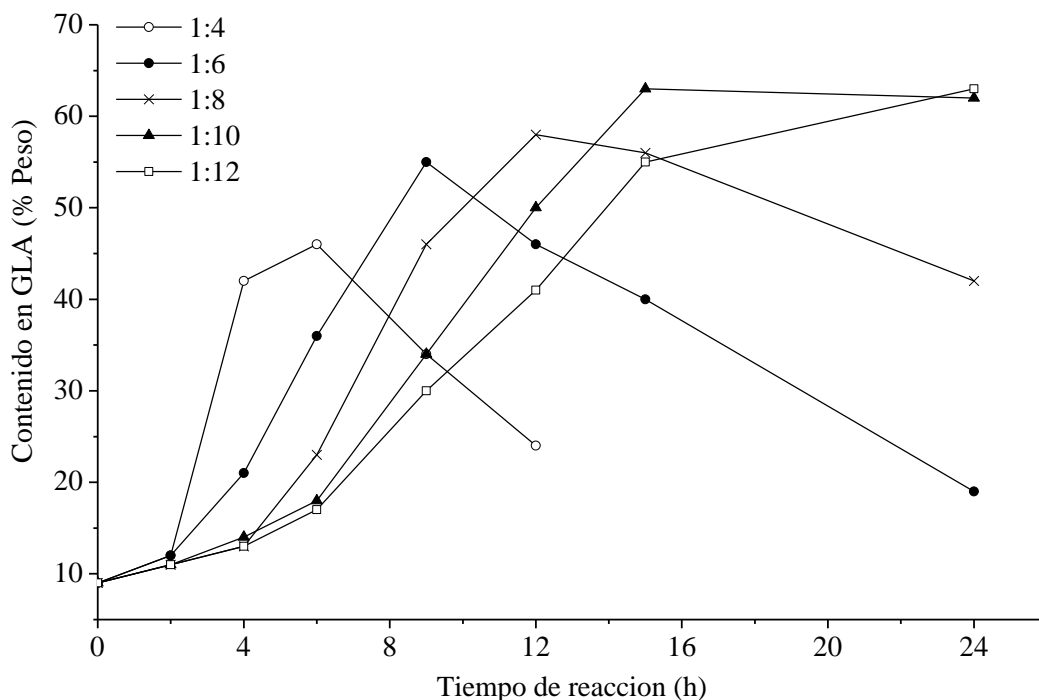
A medida que la concentración de alcohol aumentaba en el medio de reacción se favoreció la esterificación de los ácidos grasos presentes. El efecto de la adición de BtOH se evaluó en las siguientes relaciones molares: 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, y 1:12 (EPO:BtOH).

Cuando la concentración de butanol se incrementa en el medio de reacción se puede disolver e integrar de mejor manera el aceite de partida con la enzima, mejorándose de esta manera la interacción de los sustratos con los sitios activos de la enzima. Sin embargo, esta creciente concentración de alcohol en el medio tiene también un efecto negativo sobre la eficiencia catalítica de la enzima (reducción de la actividad enzimática).

Tal y como puede apreciarse en la Figura 10, a medida que el BtOH incrementa su concentración en el medio de reacción se enriquece en GLA el aceite de partida. Sin embargo, este incremento se observó hasta una relación molar 1:10, ya que al evaluar una relación 1:12 se alcanzó una menor concentración de GLA. Este comportamiento se explica como un desplazamiento de las moléculas de agua que se encuentran en el sitio activo de la enzima causando una disminución en su eficiencia catalítica. Las altas concentraciones de alcohol ejercen un efecto inhibitorio sobre la enzima haciendo que la reacción proceda más lenta y no se alcancen mayores concentraciones de GLA. La consecuencia directa de esta inhibición es que la enzima requiere de un mayor tiempo de reacción para alcanzar concentraciones más elevadas de GLA (ver Figura 10).

Este comportamiento ha sido previamente documentado y se ha mencionado que el tipo de alcohol empleado es determinante en las conversiones y rendimientos que pueden alcanzarse durante una reacción de esterificación (Zaidi *et al.*, 1995; Shimada *et al.*, 1998).

Como resultado de estudiar esta variable se logró incrementar el contenido de GLA de 8.87 a 62.6% y la relación molar 1:10 se seleccionó para evaluar el efecto de la temperatura.



**Figura 10.** Efecto de la relación molar de sustratos (EPO-FA:BtOH) en el contenido de GLA a 40°C, 400 rpm y 10% (p/p) de enzima

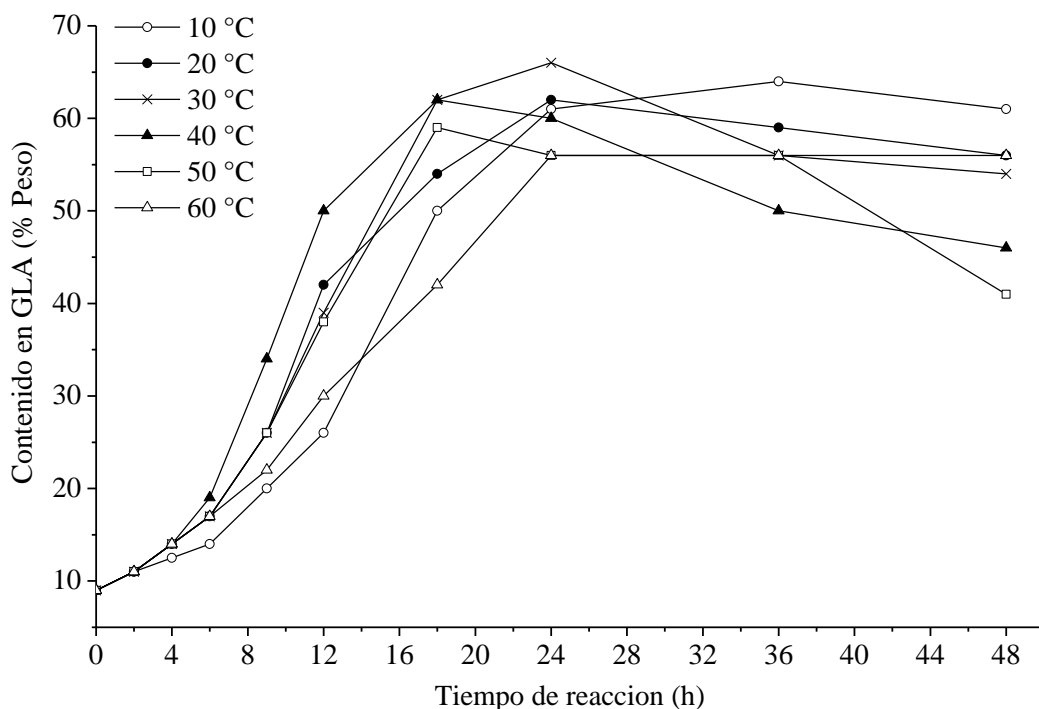
### 6.1.2. Efecto de la temperatura

Dado que el catalizador que estamos empleando en las reacciones de esterificación es enzimático, evaluar la temperatura es de suma importancia por el efecto que puede tener a nivel de estructura y funcionalidad. Las temperaturas empleadas son: 30, 40, 50 y 60°C (ver Figura 11).

Al explorar diferentes temperaturas, encontramos que durante las primeras 12 h de reacción el contenido de GLA era, prácticamente similar a 20, 30 y 50°C, mientras que a 40°C era mayor. Para el mismo periodo de tiempo, los menores contenidos se obtuvieron a 10 y 60°C. Sin embargo, el mayor contenido de GLA (66.6%) se alcanzó a 30°C después de 24 h de reacción.

A 60°C se acelera la velocidad de la reacción de esterificación, debido a que se disminuye la viscosidad de la mezcla de reacción; esto favorece la interacción de la enzima con los sustratos y de esta manera la reacción tiene lugar de manera más eficiente (incrementa el

contenido de GLA). Por otra parte, éste incremento de temperatura también provoca la desnaturalización prematura de las enzimas, con lo que se puede explicar el menor contenido en GLA en los ésteres butílicos.



**Figura 11.** Efecto de la temperatura en el contenido de GLA con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 400 rpm y 10% (p/p) de enzima

Se debe tener en cuenta que esta serie de experimentos se llevaron a cabo con una relación molar de sustratos EPO-FA:BtOH 1:10. Como se mencionó en la sección anterior, esta relación permitió una mejor disolución de los ácidos grasos de partida y, si bien, una mayor temperatura promovería un mayor número de colisiones moleculares entre la enzima y los sustratos, las temperaturas moderadas (20 y 30 °C) también lo logran.

Otros trabajos en la literatura se han observado excelentes rendimientos en reacciones de esterificación a temperaturas mayores. Rahmatullah *et al.* (1994) reportan altos rendimientos con temperaturas de 50°C, pero en presencia de hexano como solvente. Otros trabajos emplean sistemas a bajas temperaturas como winterización (Yokochi *et al.*, 1990; López-Martínez *et al.*,

2004), cristalización (Ju and Chen, 2002; Syed Ubaid *et al.*, 2009) y fraccionamiento con urea (Cohen *et al.*, 1993; Canas y Yurawecs, 1999).

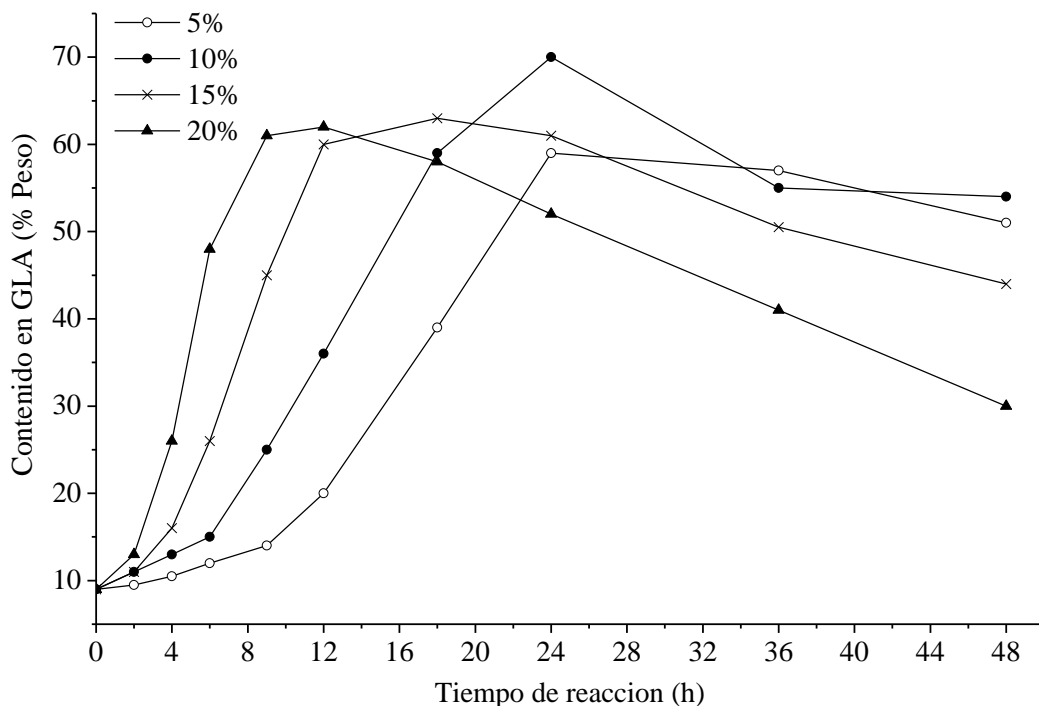
El mejor valor de temperatura encontrado para la reacción de esterificación catalizada por *C. rugosa* es conveniente desde un punto de vista práctico y técnico ya que para una producción piloto o industrial los requerimientos energéticos no serían tan elevados, así mismo, la degradación térmica de la enzima no sería tan severa en comparación con valores más bajos o altos de temperatura evitando así su desnaturalización. Por otro lado, nuestro sistema es libre de solventes que es una gran ventaja para sistemas de reacción aplicados al área de alimentos y también llevar a cabo la reacción de esterificación a 30°C evita la oxidación de los ácidos grasos presentes en el aceite de partida.

Como resultado de estudiar esta variable se logró incrementar el contenido de GLA de 62.6 a 66.6% para una relación molar 1:10 y 30°C. Bajo estas condiciones se procedió a evaluar el efecto de la carga de enzima.

### **6.1.3. Efecto de la carga de enzima**

Para llevar a cabo una reacción en presencia de un catalizador debe garantizarse que la concentración del mismo sea la suficiente para que se encuentre disponible y se puedan alcanzar los rendimientos, conversiones y/o productividades deseados. Para un catalizador enzimático este parámetro es de vital importancia dado el costo de las enzimas. Bajo ese contexto la cantidad de enzima se evaluó en las siguientes concentraciones: 5, 10, 15 y 20% (con respecto a la mezcla total de sustratos).

Tal y como se muestra en la Figura 12, el mayor contenido en GLA se obtuvo con 10% de enzima, que había sido la concentración utilizada al explorar los efectos de la relación molar de sustratos y la temperatura. A fin de precisar más, se estudiaron reacciones de esterificación con dos nuevas cargas de enzima (7.5 y 12.5% p/p, datos no mostrados en la Figura 12), que rindieron contenidos menores de GLA que con la carga de 10%. Con el estudio de esta variable se logró enriquecer el aceite de partida (EPO) hasta un 70% en GLA después de 24 h de reacción (Figura 12). Este enriquecimiento se muestra en la Tabla 5 como Concentrado 1.



**Figura 12.** Efecto de la carga de enzima (% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) en el contenido de GLA con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 400 rpm y 30°C

La velocidad de reacción de esterificación es proporcional a la cantidad de enzima añadida a la mezcla de reacción; igualmente, la cantidad de catalizador es proporcional a la velocidad de reacción de hidrólisis (la reacción inversa a la esterificación), tal como se observa en la Figura 12. Con esto, podemos notar que la enzima no discrimina entre la reacción de esterificación y su reacción inversa, lo que afecta la cantidad de GLA en la fase no esterificada.

Además, una mayor cantidad de catalizador (15 y 20% p/p) implica una mayor resistencia a la transferencia de masa de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima, a pesar de que los experimentos se llevaron a cabo con un exceso de butanol en el medio de reacción.

Esta carga de enzima es una concentración igualmente práctica puesto que el costo de las enzimas es elevado y pensar en una aplicación a nivel piloto o industrial incrementaría los costos de producción de este triglicérido estructurado. Una alternativa a este aspecto es llevar a cabo la inmovilización de la enzima lo cual no solo optimizaría la cantidad de enzima a emplear si no que también haría posible llevar a cabo ciclos de reutilización.

Es de suma importancia destacar la especificidad de la enzima empleada (*C. rugosa*). Los ácidos oleico (18:1n-9) y linoleico (18:2n-6) fueron los primeros en ser esterificados, seguidos de palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Por la baja preferencia de la enzima por GLA, y efecto de las variables de reacción que se exploraron, este ácido fue enriquecido satisfactoriamente en la fracción sin esterificar como se muestra en la Tabla 5 (columna Concentrado 1).

Aún cuando se logró enriquecer significativamente en GLA el aceite de partida (EPO), en todas las cinéticas de reacción obtenidas al explorar el efecto de las diferentes variables de reacción, se observó siempre un perfil de disminución en el contenido de GLA tras haber alcanzado el contenido máximo. La reacción inversa a la esterificación es la hidrólisis, por lo que el equilibrio del sistema indica que a medida que procede la reacción hay más agua en el medio que puede afectar la actividad enzimática. Este incremento en el contenido de agua afecta a la interfase lípido-agua del complejo lipasa-éster, lo que resulta en reorganizaciones estructurales en la región del sitio activo de la enzima, alterando su actividad catalítica.

Por lo anterior, se buscó optimizar esta primera etapa con la adición de tamiz molecular como una estrategia para controlar el contenido de agua presente en el medio de reacción a medida que ocurren las esterificaciones enzimáticas.

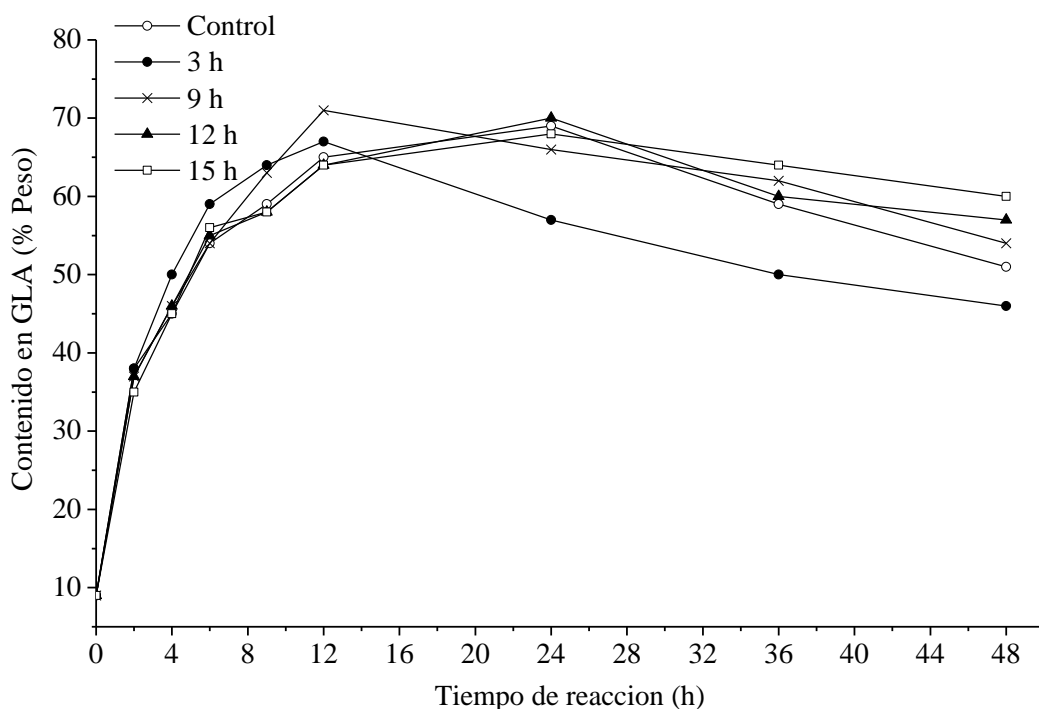
#### **6.1.4. Efecto de la carga y tiempo de adición de tamiz molecular**

La presencia de agua es un factor crucial para mantener una óptima conformación estructural de las enzimas. Las lipasas, en particular, requieren de cierta cantidad de agua para mantener su estructura tridimensional y su actividad catalítica (Rosu *et al.*, 1998; Xu, 2005). Además, la presencia de agua es un elemento importante en el equilibrio químico de la reacción de esterificación.

Dado que la reacción inversa a la esterificación es la hidrólisis, al aumentar la cantidad de agua en el medio de reacción tanto la velocidad de reacción como el rendimiento se ven disminuidos. Para paliar este fenómeno, se estudió el efecto de la adición de tamiz molecular sobre estas reacciones de esterificación.



La Figura 13 muestra el efecto del tiempo de adición del tamiz molecular en las reacciones de esterificación. Los tiempos de adición estudiados son 3, 9, 12 y 15 horas, empleando 10% en peso de tamiz molecular (con respecto a la mezcla total de sustratos); bajo las mejores condiciones de reacción encontradas anteriormente: 30°C, 400 rpm y 10% en peso de carga de enzima de *C. rugosa* (con respecto a la mezcla total de sustratos). La reacción de esterificación que se llevó a cabo con esas condiciones es la que se indica como control en la Figura 13.



**Figura 13.** Efecto del tiempo de adición del tamiz molecular sobre el enriquecimiento en GLA de la fase ácido graso. Las condiciones de reacción son: 30°C, 400 rpm y 10% peso de carga enzimática (con respecto a la mezcla total de sustratos). La cantidad de tamiz molecular añadido en todas las reacciones fue de 10% peso (con respecto a la mezcla total de sustratos).

Como se puede observar en la Figura 13, durante las primeras 10 horas de reacción, la esterificación era la reacción controlante; para tiempos de reacción mayores, la producción de agua y el efecto de la adición de tamiz molecular se hicieron evidentes. Cuando se añadió el tamiz molecular a las 3 horas de reacción, la concentración de GLA obtenida es de 67% después

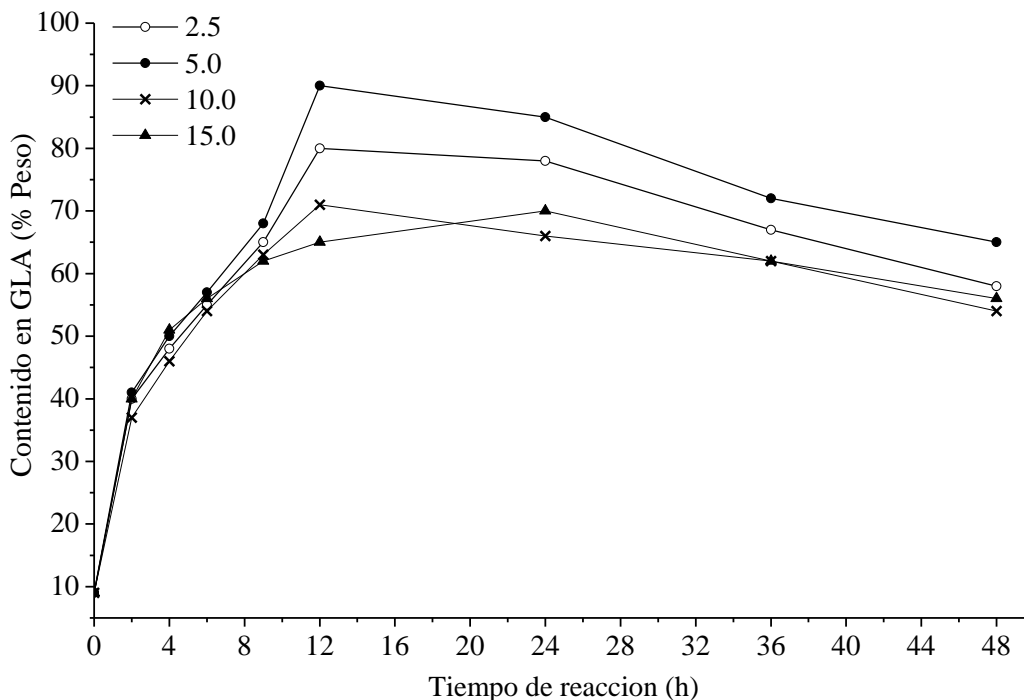
de 12.5 horas de reacción. Al añadirlo a las 9 horas, se alcanzó un máximo en el contenido de GLA de 72%, tras 12.5 horas de reacción. Finalmente, al añadirlo a las 12 y 15 horas de reacción, el GLA enriquecido en dichas reacciones es de 70 y 66%, respectivamente, tras 24 horas de reacción.

Como puede notarse, el tiempo de adición de tamiz molecular no permite un mayor enriquecimiento en GLA ya que los contenidos alcanzados son muy cercanos entre sí. Sin embargo, si se logró un efecto positivo con la adición de tamiz y es la reducción del tiempo de reacción requerido para enriquecer en GLA el aceite de partida. Sin adicionar tamiz (control, Figura 13) se necesitaban 24 h de reacción para alcanzar un contenido de GLA de 70% mientras que adicionando tamiz (10%) a las 9 horas de reacción dicho máximo se produjo a las 12.5 h de reacción.

De lo anterior se puede destacar que al remover parte del agua que se está produciendo a medida que tiene lugar la reacción de esterificación, se aumenta la velocidad de reacción; es decir, las moléculas de agua producen la inhibición de los sitios activos de la enzima y, a la vez, favorecerían la reacción de hidrólisis.

Desde el punto de vista de operación, reducir el tiempo de reacción a la mitad impactaría significativamente en costos de producción, requerimientos energéticos, se reduce la exposición de la enzima a las condiciones del medio haciendo más factible su reutilización y se incrementaría la obtención de triglicéridos estructurados ricos en GLA.

Aunque se redujo el tiempo de reacción necesario para el enriquecimiento en GLA al adicionar tamiz molecular, se decidió evaluar a continuación si la concentración del mismo tendría algún efecto sobre el contenido de GLA en el medio de reacción. Como se muestra en la Figura 14, al añadir 2.5 y 5% de tamiz molecular se aumentó la cantidad de GLA en el concentrado: 80 y 90%, respectivamente. Sin embargo, al agregar 15% de tamiz molecular, la cantidad de GLA se vio reducida.



**Figura 14.** Efecto de la cantidad añadida de tamiz molecular sobre el enriquecimiento en GLA de la fase ácido graso. Las condiciones de reacción son: 30°C, 400 rpm y 10% peso de carga enzimática (con respecto a la mezcla total de sustratos). El tiempo al cual se añadió el tamiz molecular en todas las reacciones fue a las 9 horas

Tal y como se muestra en la Figura 14 la concentración de tamiz molecular afectó también el enriquecimiento en GLA. Es importante remarcar aquí que aún cuando el propósito es elevar el contenido de GLA no por ello habría de sacrificarse la eficiencia catalítica de *C. rugosa*. Todas las enzimas sin excepción requieren de una cantidad mínima de agua para llevar a cabo su función catalítica, sin embargo, un exceso de agua provoca cambios conformacionales que disminuyen su capacidad de transformar el sustrato de interés en el producto deseado.

Cabe destacar que la cantidad de tamiz molecular no guarda una evidente relación con la cantidad de GLA en la fase ácido graso. Sin embargo, podemos apreciar que al agregar mayores cantidades de tamiz molecular (10 y 15%), se reduce la cantidad de GLA. Esto lo podemos atribuir a dos factores: por una parte, al aumentar la cantidad de tamiz molecular se aumenta la resistencia a la transferencia de masa, disminuyendo así la interacción entre los sustratos y la enzima; por otra parte, al haber mayor cantidad de tamiz molecular, se disminuye la cantidad de moléculas de agua que, como ya se ha mencionado con antelación, requiere la enzima para su

óptimo funcionamiento. Luego entonces, podemos hablar de un efecto combinado que provoca la disminución de la cantidad de GLA al aumentar la cantidad de tamiz molecular en la mezcla de la reacción: la resistencia a la transferencia de masa y la disminución de moléculas de agua disponibles.

La adición de tamiz molecular a diferentes tiempos y concentraciones claramente sugiere que la cantidad de agua se debe controlar a fin de que en la reacción de esterificación el equilibrio químico se desplace hacia la formación de los butil esteres correspondientes y en consecuencia se enriquezca el contenido de GLA; sin embargo, el agua no debe removerse en su totalidad, ya que las enzimas la requieren para mantener su actividad catalítica.

Con el estudio de las variables anteriores y habiendo incrementado el contenido de GLA de 8.87 a 90% (columna Concentrado 2 en la Tabla 5), se procedió a la separación física de las fases de reacción: fase éster y fase ácido graso.

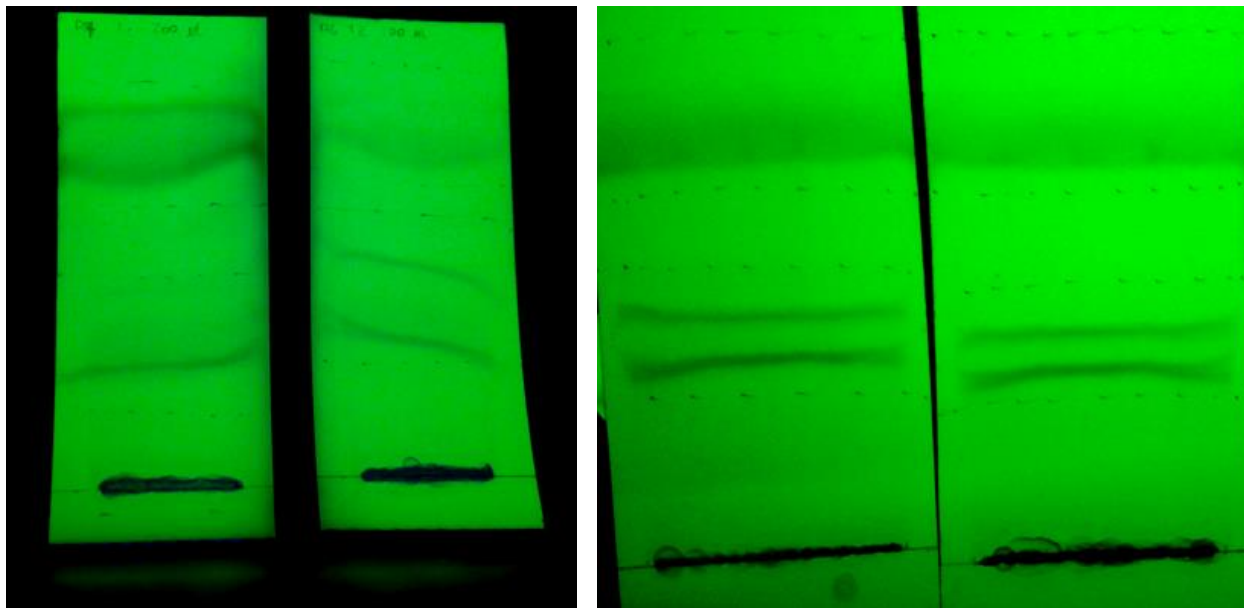
## **6.2. Separación de las fases de reacción**

Se dice que una etapa de separación es adecuada cuando permite la creación de dos o más zonas de coexistencia que puedan diferir en temperatura, presión, composición y/o estado de fase. Cada una de las especies moleculares presente en la mezcla a separar reacciona de manera única a las diferentes condiciones del medio que las contiene.

Para la segunda parte de este trabajo de tesis se hizo necesaria una etapa de separación puesto que con la evaluación de los diferentes parámetros de reacción durante las esterificación se crearon dos zonas que difieren en composición: se tiene una zona que contiene butil esteres y otra zona que es rica en el ácido graso de interés, GLA.

Debido a las ventajas que poseen las técnicas cromatográficas y a la naturaleza química de las zonas que se quieren separar, para esta etapa se llevaron a cabo cromatografías en columna y placa fina. Primeramente se procedió a separar las fases de reacción por medio de una cromatografía en columna. Sin embargo, la separación mediante esta técnica no resultó satisfactoria y el consumo de disolventes orgánicos para su ensayo era excesivo.

Por lo anterior, se utilizó en segunda instancia la cromatografía en capa fina (TLC), mostrando ser una técnica sencilla, eficiente y con un consumo mínimo de disolventes orgánicos (Figura 15).



**Figura 15.** Cromatografía en capa fina para la separación de las fases de reacción. La parte superior muestra los butil ésteres de ácidos grasos, mientras que las bandas inferiores corresponden a los ácidos grasos libres.

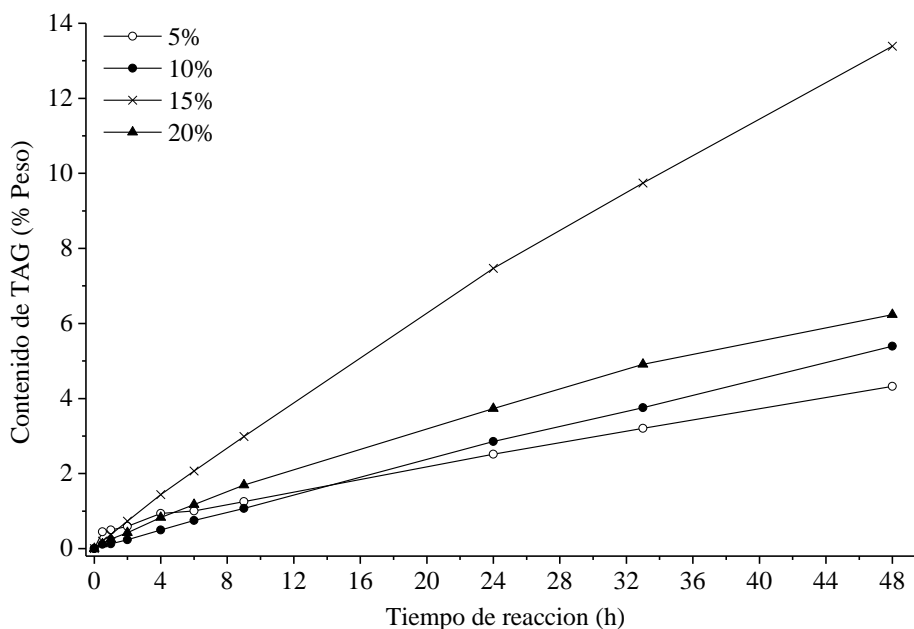
Como se muestra en la Figura 15, se han formado diferentes bandas como consecuencia del contacto de la fase móvil y la mezcla colocada en la parte inferior de los placas. Las bandas que se rasparon son las inferiores, ya que corresponden al GLA, y posteriormente se resuspendieron en cloroformo para poder extraer el GLA. A continuación el cloroformo se evaporó y el concentrado de GLA se empleó para la tercera y última etapa de este trabajo de tesis: la producción de TAG estructurados.

### 6.3. Preparación enzimática del triacilglicérido estructurado

En la última parte de este trabajo de tesis tuvo lugar la síntesis enzimática del TAG estructurado rico en GLA, evaluando los siguientes parámetros de reacción: carga de la enzima CALB (5, 10, 15 y 20%, con respecto a la mezcla total de sustratos), temperatura de operación (30, 40, 50 y 60°C) y la relación molar de los sustratos (1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 glicerol:GLA).

#### 6.3.1. Efecto de la carga de enzima: CALB

La primera variable estudiada fue la carga de enzima. La cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción es importante para llevar a cabo la reacción de glicerólisis. Con una cantidad suficiente de enzima la reacción procede hacia la formación de triglicéridos, pero un exceso de esta trae consigo resistencia a la transferencia de masa y la consecuente reducción en el rendimiento. Las cantidades de CALB que se evaluaron son: 5, 10, 15 y 20% (% p/p con respecto a la mezcla total de sustratos) como se muestra en la Figura 16, bajo las siguientes condiciones de reacción: 40°C, una relación molar de los sustratos 1:1 (glicerol:GLA) y 400 rpm.



**Figura 16.** Efecto de la carga de enzima CALB (% p/p con respecto a la mezcla total de sustratos) con una relación molar 1:1 (GLA:glicerol), 40 °C y 400 rpm

Puede observarse que la cantidad de TAG obtenida incrementa en función de la carga de enzima. Sin embargo, al agregar 20% de carga de enzima, se obtuvo una menor cantidad de TAG comparado con una adición de 15%; ello sugiere que parte de la enzima es retenida en las paredes del reactor, y por lo tanto, menor cantidad de ésta interactúa con los sustratos. Adicionalmente, el empleo de altas cantidades de enzima produce una agitación inadecuada y limita la transferencia de masa. Así mismo, emplear altas concentraciones de enzima implica un incremento en los costos de producción por el elevado precio de las enzimas.

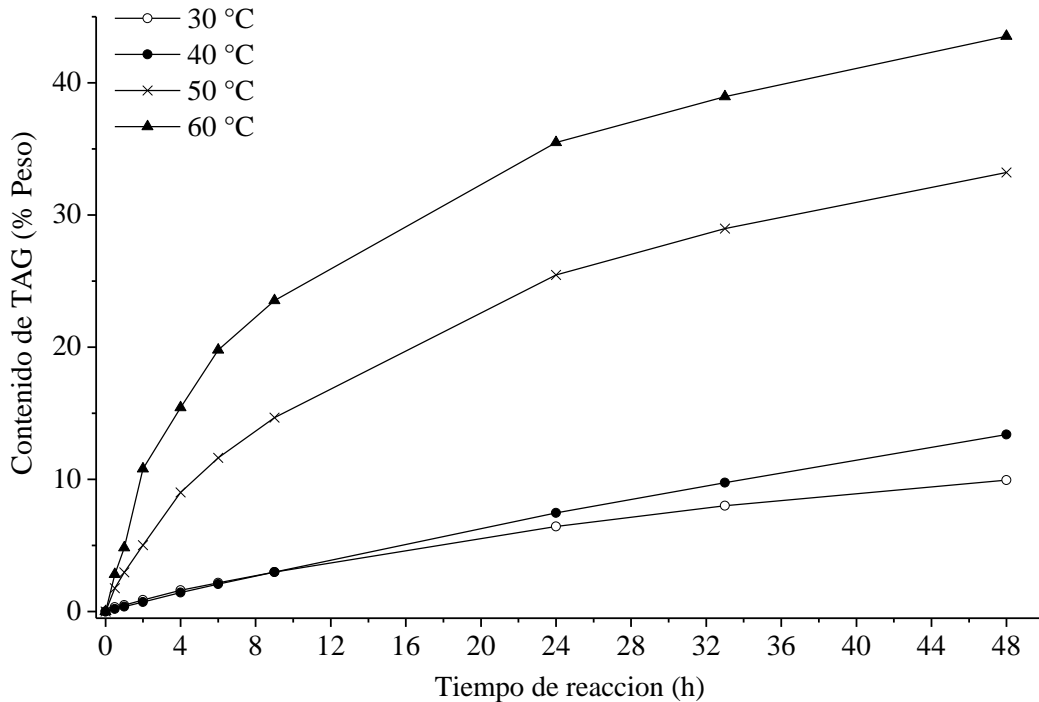
El máximo contenido en TAG (13.9%) se logró con una carga de enzima de 15%; en consecuencia, se seleccionó esta cantidad para evaluar el efecto de la temperatura. Estudios similares en la literatura han reportado un 15% de carga de enzima como una cantidad suficiente para la obtención de diferentes acilglicéridos (Camino-Feltes *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2013).

Por otro lado, Liu *et al.* (2015), encontraron que para la producción de TAG estructurados con ácidos palmítico y DHA, 10% de enzima es la mejor concentración. De igual manera, estos autores refieren que la carga de enzima está delimitada por consideraciones económicas y de transferencia de masa en el sistema de reacción.

### **6.3.2. Efecto de la temperatura**

La segunda variable estudiada es la temperatura. Las grasas y los aceites presentan una baja miscibilidad con glicerol. A altas temperaturas, la viscosidad se puede ver reducida, y la solubilidad o la difusión de los sustratos se pueden ver mejoradas, lo que significa mayores cantidades de TAG obtenidas.

Por ello, la temperatura se incrementó en los siguientes niveles: 30, 40, 50 y 60°C (Figura 17). Al incrementar la temperatura, la cantidad de TAG producida también incrementó, alcanzando el máximo de concentración (43.5%) a 60°C. Luego entonces, 15% de carga de enzima CALB y 60°C se emplearon para estudiar el efecto de la relación molar de sustratos en un sistema libre de solventes.



**Figura 17.** Efecto de la temperatura. Carga de enzima CALB de 15% (con respecto a la mezcla total de sustratos) con una relación molar 1:1 (GLA:glicerol) y 400 rpm

Kahveci *et al.* (2009) refieren que la conversión y el rendimiento de TAGs obtenidos, incrementan con la temperatura. Por otro lado, Camino-Feltes *et al.* (2010) obtuvieron 43% de diglicéridos a 70°C, empleando 15% de la enzima N435 y una relación molar de sustratos 1:1 (aceite de pescado:glicerol). Es importante resaltar que en dichos trabajos se utilizaron disolventes orgánicos (*t*-butanol) en el primero y agentes surfactantes (Tween 65) en el segundo, por lo que sus reacciones se llevaron a cabo en menor tiempo. Por otra parte, Krüger *et al.* (2010), emplearon aceite de oliva, 10% carga de enzima N435 y *t*-butanol para la obtención de MAG y DAG a una temperatura de 70°C. En otro estudio llevado a cabo por Liu *et al.* (2015), 60°C se seleccionó como la mejor temperatura de reacción. Estos autores señalan que la temperatura de reacción debe seleccionar considerando la termoestabilidad de la enzima porque a altos valores de temperatura se puede desactivar el biocatalizador en cuestión.

En términos generales, en este estudio se apreció que la temperatura favoreció positivamente nuestro sistema de reacción por lo que se alcanzó una mayor concentración de TAG. Esto es consecuencia de una reducción en la viscosidad de la mezcla de reacción derivado

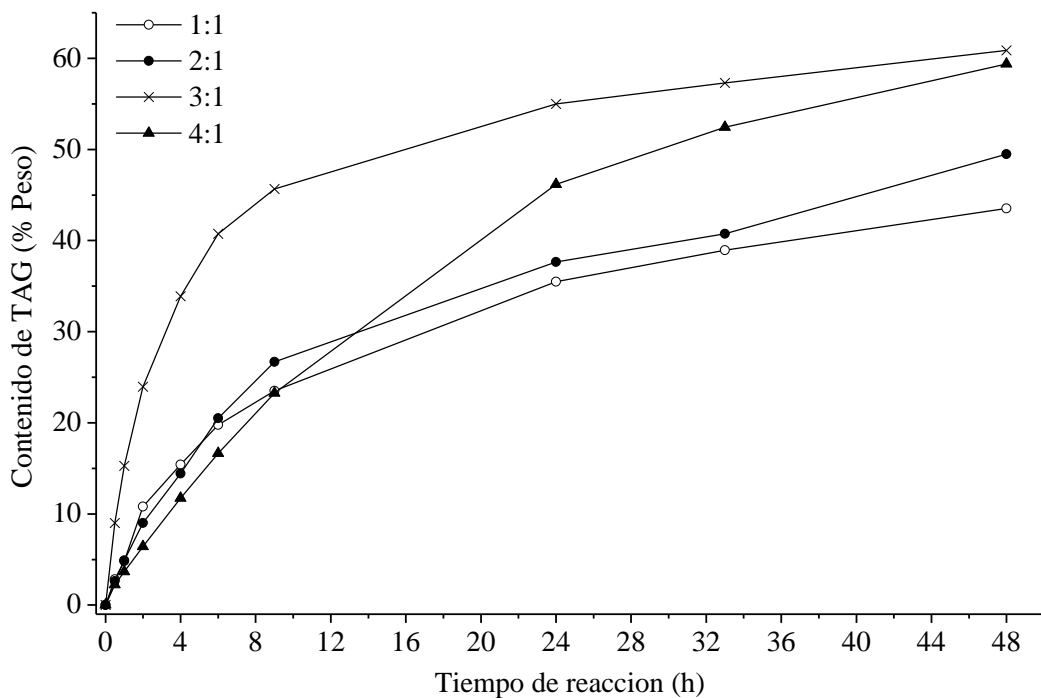


del aumento de temperatura, dando como resultado una mejor solubilidad o difusión de los sustratos al ya no ocurrir impedimento estérico entre los sustratos involucrados: GLA y glicerol. Es relevante destacar que este sistema de reacción es libre de solvente a diferencia de otros reportados previamente en la literatura.

### **6.3.3. Efecto de la relación molar de sustratos**

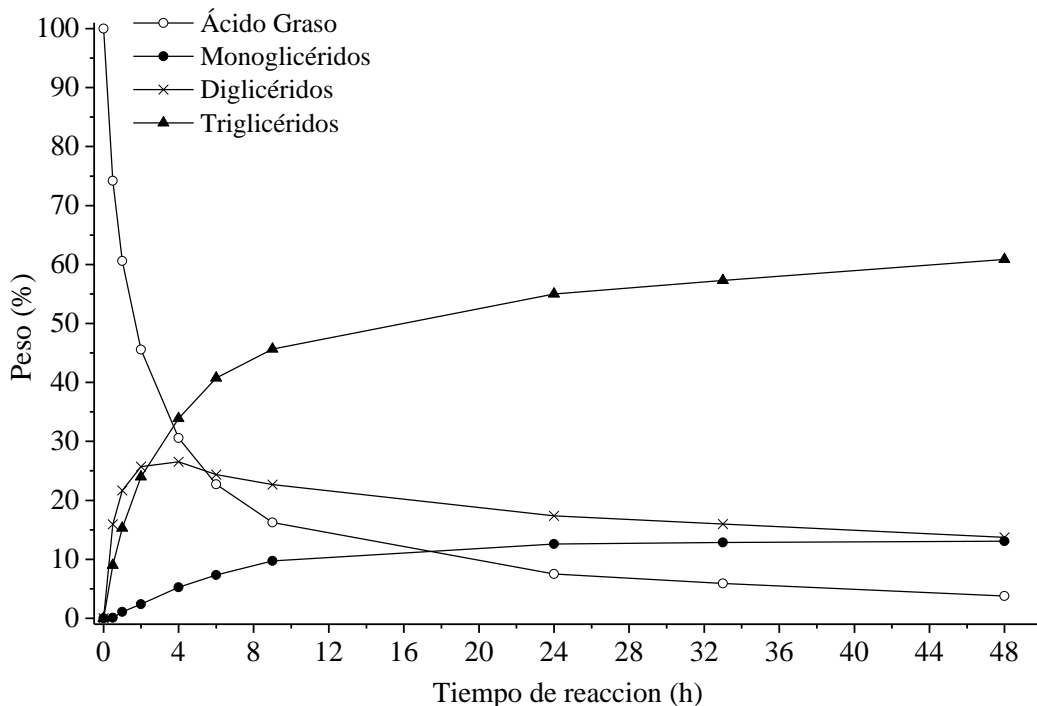
El último parámetro de reacción estudiado durante la glicerólisis es la relación molar de sustratos. Debido a la viscosidad e inmiscibilidad de los reactivos, es importante asegurar una agitación tal que conduzca hacia la homogenización de la mezcla de reacción. Sin duda, al incrementar la cantidad de glicerol presente en la reacción, mayor cantidad de TAG se podrá obtener. Sin embargo, este aumento en glicerol puede provocar resistencia a la transferencia de masa y reducir la interacción entre la enzima y los sustratos.

La Figura 18 muestra el efecto de la relación molar de sustratos. Al aumentar la cantidad de glicerol presente en la reacción, se obtuvo mayor cantidad de TAG. No obstante, esto fue válido únicamente para las relaciones 1:1, 2:1 y 3:1 glicerol:GLA. Cuando se empleó la relación 4:1, se obtuvo la menor cantidad de TAG durante las primeras 9 h de reacción; después de este tiempo, el contenido en TAG fue mayor que al utilizar las relaciones 1:1 y 2:1. Sin embargo, la relación 4:1 nunca alcanzó el porcentaje de TAG producido con la relación 3:1: 61% de TAG.



**Figura 18.** Efecto de la relación molar de sustratos GLA:glicerol. Carga de enzima CALB de 15% (con respecto a la mezcla total de sustratos), 60 °C y 400 rpm

Habiendo encontrado las mejores condiciones de reacción para la obtención de TAG estructurados, se procedió a determinar el perfil de los diferentes glicéridos que se producen. En la Figura 19 se muestra dicho perfil y puede observarse que bajo esas condiciones se favorece la producción de TAG, el objetivo de esta tesis. Con respecto a los otros glicéridos, se muestra que el contenido de DAG alcanza un máximo a las 4 horas de reacción, para posterior y gradualmente disminuir a 15%. Por otra parte, el contenido de MAG incrementó progresivamente a 15%.



**Figura 19.** Composición de ácido graso, mono, di y triglicéridos. Relación molar de sustratos GLA:glicerol 3:1, carga de enzima CALB de 15% (con respecto a la mezcla total de sustratos), 60 °C y 400 rpm

La curva correspondiente a ácido graso describe el comportamiento del GLA libre presente en el medio de reacción. La reducción que puede notarse nos indica que como consecuencia de la reacción de glicerólisis, el GLA se va incorporando en los diferentes glicéridos que se forman a lo largo del tiempo de reacción. Cuando se llevo a cabo la caracterización cromatográfica de los diferentes glicéridos, se cuantificó que los TAG contienen 49% de GLA.

Es importante mencionar que las condiciones de reacción afectan el perfil de glicéridos, la reactividad de los diferentes ácidos grasos presentes y la especificidad enzimática. Cuando se enriqueció el GLA en la primer parte de esta tesis, la lipasa de *Candida rugosa* no presentaba selectividad alguna por el GLA, permitiendo incrementar su concentración hasta un 90%. En el caso de la reacción de glicerólisis, la baja miscibilidad entre el glicerol y el aceite afectó la interacción con la enzima, y en consecuencia, la incorporación del GLA en el glicerol fue baja. Para los DAG la incorporación del GLA fue del 17.9% y 4.9% para los MAG. Sin embargo, estudios posteriores podrían llevarse a cabo para optimizar los diferentes parámetros de reacción

para dirigir las diferentes cinéticas a la obtención de DAG y MAG estructurados en GLA o cualquier otro PUFA que puede considerarse como funcional o nutracéutico.

Los efectos benéficos de los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 están extensamente documentados en la literatura. Sin embargo, la mayoría de esos trabajos están relacionados con los ácidos grasos  $\omega$ -3: EPA, ácido docosapentaenoico (DPA) y DHA. García *et al.* (2008) y Kim *et al.* (2010), realizaron un estudio de incorporación de ácidos grasos  $\omega$ -3 en fosfatidilcolina (PC). Estos autores destacan que el EPA fue el ácido graso más reactivo, seguido por el ácido DPA y DHA.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, sugieren que al igual que los diferentes parámetros de reacción estudiados, la especificidad de la enzima juega un rol muy importante. Dado que la enzima de *Candida rugosa* presenta una menor preferencia hacia el GLA, pudo llevarse la concentración de este ácido graso durante la primera etapa del estudio; permitiendo así, la obtención de un triglicérido estructurado.

Por otro lado, las diferentes condiciones de reacción evaluadas afectaron la estabilidad operacional de la enzima, permitiendo obtener los perfiles de glicéridos mostrados a lo largo de este trabajo de tesis.

## 7. Conclusiones

- En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de diversas variables de reacción sobre reacciones enzimáticas. Se logró el enriquecimiento enzimático en GLA dado que *C. rugosa* exhibe una baja selectividad por dicho ácido graso.
- En conjunto con la adición de tamiz molecular, se llevó a cabo la obtención de un concentrado con 90% en GLA. Cabe mencionar que es un aspecto relevante para el desarrollo de este trabajo el controlar la cantidad de agua presente en el medio de reacción.
- La separación física de las dos fases de reacción producidas durante las esterificaciones fue exitosa y mediante TLC se pudo recuperar la fase rica en GLA.
- Al evaluar las diferentes variables en las reacciones de glicerólisis, el perfil de glicéridos obtenidos muestra un contenido de 60% en TAG. La caracterización cromatográfica de los mismos mostró un contenido de 49% de GLA.
- Relevante es destacar que a diferencia de otros trabajos reportados en la literatura, los sistemas de reacción aquí desarrollados son libres de solvente. Así mismo, las condiciones de reacción son moderadas demostrando así el potencial de estos sistemas para una producción piloto o industrial de concentrados ricos en PUFA.
- Se recomienda realizar estudios más profundos a fin de cuantificar las variables de reacción, a saber: coeficientes de transferencia de masa, velocidades iniciales de reacción y el efecto de la temperatura sobre la viscosidad del sistema.

## 8. Bibliografía

Aehle Wolfgang (2007). *Enzymes in Industry. Production and Applications*, 3a ed., Alemania, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 1-10.

Akoh Casimir (2006). *Handbook of Functional Lipids*. Estados Unidos, Ed. Taylor and Francis, pp 490.

Aranceta Bartrina Javier, Gil Ángel (2010). *Alimentos Funcionales y Salud en las Etapas Infantil y Juvenil*. España, Ed. Médica Panamericana, pp 12-15.

Baeza Jiménez Ramiro, López Martínez Leticia, García Galindo Hugo (2014a). Biocatalytic Modification of Food Lipids: Reactions and Applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13: 31-49.

Baeza Jiménez Ramiro; Som No Da; Otero Christina; García Galindo Hugo; Sig Lee Jeom; Kim In-Hwan. (2014b). Lipase-Catalysed Enrichment of  $\gamma$ -Linolenic Acid from Evening Primrose Oil in a Solvent-Free System. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 91:1147-1153.

Baeza Jiménez Ramiro. (2013). *Desarrollo de Procesos Enzimáticos Selectivos Para Aplicaciones Nutricionales*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.

Bagchi D.; Lau F.; Ghosh DK. (2010). *Biotechnology in Functional Foods and Nutraceuticals*. Estados Unidos, Ed. CRC Press, pp 3-4.

Ballesteros García Paloma, Claramunt Vallespí Rosa, Sanz del Castillo Dionisia, Teso Vilar Enrique (2013). *Química Orgánica Avanzada*, España, Ed. Universidad Nacional de Educación a Distancia, pp 144-145.

Bello Gutiérrez José (2012). *Calidad de Vida, Alimentos y Salud Humana. Fundamentos Científicos*. España, Ed. Díaz de Santos, pp 62-67.

Cabrera Zaida, Fernández-Lorente Gloria, Fernández-Lafuente Roberto, Palomo José, Guisan José. (2009). Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57:171-176.

- Camino-Feltes MM., Oliveira JV., Treichel H., Block JM., DeOliveira D., Ninow JL. (2010). Assessment of process parameters on the production of diglycerides in omega-3 fatty acid through the enzymatic glycerolysis of fish oil. *European Food Research and Technology*, 231:701–710.
- Campra Madrid Pablo. (2003). *Ácido Gamma-Linolénico (18:3n-6): Distribución, y Purificación a Partir de Nuevas Fuentes Vegetales*. Tesis Doctoral, Universidad de Almería.
- Canas B.I., Yurawecz M.P. (1999). Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 76: 537.
- Cohen Z., Reungjitchachawali M., Siangdung W., Tanticharoen M. (1993). Production and partial purification of  $\gamma$ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 5: 109–115.
- Díaz Zagoya Juan, Juárez Oropeza Marco. (2007). *Bioquímica. Un Enfoque Básico Aplicado a las Ciencias de la Vida*, México, Ed. Mc. Graw-Hill, pp 130-135.
- Fan Yang-Yi, Chapkin Robert S. (1998). Importance of Dietary  $\gamma$ -Linolenic Acid in Human Health and Nutrition. *The Journal of Nutrition*, 128: 1411-1414.
- Fogliano V, Vitaglione P. (2005) Functional foods: planning and development. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49:256–262.
- Fornaguera Jaime; Gómez Georgina (2004). *Bioquímica: La Ciencia de la Vida*, Costa Rica, Ed. Universidad Estatal a Distancia, pp 98-100.
- García HS., Kim I., Lopez-Hernandez A., Hill Jr. CG. (2008). Enrichment of lecithin with n-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A1. *Grasas Aceites*, 59:368-374.
- Ghosh DK, Bagchi D, Konishi T. (2015). *Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals*, Estados Unidos: CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 52–53.
- Gil Ángel (2010). *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*, Tomo II, 2ª ed, España, Ed. Médica Panamericana, pp 47-50.

Guo Zheng, Vikbjerg Anders, Xu Xuebing (2005). Enzymatic Modification of Phospholipids for Functional Applications and Human Nutrition. *Biotechnology Advances*, 23: 203-259.

Hernández-Martín Estela, Otero Cristina (2008). Selective enzymatic synthesis of lower acylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids. *European Journal Of Lipid Science and Technology*. 110: 325-333.

Hills Matthew, Kiewitt Irmgard, Mukherjee Kumar (1990). Enzymatic Fractionation of Fatty Acids: Enrichment of  $\gamma$ -Linolenic Acid and Docosahexaenoic Acid by Selective Esterification Catalyzed by Lipases. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 67: 561-564.

Huang Yung-Sheng, Ziboh Vincent A. (2001).  *$\gamma$ -Linolenic Acid: Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications*, Estados Unidos, Ed. American Oil Chemists' Society, pp 1-5.

Ju YH, Chen TC (2002). High-purity  $\gamma$ -linolenic acid from borage oil fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 79: 29–32.

Kahveci D., Guo Z., Ozcelik B., Xu X. (2009) Lipase-catalyzed glycerolysis in ionic liquids directed towards diglyceride synthesis. *Process Biochemistry*, 44:1358–1365

Kapoor Manali, Nath Gupta Munishwar (2012). Lipase Promiscuity and Its Biochemical Applications. *Process Biochemistry*, 47: 555-569.

Khodadadi M., Aziz S., St-Louis R., Kermasha Selim. (2013). Lipase-catalyzed synthesis and characterization of flaxseed oil-based structured lipids. *Journal of Functional Foods*, 5: 424-433.

Kim IH., Garcia HS., Hill Jr. CG. (2007). Phospholipase A1-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in n-3 polyunsaturated fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1130-1135.

Kim IH., Garcia HS., Hill Jr. CG. (2010). Synthesis of Structured Phosphatidylcholine Containing n-3 PUFA Residues via Acidolysis Mediated by Immobilized Phospholipase A1. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87: 1293-1299.



Kuang Chow Ching (2008). *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, 3a ed., Estados Unidos, Ed. Taylor & Francis Group. pp 1-10.

Kruger RL., Valerio A., Balen M., Ninow JL., Oliveira JV., Oliveira D., Corazza ML. (2010) Kinetics of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in organic solvent system. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112: 921–927.

Liu, Y.; Guo, Y.; Sun, Z.; Jie, X.; Li, Z.; Wang, J.; Wang, Y.; Xue, C. (2015). Production of structured triacylglycerols containing palmitic acids and docosahexaenoic acids at *sn*-1,3 positions. *Journal of Oleo Science*, 64: 1227-1234.

López-Martínez J.C., Campa-Madrid P., Ramírez-Fajardo A., Esteban-Cerdán L., Guil-Guerrero J.L. (2006). Screening Of Lipases For Enzymatic Concentration of  $\gamma$ -Linolenic Acid (GLA) From Seed Oils. *Journal of Food Lipids*, 13: 362-374.

López-Martínez J.C., Campa-Madrid P., Guil-Guerrero J.L. (2004).  $\gamma$ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97: 294–298.

Mazza G. (2000). *Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicos y de Procesado*, España, Ed. Acribia, pp 6-9.

McMurry J., Castellion M., C, Ballantine D., Hoeger C., Peterson V. (2010). *Fundamentals of General, Organic, and Biological Chemistry*. 6<sup>a</sup> ed., Estados Unidos, Ed. Prentice Hall, pp 757-758.

Miranda Kelhy, Baeza-Jiménez Ramiro, Noriega-Rodríguez Juan A., Otero Cristina and García Hugo S. (2013). Optimization of structured diacylglycerols production containing n-3 via enzyme-catalysed glycerolysis of fish oil. *European Food Research and Technology*. 236: 435 – 440.

Mostofsky David., Yehuda Shlomo, Salem Norman (2001). *Fatty Acids. Physiological and Behavioral Functions*. Estados Unidos, Ed. Springer Science Bussiness Media, pp 403-407.

- Owen C.G., Martin R.M., Whincup C.H., Smith G.D., Cook D.G. (2006). Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 84:1043–54.
- Primo Yúfera Eduardo (2007). *Química Orgánica Básica y Aplicada. De la Molécula a la Industria*, Tomo 2, España, Ed. Reverté, pp 1017-1019.
- Qin X.L., Wang Y.M., Wang YH., Huang H.H., Yang B. (2011). Preparation and characterization of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:5714–5719.
- Rahmatullah Syed, Shukla V., Mukherjee Kumar. (1994).  $\gamma$ -Linolenic Acid Concentrates From Borage and Evening Primrose Oil Fatty Acids via Lipase-Catalyzed Esterification. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 71: 563-567.
- Ramírez Fajardo Antonio. (2005). *Purificación de Ácido Eicosapentaenoico (EPA) Mediante Reacciones Enzimáticas*. Tesis Doctoral, Universidad de Almería.
- Reetz Manfred. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6: 145-150.
- Rosu R., Iwasaki Y., Shimidzu N., Doisaki N., Yamane T. (1998) Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4:191-198.
- Shimada Y., Sakai N., Sugihara A., Fugita H., Honda Y., Tominaga Y. (1998). Large-scale purification of  $\gamma$ -linolenic acid by selective esterification using *Rhizopus delemar* lipase. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75: 1539–1544.
- Syed Ubaid A., Konda Reddy K., Swathy S.L., Singh S.K., Kanjilal S., Prasad R.B.N., Pandey A. (2009) Enrichment of  $\gamma$ -linolenic acid in the lipid extracted from *Mucor zychnae* MTCC 5420. *Food Research International*, 42: 449–453.
- Torres C., Lin B., Hill C. (2002) Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues. *Biotechnology Letters*, 24: 667–673.

Tsao-Jen Lin, Shin-Wan Chen, An-Chan Chang (2006). Enrichment Of n-3 PUFA Contents On Triglycerides Of Fish Oil By Lipase-catalyzed Trans-esterification Under Supercritical Conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 29: 27–34.

Uwe Bornscheuer (2000). *Enzymes in Lipid Modification*, Alemania, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 23-25.

Voet Donald, Voet Judith, Pratt Charlotte (2007). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*, 2ª ed., España, Ed. Médica Panamericana, pp 313-316.

Vollhardt KPC, Schore NE. (2011). *Organic chemistry: structure and function*. 6a ed., Nueva York, Ed. W.H. Freeman; pp 942-943.

Wang C, Li S. Functional Foods and Nutraceuticals. Potential Role in Human Health, Estados Unidos: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 40-45.

Willis Wendy, Lencki Robert, Marangoni Alejandro. (1998). Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 639–674.

Yokochi T, Usita MT, Kamisaka Y, Nakahara T, Suzuki O (1990). Increase in the  $\gamma$ -linolenic acid content by solvent winterization of fungal oil extracted from *Mortierella* Genus. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 67:846–851.

Zaidi A., Gainer J.L., Carta G. (1995). Fatty acid esterification using nylon-immobilized lipase. *Biotechnology Bioengineering*, 48: 601–605.