

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**PURIFICACIÓN DE ÁCIDO
EICOSAPENTAENOICO (EPA) MEDIANTE
REACCIONES ENZIMÁTICAS**

Antonio F. Ramírez Fajardo

Almería, Abril de 2005

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, en general, a todo el conjunto universitario y en particular al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, dirigido por el Dr. D. Emilio Molina Grima, por la oportunidad que me ha brindado para realizar la presente Tesis Doctoral y a todos sus miembros, por su inestimable colaboración. En particular agradezco la financiación recibida por parte del proyecto PPQ2000-120, cuyo responsable es el Dr. D. Gabriel Ación Fernández, sin la cual no hubiese sido posible llevar a cabo esta investigación y a mis directores de Tesis, Dr. D. Alfonso Robles Medina y Dr. D. Luis Esteban Cerdán, por todas sus enseñanzas, su dedicación y su apoyo que han hecho posible la realización de este trabajo.

A D. Fernando Camacho y D. Vicente Bravo, siempre incentivadores como fuentes de formación e inspiración tanto profesional como humana, pues entre otras cosas hicieron de mí un ingeniero químico con ilusión.

A Pedro, por ser cómplice de mis venturas y desventuras a lo largo de estos años, convertirse en mi amigo, mi apoyo, mi consejero y mi maestro no sólo en temas profesionales sino que también de cara a la vida.

A M^a del Mar, que este último año he tenido la suerte de conocer, siempre capaz de un nuevo detalle, genuino y sorprendente, porque ha ganado mi plena confianza y admiración.

A mi familia completa del laboratorio: a los que estaban cuando llegué, como Belén o Baena, y los que han ido llegando, como Estrella o Juan Carlos. Por su ayuda prestada y por hacer de mi entorno de trabajo un lugar más alegre y agradable.

A Emilio por su ánimo, su ejemplo y su contagiosa ilusión.

A Luis Esteban, siempre con sus puertas abiertas, sus oídos dispuestos y una sonrisa de regalo.

A Alfonso, por su exigencia y sus conocimientos.

Al Antonio Giménez, Paco Camacho, Pepe, Gabi, Jose Luis Casas, Asterio, Juanfra, Menta y resto de compañeros becarios y profesores, por su ayuda y su puesta en común de charlas en los descansos, risas en el bar y saludos en los pasillos.

A Antonio Cano, pues gracias a él mi ordenador sigue funcionando.

A los técnicos Luis y Juan y a Miguel Angel, siempre dispuestos a echar una mano y a Cristóbal, que le echamos de menos.

A todos mis seres queridos, fuentes de ilusión que han hecho de mí todo lo que soy. Por su tan enorme derroche hecho conmigo: de apoyo y comprensión en todos los momentos difíciles y de alegría y emoción en tantas celebraciones..

Especialmente a mis padres, mi hermano, tíos y abuelos, por las mil y una oportunidades que me han brindado. Por enseñarme a mirar lejos, por su incondicional apoyo, su ilimitado cariño y su grata compañía..

A la Pin, fuente de luz, por empapar al Pin de plenitud, ilusión y sentido..

Al KHA, la Family y demás compañer@s y amig@s, por el ferviente "pagüer pelusiano" que emana entre nuestros corazones y los cuatro vientos..

A todos vosotros, personajes que habéis hecho de mi vida un mundo interesante, confortable y divertido.

Índice

RESUMEN.....R-1

1. ANTECEDENTES..... 1

1.1. INTRODUCCIÓN..... 3

1.1.1. Objetivos..... 3

1.1.2. Procedimiento..... 4

1.1.2.1. Extracción de lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*..... 4

1.1.2.2. Acondicionamiento de los lípidos saponificables contenidos
en el extracto crudo..... 5

1.1.2.3. Hidrólisis enzimática de distintos aceites y de los extractos de
lípidos saponificables 5

1.1.2.4. Esterificación enzimática de los extractos de ácidos grasos.....5

1.2. ALIMENTOS FUNCIONALES..... 7

1.3. LÍPIDOS..... 9

1.3.1. Grasas y aceites..... 10

1.3.2. Fosfolípidos..... 11

1.3.3. Esteroides (colesterol y otros)..... 12

1.3.4. Carotenoides..... 12

1.3.5. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) 12

**1.4. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAS): NATURALEZA E
INTERÉS**..... 13

1.4.1. Nomenclatura y clasificación..... 13

1.4.2. Biosíntesis y principales funciones en el organismo humano..... 14

1.4.3. Beneficios de los PUFAs en la salud humana..... 16

1.4.3.1. Enfermedades cardiovasculares..... 17

1.4.3.2. Enfermedades que cursan con inflamación.....	18
1.4.3.3. Cáncer.....	19
1.4.3.4. Desórdenes en el desarrollo y funcionamiento del cerebro y la retina.....	19
1.4.3.5. Otros tipos de dolencias.....	20
1.4.4. Estabilidad de los PUFAs.....	21
1.4.5. Fuentes de PUFAs.....	25
1.4.5.1. Aceites de pescado.....	25
1.4.5.2. Microalgas marinas.....	27
1.5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.....	31
1.5.1. Extracción de los lípidos.....	31
1.5.1.1. Lípidos en microalgas.....	31
1.5.1.2. Aspectos a tener en cuenta en la extracción.....	32
1.5.1.3. Procedimientos de extracción de lípidos.....	33
<i>1.5.1.3.1.</i> Método de Folch.....	33
<i>1.5.1.3.2.</i> Método de Bligh y Dyers.....	33
<i>1.5.1.3.3.</i> Método de Kates.....	34
<i>1.5.1.3.4.</i> Otros métodos.....	34
1.5.2. Extracción de los ácidos grasos.....	36
1.5.3. Separación, identificación y cuantificación de los lípidos.....	36
1.5.3.1. Fraccionamiento de los lípidos.....	36
1.5.3.2. Separación de las especies lipídicas: cromatografía en capa fina (CCF).....	37
1.6. TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PUFAS.....	39
1.6.1. Método de los compuestos de inclusión de urea.....	39
1.6.2. Separación de los PUFAs por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	41
1.6.2.1. Cromatografía de adsorción con nitrato de plata	41
1.6.2.2. Cromatografía de partición en fase inversa	41
1.6.3. Extracción con acetona a baja temperatura.....	42

1.6.4. Extracción de PUFAs mediante soluciones acuosas de nitrato de plata.....	42
1.6.5. Formación de sales de los ácidos grasos.....	43
1.6.6. Cristalización fraccionada a baja temperatura.....	43
1.6.7. Extracción y separación de los PUFAs con fluidos supercríticos.....	44
1.6.8. Destilación fraccionada.....	45
1.6.9. Separación de PUFAs y de sus ésteres por cromatografía en columna a presión atmosférica.....	46
1.6.10. Purificación por vía enzimática.....	47
1.7. REACCIONES ENZIMÁTICAS.....	49
1.7.1. Enzimas.....	49
1.7.1.1. Estructura.....	50
1.7.1.2. Características.....	51
1.7.1.3. Clasificación.....	53
1.7.2. Lipasas.....	54
1.7.2.1. Aplicaciones.....	55
1.7.2.2. Inmovilización.....	59
1.7.2.2.1. Inmovilización por unión química.....	60
1.7.2.2.2. Inmovilización por retención física.....	62
1.7.2.3. Especificidades.....	64
1.7.2.3.1. Especificidad por el sustrato.....	65
1.7.2.3.2. Especificidad posicional, regioespecificidad o regioselectividad.....	65
1.7.2.3.3. Especificidad por los ácidos grasos o acil- especificidad.....	67
1.7.2.3.4. Estereoespecificidad.....	69
1.7.3. Reacciones catalizadas por lipasas.....	70
1.7.3.1. Tipos de reacciones.....	70
1.7.3.1.1. Esterificación.....	71
1.7.3.1.2. Hidrólisis.....	72
1.7.3.1.3. Acidolisis.....	73
1.7.3.1.4. Interesterificación.....	74

1.7.3.1.5. Alcoholisis.....	75
1.7.3.2. Variables más importantes para la catálisis en medio no acuoso.....	76
1.7.3.2.1. Influencia del disolvente.....	78
1.7.3.2.2. Influencia del contenido de agua.....	83
1.7.3.2.3. Influencia del soporte de inmovilización de la lipasa.....	86
1.8. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA.....	89
1.8.1. Lipasas que catalizan reacciones en purificación de PUFAs.....	89
1.8.1.1. Actividad.....	89
1.8.1.2. Selectividad.....	89
1.8.2. Hidrólisis enzimática de aceites marinos.....	91
1.8.2.1. Especificidad de las lipasas.....	92
1.8.2.2. Factores más importantes que afectan a la hidrólisis.....	95
1.8.2.3. Hidrólisis enzimática no discriminativa.....	97
1.8.3. Esterificación enzimática selectiva.....	99
1.8.3.1. Especificidad de las lipasas: principales variables.....	99
1.8.3.2. Eliminación de agua.....	100
1.8.3.3. Uso de disolvente orgánico.....	102
1.8.3.4. Esterificación de AGLs con alcoholes de cadena larga: purificación de PUFAs.....	103
1.8.4. Purificación enzimática en dos etapas.....	105
1.8.5. Separación de los productos de reacción.....	107
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>.....	109
2.1. MATERIALES: BIOMASA, ACEITES Y LIPASA EMPLEADA.....	111
2.1.1. Biomasa.....	111
2.1.2. Aceites.....	112
2.1.3. Lipasas.....	116

2.2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA BIOMASA DE <i>PHAEODACTYLUM</i>	
<i>TRICORNUTUM</i>	121
2.2.1. Extracción de lípidos con etanol (96% v/v).....	121
2.2.1.1. Volumen de disolvente: etapas extractivas.....	122
2.2.1.2. Influencia del tiempo: criterio de corte.....	122
2.2.1.3. Tipo y volumen de disolvente en la segunda etapa.....	123
2.2.1.4. Cinética de la segunda etapa: criterio de corte.....	123
2.2.1.5. Número de etapas.....	123
2.2.2. Purificación de los lípidos extraídos.....	124
2.2.2.1. Determinación del porcentaje de agua en el hidroalcohol... ..	124
2.2.2.2. Curva de equilibrio y rendimiento teóricos por etapas.....	124
2.2.2.3. Extracción en etapas de equilibrio.....	125
2.3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.....	126
2.3.1. Obtención de ácidos grasos libres a partir de aceite de hígado de bacalao y de EPAX4510TG.....	126
2.3.1.1. Saponificación de aceites.....	126
2.3.1.2. Extracción con n-hexano.....	126
2.3.2. Obtención de ácidos grasos libres a partir de biomasa microalgal.....	127
2.3.2.1. Saponificación directa de la biomasa microalgal.....	127
2.3.2.2. Extracción de insaponificables.....	127
2.3.2.3. Extracción de los ácidos grasos.....	128
2.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS.....	130
2.5. REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN.....	134
2.6. METODOS ANALÍTICOS.....	138
2.6.1. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	138
2.6.1.1. Metilación de las muestras.....	138
2.6.1.2. Análisis en el cromatógrafo de gases.....	140

2.6.1.3. Análisis de cromatogramas.....	143
2.6.2. Separación de los productos por cromatografía en capa fina.....	145
2.6.2.1. Productos derivados de aceites comerciales.....	146
2.6.2.2. Productos derivados de extractos de <i>P. tricornutum</i>	150
2.6.3. Fraccionamiento lipídico.....	154
2.6.4. Determinaciones volumétricas.....	156
2.6.4.1. Grado de hidrólisis.....	156
2.6.4.1.1. Grado de hidrólisis de aceites comerciales.....	157
2.6.4.1.2. Grado de hidrólisis de extractos de <i>P. tricornutum</i>	157
2.6.4.2. Grado de esterificación.....	157
2.6.5. Análisis de productos de esterificación mediante separación de los ésteres y los AGLs.....	158
2.6.6. Métodos separativos: separación de ésteres y ácidos grasos tras la esterificación	160
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>.....	161
3.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	163
3.1.1. Estudios previos.....	163
3.1.1.1. Hidrólisis enzimática de EPAX4510TG.....	164
3.1.1.1.1. Comparación de los resultados obtenidos con varias lipasas.....	164
3.1.1.1.2. Influencia del disolvente.....	167
3.1.1.1.3. Influencia de la cantidad de lipasa y del tiempo de hidrólisis.....	170
3.1.1.1.4. Influencia de la cantidad de sustrato.....	175
3.1.1.2. Hidrólisis enzimática de aceite de onagra.....	177
3.1.1.3. Hidrólisis enzimática de extracto lipídico de <i>P. tricornutum</i>	179
3.1.2. Elección de la lipasa más adecuada para la hidrólisis de aceites.....	183
3.1.2.1. Caracterización y elección de las lipasas más adecuadas.....	183
3.1.2.2. Influencia de la intensidad de tratamiento sobre el grado de hidrólisis con las lipasas más adecuadas.....	188

3.1.3. Obtención de las condiciones de hidrólisis óptimas para la lipasa AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	193
3.1.3.1. Optimización de la relación entre sustratos.....	193
3.1.3.2. Optimización de la temperatura.....	196
3.1.3.3. Intensidad de tratamiento.....	198
3.1.4. Cinética de la hidrólisis de triglicéridos del EPAX4510TG.....	201
3.2. ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA.....	211
3.2.1. Esterificación de ácidos grasos procedentes de aceite de hígado de bacalao (AHB).....	211
3.2.2. Esterificación de ácidos grasos procedentes de EPAX4510TG.....	218
3.2.3. Análisis de las lipasas seleccionadas: elección de la lipasa más adecuada.....	226
3.2.3.1. Lipasa AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	232
3.2.3.2. Lipasa D de <i>Rhizopus oryzae</i>	237
3.2.3.3. Lipasa EU093 de <i>Rhizopus delemar</i> (Rd).....	241
3.2.4. Optimización de las condiciones de esterificación con la lipasa AK de <i>P. fluorescens</i>	244
3.2.4.1. Procedimiento de inmovilización.....	244
3.2.4.2. Relación molar y temperatura.....	248
3.2.4.3. Adición de agua y temperatura.....	249
3.2.4.4. Relación molar sin agua e intensidad de tratamiento.....	250
3.2.4.5. Relación sustratos/disolvente.....	252
3.2.4.6. Grado de esterificación óptimo.....	255
3.2.4.7. Esterificaciones sucesivas.....	259
3.2.5. Esterificación selectiva de extractos de AGLs de <i>P. tricornutum</i>	260
3.2.6. Cinética de la esterificación de AGLs ricos en EPA mediante alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de <i>P. fluorescens</i>	266
3.3. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA BIOMASA DE <i>P. TRICORNUTUM</i>	281
3.3.1. Caracterización de la biomasa microalgal.....	281
3.3.2. Extracción de lípidos de la biomasa	281

3.3.2.1. Aumento del tiempo de extracción y modificación del procedimiento de lavado.....	284
3.3.2.2. Extracción en dos etapas y lavado con hexano o etanol.....	285
3.3.2.3. Extracción en tres etapas	286
3.3.2.4. Influencia del volumen de disolvente y del tiempo de extracción	287
3.3.2.5. Fin de la primera etapa de extracción y estudio de la segunda	289
3.3.2.6. Fin de la segunda etapa de extracción	291
3.3.2.7. Tercera etapa extractiva.....	292
3.3.3. Purificación de los extractos lipídicos	293
3.3.3.1. Optimización del contenido de agua en la mezcla hidroalcohólica	293
3.3.3.2. Optimización de la extracción de los lípidos con hexano.....	297
4. <u>CONCLUSIONES</u>.....	205
4.1. Hidrólisis enzimática.....	307
4.2. Esterificación enzimática selectiva.....	308
4.3. Extracción de lípidos	310
5. <u>FUTURO</u>.....	311
<u>NOMENCLATURA</u>.....	315
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>.....	323
<u>ANEXO 1: RESULTADOS DE HIDRÓLISIS</u>.....	Cd anexo
<u>ANEXO 2: RESULTADOS DE ESTERIFICACIÓN</u>.....	Cd anexo

Resumen

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) tienen importantes funciones fisiológicas como tales ácidos libres o como triglicéridos. En el grupo de investigación de Biotecnología de Microalgas Marinas de la Universidad de Almería se han puesto a punto métodos para su obtención con alta pureza a partir de aceites de pescado y de microalgas marinas. Estos métodos han sido seleccionados fundamentalmente en función de su eficiencia, es decir, de su viabilidad técnica, rendimientos, purezas obtenidas, etc.

Este trabajo se engloba dentro de un proyecto de obtención de PUFAs marcados con isótopos estables de carbono 13 procedentes de la biomasa de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. El ácido graso mayoritario de los lípidos de esta biomasa es el ácido eicosapentaenoico (EPA, 23%), que es un PUFA n-3, con numerosos beneficios descritos para la salud, y que está presente en aceites de origen marino y biomasa de microalgas.

La concentración de PUFAs a partir de extractos de ácidos grasos libres (AGLs) se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio por distintos procedimientos, como el método de los compuestos de inclusión de urea y la cromatografía líquida. En este trabajo se abordó la concentración de EPA mediante reacciones enzimáticas. Por lo tanto, un primer objetivo de este trabajo es tratar de concentrar el EPA aprovechando la posible selectividad de distintas lipasas por este PUFA, para concentrarlo en una determinada fracción lipídica.

Sin embargo, las industrias farmacéutica y agroalimentaria, que son las que demandan estos PUFAs, buscan, cada vez más, métodos saludables de obtención que preserven al máximo la estabilidad de los PUFAs y sean poco contaminantes. En el presente trabajo se aborda el estudio de las etapas de un proceso de obtención y concentración de PUFAs que cumpla estos requisitos, además de proporcionar la mayor eficiencia posible. Estas etapas son:

- hidrólisis enzimática de triglicéridos ricos en EPA,
- esterificación enzimática selectiva de ácidos grasos ricos en EPA y
- extracción y purificación de los lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*.

1.- Hidrólisis enzimática

La obtención de PUFAs y de ácidos grasos libres (AGLs) en general a partir de extractos lipídicos puede hacerse por saponificación alcalina a temperaturas de 60-80 °C o por hidrólisis enzimática. Numerosos autores han puesto de manifiesto que este último método es una alternativa atractiva ya que se realiza en condiciones más suaves (30-45 °C, pH 6-7), que evitan los riesgos de isomerización de los PUFAs y produce aguas residuales menos contaminadas. Además, dado el carácter específico de las lipasas, los procesos enzimáticos podrían presentar la ventaja de discriminar o seleccionar entre los diferentes ácidos grasos, de forma que los PUFAs (o más concretamente el EPA) se concentrasen durante la acción hidrolítica de las lipasas.

Antes de emplear triglicéridos procedentes de microalgas, la hidrólisis enzimática se ha puesto a punto empleando otros aceites que resultaban más fáciles de obtener y de manipular, como el aceite comercial EPAX4510TG, con un 45% de EPA. Con estos aceites se han determinado las condiciones de partida más adecuadas, se han ensayado diferentes enzimas y se han optimizado las condiciones de operación del proceso para, posteriormente, aplicar estas condiciones a extractos lipídicos de la biomasa microalgal.

En primer lugar se han realizado estudios previos, en los que se han buscado unas condiciones de partida comunes para las lipasas a ensayar, que hicieran posible trabajar con cantidades pequeñas de sustrato y en ausencia de disolvente.

Encontradas las condiciones de partida apropiadas, se ha comparado la acción hidrolítica de nueve lipasas. En las condiciones generales planteadas todas las lipasas ensayadas, excepto la de *Candida rugosa*, presentaron algún grado de discriminación en la hidrólisis de EPA a bajas intensidades de tratamiento (horas de incubación × mg de lipasa utilizada) y, por tanto, a bajos grados de hidrólisis. Así pues, hasta aproximadamente el 15% de AGLs hidrolizados, las lipasas de *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaliginese*,

Alcaligines spp., *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas cepacia*, hidrolizan el EPA claramente a menor velocidad que el resto de los ácidos grasos y lo concentran en la fracción de glicéridos sin hidrolizar.

Sin embargo, todas las lipasas hidrolizan apreciablemente el EPA a medida que aumenta la intensidad de tratamiento, aumentando el porcentaje de EPA en los ácidos grasos libres a medida que aumenta el grado de hidrólisis. Es decir, los factores de concentración del EPA (relación entre las concentraciones de EPA en los AGLs obtenidos y en los glicéridos iniciales) pasan desde valores menores de 0,3, a bajas intensidades de tratamiento (lo que representa cierta concentración del EPA en la fracción de glicéridos sin hidrolizar), hasta valores próximos a uno cuando la hidrólisis se acerca al equilibrio. Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, la hidrólisis de los glicéridos no puede considerarse como un método apropiado para concentrar el EPA. Sin embargo, la hidrólisis enzimática sí que puede considerarse como un método muy adecuado para obtener ácidos grasos libres. En este sentido, las lipasas de *Rhizopus oryzae*, *Alcaligines spp.*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas cepacia* son las más apropiadas para obtener ácidos grasos libres con alto contenido en EPA. Estas cuatro lipasas presentan los grados de hidrólisis más altos (71,2, 76,5, 75,2 y 69,7, respectivamente) y los mayores rendimientos de recuperación del EPA en la fracción de AGLs formados (71,0, 72,1, 70,4 y 63,9, respectivamente) para una intensidad de tratamiento de 2500 mg de lipasa × hora.

Optimizando las condiciones de operación (relación agua/aceite, temperatura e intensidad de tratamiento) de la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* se han alcanzado grados de hidrólisis superiores al 80% y rendimientos de obtención de EPA en la fracción de AGLs del 77%, que son resultados competitivos con los obtenidos mediante técnicas no enzimáticas.

Los resultados obtenidos (grados de hidrólisis y fracciones molares de EPA en los AGLs, con respecto al EPA total) con las cuatro mejores lipasas se han ajustado a un modelo cinético simple que se basa en considerar que la velocidad de hidrólisis es proporcional al alejamiento del equilibrio. Se trata de un modelo

empírico, pero que permite estimar valores para las constantes cinéticas aparentes de hidrólisis. El modelo permite estimar los grados de hidrólisis y las fracciones molares de EPA como ácido graso libre que se pueden obtener con distintas intensidades de tratamiento y puede utilizarse como criterio para el escalamiento de los reactores discontinuos mezcla perfecta en que se ha llevado a cabo la hidrólisis.

Además de la hidrólisis del aceite EPAX4510TG (rico en EPA), también se ha realizado la hidrólisis enzimática de un aceite de onagra (rico en ácido γ -linolénico, GLA) y de extractos lipídicos de la microalga *P. tricornutum* obtenidos por el método de Kates (1988) (cloroformo-metanol). En el primer caso se obtuvieron altos rendimientos en la hidrólisis. Sin embargo la hidrólisis enzimática de los extractos lipídicos microalgales originó numerosas dificultades de operación y de análisis (tanto por volumetría ácido-base como por cromatografía en capa fina, CCF).

2.- Esterificación enzimática selectiva

Diferentes autores han descrito que algunas enzimas muestran acil-selectividad en la esterificación de ácidos grasos con alcoholes. La esterificación preferente de otros ácidos grasos ha permitido un enriquecimiento de algunos PUFAs, como el ácido γ -linolénico (GLA) o el ácido docosohexaenoico (DHA), en la fracción de ácidos grasos sin esterificar. Sin embargo, no se han encontrado referencias bibliográficas previas en las que la esterificación enzimática selectiva se aplique para tratar de concentrar el EPA, ni tampoco se ha aplicado esta técnica a extractos de ácidos grasos de microalgas.

En primer lugar se realizaron experimentos de esterificación enzimática de ácidos grasos libres de aceite de hígado de bacalao (rico en EPA y DHA) con dos alcoholes (etanol y dodecanol o alcohol láurico) y distintos contenidos de agua. Los mejores resultados se obtuvieron con alcohol láurico añadiendo agua (en torno al 2,5% v/v con respecto la mezcla de reacción), comprobándose que la

longitud de la cadena carbonada del alcohol y el contenido de agua son importantes para la selectividad enzimática en la esterificación de ácidos grasos.

A continuación se han ensayado hasta nueve lipasas para la concentración de EPA, esterificando un extracto de AGLs de EPAX4510TG con dodecanol en relación molar 1:2, usando hexano como disolvente y diferentes temperaturas. En las condiciones indicadas, varias lipasas muestran discriminación hacia el EPA con respecto a los demás AGLs en su esterificación por el alcohol, de forma que el EPA se concentra en la fracción de AGLs. De esta manera, por un lado, las lipasas QLM de *Alcaligines spp* y EU-093 de *Rhizopus delemar* proporcionaron los mayores grados de concentración (relación entre las concentraciones de EPA en los AGLs que quedan tras la esterificación y en los AGLs iniciales), que fueron, respectivamente, de 1,60 (a 55 °C) y de 1,47 (a 40 °C). Sin embargo, con estas lipasas los rendimientos de recuperación de EPA en los AGLs fueron bajos (en torno al 16 y al 45%, respectivamente). Por otro lado, las lipasas AK de *Pseudomonas fluorescens* y D de *Rhizopus oryzae*, a pesar de no presentar grados de concentración tan elevados (1,32 y 1,27, respectivamente), presentan rendimientos de recuperación de EPA superiores (84% para la AK, a 55 °C, y 66,7% para la lipasa D, a 40 °C). De estos experimentos se seleccionaron las tres lipasas que se consideraron más idóneas para concentrar el EPA por esterificación, que fueron las lipasas AK de *P. fluorescens*, EU-093 de *R. delemar* y D de *R. oryzae*.

En el párrafo anterior se ha puesto de manifiesto que los criterios para seleccionar las mejores lipasas y también las mejores condiciones de operación fueron obtener altos factores de concentración y altos rendimientos de recuperación de EPA en la fracción de ácidos grasos libres. Para unificar ambos parámetros se ha definido el factor adimensional de eficacia (F_{AE}), que es el producto de los factores de concentración y del rendimiento de recuperación de EPA, ambos valorados de 0 a 1. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que la acil-selectividad de las lipasas hacia el EPA (o cualquier otro ácido graso) se debe a que éstas esterifican el EPA a una velocidad menor a la velocidad de esterificación del resto de los ácidos grasos, por lo que, a medida que aumenta el

grado de esterificación, también se esterificará el EPA e irá disminuyendo el valor del F_{AE} . Teniendo en cuenta esto, se ha llevado a cabo un estudio detallado de la variación del F_{AE} con el grado de esterificación para las tres lipasas seleccionadas en diferentes condiciones de operación. De esta manera se ha estudiado su especificidad en un abanico amplio de grados de esterificación y se han podido obtener las condiciones más favorables. Así, la mayor eficacia para la purificación de EPA se ha conseguido con la lipasa AK de *P. fluorescens*, con la que el mayor F_{AE} que se ha conseguido ha sido cuando el grado de esterificación alcanzó el 45% (prediciéndose un F_{AE} máximo para grados de esterificación superiores, 55-75%). Para este grado de esterificación, el contenido de EPA en los AGLs se ha llegado a incrementar desde un 43% hasta un 64% p/p, con una recuperación del 84% del EPA inicial en la fracción no esterificada. Estos resultados se han obtenido en las siguientes condiciones: 178 mg de aceite EPAX4510TG, 222 mg de alcohol láurico (relación molar alcohol láurico/aceite 2), 4 ml de n-hexano (relación aceite/n-hexano 44,5 mg/ml), 40 °C, 24 horas y 320 mg de lipasa AK (relación lipasa/aceite 1,80 g/g) inmovilizada sobre Celite, con una relación lipasa/soporte igual a 0,67 p/p. La cantidad de lipasa utilizada puede resultar excesiva, pero siempre podrá emplearse una cantidad menor y un tiempo mayor.

A continuación se llevó a cabo un estudio más detallado de la cinética de la esterificación con la lipasa AK, para determinar la influencia de las principales variables de operación (inmovilización, temperatura, relación molar entre sustratos, relación disolvente/sustrato y cantidad de agua añadida) sobre el grado de esterificación. Las condiciones en las que se obtuvieron los mayores grados de esterificación (83%) fueron: 40 mg de lipasa de *P. fluorescens* sin inmovilizar, 24 horas, relación molar alcohol/AGLs igual a 2, 55 °C, relación sustratos/hexano p/v igual a uno. Correlacionando el factor adimensional de eficacia con el grado de esterificación se obtuvo el valor óptimo de esta última variable (60%) que permitió alcanzar un buen enriquecimiento de EPA en la fracción de AGLs (73,2%) con una buena recuperación del mismo (72,6%). Este resultado se puede

conseguir en las condiciones descritas anteriormente, pero a 40 °C y con una intensidad de tratamiento en torno a 820 (mg de lipasa × hora).

También se realizaron experimentos en ausencia de disolvente, obteniéndose velocidades de esterificación menores pero grados de esterificación en el equilibrio iguales a los obtenidos con disolvente. Así, el equilibrio con y sin hexano se obtiene prácticamente a los mismos valores de la relación intensidad de tratamiento / masa de sustrato.

Finalmente, las mejores condiciones encontradas para la purificación de EPA a partir de EPAX4510TG (400 mg de mezcla de sustratos en relación molar 1:2, disueltos en 4 ml de n-hexano, sin agua añadida y a 40 °C) se han aplicado a extractos de ácidos grasos procedentes de la microalga *P. tricornutum*. Con este sustrato se estudió la influencia de la intensidad de tratamiento sobre la pureza y el rendimiento en EPA. Así, con una intensidad de tratamiento de 2200 (mg de lipasa × hora) el grado de esterificación fue del 78% y más del 76% del EPA se recuperó en la fracción de AGLs sin esterificar, con un 71-74% de pureza.

También los resultados obtenidos con la lipasa AK (grados de esterificación y fracciones molares de EPA en los ésteres, con respecto al EPA total) se han ajustado a un modelo cinético simple igual al utilizado para ajustar los resultados de la hidrólisis enzimática, y que se basa en considerar que la velocidad de esterificación es proporcional al alejamiento del equilibrio. Se trata de un modelo empírico, pero que permite estimar valores para las constantes cinéticas aparentes de esterificación. El modelo permite estimar los grados de esterificación y las fracciones molares de EPA como éster que se pueden obtener con distintas intensidades de tratamiento y puede utilizarse como criterio para el escalamiento de los reactores discontinuos mezcla perfecta en que se ha llevado a cabo la esterificación.

3.- Extracción y purificación de lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*

Tradicionalmente, la extracción de lípidos de microalgas se ha realizado mediante el procedimiento de Bligh & Dyer (1959), modificado por Kates (1988), que utiliza cloroformo y metanol como disolventes extractores. Sin embargo, estos disolventes son muy tóxicos y, además, dificultan la hidrólisis posterior de los triglicéridos extraídos, así como el análisis de los productos de estas hidrólisis. Por lo tanto se ha buscado un método alternativo para obtener extractos lipídicos, que utilizara disolventes menos tóxicos y que también produjera extractos menos pigmentados con rendimientos en lípidos semejantes. En este sentido, se ha elegido el sistema etanol (96% v/v)-hexano, realizándose la extracción en dos etapas: (i) extracción de lípidos de la biomasa liofilizada usando etanol (96% v/v) y (ii) adición de agua y hexano para transferir los lípidos a la fase hexánica, donde quedarán concentrados con un mayor grado de pureza.

La extracción de los lípidos de la biomasa de *P. tricornutum* se hizo agitando las mezclas etanol (96% v/v)-biomasa, a temperatura ambiente, en dos etapas de 10 horas de duración cada una, utilizando 5 ml y 3 ml de etanol por gramo de biomasa liofilizada en la primera y segunda etapa, respectivamente. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento en lípidos saponificables máximo superior al 90%.

Para la purificación de este extracto lipídico, en primer lugar se optimizó el contenido de agua de la fase hidroalcohólica y a continuación se optimizó la relación hexano/extracto lipídico y el número de etapas de extracción. Mediante cinco extracciones consecutivas de una mezcla hidroetanólica (40% en agua, p/p) con hexano en una relación hexano/disolución hidroalcohólica 5:1, v/v se consiguieron recuperar del orden del 95% de los lípidos contenidos en dicho extracto.

También se obtuvieron las concentraciones de equilibrio de distribución de los lípidos saponificables entre las fases hexánica e hidroalcohólica (40% en agua, p/p). Utilizando estos datos de equilibrio es posible predecir los rendimientos de

extracción de lípidos con distintas relaciones hexano/disolución hidroalcohólica y distinto número de etapas de extracción, comprobándose que los rendimientos predichos y los experimentales son prácticamente idénticos.

El proceso de extracción puesto a punto es una alternativa a los métodos tradicionales de extracción de lípidos y permite un ahorro considerable de disolventes.

1.-Antecedentes

1.1.- INTRODUCCIÓN

En trabajos previos llevados a cabo por este grupo de investigación (Molina Grima y cols., 1996; Robles Medina y cols., 1995a y b, 1998, 1999; López Alonso y cols., 1996; Giménez Giménez y cols., 1998; García Sánchez y cols., 1993; Esteban Cerdán y cols., 1997; Ibáñez González y cols., 1998; Belarbi y cols., 2000) se han puesto a punto métodos para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de alta pureza a partir de microorganismos, fundamentalmente microalgas marinas. Estos métodos han sido seleccionados exclusivamente en virtud a su eficiencia (viabilidad técnica, rendimientos y purezas obtenidas, etc).

Sin embargo, las industrias farmacéutica y agroalimentaria, que son las que demandan estos PUFAs, lo hacen, cada vez más, atendiendo a la biocompatibilidad y a los aspectos medioambientales del método de obtención. Por tanto, en la actualidad, los productos que consideren estos aspectos en su método de obtención adquirirán un mayor valor añadido para estas industrias.

Por otra parte, este trabajo es una de las tareas del proyecto “Producción y purificación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) marcados con carbono 13 a partir de microalgas (PUFAsC13)” (Ref. PPQ2000-1220), concedido por los Ministerios de Educación y Cultura y de Ciencia y Tecnología. Esta tarea consistía básicamente en obtener concentrados de ácido eicosapentaénico (EPA) de la biomasa de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* y se abordó dividiéndola en al menos dos etapas:

- Extracción de los lípidos de la biomasa de *P. tricornutum* y
- Concentración del EPA mediante reacciones catalizadas por lipasas.

1.1.1.- OBJETIVOS

Así pues, el objetivo de este trabajo es desarrollar un proceso para la obtención de concentrados de PUFAs a partir de microalgas marinas y de aceites de pescado, que sea suave, natural y poco contaminante, además de proporcionar la mayor eficiencia posible. Este proceso deberá tener en cuenta estos aspectos tanto en la obtención de PUFAs a partir de la biomasa de microalgas (como *Phaeodactylum tricornutum*) y de aceites de pescado, como en la posterior concentración de estos PUFAs.

Aprovechando las selectividades naturales que presentan algunas lipasas se pueden concentrar determinados PUFAs en los reactivos o productos de determinadas reacciones enzimáticas. De esta manera, la concentración de los PUFAs por vía enzimática (a través de reacciones de hidrólisis, esterificación, alcoholisis, etc. catalizadas por lipasas) permitirá obtener estos concentrados en condiciones suaves que garanticen su estabilidad y presenten ventajas para la salud y el medio ambiente.

El proceso enzimático que, según la revisión bibliográfica efectuada, se perfiló como el más eficaz para los objetivos de este trabajo, fue la hidrólisis de los extractos lipídicos para obtener ácidos grasos libres (AGLs), seguida de la esterificación de los mismos con un alcohol, estando ambas reacciones catalizadas por lipasas.

Por otro lado, la extracción y purificación de los lípidos de la biomasa de la microalga *Phaeodactylum tricorutum* (de alto contenido en ácido eicosapentaenoico, EPA) se ha realizado a temperatura ambiente, empleando etanol del 96% (v/v) y n-hexano. Se trata de un método más fácil y seguro y menos contaminante que los empleados tradicionalmente.

En este trabajo se ha llevado a cabo la optimización de estos procesos, con el objetivo de hacer máximos sus rendimientos, de forma que pueda alcanzarse una solución competitiva con los métodos vigentes.

1.1.2.- PROCEDIMIENTO

De esta forma, el trabajo realizado se estructuró en las siguientes partes:

1.1.2.1.- Extracción de lípidos de la biomasa de *P. tricorutum*

Optimización de las condiciones de la extracción de lípidos de la biomasa de *Phaeodactylum tricorutum* con etanol 96%.

- a) Selección de biomasa liofilizada de *Phaeodactylum tricorutum* con un contenido mínimo de EPA del 20%, mediante el análisis de muestras de biomasa procedentes de los cultivos obtenidos en un fotobiorreactor tubular externo.
- b) Análisis de las diversas variables que afectan al proceso de extracción de lípidos: volumen de disolvente, número de etapas de extracción,

utilización de otros disolventes distintos del etanol 96%, tiempos de extracción, lavados, tipos de contacto, etc.

1.1.2.2.- Purificación de los lípidos contenidos en el extracto crudo

Optimización de las condiciones para la limpieza del extracto bruto generando un sistema bifásico mediante la adición de agua y hexano.

- a) Obtención de extracto bruto con etanol 96%.
- b) Análisis de las diversas variables que afectan al proceso de limpieza: contenido en agua, relación disolvente extractor/refinado, número de etapas, etc.

1.1.2.3.- Hidrólisis enzimática de distintos aceites y de los extractos de lípidos saponificables

Optimización de las condiciones de la hidrólisis enzimática de los aceites y de los extractos lipídicos.

- a) Selección de la mejor lipasa para la hidrólisis de aceites de alto contenido en EPA.
- b) Análisis de las diversas variables que afectan a la hidrólisis enzimática de estos aceites: tipo y cantidad de disolvente orgánico, temperatura, cantidad de enzima, relación agua/(aceite o extracto lipídico), velocidad de agitación y tiempo de incubación.
- c) Hidrólisis enzimática de los lípidos saponificables extraídos de la biomasa de *P. tricornutum*.

1.1.2.4.- Esterificación enzimática de los extractos de ácidos grasos

Optimización de las condiciones de la esterificación enzimática de los extractos de ácidos grasos ricos en PUFAs.

- a) Obtención de extractos de AGLs ricos en EPA mediante saponificación directa de aceites comerciales con alto contenido en los mismos.
- b) Selección de la mejor lipasa para la esterificación selectiva de extractos de ácidos grasos de alto contenido en EPA.

- c) Análisis de las diversas variables que afectan a la esterificación con esa lipasa: inmovilización de la misma, tipo de disolvente orgánico, temperatura, cantidad de lipasa, relación alcohol/ácidos grasos, contenido de agua, velocidad de agitación y tiempo de incubación.
- d) Esterificación selectiva de concentrados de PUFAs de procedencia microalgal para la obtención de los ésteres ricos en PUFAs.

1.2.- ALIMENTOS FUNCIONALES

A mediados de la década de los ochenta surgió en Japón un nuevo concepto en el campo de la industria alimentaria: los “alimentos funcionales”. El envejecimiento progresivo de la población japonesa, junto con el incremento de los gastos sanitarios, hizo que el gobierno japonés se planteara la necesidad de fomentar programas de desarrollo de productos alimentarios que pudieran ejercer un efecto positivo sobre la salud y reducir a largo plazo los ingentes gastos del sistema de salud. Nacieron así los denominados “alimentos funcionales” (“Functional foods” es una abreviación del nombre “Physiologically Functional Foods”).

De esta manera, al iniciarse el nuevo milenio, se ha hecho presente con cada vez mayor intensidad una nueva área en el campo de las ciencias de los alimentos y de la nutrición: el área de la interacción alimentos-medicina, cada vez más reconocida como la de los "alimentos funcionales", Hollingworth (1997).

En Estados Unidos, en este área, dentro de los componentes alimenticios se suelen diferenciar entre los nutrientes esenciales, necesarios para el mantenimiento de la vida y de la salud, y los compuestos no esenciales para la vida, pero que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas. La idea de la formulación de alimentos en base a los beneficios que sus componentes no esenciales pueden proveer para la salud fue considerada inicialmente como una curiosidad pasajera, sin embargo hoy día se ha convertido en una área de mucho interés para las grandes compañías de alimentos, Best (1997), Hollingworth (1997).

El concepto tradicional de que para el mantenimiento de una salud óptima la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas sólo de nutrientes esenciales ha cambiado en los últimos años. Este cambio se debe a la evidencia cada vez más fuerte de que los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que, al igual que los nutrientes esenciales, contribuyen a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y, por tanto, son necesarias para una vida saludable, Caragay (1992). Excepto algunos nutrientes reconocidos, la mayoría de tales sustancias alimentarias permanecen sin ser completamente caracterizadas en cuanto a sus funciones fisiológicas.

En Europa, aunque no existe acuerdo general sobre qué son los alimentos funcionales, se acepta la definición del término propuesta por el profesor M.

Robertfroid de la Universidad Católica de Lovaina, que dice que un alimento puede convertirse en alimento funcional utilizando una de las siguientes vías:

1. Eliminar un componente conocido que cause un efecto no beneficioso cuando se consume (por ejemplo, una proteína alergénica).
2. Aumentar la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta un nivel que produzca un efecto deseado.
3. Añadir un componente que normalmente no se encuentra presente en la mayoría de los alimentos y que no necesariamente es un macronutriente o un micronutriente (componentes “no esenciales”), pero para el cual se ha encontrado un efecto beneficioso (por ejemplo, antioxidantes no vitamínicos o carbohidratos prebióticos).
4. Reemplazar un componente, usualmente un macronutriente (por ejemplo, grasas) cuya ingesta es normalmente alta y que causa un efecto nocivo, por otro macronutriente de efecto beneficioso para el organismo (por ejemplo, fibra).
5. Aumentar la biodisponibilidad o la estabilidad de un componente que produzca un efecto beneficioso o que reduzca el riesgo de padecer una determinada enfermedad.

Por tanto, el valor añadido de los alimentos funcionales desde el punto de vista farmacológico es fundamentalmente preventivo, ya que por sí solos no curan enfermedades. Es decir, su propiedad funcional está relacionada con el papel metabólico, estructural o fisiológico sobre el crecimiento, desarrollo, mantenimiento y otras funciones normales del organismo.

La utilización de la Biotecnología en el campo de los alimentos funcionales y la nutrición clínica se centra en la obtención de compuestos de interés nutricional y/o farmacológico que pueden ser incorporados en la dieta o dietas específicas. Para ello se tratan de implementar los conocimientos del proceso digestivo y de los mecanismos de absorción intestinal en el desarrollo y producción de dichos alimentos por parte de la Industria Alimentaria.

Puesto que la finalidad primaria de la alimentación es la nutrición, la fabricación de estos alimentos especiales no es sólo necesaria en lactantes y adultos con sus capacidades digestivas y de absorción intestinal disminuidas, sino que también puede contribuir al desarrollo de alimentos con una composición en nutrientes más equilibrada y más sanos para la alimentación humana en general.

1.3.- LÍPIDOS

Los lípidos son un grupo muy heterogéneo de compuestos orgánicos, constituidos principalmente por carbono, hidrógeno y oxígeno, y además, en ocasiones, por azufre, nitrógeno y fósforo.

Los lípidos desempeñan muchas funciones en los organismos vivos. No sólo son la principal forma de reserva de energía metabólica, sino que también son precursores de gran número de biomoléculas esenciales; además los glucolípidos y fosfolípidos son los componentes principales de las membranas biológicas. Las **funciones** de los lípidos se pueden clasificar en la forma siguiente:

- a) **Energética.** Los triglicéridos proporcionan al metabolizarse oxidativamente 9 kcal/g, más del doble de la energía producida por los glúcidos, debido a su mayor grado de reducción. Además pueden acumularse y ser utilizados como material de reserva en las células adiposas, con el consiguiente efecto ahorrador, ya que las reservas de lípidos almacenan seis veces más energía metabólica que el mismo peso de carbohidratos hidratados, debido a que los lípidos son no polares y se almacenan en estado anhidro, mientras que los carbohidratos se almacenan en forma hidratada, conteniendo en agua el doble de su peso seco.
- b) **Estructural.** Fosfolípidos y colesterol forman parte de las membranas biológicas, contribuyendo a las características funcionales de las mismas.
- c) **Transporte.** La grasa dietética es necesaria para el transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E y K, y para la absorción intestinal de las mismas.
- d) **Reguladora.** El colesterol es precursor de compuestos de gran importancia biológica, como hormonas sexuales o suprarrenales y vitamina D, que interviene en la regulación del metabolismo del calcio.
- e) **Otras.** Además de estas funciones, las grasas de la dieta son fundamentales para apreciar el gusto y aroma de los alimentos, así como también contribuyen a la sensación de saciedad tras la ingestión de los mismos.

En los alimentos existen fundamentalmente tres tipos de lípidos: grasas o aceites (también llamados triglicéridos o triacilglicéridos), fosfolípidos y ésteres de colesterol. Todos estos lípidos muestran un componente común, los **ácidos grasos**, que son moléculas orgánicas formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Presentan una cadena hidrocarbonada, apolar, en cuyo extremo se halla un grupo ácido (-COOH), aunque su carácter ácido suele ser débil. Dependiendo de su estructura química se clasifican en:

- a) **Ácidos grasos saturados**. Aquellos en los que sus átomos de carbono presentan enlaces sencillos entre sí y las restantes valencias están saturadas con enlaces a átomos de hidrógeno.
- b) **Ácidos grasos monoinsaturados**. Son aquellos en los que dos de sus átomos de carbono tienen un enlace doble entre sí.
- c) **Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs de *PolyUnsaturated Fatty Acids*)**. Son aquellos que presentan dos o más dobles enlaces.

A continuación, para los lípidos más habituales, se comentan algunas de las características principales que se encuentran en los libros de bioquímica básica.

1.3.1.- GRASAS Y ACEITES

En general, los aceites y las grasas (visibles o de depósito) constituyen un 94% en peso de los lípidos totales de la dieta y están formados casi exclusivamente por triglicéridos, que contienen tres ácidos grasos unidos por medio de un enlace éster a una molécula de glicerol.

Las grasas a temperatura ambiente son sólidas ya que están compuestas principalmente por ácidos grasos saturados, que les confieren una temperatura de fusión más alta que la ambiental. Por el contrario, los aceites a temperatura ambiente son líquidos debido a la mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que contienen.

Las grasas y los aceites son unos de los nutrientes esenciales para el ser humano. Las grasas son buenas y necesarias para el buen funcionamiento del organismo siempre que su consumo se realice en la cantidad y calidad adecuada. La FAO y la OMS han recomendado que para la mayor parte de los adultos la grasa de la dieta debe proporcionar al menos el 15% del total de la ingesta energética. Este porcentaje sube al 20% en mujeres en edad reproductiva y debe oscilar entre un 40 y un 50% en

lactantes y niños de corta edad. Además, para lactantes y niños de corta edad es importante que la distribución de ácidos grasos sea similar a la de la leche materna. En individuos adultos sanos el consumo de grasas nunca debe suponer más del 35% de la energía total, y el consumo de grasas saturadas no debe exceder del 10% de la energía total (FAO/WHO, 1994).

Además de su función energética, las grasas y aceites tienen una importante función plástica y estructural. También aportan junto a ellas vitaminas liposolubles: vitaminas A, D, E y K. Como ya se ha dicho, una ingesta adecuada de grasa en cantidad y calidad es de particular importancia, antes y durante el embarazo y la lactancia, así como durante la infancia. Por otra parte, durante la vida adulta y la vejez, el consumo de ciertos tipos de grasas determina en gran medida la aparición y prevalencia de multitud de enfermedades, muy especialmente las de tipo cardiovascular (FAO/WHO, 1994).

Las grasas y los aceites se dividen en dos grupos, las **grasas saturadas** (principalmente grasas animales y algunas vegetales) y las **grasas insaturadas** (vegetales, aceite de oliva, pescado). Un consumo elevado de grasas saturadas puede suponer trastornos en la salud del consumidor ya que, por ejemplo, son responsables en parte del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Por el contrario, el consumo en la cantidad suficiente de grasas insaturadas constituye un aliado en la prevención de éstas y de otras enfermedades.

Actualmente en el mundo occidental existe un consumo excesivo de carnes, embutidos, bollería industrial y platos preparados, lo que contribuye a que exista un desequilibrio alimenticio, con una excesiva ingesta de grasa saturada frente a una disminución en el consumo de grasas insaturadas, Carmena y cols. (1989). Ello supone un reto que están afrontando los sistemas de salud y la industria alimentaria de los países desarrollados, tanto a nivel político como tecnológico, Simopoulos (2001).

1.3.2.- FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos, 5% del aporte total de lípidos de la dieta, constituyen un aporte de ácidos grasos de menor importancia que los triglicéridos. No obstante, intervienen en funciones de transporte de lípidos en el plasma (lipoproteínas) y desempeña un importante papel en la constitución de las membranas celulares debido a que los dos extremos de una molécula de fosfolípido son física y químicamente diferentes (uno

es hidrófilo y otro hidrófobo), lo que les permite formar bicapas lipídicas. También forman parte de la vaina de mielina de las neuronas.

1.3.3.- ESTEROIDES (COLESTEROL Y OTROS)

Constituye aproximadamente un 1% de los lípidos de la dieta. Su estructura es completamente diferente a la de los ácidos grasos. El principal esteroide es el colesterol. Aunque no es considerado un nutriente esencial, es fundamental a nivel celular para la formación de la membrana celular y forma parte de algunas lipoproteínas. Además, actúa como precursor en la síntesis de hormonas sexuales (testosterona) y suprarrenales (cortisol), así como de ácidos biliares, precursores de sales biliares necesarias para la emulsión y posterior absorción de las grasas.

1.3.4.- CAROTENOIDES

Los carotenoides se clasifican junto a los lípidos porque son insolubles en agua y su consistencia es aceitosa. Están compuestos por cinco subunidades de carbono conocidas como isopreno. El principal es el β -caroteno, precursor de la vitamina A.

1.3.5.- ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAS)

Los ácidos grasos poliinsaturados son compuestos orgánicos cuyas funciones en el organismo son las de reserva energética celular, como componentes de las membranas celulares y como precursores de biomoléculas esenciales. Tienen una estructura de cadena larga, generalmente 18 ó más átomos de carbono. Los más comunes, que se encuentran en los lípidos de plantas, animales y microorganismos, tienen un número par de átomos de carbono, todos los dobles enlaces entre átomos de carbono tienen la configuración cis y nunca se presentan conjugados, sino separados por dos enlaces simples. Se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en la posición de sus dobles enlaces.

1.4.- ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAs): NATURALEZA E INTERÉS

1.4.1.- NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN

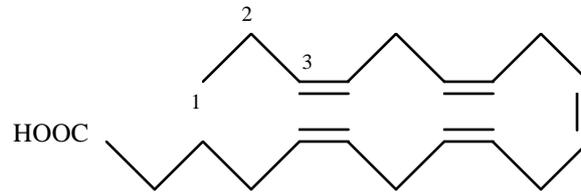
En la nomenclatura de ácidos grasos mono y poliinsaturados hay que indicar la longitud de la cadena y el número de dobles enlaces además de su posición, la cual se puede indicar mediante los símbolos Δ , ω (o w) y n . Cuando en la cadena se cuenta a partir del grupo carboxilo se emplea el símbolo Δ y se indican todos los carbonos que llevan el doble enlace. Si se cuenta a partir del grupo metilo terminal se utilizan las letras ω o n , y se indica el número de dobles enlaces que hay y sólo el primer carbono que lo presenta; esta designación es completa ya que, como se ha indicado, los dobles enlaces están siempre separados por dos enlaces simples (ejemplo en figura 1.1).

Los PUFAs se dividen en familias según la posición del primer doble enlace dentro de la cadena carbonada contando a partir del metilo terminal. Las tres familias más importantes tienen ese primer doble enlace en las posiciones 3, 6 ó 9, dando lugar a las llamadas series $n-3$, $n-6$ y $n-9$ (o $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$), respectivamente.

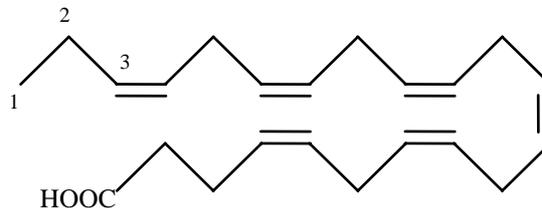
El grupo de ácidos grasos $n-3$ (o $\omega-3$) está constituido por los ácidos docosaheptaenoico (DHA, 22:6 n 3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n 3), estearidónico (SA, 18:4 n 3) y α -linolénico (ALA, 18:3 n 3). Todos son de origen marino, excepto el ácido α -linolénico, que se encuentra en los aceites de vegetales superiores, Herold y Kinsella (1986).

Los PUFAs $n-6$ (ácidos linoleico, LA, 18:2 n 6; γ -linolénico, GLA, 18:3 n 6, y araquidónico, AA, 20:4 n 6) son componentes estructurales esenciales de los fosfolípidos de la membrana celular que influyen en algunas características de estas membranas, como por ejemplo en la fluidez, el transporte de electrólitos y las actividades hormonales e inmunológicas, Innis (1991, 1993). La fuente principal de estos PUFAs $n-6$ son las plantas.

Figura 1.1.- Fórmula estructural del EPA y DHA, ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3.



Ácido Eicosapentaenoico, EPA.
(todo-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico; 20:5n3)



Ácido Docosahexaenoico, DHA.
(todo-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico;
22:6n3)

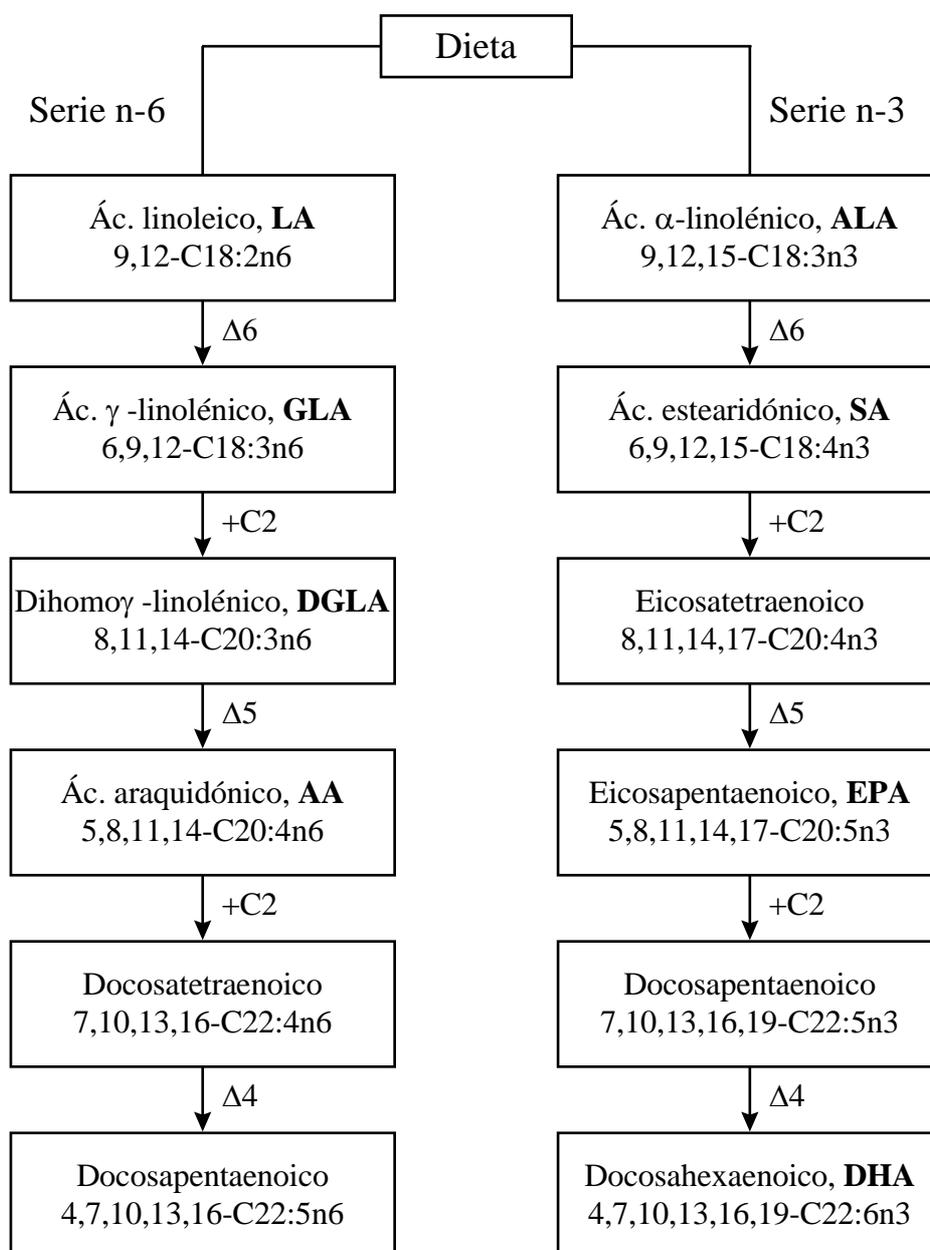
1.4.2.- BIOSÍNTESIS Y PRINCIPALES FUNCIONES EN EL ORGANISMO HUMANO

La mayoría de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados del organismo proceden de la dieta y de su propia biosíntesis, la cual tiene lugar, principalmente, a partir de los hidratos de carbono. Los PUFAs LA (un n-6) y ALA (un n-3) son ácidos grasos esenciales (EFA de Essential Fatty Acid), ya que no pueden ser sintetizados en el organismo humano y éste únicamente puede obtenerlos a través de la dieta. Además, estos ácidos son los precursores del resto de los PUFAs de sus respectivas familias encontrados en las células animales.

Los PUFAs son sintetizados a nivel celular mediante la desaturación oxidativa directa (introducción de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada) de ácidos grasos ingeridos en la dieta o sintetizados. Las enzimas implicadas son las $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas (cada una de ellas introduce un doble enlace en el carbono

indicado) que están presentes en los mamíferos que sin embargo no disponen de las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 15$, necesarias para la biosíntesis de los ácidos grasos LA y ALA, que se encuentran en las plantas, Voet y Voet (1990) y Sprecher y cols. (1995). Estas desaturasas se pueden alternar en su acción con elongasas (+C2), que alargan la cadena hidrocarbonada introduciendo dos átomos de carbono. De esta forma se pueden sintetizar todos los ácidos grasos presentes en el organismo (figura 1.2), Mataix y Martínez de Victoria (1988), Innis y cols. (1999).

Figura 1.2.- Metabolismo de las series de PUFAs n-6 y n-3



En la figura 1.2 se observa que a partir del LA el cuerpo humano puede producir GLA, ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA, 20:3n6), AA, ácido docosatetraenoico (22:4n-6) y ácido docosapentaenoico (22:5n-6) (todos de la familia n-6). Igualmente, a partir del ALA se sintetizan todos los ácidos grasos de la familia n-3, incluidos el EPA y el DHA. La conversión en el organismo humano del ácido α -linolénico (ALA) a EPA y DHA tiene lugar a velocidades muy bajas, especialmente en presencia de grandes cantidades de ácido linoleico (LA), ya que ambos ácidos compiten por el mismo sistema enzimático, Dyerberg (1986). Cuando el LA y el ALA se encuentran en la dieta en la misma proporción relativa, la desaturasa $\Delta 6$ actúa preferentemente sobre el ALA (serie n-3), aumentando la cantidad relativa de PUFAs n-3; en cambio, con un exceso de LA en la dieta, la desaturasa $\Delta 6$ actúa sobre este ácido, sintetizándose un exceso de PUFAs n-6.

Además de su función como reserva de energía y como constituyentes estructurales de las membranas celulares, los PUFAs tienen otras funciones de gran importancia fisiológica y bioquímica. Entre esas funciones destaca la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos, que ejercen controles en diversos procesos metabólicos. Estos compuestos son eicosanoides y, por tanto, metabolitos de los PUFAs de 20 átomos de carbono, como el AA (20:4n6), el eicosatrienoico (20:3n6) y el EPA (20:5n3). Estos ácidos grasos precursores de los eicosanoides están presentes en gran cantidad en los fosfolípidos de todas las membranas celulares, Voet y Voet (1990).

Los derivados eicosanoides citados no se almacenan, sino que se sintetizan cada vez que son necesarios para ser degradados rápidamente después de ejercer su acción.

1.4.3.- BENEFICIOS DE LOS PUFAS EN LA SALUD HUMANA

Desde hace tres décadas se conocen muchos de los beneficios en el cuidado de la salud que supone incluir PUFAs en la dieta, Nettleton (1993), Singh y Chandra (1988), Connor y Bendich (2000), Watkins y cols. (2000). Estos beneficios requieren una proporción adecuada entre PUFAs n-6 y n-3, normalmente recomendada entre 5 y 10. En lo concerniente a los PUFAs, este trabajo se centra en la familia n-3 (ω -3) debido a que la dieta occidental es altamente deficitaria en estos ácidos grasos; los más interesantes son el EPA, por tener unas interesantes perspectivas

nutricionales y farmacéuticas, Belarbi y cols. (2000), y el DHA, cuyos beneficios se aprovechan sobre todo en alimentos especiales para recién nacidos y niños, Simopoulos (1999 y 2000). Los efectos sobre la salud de una ingesta adecuada de PUFAs n-3 se describen a continuación:

1.4.3.1.- Enfermedades cardiovasculares

Entre los años 1971-1978, Bang y Dyerberg descubrieron que los esquimales de la isla de Groenlandia poseían una tasa de mortalidad muy baja por enfermedades cardiovasculares, incluso a pesar de ingerir cantidades altas de grasa en su alimentación. Se detectó en la sangre de estos esquimales altos niveles de ácidos grasos n-3 y se observó que tomaban mucho pescado, cuyos aceites son ricos en estos ácidos grasos. Por este motivo se consideró la influencia positiva del consumo de ácidos grasos n-3 en la alimentación para la prevención de la aterosclerosis, Dyerberg (1986). También contribuyó a refrendar la bondad de los ácidos grasos n-3 en la salud cardiovascular el estudio realizado en la población japonesa. Los japoneses consumen entre 100 y 250 g de pescado diariamente, lo que provoca que exista un alto nivel de ácidos grasos n-3 en su sangre. Es interesante apuntar que cuando se compara su población con la de otros países desarrollados, los japoneses tienen la más baja incidencia de enfermedades coronarias y aterosclerosis.

Una causa habitual que provoca o potencia enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis o la hipertensión, son los desórdenes en los niveles de colesterol (colesterolemia) y triglicéridos (trigliceridemia) debidos a una alimentación poco equilibrada. El colesterol se transporta por la sangre asociado a dos tipos de lipoproteínas: LDL (son las que lo transportan en mayor proporción pero son aterogénicas, ya que lo depositan en las paredes arteriales) y HDL (lo retiran de las arterias y lo transportan al hígado para metabolizarlo).

Aunque existe cierta controversia, en general se considera que el consumo de ácidos grasos n-3 tiene un efecto positivo sobre los niveles de las lipoproteínas plasmáticas HDL (lipoproteínas de alta densidad: colesterol bueno) y negativo sobre los niveles de las LDL (lipoproteínas de baja densidad: colesterol malo), Howell (1997), Harper y Jacobson (2001), Schmidt y cols. (2001); en todo caso, estos ácidos aumentan mucho menos el nivel de LDL en comparación al incremento provocado si los ácidos grasos son saturados. Además, son efectivos para reducir los niveles de triglicéridos plasmáticos y de VLDL (lipoproteína de muy baja densidad, que incrementa fuertemente el riesgo de arterosclerosis), Weber (2000). Sin embargo,

otros investigadores no aprecian beneficios significativos del consumo de PUFAs n-3 sobre los niveles de las lipoproteínas HDL y LDL pero sí sobre los niveles de triglicéridos en sangre: por ejemplo, según los trabajos de Harris (1997), los efectos producidos por los PUFAs n-3 procedentes del pescado son un aumento ligero del colesterol total (2-3%) ya que tiende a aumentar el colesterol correspondiente a las LDL (5-10%) y el de las HDL (1-3%) mientras que los triglicéridos plasmáticos disminuyen significativamente (25-30%).

Los datos epidemiológicos indican que los efectos protectores de los ácidos grasos n-3 en la enfermedad cardiovascular se deben a sus mecanismos antitrombóticos y a sus efectos de modulación del sistema inmune, Kinsella y Lokesh (1990), Calder (2001), más que a un efecto sobre las lipoproteínas séricas, Lahoz y cols. (1997). Además, evitan la oxidación de las grasas que posteriormente dan lugar a la placa de aterosclerosis y facilitan el funcionamiento del endotelio vascular y de la membrana celular. Asimismo reducen la presión arterial debido a que el efecto de los n-3 es el resultado de la formación de eicosanoides (que hacen que la sangre sea menos viscosa), y de un balance entre vasodilatadores y vasoconstrictores en la pared celular de las arterias y en el riñón, Rudman y Cohan (1991). En definitiva, estos ácidos grasos mejoran la circulación sanguínea y favorecen la dilatación y flexibilidad de las arterias, Schmidt (1997). De esta forma, previenen el infarto y los accidentes cerebro-vasculares. Además, mejoran la glucemia y ayudan a evitar la obesidad, factores que también elevan el riesgo coronario. Por otra parte, los ácidos grasos n-3 contribuyen a prevenir la arritmia cardíaca que ocurre en los procesos de isquemia, Nair y cols. (1997).

1.4.3.2.- Enfermedades que cursan con inflamación

En último término, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria, de forma que si los ácidos grasos del pescado la previenen, también hacen lo propio con otras alteraciones de este tipo, como el asma, la artritis reumatoide, la neumonía o la psoriasis, Clealand y James (2000), Calder (2001). Asimismo previenen y mejoran el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, Teitelbaum y Walker (2001). Experimentos con animales y humanos han revelado que los ácidos n-3 mejoran considerablemente las lesiones de la mucosa gástrica provocadas por la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, enfermedades que pueden degenerar en cáncer. Su efecto antiinflamatorio consiste en disminuir la biosíntesis de ciertas prostaglandinas y tromboxanos de marcado

carácter proinflamatorio e inhiben la agregación de las plaquetas, Knapp (1989). Estos efectos antiinflamatorios están relacionados con cambios que provocan los n-3 en el sistema inmune, Calder (2001), Ergas y cols. (2002). Un balance adecuado entre los PUFAs n-6 y los n-3 afectaría directamente sobre el sistema inmune y la autoinmunidad, Harbige (2003), e incluso apareciendo las primeras evidencias aplicables a enfermos afectados por el virus del SIDA, Flamand y cols. (2004).

1.4.3.3.- Cáncer

Las acciones de los PUFAs n-3 en las enfermedades cancerosas se basan en la idea de que buena parte de los tumores podrían prevenirse con una buena alimentación, ya que la inmensa mayoría de los casos de cáncer se deben, fundamentalmente, a factores externos como los malos hábitos dietéticos (asociados al 35% del total de muertes por cáncer), Informe de la Sociedad Americana del Cáncer (1996). Las dietas pobres en grasas saturadas y abundantes en lípidos monoinsaturados y del tipo n-3 pueden ayudar a prevenir e incluso contrarrestar diversos tumores (o afecciones asociadas), Greenwald y cols. (2001); entre ellos, el de mama, Braden y Carrol (1986), Cave (1996), Ip (1997), Simonsen y cols. (1998), Moore y cols. (2001), el de páncreas, Wigmore y cols. (2000), el de próstata, Rose (1997), Yoon y cols. (1999), y el de colon, Dommels y cols. (2002), aunque los estudios científicos en humanos todavía requieren investigaciones más profundas y con un mejor control de las muchas variables que intervienen, Rose y Connolly (1999). En estudios in vitro y en animales hay más certeza sobre la acción de los ácidos grasos n-3. También se ha podido observar que, en presencia de los ácidos grasos omega-3, algunos medicamentos anticancerosos son mucho más potentes.

1.4.3.4.- Desórdenes en el desarrollo y funcionamiento del cerebro y la retina

Los PUFAs de cadena larga como el AA y el DHA son componentes estructurales importantes de todas las membranas celulares, pero se acumulan de forma particular en ciertos tejidos como el cerebro y la retina. El AA es un precursor de las prostaglandinas y los leucotrienos, con importantes funciones en los sistemas circulatorio, Sing y Chandra (1988), y nervioso central, Innis (1991, 1993). El AA es el PUFA más abundante en el córtex cerebral, y también las concentraciones de DHA son más elevadas en comparación con las de otros tejidos. En la retina el DHA es el PUFA más abundante, y sus concentraciones llegan a ser incluso 3 o 4 veces superiores a las de los eritrocitos. El DHA es importante para el buen funcionamiento de las señales neuronales, Kim y Edsall (1999).

Se ha demostrado que el período de mayor deposición de PUFAs de cadena larga en el cerebro es el tercer trimestre de gestación, coincidiendo con la época de mayor desarrollo cerebral en el feto, Martínez (1991). Durante esta etapa, el feto recibe los PUFAs de la madre a través de la placenta. Después del nacimiento, la incorporación de PUFAs de cadena larga se prolonga incluso hasta los 2 años de vida. Así pues, en los primeros meses de vida los niveles de AA y DHA del recién nacido han de ser los adecuados para garantizar una correcta mielinización de las neuronas en el cerebro. El aporte de ácidos grasos esenciales y PUFAs de cadena larga está asegurado en los recién nacidos alimentados con leche materna. Sin embargo, una cierta proporción de niños no pueden ser alimentados con leche materna por diversas causas y reciben entonces leches infantiles. Se ha demostrado que los niños recién nacidos alimentados con fórmulas que contienen ácido linoleico y linolénico, pero sin PUFAs de cadena larga, presentan niveles de AA y DHA en plasma y eritrocitos inferiores a los niños alimentados con leche materna, Bondía-Martínez (1998), debido al bajo grado de conversión de los ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico en relación con los elevados requerimientos durante los primeros meses de vida. La suplementación de las fórmulas infantiles con AA y DHA, en cambio, consigue la elevación de los valores sanguíneos hasta niveles similares a los que presentan los niños alimentados con leche materna, Clandinin y cols. (1997). Niveles bajos de AA y DHA en las primeras etapas de la vida pueden provocar menor desarrollo cerebral-intelectual, Horwood y Fergusson (1998), hiperactividad, fibrosis quística, Koletzko y Reinhardt (2001), y otras alteraciones relacionadas con el sistema nervioso y el funcionamiento de la retina, Lauritzen (2001).

La disminución del DHA en el cerebro de adultos se asocia con una disminución de las capacidades intelectuales, Wainwright (2000), como en la enfermedad de Alzheimer, Horrocks y Yeo (1999). También se ha demostrado útil en la terapia del glaucoma, Cellini y cols. (1998).

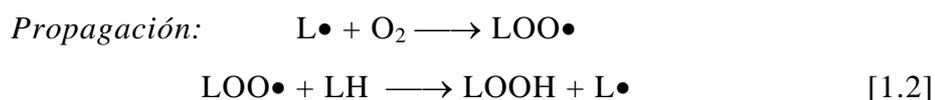
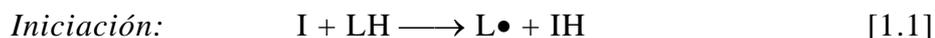
1.4.3.5.- Otros tipos de dolencias

Actualmente, otros campos donde se investiga el efecto beneficioso del suplemento en EPA y DHA de la dieta son la prevención de la osteoporosis por su influencia en la mineralización de los huesos, Albertazzi y Coupland (2002), y en enfermedades mentales como la depresión y la esquizofrenia, Su y Huang (2001), Glen (2002).

1.4.4.- ESTABILIDAD DE LOS PUFAS

La autooxidación de los lípidos se inicia con su peroxidación. Se trata de un proceso en cadena que transcurre a través de radicales libres. La autooxidación de los PUFAs tiene lugar generalmente en tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

La reacción de iniciación (ecuación [1.1]) implica la generación de un radical, generalmente un radical alquilo ($L\bullet$) de un ácido graso insaturado (LH). Este proceso es muy lento y depende del iniciador empleado (I). La reacción puede ser catalizada por el calor, la luz y por trazas de metales y/o enzimas. Los radicales alquilo así formados son muy reactivos y reaccionan rápidamente con el oxígeno presente formando radicales peróxido ($LOO\bullet$). Éstos captan un átomo de hidrógeno de otra molécula de ácido formándose un hidroperóxido (LOOH) y otro radical alquilo, que propaga la reacción en cadena (ecuación [1.2]). En el momento en que la concentración de hidroperóxido es apreciable su descomposición genera radicales con mayor velocidad que en la etapa de iniciación, de ahí la autocatálisis de estos procesos, ramificación degenerada. La etapa de terminación (ecuación [1.3]) se produce por choques entre los radicales o con las paredes del recipiente (figura 1.4), Holman (1954 a), Kamal-Eldin y Appelqvist (1996):

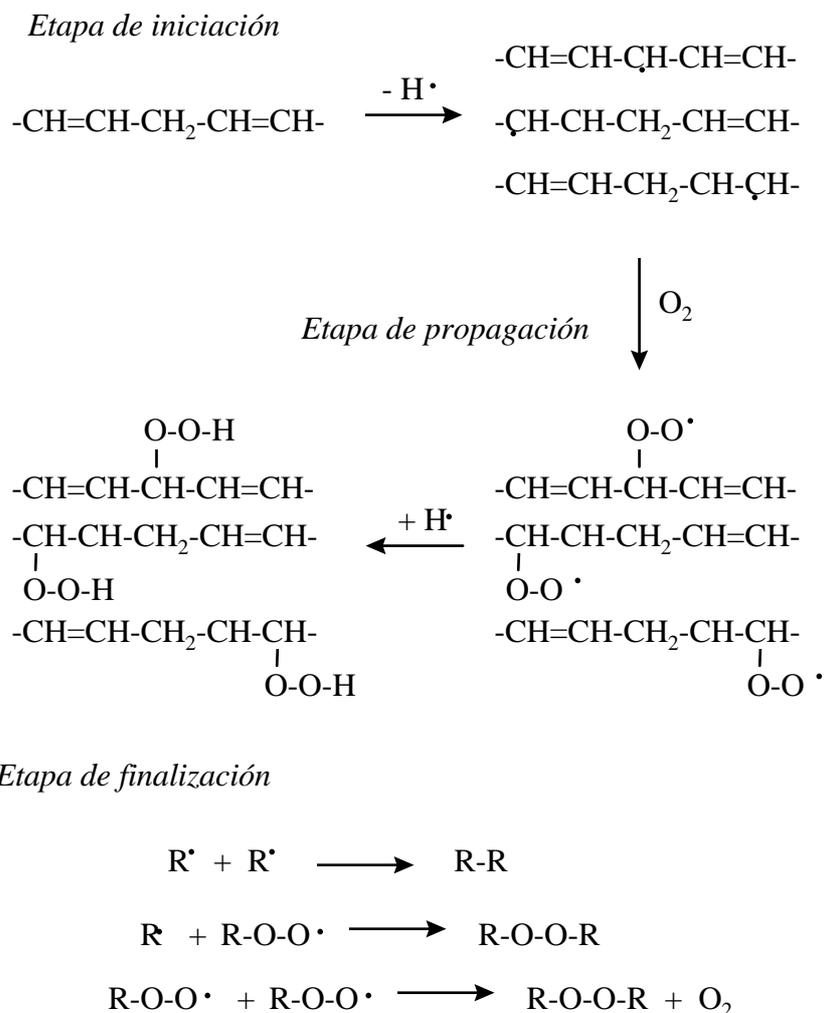


Los grupos metileno no conjugados de los PUFAs son muy fáciles de atacar por el oxígeno y, además, su oxidación tiene lugar a una velocidad elevada debido a la activación de los dobles enlaces adyacentes (figura 1.3).

La formación de estos peróxidos e hidroperóxidos corresponde a una primera etapa en la oxidación de los PUFAs. Posteriormente pueden darse sucesivas oxidaciones, dando lugar a productos cuya naturaleza es muy variada y poco conocida en algunos casos; se trata de alcoholes, aldehídos, ácidos y otros

compuestos de baja masa molecular formados por ruptura de los ácidos grasos originales. En sucesivas etapas de la oxidación pueden tener lugar también sucesivas reacciones de polimerización, Lundberg y Järvi (1966).

Figura 1.3.- Mecanismo de oxidación de los PUFAs: formación del grupo hidroperóxido y conjugación de dobles enlaces, Holman (1954 a).



La velocidad de oxidación de una mezcla de ácidos grasos, depende fundamentalmente del componente más sensible a la oxidación, dado el carácter de estos procesos de reacciones en cadena iniciadas por radicales libres. Basta una pequeña cantidad de PUFAs en una mezcla con otros ácidos saturados y monoinsaturados para que la velocidad de oxidación aumente considerablemente y deban tomarse medidas especiales para la protección de la muestra.

Como se ha dicho anteriormente, la velocidad de oxidación se acelera, además de por la presencia de oxígeno, por la acción del calor, de la luz y de otros agentes

químicos como los cationes metálicos. En cuanto al efecto de la temperatura, el almacenamiento a - 20°C reduce la velocidad de oxidación en 1/16 de la velocidad a temperatura ambiente, Holman (1954b). Pero debe tenerse presente que el descenso de temperatura disminuye fundamentalmente la velocidad de la etapa de iniciación, por lo que una vez iniciado el proceso de oxidación el descenso de la temperatura no permite detenerlo.

Miyashita y cols. (1993) analizaron la estabilidad oxidativa relativa de seis tipos de PUFAs en soluciones acuosas (pH = 7,4 y 37°C), utilizando Fe²⁺-ácido ascórbico como inductor de la peroxidación y la compararon con la estabilidad de los PUFAs en el aire. El orden de estabilidad que obtienen en disoluciones acuosas es: DHA > EPA > AA > ALA > GLA > LA. Es decir, tanto el DHA como el EPA son muy estables en estas condiciones (entre el 80-90% de estos PUFAs permanecen inalterados después de unas 2000 h de oxidación mientras que hay una pérdida de casi un 50% de LA al cabo de 13 h de oxidación). Esto indica que la estabilidad en disoluciones acuosas se incrementa con el grado de insaturación, lo que difiere notablemente de lo que ocurre cuando los PUFAs están al aire, donde el DHA y el EPA son rápidamente oxidados y el LA es el más estable. Por otro lado, existe una diferencia significativa entre la oxidación del ALA (n3) y la del GLA (n6) que no se da en el aire y, en general, en estas condiciones, los PUFAs n-3 se muestran más estables a la oxidación que los PUFAs n-6. Para la explicación de este comportamiento sugieren que probablemente los PUFAs n-3, DHA y EPA, adquieren una conformación más compacta en la fase acuosa que dificulta el ataque del oxígeno y/o radicales libres.

Soon-Yeong y cols. (1987) han estudiado la oxidación de los ésteres etílicos del EPA y del DHA a dienos, hidroperóxidos y productos secundarios, comparando cuantitativamente la oxidación de estos PUFAs con la de los ésteres etílicos de los ácidos linoleico y linolénico. Tanto el EPA como el DHA se oxidaron muy rápidamente a 5°C después de tan sólo un período de inducción de 2-3 días, mientras que los ácidos linoleico y linolénico necesitaron 60 y 20 días respectivamente de incubación, oxidándose a continuación a velocidades más pequeñas. Estos resultados indican que la energía necesaria para la formación del radical L• (ecuación [1.1], figura 1.3), es más pequeña en el caso de los ácidos EPA y DHA, o lo que es lo mismo que este radical en el caso de los ácidos indicados se estabiliza más, probablemente, por resonancia.

La mayoría de los PUFAs se encuentran como componentes de triglicéridos o fosfolípidos en los sistemas biológicos. Por ello, es importante determinar la estabilidad oxidativa de los PUFAs esterificados en la estructura de los glicéridos. Miyashita y cols. (1990) estudiaron la estabilidad de diversos triglicéridos conteniendo PUFAs (linoleico y linolénico, en particular) y observaron que, como se esperaba, su estabilidad oxidativa disminuyó con el incremento total de la insaturación, resultando además dependiente de la posición ocupada por los PUFAs. Endo y cols. (1997 a y b) analizaron la autooxidación de triglicéridos conteniendo EPA y DHA; sus resultados también indican que la estructura del TG afecta notablemente la oxidación de los TG-PUFAs. Así, por ejemplo, el tri-EPA es más inestable que un TG con un sólo EPA. La posición de este PUFA también influye en su estabilidad; los triglicéridos con EPA en posición sn-2 son más estables que cuando el EPA está en las posiciones sn-1 ó sn-3 y los triglicéridos con dos PUFAs en posiciones sn-1,3 son más estables que cuando están en posiciones sn-1,2 (ó 2,3). Estos autores obtuvieron que los TG que contienen PUFAs, a diferencia de los PUFAs en forma de AGLs, son muy oxidables tanto al aire como en disoluciones acuosas

Así pues, los PUFAs, una vez obtenidos, deben ser protegidos para evitar su oxidación durante su conservación. Si las muestras que contienen PUFAs se van a almacenar durante períodos de tiempo relativamente cortos pueden disolverse en un disolvente inerte retirando el oxígeno mediante la inyección de argón.

La acción del oxígeno sobre los PUFAs se puede retrasar con la presencia de antioxidantes. Éstos reaccionan con los radicales libres que se van formando dando lugar a un estado de oxidación intermedio que paraliza la etapa de propagación, Stansby (1990). Entre los antioxidantes más efectivos se encuentran la tert-butilhidroxiquinona (TBHQ), el butilhidroxitolueno (BHT) y el galato de octilo. Estos antioxidantes se añaden en concentraciones que fluctúan entre el 0.01% y el 0.02%. El α -tocoferol (Toch) inhibe también la peroxidación de lípidos reaccionando con los diversos radicales que se forman, Kamal-Eldin y Appelqvist (1996):



y, finalmente



Sin embargo, a altas concentraciones este antioxidante actúa como prooxidante en la autooxidación de los PUFAs, Porter y cols. (1995), Kamal-Eldin y Appelqvist (1996):



La concentración óptima varía de un sustrato a otro, acercándose a su cantidad habitual en los sistemas naturales.

1.4.5.- FUENTES DE PUFAS

En la tabla 1.1 se muestran las fuentes más usuales para la obtención de los PUFAs de mayor interés. En general, los alimentos de origen animal terrestre contienen grasas ricas en ácidos grasos saturados y los de origen vegetal junto con los aceites de pescado son relativamente ricos en ácidos grasos monoinsaturados y PUFAs, respectivamente. Hay algunas excepciones, como el aceite de coco, el de cacahuete y el de palma, que tienen una alta proporción de ácidos grasos saturados.

Las plantas son la principal fuente de ácidos grasos de la serie n-6. Los aceites de muchas semillas, como el algodón, girasol, maíz y soja, son buenas fuentes de ácido linoleico, Bartsch y cols. (1999). Para el ácido γ -linolénico las principales fuentes son las semillas de taginastes de Macaronesia, Guil Guerrero y cols. (2000 a y b), de onagra y de borraja. El ácido araquidónico se obtiene de carnes, huevos y derivados lácteos. Las cantidades de PUFAs en la carne, derivados del pollo y leche dependen del tipo de alimentación dada a los animales.

En cuanto a la serie n-3, el ácido α -linolénico se encuentra en vegetales de hoja verde (coles, espinacas, lechuga, etc.) y en otros aceites vegetales como el de linaza y soja, Bartsch y cols. (1999). Como se observa en la tabla 1.1 las fuentes más

usuales de obtención de PUFAs n-3 son aceites vegetales y aceites de pescado, Nettleton (1991), y las algas marinas. El EPA y el DHA se encuentran principalmente en aceites de pescado: la caballa, el arenque y el salmón son especialmente ricos en PUFAs n-3, Rose y Connolly (1999). Algunas algas también contienen cantidades importantes de estos ácidos.

Tabla 1.1.- Fuentes de ácidos grasos poliinsaturados, Privett (1968).

Ácidos grasos*	Fuentes
16:4n3 (4,7,10,13)	<i>Chlorella</i> , aceite de lacha
18:2n6 (9,12), LA	Aceites de semillas
18:3n3 (9,12,15), ALA	Aceites de semillas
18:4n3 (6,9,12,15), SA	<i>Chlorella</i> , arenque, lacha, salmonete
20:4n3 (8,11,14,17)	Aceite de lacha y de arenque
20:4n6 (5,8,11,14), AA	Arenque, tejidos de reproducción y vísceras (hígado, riñones y corazón de ternera), hígado de buey y de cerdo, testículos de bovino
20:5n3 (5,8,11,14,17), EPA	Aceites de pescado, hígado de bacalao, tejidos de reproducción e hígado de ternera, hígado de buey, vísceras de cerdo
22:4n6 (7,10,13,16)	Hígado de buey, cerdo, salmonete, tejidos de reproducción de ternera
22:5n6 (4,7,10,13,16)	Sesos de buey, huevos, cerdo, tejidos de reproducción de ternera, salmonete
22:5n3 (7,10,13,16,19)	Hígado de bacalao, sardina, arenque, salmonete, cerdo, tejidos de reproducción de ternera, sesos de buey,
22:6n3 (4,7,10,13,16,19), DHA	Hígado de bacalao, aceites de pescado, arenque, atún, salmonete, sardina, hígado y sesos de buey, sesos de cerdo, tejidos de reproducción de ternera,
24:4n9 (6,9,12,15)	Sesos de buey, cerdo, tejidos de reproducción de ternera
26:2n6 (17,20)	<i>Speciospongia vesparia</i> , sesos de cerdo

*Entre paréntesis se especifica la posición de los dobles enlaces.

1.4.5.1.- Aceites de pescado

Los PUFAs se acumulan en los tejidos de los animales marinos como consecuencia de la ingestión de algas y fitoplancton. Recientemente, se está prestando atención a las larvas de pescado como fuente alternativa de PUFAs, Sargent y cols. (1999 a y b). La composición y contenido de PUFAs n-3 en los aceites de pescado varía ampliamente con la especie, tamaño, sexo y alimentación de los pescados, así como con la zona de pesca y época del año, Yongmanitchai y Ward

(1989). Los PUFAs n-3 encontrados en las grasas de animales marinos tienen mayoritariamente 20 ó 22 átomos de carbono, probablemente debido a que las bajas temperaturas del entorno marino favorecen la síntesis de moléculas insaturadas con mayor número de átomos de carbono, Dyerberg (1986). Las especies de aguas frías contienen mayores cantidades de DHA, mientras que los pescados criados en piscifactorías parecen tener un mayor contenido en lípidos totales que los capturados (Linko y Hayakawa, 1996).

Sus costes de producción son bajos y poseen un alto contenido de vitaminas liposolubles, como las vitamina A y E (esta última tiene además efecto antioxidante) pero los concentrados de PUFAs procedentes de aceites de pescado presentan algunos problemas, como son su olor desagradable, la presencia de ciertos compuestos químicos (metales pesados en forma alquílica y de partículas) presentes en el medio marino, Plakas y Guarino (1986), y un elevado contenido en colesterol, Cohen y Cohen (1991), Bajpai y Bajpai (1993). Por otra parte, su producción puede fluctuar con la pesca y, además, la composición de estos aceites es bastante compleja, (a menudo contienen de 40 a 50 ácidos grasos diferentes). Akoh y Hearnberger (1991) advierten que el efecto beneficioso de la incorporación en la dieta de PUFAs n-3 procedentes de pescados marinos puede ser contrarrestado por el alto contenido en sodio de algunos pescados; el contenido de sodio en la dieta es uno de los factores más importantes que contribuyen a los desórdenes en la circulación sanguínea e hipertensión. Por todos estos motivos se están desarrollando nuevas fuentes alternativas, como los microorganismos.

1.4.5.2.- Microalgas marinas

Las microalgas comprenden un grupo muy diverso de microorganismos, incluyendo el fitoplancton marino, que constituyen la fuente primaria de la cadena alimenticia en el mar. La mayoría de las microalgas son fotoautotróficas, es decir, necesitan sólo luz, dióxido de carbono y otros minerales para su crecimiento. Algunas microalgas marinas y otros microorganismos son capaces de sintetizar EPA y/o DHA. Ciertas especies contienen cantidades considerables de EPA y DHA y representan, sin duda, una fuente potencial interesante para la producción comercial de estos ácidos, Richmond (1986), Kyle (1989), Ackman (1994). La producción de EPA a partir de algas marinas y de diatomeas ha sido analizada por Seto y cols. (1984), Cohen y cols. (1988 a y b), Cohen y Cohen (1991), Yongmanitchai y Ward (1991 a), Bajpai y cols. (1991), Bajpai y Bajpai (1992 y 1993), Cohen (1994), Robles

Medina y cols. (1995 a), Carsten y cols. (1996) y Molina Grima y cols. (1994 a, 1994 b y 1996). El estudio conjunto de los aspectos genéticos, bioquímicos y fisiológicos permitirá una mejora en la productividad de estos ácidos, incluyendo una reducción en el coste de producción de esta biomasa, lo que permitirá alcanzar proyectos viables económicamente. Cohen y cols. (1995), consideran que para conseguir ese objetivo es un factor primordial la mejora en el contenido inicial de ácidos grasos en las células de las algas por ingeniería genética.

Las ventajas potenciales de la utilización de las microalgas como fuente alternativa de PUFAs, con respecto a los aceites de pescado, son su buen sabor, su biomasa está libre de partículas y metales pesados y menor contenido en sodio, su producción puede ser estable durante todo el año (suponiendo que la producción se realiza en condiciones controladas), presentan ausencia de colesterol y al ser su composición en ácidos grasos más sencilla se simplifican los procesos de fraccionamiento y purificación.

Son numerosas las especies de microalgas marinas en las que se han encontrado cantidades importantes de EPA y DHA, Yongmanitchai y Ward (1989, 1993). Además, el contenido en lípidos y PUFAs de las microalgas no sólo depende de la especie, sino también de los factores ambientales en que se desarrollan los cultivos. Las variables más estudiadas han sido la composición del medio, Alvarez Cobelas (1989) y Yongmanitchai y Ward (1989), la velocidad específica de suministro de aire, la intensidad de iluminación, la duración del ciclo luz/oscuridad, la temperatura, Lynch y Thompson (1984) y la edad del cultivo.

En la tabla 1.2 se muestran algunas de las principales algas marinas productoras de PUFAs. Como se observa, existen numerosas especies productoras de EPA y/o DHA.

Varias algas marinas tienen altos contenidos en los ácidos grasos esenciales LA, ALA, AA, y EPA. Las especies *Chlorella minutissima*, *Porphyridium cruentum* (con proporciones variables de EPA y AA dependiendo de las condiciones de cultivo), *Phaeodactylum tricorutum* (EPA como PUFA mayoritario y poca cantidad de otros PUFAs), *Monodus subterraneus* (EPA como único PUFA mayoritario), *Nannochloropsis oculata* (la fracción de glucolípidos contiene más del 70% de EPA y, dada la ausencia de otros PUFAs, puede purificarse por encima del 95%) e *Isochrysis galbana* (alto contenido en DHA localizado fundamentalmente en los fosfolípidos) son fuentes comerciales prometedoras de EPA y DHA (Yongmanitchai y Ward, 1993, y Cohen y cols., 1995).

Tabla 1.2.- Principales algas marinas fuentes de PUFAs (Yongmanitchai y Ward, 1989)

Organismos	PUFAs (% en peso del total de ácidos grasos)							
	18:2	18:3	18:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6
Chrysophyceae								
<i>Monochrysis lutheri</i>	2	0		2	1	19	4	-
<i>Isochrysis</i> sp.	5	6	14	0	0	0	0	15
Xanthophyceae								
<i>Monodus subterraneus</i> (a.dulce)	4	0	-	1	5	29	-	-
Eustigmatophyceae								
<i>Nannochloris</i> sp.	1	1	0	3	-	27	-	-
<i>N. salina</i>	0	1	1	-	1	15	-	0
Bacillariophyceae (diatomeas)								
<i>Chaetoceros eptentrionale</i>	1	1	0	-	2	21	4	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	3	-	-	-	-	28	-	-
<i>Skeletonema costatum</i>	1	1	2	-	-	14	0	2
Dinophyceae (flageladas)								
<i>Amphidinium carteri</i>	1	3	19	-	-	20	3	24
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	30
<i>Gonyaulax catanella</i>	3	6	14	-	-	1	-	12
<i>Gonyaulax digensis</i>	0	2	1	-	-	8	-	25
<i>Gymnodinium nelsoni</i>	1	1	4	-	-	5	-	20
Rhodophyceae								
<i>Chondrus crispus</i>	4	6	6	1	13	26	-	-
<i>Corallina officinalis</i>	2	1	1	1	6	52	-	-
<i>Porphyridium cruentum</i> , micros	16	0	0	2	36	17	-	0
Phaeophyceae								
<i>Fucus vesiculosus</i>	9	8	8	1	14	16	-	-
<i>Laminaria digitata</i>	3	7	19	0	14	25	-	-
Chlorophyceae								
<i>Chlorella minutissima</i>	2	0	0	0	5	45	-	-
<i>Dunaliella primolecta</i>	6	13	7	1	2	10	4	-
<i>D. tertiolecta</i>	6	9	8	2	4	19	6	-

La velocidad de crecimiento del microorganismo también será un factor importante para la producción de PUFAs. Así, la cantidad de PUFAs que es capaz de producir un microorganismo por unidad de volumen de cultivo en un tiempo determinado será el

parámetro más importante. En la tabla 1.3 se muestran las productividades en EPA a partir de algunas microalgas (López Alonso y cols., 1996).

Tabla 1.3.- Contenido y productividad en EPA de algunas microalgas, López Alonso y cols. (1996).

Microalgas	EPA (mg/g seco)	Productividad mg·(L·día) ⁻¹	Referencia
<i>Chlorella minutissima</i> ^b	31.8	3.0	Seto y cols. (1984)
<i>C. minutissima</i>	26.0	---	Borowitzka (1988)
<i>Isochrysis galbana</i> ALII4 ^b	46.5	23.2	
<i>Isochrysis galbana</i> ALII4 ^b	46.5	23.2	
<i>Phaeodactylum tricornerum</i> WT	33.0	19.0	Yongmanitchai y Ward (1991b)
<i>P. tricornerum</i> WT ^b	18.7	47.8	Molina Grima y cols. (1994b)
<i>P. tricornerum</i> ^a	7.0	---	Veloso y cols. (1991)
<i>P. tricornerum</i> WT ^a	17.3	3.5	López Alonso y cols. (1996)
<i>P. tricornerum</i> II4 ^a	31.5	4.0	López Alonso y cols. (1996)
<i>P. tricornerum</i> II242	38.6	5.0	López Alonso y cols. (1996)
<i>Porphyridium cruentum</i>	24.0	---	Cohen y Heimer (1992)
<i>P. cruentum</i>	12.2	0.8	Otha y cols. (1992)
<i>Monodus subterraneus</i> ^b	34.4	25.7	Cohen (1994)

^a Cultivos *batch*

^b Aire suplementado con dióxido de carbono.

En las fuentes naturales los ácidos grasos se encuentran fundamentalmente como triglicéridos. Estos compuestos constituyen la reserva energética cuantitativamente más importante de los organismos superiores. En los triglicéridos naturales, los PUFAs n-3 (especialmente el DHA) están preferentemente localizados en la posición 3 en el caso de los mamíferos marinos y en posición 2 en los aceites de pescado, Ackman (1992). En aceites vegetales (maíz, girasol y soja) los PUFAs también se encuentran en la posición 2 de los triglicéridos, Yoshida y Alexander (1982).

Según Cohen y cols. (1995), actualmente la producción de EPA a partir de microalgas no puede competir económicamente con el aceite de pescado cuando el EPA se va a utilizar como suplemento en alimentación. Sin embargo, para aplicaciones farmacéuticas, donde hay otros requisitos específicos, sí podría ser competitiva.

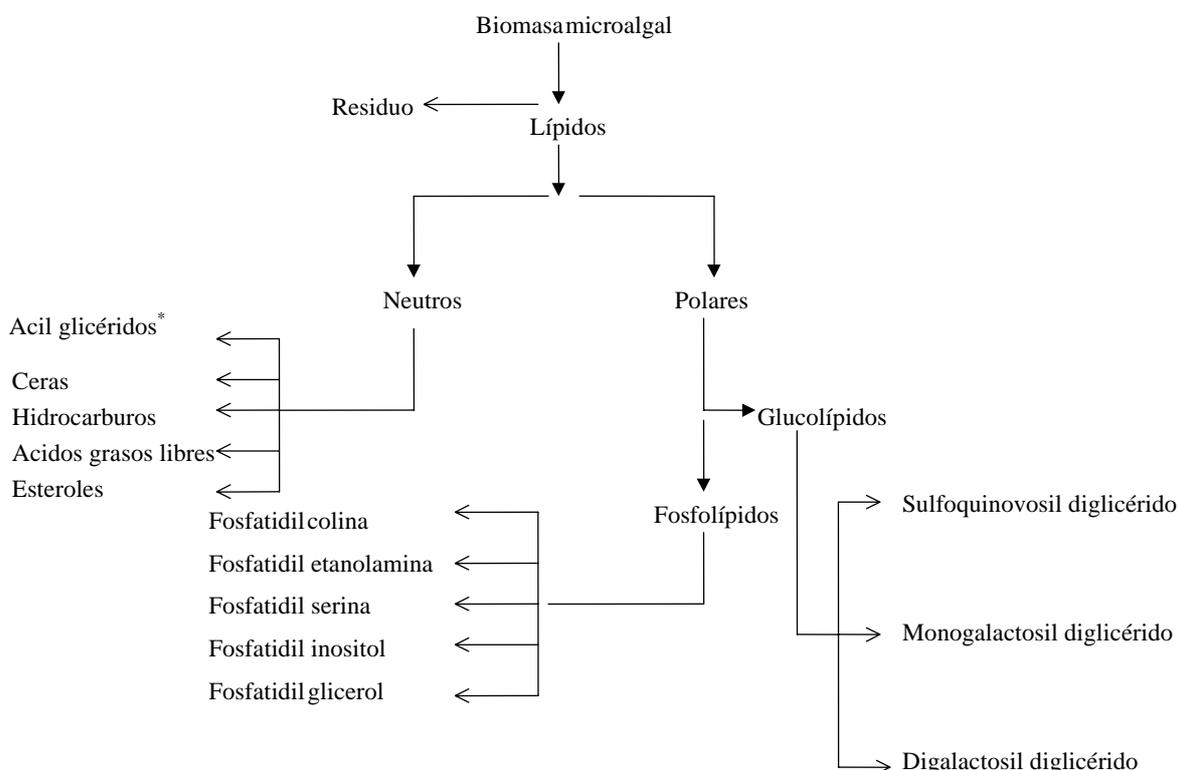
1.5.- TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

1.5.1. EXTRACCIÓN DE LOS LÍPIDOS

1.5.1.1. Lípidos en microalgas

Como se ha visto anteriormente, los lípidos constituyen un grupo de compuestos químicamente diverso cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua, pero que, en cambio, se disuelven fácilmente en los disolventes apolares orgánicos. La fracción lipídica de la biomasa microalgal está constituida por lípidos neutros y lípidos polares. Los lípidos neutros constituyen la reserva energética de la célula y los lípidos polares son lípidos estructurales. Las principales clases lipídicas de las microalgas son las que se recogen en la figura 1.4 (Pohl y Zurheide, 1982).

Figura 1.4.- Principales clases lipídicas de las microalgas.



* Acil glicéridos (triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos).

El contenido en las diferentes clases lipídicas depende de la especie y de las condiciones de cultivo hasta el punto de que el contenido en lípidos también se utiliza con criterios taxonómicos (Mühling y cols., 1999)

1.5.1.2. Aspectos a tener en cuenta en la extracción

En general la extracción de los lípidos debe ser rápida, fiable y lo suficientemente suave para minimizar las degradaciones por oxidación y la aparición de productos de degradación. Así por ejemplo, en ocasiones la extracción se inicia con un pretratamiento del tejido con una disolución acuosa de ácido acético (0,25%) para inactivar las enzimas hidrolíticas (Philips y cols., 1979) y es importante efectuar todas las operaciones de extracción bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos.

Los disolventes a utilizar deben ser seleccionados teniendo en cuenta: su toxicidad, facilidad de manejo, costo, seguridad, alta volatilidad para facilitar su eliminación posterior, posibilidad de formar dos fases con agua para retirar la fracción no lipídica de la biomasa, poco poder de extracción para compuestos indeseados y un intervalo de extracción adecuado para los diferentes tipos de lípidos.

Por otra parte, hay que tener en cuenta las interacciones y enlaces que existen entre los lípidos y los componentes no lipídicos. Así por ejemplo, los lípidos polares de las membranas forman hasta tres tipos de enlaces: interacciones hidrofóbicas, que pueden romperse con disolventes apolares como el hexano y el cloroformo, enlaces de hidrógeno, que necesitan disolventes polares de alta constante dieléctrica para romperse, y enlaces iónicos, que se rompen actuando sobre el pH.

A continuación, los lípidos extraídos deben ser purificados, porque en la mayoría de los casos están contaminados por otros compuestos no lipídicos, como proteínas hidrofóbicas, aminoácidos libres y pigmentos, que se arrastran con los lípidos al usar disolventes polares.

1.5.1.3. Procedimientos de extracción de lípidos

1.5.1.3.1.- Método de Folch

Folch y cols. (1957) utilizaron la mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v) para la extracción de los lípidos, seguida por una purificación que consiste en lavar el extracto de lípidos crudos con una disolución salina. De esta manera se forman dos fases, quedando los lípidos purificados en la fase inferior hidrofóbica (cloroformo), y los no lípidos en la fase superior hidrofílica (hidroalcohólica). La separación de las fases no es completa y los lípidos quedan en la capa clorofórmica con algunos componentes no lipídicos; existen varias proteínas hidrofóbicas en la membrana que son solubles en el cloroformo (Zhukov y Vereshchagin, 1981) y en la interfase existe una capa de emulsión acuosa estable de lípidos y proteínas (Folch y cols., 1957; Bligh y Dyers, 1959).

1.5.1.3.2.- Método de Bligh y Dyers

El método de extracción-purificación de Bligh y Dyers (1959) utiliza el sistema monofásico cloroformo-metanol-agua (1:2:0,8, v/v/v). La separación de los lípidos extraídos de los no lípidos se consigue diluyendo el sistema monofásico resultante (extracto crudo de lípidos en cloroformo-metanol-agua (1:2:0,8, v/v/v)) con agua y/o cloroformo para obtener un sistema bifásico, quedando los lípidos en la capa de cloroformo y los no lípidos en la capa hidrometanólica. De esta manera se consigue un extracto lipídico purificado en la capa clorofórmica.

Este método tiene las ventajas de ser un método simple, rápido (la extracción y la purificación se realizan agitando durante 3 minutos en total) y suave para los lípidos, ya que se realiza a temperatura ambiente. Además, se consigue prácticamente la extracción completa de los lípidos y una separación casi cuantitativa de los contaminantes no lipídicos. El único inconveniente que tiene este método es el uso del cloroformo que es un disolvente tóxico prohibido en la industria alimentaria.

1.5.1.3.3.- Método de Kates

Kates (1988) adaptó el método de Bligh y Dyer a las algas y a los microorganismos, eliminando la etapa de homogeneización inicial debido a que las células se rompen rápidamente al ser resuspendidas en los disolventes, la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Este método es el más utilizado en la extracción de los lípidos de las microalgas.

1.5.1.3.4.- Otros métodos

Extracción con el sistema hexano-isopropanol 3:2 (HIP) y lavado con disoluciones acuosas de sulfato sódico para eliminar los contaminantes no lipídicos. Las ventajas de este sistema sobre el sistema cloroformo: metanol, son (Hara y Radin, 1978):

- a) el extracto contiene menos contaminantes no lipídicos,
- b) la separación de las dos fases se produce de manera más rápida durante el lavado,
- c) la densidad del disolvente es suficientemente baja como para permitir la centrifugación del homogenizado en lugar de una filtración,
- d) los disolventes pueden eliminarse por evaporación a vacío hasta sequedad, y
- e) el isopropanol tiene la ventaja de inactivar la lipasa responsable de la degradación de los lípidos.

Los inconvenientes de este sistema son (Hara y Radin, 1978):

- a) no es adecuado para las microalgas debido a los bajos rendimientos que se obtienen comparados con los del sistema cloroformo:metanol, y
- b) el hexano a elevadas concentraciones también es una neurotoxina.

Nagle y Lemke (1990) han utilizado varios sistemas extractantes para obtener lípidos de microalgas. Los sistemas empleados son: hexano-isopropanol (2:3, v/v), n-butanol y etanol.

Estos sistemas presentan las ventajas de ser: poco costosos, fáciles de manejar y poco cancerígenos. Se emplean relaciones disolvente-biomasa más pequeñas que con los métodos anteriores, sin embargo para obtener altas eficiencias es necesario operar a temperaturas próximas a las de ebullición de los disolventes durante 90 min.

De estos tres sistemas el más efectivo parece ser el butanol (90%), seguido del hexano-isopropanol y del etanol (73%). En todos los casos los lípidos extraídos fueron purificados por el método de Bligh y Dyer (Nagle y Lemke 1990).

Molina Grima y cols. (1994b) hicieron un estudio comparativo de siete sistemas extractantes de los lípidos de biomasa liofilizada de *I. galbana*. Los sistemas extractantes estudiados fueron los siguientes:

- ✓ Cloroformo-metanol-agua (1:2:0.8, v/v/v).
- ✓ Hexano-etanol (96%) (1:2.5, v/v).
- ✓ Hexano-etanol (96%) (1:0.9, v/v).
- ✓ Butanol.
- ✓ Etanol (96%).
- ✓ Etanol (96%)-agua (1:1, v/v).
- ✓ Hexano-isopropanol (1:1.5, v/v).

Los mejores sistemas extractantes fueron: cloroformo-metanol-agua (1:2:0.8, v/v/v), etanol (96%)-agua (1:1, v/v) y hexano-etanol (96%) (1:2.5, v/v), con rendimientos en lípidos saponificables del 93,8%, 84,4% y 79,6% respectivamente.

De los estudios realizados puede concluirse que no es factible desarrollar un método universal de extracción y purificación aplicable a materiales biológicos, teniendo en cuenta que en cada caso han de tenerse en cuenta las particularidades de cada material.

Como se ha dicho anteriormente, un aspecto muy importante es la conservación de los lípidos extraídos, ya que se trata de compuestos que fácilmente se degradan a peróxidos o se hidrolizan. Su conservación debe hacerse durante períodos de tiempo lo más cortos posibles y tomando ciertas precauciones. Así, para una conservación de varias semanas debemos asegurarnos que se ha retirado completamente el agua (destilación azeotrópica con benceno) y pueden conservarse disueltos en cloroformo destilado conteniendo 10-15% de metanol, a temperaturas de -10°C a -15°C y en frascos completamente llenos de disolvente. Para períodos de uno o dos años se deben disolver en benceno con 10-50% de metanol o etanol del 99% inyectados con nitrógeno y añadiendo antioxidantes (por ejemplo BHT) y a -40°C o incluso -80°C (Kates, 1988).

Un método sencillo de preservar los lípidos durante periodos no demasiado largos utilizado en nuestro laboratorio (Guil y cols., 2001) es disolviéndolos en hexano, en

atmósfera inerte y en frío. Con este procedimiento el índice de peróxidos puede mantenerse por debajo de 20 meq O₂/Kg de aceite durante aproximadamente un mes.

1.5.2.- EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

La extracción de los ácidos grasos se puede realizar directamente a partir de la biomasa microalgal húmeda o liofilizada (Molina Grima y cols., 1994b).

En trabajos previos en nuestro laboratorio se han optimizado las condiciones operatorias para la saponificación directa de la biomasa húmeda de *P. tricornutum*. Estas condiciones son las siguientes (Ibáñez González y cols., 1998):

- Saponificación directa de la biomasa microalgal húmeda con 10 ml de etanol (96% v/v) y 0,4 g de KOH por gramo de biomasa seca.
- Lavado del residuo de biomasa con 5 ml de etanol (96% v/v) por gramo de biomasa seca.
- Extracción de los lípidos insaponificables mediante cinco extracciones con hexano, empleando en cada etapa una relación hexano/disolución hidroetanólica igual a 0,37 v/v, siendo la disolución hidroetanólica del 40% en agua, p/p.
- Acidulación de la disolución de sales potásicas de los ácidos grasos hasta un pH igual o inferior a 6.
- Extracción de los ácidos grasos mediante cuatro extracciones con hexano, empleando en cada etapa una relación hexano/disolución hidroetanólica (40 % agua p/p) igual a 0,2 (v/v).

1.5.3.- SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS

La cromatografía es el principal método de separación de especies químicas estrechamente relacionadas y se emplea también para la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas. En general, es la técnica tradicional utilizada en la separación y análisis de los lípidos.

1.5.3.1.- Fraccionamiento de los lípidos

En las microalgas marinas los PUFAs no se reparten de igual manera dentro de los grupos lipídicos. Por esto, un buen número de investigadores fraccionan los lípidos de las microalgas en lípidos neutros y polares como etapa previa a la obtención de PUFAs. La

técnica más usada en el fraccionamiento de los lípidos es la cromatografía de adsorción en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice, alúmina, propilamina, octadecilsilano (C18) y otros.

En los últimos años se comercializan cartuchos (minicolumnas) empaquetados con un adsorbente para un uso único, que también se están empleando para la separación de lípidos. En la mayoría de los casos se utiliza gel de sílice como adsorbente y la separación en fase normal de los lípidos depende de la polaridad de los componentes.

El fraccionamiento de los lípidos se lleva a cabo introduciendo el extracto lipídico en la columna y realizando la elución cromatográfica con una secuencia de disolventes. Los disolventes se hacen pasar en orden de polaridad creciente para separar en el mismo orden de polaridad los componentes de los lípidos; así, por ejemplo, es muy fácil separar los lípidos neutros, los glucolípidos y los fosfolípidos, y en este orden, utilizando la secuencia de disolventes siguiente (Kates, 1988):

- Cloroformo: con este disolvente eluyen los lípidos neutros, que están formados por glicéridos, hidrocarburos, carotenoides, esteroides, ésteres de esteroides, ceras, alcoholes, aldehídos, ácidos grasos libres y otros pigmentos.
- Acetona: eluyen los glucolípidos, que están formados por mono y digalactosil-diglicéridos, cerebrósidos y sulfolípidos.
- Metanol: eluyen los fosfolípidos, acompañados por trazas de glucolípidos.

1.5.3.2.- Separación de las clases lipídicas: cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica clásica de laboratorio que se utiliza fundamentalmente para el análisis cualitativo en la identificación de las distintas clases lipídicas de las microalgas. El desarrollo de la técnica de cromatografía en capa fina fue espectacular y las razones de su popularidad son:

- el bajo coste del equipo instrumental,
- la simplicidad del método experimental,
- la obtención de separaciones muy netas y
- su mayor sensibilidad para la detección de las sustancias problema.

La cromatografía en capa fina es un tipo de cromatografía plana, en la que la fase estacionaria está extendida sobre la superficie de un plano y la fase móvil fluye a través de

ella por capilaridad. La disolución que contiene la muestra a separar se sitúa sobre el plano que contiene la fase estacionaria en forma de mancha o banda, a corta distancia de uno de los extremos de dicho plano. Una vez seca la mancha o la banda, el extremo del plano próximo a la misma se pone en contacto con la fase móvil manteniendo el sistema cromatográfico en una cámara cerrada. La separación se produce por la migración diferencial de los componentes de la muestra problema en la dirección en que se mueve la fase móvil.

La detección de las manchas o bandas de los lípidos se hace con reveladores generales, como el yodo resublimado, ácidos fuertes y agentes fluorescentes, o bien con reveladores específicos que revelan alguno o algunos de los grupos y clases lipídicas existentes. En general la visualización de las clases lipídicas por métodos específicos es más compleja y está basada en las reacciones químicas que pueden tener lugar entre el grupo funcional del lípido y el revelador específico (Hamilton y Hamilton, 1992).

La técnica de cromatografía puede servir como una guía para el desarrollo de las condiciones óptimas para realizar separaciones de lípidos en columna.

1.6.- TÉCNICAS DE CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DE PUFAS

1.6.1.- MÉTODO DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN DE UREA

El método de los compuestos de inclusión de urea es la técnica más utilizada para la obtención de concentrados de PUFAs y ésteres metílicos. Este método consiste en separar los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de los ácidos grasos poliinsaturados partiendo de una disolución caliente y saturada de urea que contiene a todos los ácidos grasos. Esta disolución se enfría, provocándose la cristalización de la urea y los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, debido a su estructura en forma de cadenas largas y lineales, quedan ocluidos en el interior de la estructura cristalina de la urea, mientras que los PUFAs quedan en disolución.

Investigaciones con rayos X confirman que, si bien la urea cristaliza normalmente en una estructura tetragonal, en presencia de moléculas orgánicas de cadena larga y lineal los cristales son hexagonales. Los PUFAs no forman compuestos de inclusión con la urea debido a que la presencia de dobles enlaces en sus moléculas introduce irregularidades estéricas y como consecuencia desviaciones de las distancias óptimas intermoleculares, disminuyendo la fuerza de atracción neta que estabiliza los compuestos de inclusión (disminución de las energías de formación) (Abu-Nasr y cols., 1954).

Los PUFAs de cadena larga, como el EPA y el DHA, tienen muy poca tendencia a formar compuestos de inclusión de urea a temperatura ambiente, aunque sí los pueden formarlos a 0°C, Iverson y Weik (1967).

La constante de estabilidad es la inversa de la constante de equilibrio de la reacción de formación de los compuestos de inclusión. Según Swern (1964), es fácil obtener rendimientos de orden del 100% en la formación de compuestos de inclusión cuando la longitud de cadena es de 8 ó más átomos de carbono. La progresiva introducción de dobles enlaces reduce la constante de estabilidad en un factor de 10 a 20 por cada doble enlace.

En este método de fraccionamiento las variables más significativas son la relación urea/ácidos grasos y la temperatura de cristalización. Cuanto mayor es la relación urea/ácidos grasos más favorecida está la formación de los compuestos de inclusión, es decir, a medida que esta relación aumenta decrece el porcentaje de ácidos grasos

recuperados en el filtrado y aumenta su grado de insaturación (Schlenk, 1954; Robles Medina y cols., 1995a y 1995b). La relación urea/ácidos grasos media óptima para la formación de compuestos de inclusión está en torno a 3:1 p/p, siendo su valor exacto diferente para cada ácido graso.

La disminución de la temperatura de cristalización aumenta la tendencia a formar compuestos de inclusión de urea; la temperatura óptima depende de cada ácido graso en particular (Traitler y cols., 1988; Ratnayake y cols., 1988; Robles Medina y cols., 1995a y 1995b). El EPA presenta una mayor tendencia a formar compuestos de inclusión que otros PUFAs, por lo que para conseguir rendimientos apreciables en EPA en disolución la cristalización se debe realizar a temperaturas relativamente altas (entre 20° y 28°C), aunque a estas temperaturas disminuye el factor de concentración (Ratnayake y cols., 1988; Robles Medina y cols., 1995a y 1995b).

Entre las técnicas de obtención de concentrados de PUFAs procedentes de fuentes naturales con cuatro o más dobles enlaces, el método de la urea es la técnica más utilizada debido a las siguientes consideraciones:

- Pueden separarse grandes cantidades de ácidos grasos en equipos muy simples.
- Pueden utilizarse disolventes no muy tóxicos, como el etanol.
- Las temperaturas y condiciones de operación en general son moderadas, por lo que las estructuras moleculares de los PUFAs no se ven alteradas.
- La eficiencia de la separación es superior a otros métodos como la cristalización fraccionada o la extracción selectiva con disolventes.
- Es un método de bajo costo, además es muy versátil debido a que pueden modificarse las características del fraccionamiento cambiando simplemente las cantidades de disolvente, de urea o la temperatura de cristalización.
- Mediante esta técnica no es posible conseguir separaciones muy precisas de los PUFAs y por tanto ha de emplearse siempre en combinación con otras técnicas.
- Esta técnica presenta también problemas medioambientales, ya que para la separación de 1 Tm de un determinado PUFA se origina alrededor de 4 Tm de lodo orgánico de urea con muy escaso valor comercial desde el punto de vista agrícola (Corden, 1998).

1.6.2.- SEPARACIÓN DE LOS PUFAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

En general, es incuestionable que la cromatografía líquida de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas y su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia. Cuando se utiliza esta técnica, las metodologías habituales en la separación de ácidos grasos son fundamentalmente la cromatografía de adsorción con nitrato de plata y la cromatografía de partición en fase inversa.

1.6.2.1.- Cromatografía de adsorción con nitrato de plata.

En este tipo de cromatografía los ácidos grasos se separan según el número y la configuración de los dobles enlaces. Los iones plata interaccionan reversiblemente con los dobles enlaces, formando complejos polares y, como consecuencia, la retención de los ácidos grasos es mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces. Esta técnica es un buen método para separar ésteres de ácidos grasos que tengan entre 3 y 6 dobles enlaces (Özcimder y Hammers, 1980).

1.6.2.2.- Cromatografía líquida de partición en fase inversa

La cromatografía de partición en fase inversa es, sin lugar a dudas, la de más amplia aplicación, siendo el octadecilsilano (C18) la fase estacionaria más empleada. Las separaciones se basan en las interacciones entre las partes hidrofóbicas de las moléculas de soluto con la fase estacionaria apolar y un disolvente polar. Los ácidos grasos y ésteres se separan de acuerdo con el número de átomos de carbono de la molécula y con el número de dobles enlaces. Cuanto mayor es la longitud de la cadena mayor es el tiempo de retención y cuanto mayor es el número de dobles enlaces más intensas son las interacciones entre la fase móvil (polar) y el soluto por lo que el tiempo de retención es menor. Por otro lado, los ácidos grasos libres son más polares que sus ésteres y por lo tanto son menos retenidos por la fase estacionaria apolar y salen más rápidamente que sus correspondientes ésteres.

En nuestro laboratorio (Robles y cols. 1995a) se han obtenido fracciones de EPA del 94,4% de pureza con un rendimiento en la recuperación del 91,9% mediante fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (C18) a partir

de un concentrado de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. También a partir de un concentrado de PUFAs de la microalga marina *Isochrysis galbana* se obtuvo una fracción de EPA de una pureza del 96% y un rendimiento del 99,6%. En ambos casos, los concentrados de PUFAs se habían obtenido por el método de los compuestos de inclusión de urea, a partir de un extracto de ácidos grasos obtenido por saponificación directa. Posteriormente (Molina y cols., 1996) se llegó a obtener EPA con una pureza del 96,3% y un rendimiento del 84,2% a partir de un concentrado de PUFAs de la microalga marina *P. tricornutum* aplicando el mismo procedimiento a escala preparativa (cartucho de compresión radial Waters, C18, 37-55 μm , 125 \AA , 4,7 cm de diámetro interno y 30 cm de longitud).

Esta técnica es una de las más usadas para separar y purificar PUFAs debido a su gran eficacia. Sin embargo, su elevado costo ha llevado a muchos investigadores a buscar otras alternativas.

1.6.3.- EXTRACCIÓN CON ACETONA A BAJA TEMPERATURA

La técnica consiste en la solidificación del aceite en nitrógeno líquido, seguida de una extracción con acetona a -60°C (Moffat y cols., 1993). De esta forma los triglicéridos que contienen solamente ácidos grasos saturados o una combinación de saturados y monoinsaturados son totalmente extraídos.

Esta técnica permite obtener concentrados de triglicéridos ricos en PUFAs (EPA y DHA) a partir de aceites de pescado. De este modo, por ejemplo, Moffat y cols. (1993) obtuvieron concentrados de EPA y DHA a partir de aceite de lacha (25,5% en EPA más DHA) y aceite de sardina (34,4% en EPA más DHA) de concentraciones 41,7% en EPA más DHA para el aceite de lacha y 57,4% para el aceite de sardina.

1.6.4.- EXTRACCIÓN DE PUFAS MEDIANTE SOLUCIONES ACUOSAS DE NITRATO DE PLATA.

La extracción se realiza a ésteres metílicos o etílicos de los PUFAs contenidos en un disolvente orgánico (hexano, heptano, dodecano, etc.) con una disolución acuosa de nitrato de plata. Estos PUFAs se extraen como complejos de plata $(\text{E-PUFA.nAg})^{n+}$, donde n es el número de dobles enlaces del PUFA.

La relación de distribución (relación de concentraciones en el equilibrio del complejo en la fase acuosa y del éster en la disolución orgánica) depende del disolvente orgánico que

disuelve los PUFAs. Esta relación aumenta con el número de dobles enlaces, con la temperatura y con la adición de un alcohol (etanol, metanol o propanol) a la disolución acuosa. Esta técnica fue utilizada por Teramoto y cols. (1994) para conseguir un éster de EPA con una pureza del 98%. Esta técnica presenta el inconveniente de la posible contaminación de los PUFAs con iones plata.

1.6.5.- FORMACIÓN DE SALES DE LOS ÁCIDOS GRASOS.

Se han utilizado las solubilidades de las sales de litio en etanol para obtener ácido γ -linolénico (18:3n6) a partir del aceite de sardina (Markley, 1964). La solubilidad de las sales de los ácidos grasos saturados e insaturados en agua y en disolventes orgánicos varía con la naturaleza del ion metálico, con la longitud de la cadena, con el grado de insaturación, con la temperatura, y con las proporciones relativas de otras sales solubles.

El método de mayor interés en este caso está basado en la solubilidad de las sales de litio en acetona. Las sales de litio de los ácidos polienoicos son solubles en acetona del 95%, mientras que los menos insaturados son relativamente insolubles en este medio.

En general, aunque la precipitación con sales se ha empleado en algunos casos para la separación de los PUFAs, estos métodos se han empleado sobre todo para la separación de ácidos saturados y monoinsaturados. Generalmente no se trata de un método eficaz, ya que la estandarización de estos métodos sólo es posible a escala analítica con pequeñas cantidades de ácidos grasos, con cantidades grandes para fines separativos. La estandarización en cuanto a temperatura, pureza de los disolventes y lavado del precipitado, es difícil o impracticable.

1.6.6.- CRISTALIZACIÓN FRACCIONADA A BAJA TEMPERATURA.

Cuando se enfría una disolución de ácidos grasos se puede provocar una cristalización fraccionada de los ácidos grasos en función de su grado de insaturación: los ácidos grasos saturados, los monoinsaturados y una gran parte de los dienoicos, solidifican a diferentes temperaturas, concentrándose en la fracción cristalina, mientras que los PUFAs de tres o más insaturaciones se concentran en la fase líquida. En una primera etapa se retiran los ácidos grasos saturados cristalizados y puede aumentarse la pureza de los PUFAs contenidos en el filtrado mediante cristalizaciones sucesivas. La purificación por recristalizaciones tiene también como objetivo retirar productos de degradación de los PUFAs.

Los disolventes más frecuentes son: acetona (para los ésteres metílicos) e hidrocarburos (para los ácidos). La solubilidad de los ácidos grasos se incrementa con el número de insaturaciones y disminuye con el aumento de la longitud de la cadena (Schlenk y cols., 1961). Los ácidos grasos de cadena corta, independientemente de su grado de insaturación, son muy solubles en disolventes orgánicos y son muy difíciles de separar de los PUFAs por esta técnica.

Sobre todo cuando la mezcla contiene cantidades apreciables de PUFAs, esta técnica no es adecuada para el aislamiento de compuestos individuales sino para la separación de ácidos grasos en dos fracciones (una rica en ácidos grasos saturados y la otra en ácidos grasos insaturados). Ackman (1981) obtuvo un concentrado enriquecido en PUFAs con una composición en EPA comprendida entre 23 y 35% sobre ácidos grasos totales.

Los trabajos publicados sobre cristalización fraccionada a baja temperatura presentan el inconveniente de su escasa sistematización teórica comparada con otras técnicas.

1.6.7.- EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS PUFAS CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

La extracción con fluidos supercríticos (EFS) es una operación efectuada en condiciones de presión y temperatura superiores a las críticas del disolvente, aprovechando el gran poder disolvente de los fluidos supercríticos (FSC) y sus peculiares propiedades físico-químicas. La eficacia de estos fluidos en la extracción es mayor que con disolventes convencionales debido a que los fluidos supercríticos tienen una densidad y un poder disolvente comparable al de los líquidos, pero una viscosidad similar a la de los gases. También las velocidades de transferencia de materia son mayores que en los disolventes convenciones, lo que da lugar a extracciones más rápidas.

El CO₂ es el disolvente ideal debido a su moderada temperatura y presión críticas (31°C y 7,3 Mpa) y a que es un disolvente barato, inerte, fácilmente disponible y seguro. El CO₂ supercrítico (CO₂ SC) también actúa disminuyendo la velocidad de oxidación, ya que evita la presencia del oxígeno. Sin embargo, el CO₂ supercrítico es apolar y no disuelve adecuadamente los compuestos polares. Para evitar este inconveniente se añade hasta un 10% de un alcohol, que actúa como modificador de la polaridad del CO₂ SC (Hardardottir y Kinsella, 1988).

La extracción con esta técnica resultó selectiva sobre los PUFAs lo que permitió la obtención de concentrados de lípidos ricos en PUFAs-n3 a partir de aceites de pescado (Hardardottir y Kinsella, 1988; Polack y cols., 1989). Yamagouchi y cols. (1986) utilizaron CO₂ SC a 24,5 MPa y temperaturas comprendidas entre 40° y 60°C para extraer lípidos de “Krill” liofilizado. Otros investigadores han empleado también esta tecnología para la obtención de concentrados de PUFAs n-3 o ésteres a partir de mezclas de ácidos grasos o ésteres (Nilsson y cols., 1988; Rizvi y cols., 1988; Eisenbach, 1984). Por ejemplo, Nilsson y cols. (1988) consiguieron EPA y DHA del 90% de pureza operando a presión constante y con un gradiente de temperaturas.

Choi y cols. (1987) extrajeron lípidos del alga verde liofilizada *Scenedesmus obliquus*, empleando CO₂ y CO₂-etanol. En el primer caso se obtuvieron sobre todo lípidos neutros con algunos glucolípidos y en el segundo caso el uso de etanol incrementó el rendimiento en lípidos polares.

Polak y cols. (1989) realizaron la extracción de lípidos de *Skeletonema* (5-10% en lípidos) y *Ochromonas danica* (30% en lípidos) con CO₂ SC, siendo la solubilidad de los lípidos máxima a una presión de 24 MPa.

Según Eisenbach (1984) el CO₂ SC concentra mejor los PUFAs n-3 como ésteres metílicos que como triglicéridos, debido a que los primeros tienen un peso molecular más bajo y son más volátiles y, por tanto, son más solubles en el CO₂ SC.

1.6.8.- DESTILACIÓN FRACCIONADA

Esta técnica separa los PUFAs (o cualquier mezcla de sustancias) basándose en las diferencias entre los puntos de ebullición de los distintos componentes de la mezcla. En concreto, la destilación fraccionada de los PUFAs se realiza en columnas de relleno, a vacío y a temperaturas superiores a los 200°C. La volatilidad de los PUFAs depende de la longitud de la cadena y del número de insaturaciones. Mediante esta técnica se pueden separar ésteres de ácidos grasos que difieren en un sólo átomo de carbono, si la eficiencia de la columna es alta (de unos 100 platos teóricos). Sin embargo, la separación de los ésteres de los PUFAs que difieren solamente en el número de dobles enlaces es muy limitada debido a que las diferencias en los puntos de ebullición son pequeñas.

Esta técnica presenta el inconveniente de que, a la temperatura de operación (superior a 200°C), los ésteres de los PUFAs, que son compuestos de gran labilidad térmica, se alteran (pérdidas de insaturaciones, formación de compuestos cíclicos, formación de isómeros con dobles enlaces conjugados, etc.). Este problema se podría resolver operando a vacíos muy elevados (10^{-3} mmHg), aunque en estas condiciones la eficiencia de la columna disminuye considerablemente debido a que los puntos de ebullición de las sustancias a separar se aproximan a medida que disminuye la presión. Abu-Nasr y Holman (1954) recomiendan el uso de esta técnica como la última etapa de purificación de los PUFAs.

Una variante más sofisticada de esta técnica sería la destilación molecular. En esta técnica se aplican vacíos elevados, que permiten que la destilación se produzca a temperaturas mucho menos elevadas pero además se aplica sobre películas monocapa, con tiempos de calentamiento de la muestra reducidos (Ján Cvengros y cols., 2000, 2001). Estas condiciones más suaves permiten evitar la degradación de la muestra.

1.6.9.- SEPARACIÓN DE PUFAS Y DE SUS ÉSTERES POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA.

Se trata de una técnica antigua que, a diferencia de la cromatografía de alta presión, se puede aplicar fácilmente a escala preparativa (Hayashi y Kashimura, 1993).

Al comienzo del proceso la muestra problema se deposita en la parte superior de la columna formando una banda lo más estrecha posible. La separación de los diferentes componentes del producto problema se puede conseguir siguiendo cualquiera de las tres metodologías siguientes: elución, análisis frontal y desplazamiento.

La técnica de elución es la más importante de las tres. Se realiza haciendo fluir de manera continua la fase móvil (o agente eluyente) a través de la columna para conseguir la separación completa de los solutos. La velocidad con que fluirá cada uno de los componentes dependerá del tipo de eluyente y de la mayor o menor adsorción del mismo sobre el material que llena la columna.

En la técnica de análisis frontal la solución del producto problema se hace fluir a través de la columna de manera continua, apareciendo tantos frentes como componentes tenga la mezcla problema.

La técnica de análisis por desplazamiento se puede considerar como un híbrido entre las dos técnicas anteriores, elución y frontal. En este caso, el producto problema se sitúa en la columna de forma idéntica a como se hace en la técnica de elución, pero en este caso la fase móvil está formada por un componente llamado agente desplazante, que desplaza a los solutos en el interior de la columna, ya que compite con ellos en su interacción con la fase estacionaria. El agente desplazante se caracteriza porque se retiene en la fase estacionaria con mayor fortaleza que los solutos que se pretenden separar.

En todas estas técnicas son fundamentales para una buena separación cromatográfica el empaquetamiento uniforme de la fase estacionaria y la elección adecuada de los eluyentes. También es importante que el eluyente no se vea afectado por la fase estacionaria.

Hayashi y Kashimura (1993) obtuvieron fracciones de triglicéridos enriquecidos en EPA mediante una columna de ácido silícico, usando como fase móvil una mezcla de hexano y éter etílico, a partir de extractos de lípidos de vieira, sardina y calamar. Las últimas fracciones tenían entre 47 y 58% de EPA para el aceite de vieira y entre 32 y 40% para el de sardina y calamar.

1.6.10.- PURIFICACIÓN POR VÍA ENZIMÁTICA

Esta última técnica, que es la que desarrollamos en el presente trabajo, se basa en la selectividad que presentan algunas lipasas por determinados ácidos grasos o por determinadas posiciones de las moléculas de triglicéridos.

Así, por ejemplo, el poder de esterificación de la lipasa procedente del hongo *Rhizopus delemar* decrece en el orden oleico>palmítico>EPA>DHA. Con esta enzima, Shimada y cols. (1997b) obtuvieron DHA del 89% de pureza y un 71% de recuperación, a partir de ácidos grasos libres de aceite de atún. Estos resultados se alcanzaron mediante una serie de esterificaciones consecutivas utilizando alcohol láurico como sustrato. Los mismos autores (Shimada y cols., 1997a y 1997c) separaron DHA del 91% de pureza y un 60% de recuperación, a partir de aceite de atún, y γ -linolénico del 94% de pureza con un 67,5% de recuperación a partir de aceite de borraja. Estos resultados se alcanzaron mediante un proceso de dos etapas: hidrólisis del aceite con la lipasa de *Pseudomonas sp.* en medio acuoso y, doble esterificación con la lipasa de *Rhizopus delemar*, utilizando el alcohol láurico como sustrato.

Una de las ventajas de la utilización de las reacciones enzimáticas para la concentración de PUFAs es que permiten obtener concentrados de éstos en forma de acilglicéridos (Haraldsson y cols., 1989).

1.7.- REACCIONES ENZIMÁTICAS

1.7.1.- ENZIMAS

El término *enzima* proviene del griego y significa “que se encuentra en la levadura”. El descubrimiento de la digestión enzimática en el estómago y los estudios iniciales sobre ella, entre 1760 y 1825, fueron el origen de los primeros experimentos importantes sobre catálisis química. En 1897 E. Büchner logró extraer de las células de levadura las enzimas que catalizan la fermentación alcohólica, lo que demostraba claramente que las enzimas podían actuar independientemente de la estructura celular.

El conocimiento que se tenía de las enzimas no era de su estudio directo, sino a través de sus efectos en los sustratos sobre los que actuaban. Ya en 1894, Fischer demostró la especificidad de las enzimas para su sustrato. En 1926, Sumner cristalizó por primera vez una enzima, la ureasa de judía, y poco después Northrop y Kunitz entre 1930 y 1936 cristalizaron la pepsina, la tripsina y la quimotripsina, lo que permitió su estudio y se pudo comprobar que se trataba de proteínas. En 1969 se sintetizó químicamente la primera enzima, la ribonucleasa, a partir de aminoácidos precursores y, aunque su actividad y pureza eran escasas, se demostró que las enzimas no son cualitativamente distintas a los catalizadores no biológicos (Marison, 1996).

Las enzimas son proteínas producidas por seres vivos y su actividad depende de su procedencia. Pueden obtenerse de células animales, vegetales o de microorganismos (hongos y bacterias), siendo éstos las fuentes más habituales. Sólo un 2% de los microorganismos existentes han sido analizados como fuentes de enzimas (Cheetham, 1992).

Las enzimas que proceden de microorganismos son a menudo más útiles que las derivadas de plantas o animales por varias razones: a) se puede garantizar una producción más estable y escalable debido a que los microorganismos crecen de manera más fácil y rápida en grandes biorreactores y con nutrientes relativamente baratos); b) a partir de microorganismos se consigue una gran variedad de actividades catalíticas; c) los microorganismo utilizados tienen características fisiológicas más aceptables para la industria alimentaria, y d) la manipulación

genética permite aumentar la producción de la enzima deseada en las células del microorganismo.

Muchas de las enzimas producidas por los microorganismos son extracelulares, por lo que pueden obtenerse fácilmente separándolas de las células por filtración o centrifugación del caldo de cultivo o del extracto acuoso del cultivo semisólido (Iwai y Tsujisaka, 1984). Otras ventajas de estas enzimas con respecto a las intracelulares son que no necesitan técnicas de ruptura celular, el aislamiento de la enzima concreta a partir de la mezcla es más fácil y tienen una estructura más compacta y más resistente a la desnaturalización.

En general, las enzimas obtenidas a partir de hongos tienen un rango de pH de actuación de neutro a ácido y no son termoestables, mientras que las de origen bacteriano tienden a actuar a pH entre neutro y alcalino y con frecuencia son termoestables (Cheetham, 1992). Algunos hongos productores de lipasas son: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei* y *Penicillium cyclopium*. Algunas bacterias productoras de lipasas son: *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Candida* y *Streptococcus* sp.

1.7.1.1.- Estructura

Se trata de macromoléculas relativamente pequeñas, de varios miles de átomos y masas moleculares entre 10^4 y 10^6 , constituidas por la unión secuencial de 100 a 2500 aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. Cada cadena proteica se repliega espacialmente de forma característica. Las cadenas polipeptídicas de una proteína poseen una conformación nativa que, en condiciones normales de temperatura y pH, es mucho más estable que todas las demás conformaciones posibles, de modo que puede ser fácilmente aislada y retenida en su estado nativo.

La estructura proteínica se puede resumir en:

- 1) Estructura primaria: secuencia de los residuos de aminoácidos unidos por medio de enlaces peptídicos. Participan unos 20 aminoácidos del tipo L- α -aminoácidos que son los más comunes en la naturaleza.
- 2) Estructura secundaria: se refiere a la forma en que la estructura primaria se pliega y forma hélices α y láminas β . Es principalmente el resultado de los puentes de hidrógeno entre los aminoácidos.

- 3) Estructura terciaria: se refiere al doblamiento y curvatura de la cadena para formar proteínas globulares inducidas por interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. La estructura secundaria se pliega adoptando formas que en ocasiones parecen esféricas, que se mantienen estables por los enlaces entre los radicales R de los aminoácidos. La mayoría de las enzimas son proteínas globulares.
- 4) Estructura cuaternaria: se refiere a la unión de varias cadenas polipeptídicas, idénticas o no, mediante enlaces débiles, para formar proteínas multiméricas u oligoméricas. La mayoría de las enzimas son de este tipo.

Según su estructura, se pueden diferenciar dos tipos de enzimas: las estrictamente proteicas, que son holoproteínas, y las denominadas holoenzimas, que son enzimas constituidas por la unión de una fracción polipeptídica o apoenzima y de una fracción no polipeptídica o cofactor. Los cofactores pueden ser activadores inorgánicos, como los iones metálicos, o activadores orgánicos, como los grupos prostéticos o coenzimas (por ejemplo, el ATP, el NAD o el Acetil CoA).

1.7.1.2.- Características

Las enzimas cumplen las dos propiedades comunes a todos los catalizadores: 1ª) durante la reacción no se alteran; 2ª) no alteran la composición del equilibrio para la obtención de más producto, simplemente se alcanza en menor tiempo (catálisis positiva) o en mayor tiempo (catálisis negativa). Las enzimas, sin embargo, exhiben otras propiedades que difieren de las mostradas por los catalizadores en general, destacando su alto poder catalítico, su especificidad y la capacidad para regular su actividad catalítica mediante diversos compuestos de origen natural.

En cuanto a su eficacia catalítica, provocan un considerable incremento de la velocidad de reacción con respecto a la reacción no catalizada o usando catalizadores inorgánicos convencionales, consiguiendo que la velocidad de reacción se multiplique por un factor entre 10^6 y 10^{18} . Además, actúan a temperaturas moderadas, permitiendo que se realicen reacciones que sólo podrían llevarse a cabo en condiciones de temperatura, presión y pH mucho más severas que podrían desnaturalizar los productos de reacción. Esta eficacia catalítica está basada en el reconocimiento específico del sustrato. Existen tres tipos de especificidad:

- * Absoluta, cuando la enzima sólo reconoce un tipo de sustrato.

- * De grupo, cuando la enzima reconoce solamente a un grupo de moléculas que presentan un determinado tipo de enlace químico.
- * De clase, cuando la actuación de la enzima no depende del tipo de molécula, sino del tipo de enlace.

La especificidad se muestra incluso a nivel posicional (estereoespecificidad), (Klibanov, 1982), es decir, algunas enzimas son capaces de catalizar una reacción química que tiene lugar en un punto preciso de la molécula de sustrato. Otras enzimas son capaces de reconocer selectivamente moléculas muy semejantes, como los isómeros ópticos. Este reconocimiento específico alcanza también al tipo de reacción catalizada, es decir, una enzima catalizará sólo un tipo de reacción y no otro. Prácticamente hay tantas enzimas como reacciones celulares.

En la transformación del sustrato por la enzima no se producen reacciones secundarias, tan típicas con los catalizadores no enzimáticos, formándose un solo producto específico.

En la enzima tan sólo una pequeña región interviene en el reconocimiento y en la transformación del sustrato; es el denominado centro activo, que se caracteriza por la naturaleza de los grupos químicos de los repliegues de la cadena peptídica y por su distribución espacial. En esa zona los grupos químicos presentes fijan al sustrato y permiten su transformación.

Numerosos factores, como la temperatura, el pH y la concentración de sustratos, actúan sobre las enzimas naturales, sea como activadores o como inhibidores de la reacción. Además, algunas enzimas necesitan un cofactor para ser activas.

Un problema que se presenta en el uso de las enzimas es su estabilidad. Al ser unas moléculas muy complejas se van desnaturalizando en el transcurso de la reacción. Además, suelen actuar en medio acuoso, pero en medio orgánico, necesario para ciertas reacciones, se suelen desnaturalizar más rápidamente. En algunos casos la inmovilización de las enzimas sobre soportes de polímeros permite resolver el problema de su estabilidad.

1.7.1.3.- Clasificación

Debido a su alto grado de especificidad, la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica estableció en 1979 un sistema con seis grandes clases o grupos (tabla 1.4).

Tabla 1.4.- Clasificación de las enzimas en clases (Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, 1979)

Nº de clase	Clase o grupo	Reacciones catalizadas
1	Oxido-reductasas	Oxidación-reducción del sustrato
2	Transferasas	Transferencia de radicales sin que queden libres.
3	Hidrolasas	Hidrólisis. Se rompen enlaces por introducción de grupos -OH y -H.
4	Liasas	Eliminación de grupos con formación de dobles enlaces.
5	Isomerasas	Isomerización.
6	Ligasas (sintetasas)	Unión de dos moléculas.

Cada clase representa el tipo principal de reacción que catalizan y está dividida numéricamente en subclases que hacen referencia al tipo concreto de actuación que realizan. Cada subclase está a su vez dividida en subsubclases, según las características específicas de la enzima en particular. Así, cada enzima está numerada con cuatro cifras: la primera indica la clase; la segunda, la subclase; la tercera la subdivisión de la subclase y la cuarta es la específica de la enzima. Así, por ejemplo, el número E.C. 3.1.1.3 significa: 3, es una hidrolasa; 1, actúa sobre ésteres; 1.3, es una glicerol éster hidrolasa.

Por otra parte, es frecuente utilizar otro tipo de nomenclatura que no está sistematizada. En algunos casos los nombres de algunas enzimas se forman utilizando un prefijo tomado del nombre del sustrato y el sufijo “asa”. Así, las enzimas que actúan sobre las grasas o lípidos se denominan lipasas. Otras conservan su nombre antiguo, que puede no recordar en nada su función. Actualmente también

se aplica una nomenclatura que consta del nombre completo del sustrato, a continuación el nombre de la coenzima (si la hay), seguido por la acción que cumplen ellas en el sustrato y, por último, el sufijo “asa” (por ejemplo, la glucosa oxidasa).

1.7.2.- LIPASAS

Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica las lipasas son acilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3, ya que su función primordial es la hidrólisis de acilglicéridos.

Las secuencias de aminoácidos (estructura primaria) de los centros activos de las lipasas estudiadas hasta la fecha son His-X-Y-Gly-Z-Ser-W-Gly o Y-Gly-His-Ser-W-Gly, (donde His, Gly y Ser son los aminoácidos histidina, glicina y serina, respectivamente y W, X, Y y Z son otros aminoácidos). Brady y cols. (1990) determinaron mediante rayos X las estructuras de la lipasa de *Mucor miehei* y de la lipasa pancreática humana, estableciendo que el centro activo de estas lipasas lo forma la triada Ser..His..Asp (siendo Asp el ácido aspártico). Los resultados obtenidos por cristalografía de rayos X de la lipasa pancreática y de la lipasa de *Mucor miehei* indican que la serina, que tiene un grupo hidroxilo disponible para la esterificación con un ácido graso y así formar el complejo acil-enzima, es el residuo nucleofílico esencial para la catálisis, Verger (1984).

La mayoría de las lipasas de origen animal tienen un pH óptimo ligeramente alcalino (entre 8 y 9). En cambio, las de origen microbiano muestran una actividad máxima a valores de pH en el rango 5,6-8,5 y una máxima estabilidad a pH neutro, Malcata y cols. (1992). Dada la naturaleza adaptable de las bacterias, la dependencia de la actividad y estabilidad con el pH depende de las condiciones de cultivo: si los microorganismos estaban creciendo a pH alcalino, la lipasa producida tendrá un pH óptimo alcalino, Sugiura (1984).

Con respecto a la temperatura, la mayoría de las lipasas presentan una actividad óptima entre 30 y 45°C. La termoestabilidad varía ampliamente según su origen: las de fuentes animales y plantas son usualmente menos estables que las extracelulares microbianas. Algunas, como la lipasa pancreática de cerdo, son extremadamente estables, incluso a 100°C, Zaks y Klivanov (1984), aunque la estabilidad térmica está

relacionada con el contenido en agua en la vecindad de la lipasa, aspecto que se analiza posteriormente.

1.7.2.1.- Aplicaciones

Las lipasas tienen una amplia utilización en el tratamiento y modificación de grasas y aceites, Mukherjee (1990), sobre todo en la industria alimentaria ya que permiten una controlada modificación de sus propiedades nutricionales, Willis y cols. (1998). Otra aplicación de las lipasas es en la industria alimentaria de aromas y saborizantes, en cosmética, en la industria farmacéutica y otras. En estos campos es especialmente interesante que los ingredientes sean preparados por medios naturales como la catálisis mediante lipasas (Gandhi, 1997). Además, otros campos importantes de aplicación son: fabricación de detergentes, fabricación de papel, transformaciones en la industria petroquímica, síntesis orgánicas en la industria de química fina, biotransformaciones en medio acuoso u orgánico, resolución de mezclas racémicas de ácidos y alcoholes, acilaciones regioselectivas y síntesis de ésteres, Sharma y cols. (2001).

Sin embargo, a pesar de su enorme versatilidad, su producción sólo alcanza el 3-5% de la producción total de enzimas. Según Gandhi (1997), hay varias razones para esta infrautilización:

- Se consideraba que estas enzimas requerían un medio acuoso para su actividad. Esta idea ha sido rebatida por los trabajos de Zaks y Klibanov en los años 80-90. Estos autores han demostrado que las lipasas y otras enzimas son activas en medio orgánico, Zaks y Klibanov (1984, 1985 y 1988a).
- Existía la creencia de que las lipasas son altamente inestables, sin embargo, el uso de disolventes orgánicos y de la tecnología de inmovilización de enzimas han solucionado este problema además de permitir la fácil recuperación y reutilización de las mismas.
- También influye en el poco uso de las lipasas su alto coste, lo que implica que su uso esté restringido a los procesos donde el valor de los productos obtenidos es alto. Sin embargo, es evidente que el coste de su fabricación disminuirá al extenderse sus aplicaciones y aumentar su demanda.

El reciente avance en las ciencias alimentarias ha mostrado la importancia de los ácidos grasos insaturados y el peligro de la isomerización de cis a trans durante la hidrogenación química de aceites vegetales, lo que ha impulsado el desarrollo de bioprocesos empleando condiciones suaves, Lortie (1997). En este sentido, Schuch y Mukherjee (1989) y Makasçi y cols. (1996) han demostrado que la esterificación, catalizada por lipasas, de los ácidos grasos con los monoglicéridos (MG) y diglicéridos (DG) presentes en el aceite y/o glicerina, puede plantear una alternativa para la desacidificación de las grasas y aceites.

Otro campo de aplicación de las lipasas es la producción enzimática de monoglicéridos, que se utilizan ampliamente en alimentación como agentes emulsionantes para panadería, margarinas, etc. (Akoh y cols., 1992; Li y Ward, 1994; Kwon y cols., 1995).

Mediante lipasas es posible modificar las propiedades físico-químicas y nutritivas de distintos productos por intercambio total o parcial de algunos ácidos grasos. Así, por ejemplo, se han incorporado EPA y DHA al aceite de chufa (Sridhar y Lakshminarayana, 1992); se han incorporado PUFAs n-3 a aceites vegetales de maíz, girasol u oliva (Li y Ward, 1993b), a aceite de soja (Huang y Akoh, 1994), e incluso a las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos del aceite de palma (Ramírez Fajardo y cols, 2003); se han obtenido nuevos triglicéridos a partir de aceites de palma y coco con ácidos de cadena corta (Long y cols., 1997); se han desarrollado nuevos triglicéridos, basados en aceites vegetales, a partir de la reacción de la tripalmitina con ácidos grasos insaturados, obteniéndose una distribución de ácidos grasos semejante a la de la leche humana (Quinlan y Moore, 1993). En este sentido Balcão y cols. (1998) analizan la aplicación de lipasas en la modificación de grasas lácteas para hacer más adecuadas sus propiedades físicas, digestivas o de aporte calórico.

Igualmente se ha estudiado la obtención de aceites de pescado enriquecidos en ácidos grasos de cadena larga. Así por ejemplo, los aceites de hígado de bacalao, de sardina (Hoshino y cols., 1990) y el aceite de atún (Tanaka y cols., 1992) se han enriquecido en PUFAs mediante hidrólisis selectiva catalizada por distintas lipasas (*Candida cylindracea* es la que proporcionó los mejores resultados). También Shimada y cols. (1995) enriquecieron aceite de atún en PUFAs mediante hidrólisis selectiva con la lipasa de *Geotrichum candidum*. Yamane y cols. (1992 y 1993)

enriquecieron el aceite de hígado de bacalao en PUFAs mediante acidolisis entre este aceite y ácidos grasos libres enriquecidos en PUFAs n-3, usando la lipasa de *Mucor miehei* en sistemas sin disolvente. Por este mismo procedimiento Adachi y cols. (1993) enriquecieron aceite de sardina en PUFAs empleando como lipasas lipoproteínas de *Pseudomonas* sp. Li y Ward (1993a) sintetizaron triglicéridos ricos en PUFAs n-3 mediante esterificación enzimática de glicerina con concentrados de PUFAs n-3 procedentes de aceite de hígado de bacalao.

Recientemente, en nuestro laboratorio se han obtenido triglicéridos ricos en EPA, AA y en DHA mediante esterificación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados con glicerina con la lipasa Novozym 435 (Novo Nordisk, A/S) de *Candida antarctica* (Esteban Cerdán y cols., 1998; Robles Medina y cols., 1999). Esta obtención de los triglicéridos ricos en PUFAs se desarrolló en tres etapas: saponificación de los lípidos para la obtención de un extracto de ácidos grasos libres, concentración de los PUFAs por el método de los compuestos de inclusión de urea y, finalmente, esterificación por vía enzimática. Este método se ha aplicado a distintos sustratos y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Triglicéridos con un 45,7% de DHA y 25,7% de EPA a partir del aceite de hígado de bacalao con una recuperación del 93,5% de los TG.
- Triglicéridos con un 42,5% de EPA a partir de *P. tricornutum* con un 96,5% de recuperación de los TG.
- Triglicéridos con un 43,4% de AA y un 45,6% de EPA a partir de *P. cruentum* con un 83% de recuperación de los TG.

Tal y como se detallará en el apartado 1.8, recientemente se observa un interés creciente en la concentración y purificación de ácidos grasos específicos a partir de aceites naturales mediante procesos enzimáticos. Así por ejemplo, se han obtenido concentrados de EPA y DHA mediante la transesterificación de aceites de pescado con etanol, empleando lipasas (como *Pseudomonas*) con baja actividad hacia el EPA y el DHA (Haraldsson y cols., 1997; Breivik y cols., 1997). También se han obtenido concentrados de AA y DHA mediante hidrólisis selectiva parcial de fosfolípidos de yema de huevo utilizando la lipasa Lipozyme IM (Ono y cols., 1997). Hills y cols. (1990) obtuvieron concentrados de ácido γ -linolénico (a partir de aceite de onagra) y de DHA (a partir de aceite de hígado de bacalao) mediante esterificación selectiva de los otros ácidos grasos acompañantes con butanol, utilizando lipasas como

Lipozyme, que discriminan fuertemente a los ácidos citados. La concentración y purificación de DHA también se ha realizado mediante un proceso en dos etapas: hidrólisis de aceite de atún catalizada con la lipasa de *Pseudomonas* sp. y esterificación selectiva de los ácidos grasos libres resultantes con alcohol láurico, catalizada con la lipasa de *Rhizopus delemar* que discrimina el DHA y lo concentra en la fracción no esterificada (Shimada y cols., 1997a, b). También el ácido γ -linolénico se ha concentrado a partir de aceite de borraja empleando métodos enzimáticos en dos etapas: hidrólisis previa del aceite y esterificación selectiva posterior de los ácidos grasos libres usando la lipasa de *Rhizopus delemar* (Shimada y cols., 1997c) y en tres etapas: hidrólisis selectiva en isooctano, con la lipasa de *Candida rugosa*, esterificación selectiva de los ácidos grasos liberados con n-butanol mediante la lipasa Lipozyme IM-20 y finalmente un enriquecimiento mediante acidólisis de los ácidos grasos no hidrolizados con los ácidos grasos libres no esterificados (Huang y cols., 1997).

Otros productos de interés reciente, obtenidos utilizando lipasas, son los “lípidos estructurados”. Los de mayor interés son los triglicéridos en los que las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula están ocupadas por ácidos grasos de cadena media y la posición *sn*-2 está ocupada por ácidos grasos esenciales de cadena larga, como por ejemplo ácidos grasos poliinsaturados. Estos lípidos son más fáciles de absorber por el organismo que los que tienen ácidos grasos de cadena larga en las tres posiciones de la molécula del triglicérido, como son la mayoría de los triglicéridos naturales (Jandacek y cols., 1987). Están especialmente indicados para su incorporación a fórmulas infantiles y para pacientes con problemas de absorción de lípidos. Las lipasas son fundamentales para la síntesis de este tipo de triglicéridos porque pueden catalizar la incorporación de ácidos grasos de interés en posiciones específicas de la molécula de glicerina, bien por hidrólisis selectiva de los aceites naturales y posterior esterificación selectiva, o bien mediante reacciones de interesterificación y/o acidólisis. Así por ejemplo, Camacho Páez y cols. (2002) han obtenido lípidos estructurados ricos en PUFAs n-3 mediante acidólisis de aceite de hígado de bacalao con ácido caprílico usando la lipasa Lipozyme IM, que es específica *sn*-1,3. Por un procedimiento similar González Moreno y cols. (2004) han sintetizado lípidos estructurados enriquecidos en EPA por acidólisis de un aceite comercial de origen marino rico en EPA y ácido caprílico. (Shimada y cols., 1996a, b), también a partir de tricaprilina y ácidos de aceites de pescado enriquecidos en EPA o DHA usando la

lipasa SP 435 (Lee y Akoh, 1998); mediante interesterificación entre tricaprilina y aceite de cacahuete en presencia de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Soumanou y cols., 1997); mediante interesterificación de tricaprina y trilinoleina con ésteres etílicos de ácido cáprico usando las lipasas IM 60 de *Rhizomucor miehei* y SP 435 de *Candida antarctica* (Lee y Akoh, 1997), mediante interesterificación de triestearina y tricaprina usando la lipasa IM 60 de *Rhizomucor miehei* (Akoh y Yee, 1997). También Mu y cols. (1998) han sintetizado lípidos estructurados mediante interesterificación de varios aceites vegetales y ácido caprílico usando la lipasa IM de *Rhizomucor miehei*.

1.7.2.2.- Inmovilización

Como se ha dicho anteriormente, a pesar de todas las ventajas que aporta el empleo de lipasas en muchos procesos biotecnológicos, el empleo de estos catalizadores no se ha generalizado en los procesos a escala industrial debido a que muchas lipasas no son suficientemente estables en las condiciones de trabajo. Por otra parte, muchas lipasas son muy solubles en agua, lo que dificulta su separación de los sustratos y productos para poder reutilizarlas. Además, en las aplicaciones industriales es imprescindible para la economía del proceso utilizar la lipasa repetidas veces. Con la inmovilización de estas enzimas se han podido superar estos inconvenientes y permitir recuperarlas con facilidad en los procesos discontinuos y utilizarlas en procesos continuos haciendo el proceso biotecnológico económicamente rentable.

Como ventajas del empleo de enzimas inmovilizadas se pueden destacar:

- El aumento de la estabilidad de la enzima (estabilidad mecánica, térmica, etc.).
- La posibilidad de emplearlas tanto en medios acuosos como orgánicos.
- La facilitación de la reutilización de la enzima, por lo que disminuyen los costes del proceso.
- La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación de la enzima inmovilizada.

Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización podrían ser:

- La alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.

- La gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte.
- Suele haber una pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización.
- El biocatalizador final es más caro que la enzima nativa.

Existen diferentes tipos de reactores enzimáticos donde se aprovechan las ventajas de las enzimas inmovilizadas. Los más usuales son los reactores de tanque agitado (reactor de dispersión), de lecho fluidizado y de lecho empaquetado. Estos reactores con enzimas inmovilizadas permiten el empleo de cargas elevadas de enzima, la cual mantendrá su actividad durante más tiempo. Estos sistemas pueden incluir recirculación, lo que permite la obtención de productos con mayor pureza o mayor conversión, Balcão y cols. (1996).

La inmovilización de enzimas es un método por el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica. En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: por unión química o por retención física (Kennedy y Cabral, 1983).

1.7.2.2.1.- Inmovilización por unión química

Son los métodos más utilizados de inmovilización de enzimas en general y de lipasas en particular, y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resulta determinante en el comportamiento posterior del biocatalizador. Inicialmente los soportes solían ser de tipo mineral como vidrios porosos, tierra de diatomeas, gel de sílice o alúmina. Recientemente, son más usados los basados en resinas de intercambio iónico, Celite o biopolímeros, (Villeneuve y cols., 2000). Se debe procurar que la inmovilización de la enzima incremente su afinidad por el sustrato, disminuya las posibles inhibiciones, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado. Por otro lado, **el soporte no debe restar selectividad** a la enzima, ni facilitar reacciones secundarias; por ejemplo, soportes con cargas superficiales (resinas de intercambio aniónico como Duolite 568 o basados en gel de sílice 60) pueden promover reacciones de acil migración, lo que provoca una merma en la estereoselectividad de

las lipasas, (Millqvist Fureby y cols., 1996). En este sentido, Kosugi y cols. (2000) estudiaron como distintas formas de inmovilización influían sobre la actividad de la lipasa *Rhizomucor miehei* en la esterificación de PUFAs.

a) Adsorción:

La lipasa se adsorbe sobre soportes, generalmente hidrófobos, mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones iónicas. Existen numerosos trabajos sobre estas técnicas de inmovilización; por ejemplo, Al-Duri y Yong (2000) estudiaron el equilibrio de adsorción de cuatro lipasas distintas sobre soportes con distinto grado de hidrofobicidad y Persson y cols. (2000) compararon la adsorción de la lipasa *Candida rugosa* sobre Celite y sobre polipropileno EP-100. Los principales factores que influyen en la adsorción son: el pH del medio (que controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido), la fuerza iónica (que al aumentarse produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína) y el diámetro de poro (que debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima).

Las principales ventajas de este método son su preparación sencilla, su bajo coste, no se producen cambios de especificidad enzimática y los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua. Los principales inconvenientes de la adsorción son la difícil optimización de las variables que controlan la adsorción y que los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico, ya que la unión al soporte es débil.

b) Unión covalente:

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizás el método de inmovilización más interesante industrialmente, Arroyo (1998). Puede destacarse el trabajo de Manjon y cols. (1991), en el que se compara el comportamiento de la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada covalentemente sobre nylon y por adsorción sobre Celite; Arroyo y cols. (1999) estudian la influencia de la actividad del agua en la inmovilización covalente de la lipasa *Candida antarctica* sobre diferentes soportes; también es interesante la revisión de Stark y Holmberg (1989) sobre inmovilizaciones mediante uniones covalentes de la lipasa *Rhizopus sp.*

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con grupos nucleófilos de las proteínas. Las principales ventajas de este método son que el derivado enzima-soporte obtenido tras la inmovilización es fácil de manipular, que la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización y que aumenta la resistencia de la enzima a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. En cambio la inmovilización por enlace covalente presenta como inconvenientes que es necesario conocer la densidad de grupos de enlace activos por unidad de superficie del soporte, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte (a veces estos enlaces pueden distorsionar la estructura de la enzima y conducir a derivados inactivos), que el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo de la enzima (para evitar esta posible alteración la inmovilización puede realizarse en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo) y que la inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a los cambios de pH, fuerza iónica, etc.

c) Entrecruzamiento

El método de entrecruzamiento o “cross-linking”, consiste en utilizar reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida, Arroyo (1998), Villeneuve y cols. (2000). El resultado del entrecruzamiento son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

1.7.2.2.2.- Inmovilización por retención física

a) Atrapamiento:

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por prepolímeros fotoentrecruzables o polímeros insolubles del tipo poliacrilamida (el más corriente), colágeno, alginato, carraginato o resinas de poliuretano, Villeneuve y cols. (2000). El proceso de

inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

b) Granulación:

Este novedoso método de inmovilización se basa en la tecnología de granulación. La enzima y un aglutinante líquido se aplican por atomización a un portador de sílice cuyo tamaño de partícula es inferior a 100 μm . Durante la granulación, las partículas de sílice se aglomeran en grandes partículas porosas en cuya superficie la enzima está distribuida uniformemente. El diámetro medio de las partículas es de aproximadamente 600 μm y la superficie es de aproximadamente 50 m^2 por gramo. Esto proporciona una amplia superficie en donde el sustrato puede entrar en contacto con la enzima. Aunque los gránulos de sílice son porosos, tienen una estabilidad mecánica alta y pueden emplearse tanto en reactores de dispersión como en columnas de lecho fijo. Además todos los componentes de la granulación tienen calidad alimentaria. Estos derivados inmovilizados sólo pueden utilizarse en sistemas exentos de agua, ya que el agua provoca la desintegración del sistema enzima-material portador. Para muchas aplicaciones de lipasas, la exigencia de un proceso sin agua no es ningún problema, ya que los sustratos son aceites o grasas. La lipasa de *Mucor miehei* ya se comercializa inmovilizada de esta forma bajo la denominación Lipozyme TL IM[®], Christensen y cols. (1998).

c) Inclusión en membranas:

Microencapsulación: en esta técnica las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no

de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por agentes de superficie, también llamadas "miscelas inversas"). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con diámetros comprendidos entre 1 y 100 μm . Mediante este método se pueden encapsular simultáneamente una gran variedad de enzimas, células o biomoléculas, permitiendo que se lleven a cabo determinadas reacciones que suceden en múltiples pasos, Klei y cols. (1985). Esta novedosa técnica todavía no es muy utilizada en la inmovilización de las lipasas para fines industriales.

Reactores de membrana: el desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria, Balcão y cols. (1996). Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general en esta metodología se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor. Esta adsorción se puede realizar mediante el paso de una solución tamponada de enzima a través de la membrana o por contacto de una solución de enzima con la membrana.

1.7.2.3.- Especificidades

Las lipasas muestran grados variables de especificidad hacia los sustratos y tipos de reacciones. A menudo una lipasa puede catalizar una reacción con un amplio rango de sustratos, pero la velocidad de reacción varía ampliamente debido a las diferencias en la estructura de las moléculas de sustrato (Mukherjee, 1990; Bloomer, 1992). Según Jensen y cols. (1983), la especificidad de las lipasas depende de las propiedades moleculares de la enzima, de la estructura del sustrato y de los factores que afectan al enlace enzima-sustrato.

Así, pueden considerarse varios tipos de especificidad de las lipasas (Jensen y cols., 1983 y 1990; Bloomer, 1992; Villeneuve y Foglia, 1997):

- a) especificidad por el sustrato, que depende de la naturaleza de los lípidos o clases lipídicas,
- b) regioespecificidad, regioselectividad, especificidad por las posiciones 1(3) ó por la posición 2 del triglicérido,

- c) especificidad por el ácido carboxílico,
- d) estereoespecificidad o especificidad por la posición 1 o por la posición 3.

Rangheard y cols. (1989), aunque ensayaron sólo cuatro lipasas y los resultados no puedan ser generalizables, encontraron que las lipasas ensayadas presentan la misma especificidad (ácido graso, posicional, etc.) en disolventes orgánicos que en sistemas emulsificados bifásicos.

1.7.2.3.1.- Especificidad por el sustrato

Los acilglicéridos son el sustrato normal de las lipasas, por lo que éstas son capaces de hidrolizar los enlaces ésteres de los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos e incluso de los fosfolípidos, aunque no todos a la misma velocidad. Así, la especificidad con respecto al sustrato está definida como la habilidad para hidrolizar preferentemente un glicérido en particular (Villeneuve y Foglia, 1997). Por ejemplo, durante la digestión, la hidrólisis de los triglicéridos es incompleta; los diglicéridos resultantes son transformados en monoglicéridos, pero su hidrólisis es mucho más lenta. En la mayoría de los animales los triglicéridos son el sustrato preferente de las lipasas y los monoglicéridos el peor. También es así para la amplia mayoría de las lipasas procedentes de plantas y microorganismos. El plasma animal aparentemente contiene lipasas lipoproteínas independientes para la hidrólisis de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos (Jensen y cols., 1983).

La actividad de las lipasas también depende del tipo de reacción. Así, la actividad de la lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme) sobre sustratos similares disminuye en el orden de las siguientes reacciones: hidrólisis > síntesis de ésteres > alcoholisis de un triglicérido > alcoholisis de un éster metílico > interesterificación de un triglicérido y un éster etílico > acidolisis de un triglicérido (Bloomer, 1992). Igualmente se ha observado que la actividad de transesterificación con ésteres etílicos como dadores de grupos acilo es mayor que con los ácidos grasos libres (Haraldsson y cols., 1989; Bloomer y cols., 1991).

1.7.2.3.2.- Especificidad posicional, regioespecificidad o regioselectividad

Esta especificidad está definida como la habilidad de las lipasas para distinguir entre las dos posiciones externas (enlaces éster primarios, posiciones 1 y 3) y la posición interna (posición 2) del esqueleto de los triglicéridos. En todas las

reacciones con glicéridos las lipasas catalizan la eliminación o el intercambio de grupos acilo del esqueleto de la glicerina, sin embargo, diferentes lipasas pueden mostrar preferencias por la posición del grupo acilo en el triglicérido. Las lipasas obtenidas de fuentes naturales pueden ser posicionalmente no específicas (o aleatorias) o disponer de uno o dos tipos de especificidad posicional: específicas *sn*-1,3 o específicas *sn*-2.

Para las lipasas no específicas, las tres posiciones del triglicérido son igualmente catalizadas. Algunas lipasas de este tipo son: *Chromobacterium viscosum*, *Candida cylindracea*, Novozym 435 de *Candida antarctica*, *Penicillium expansum* y *Aspergillus* sp.

La especificidad *sn*-1,3 representa la catálisis preferente sobre las posiciones externas de la molécula de glicerina frente a la del carbono central. Ejemplos de lipasas con este tipo de especificidad son *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* (Okumura y cols., 1975), la lipasa pancreática de cerdo, *Rhizopus arrhizus* y Lipozyme de *Mucor miehei*.

La especificidad *sn*-2 representa la catálisis preferente del carbono central, y es extremadamente rara. Ejemplos de este tipo son las lipasas de *Geotrichum candidum*, de *Candida antarctica* A y de *Candida parapsilosis*. La primera tiene la particular habilidad de hidrolizar los ácidos oleico y linoleico de la posición *sn*-2 (Jensen y cols., 1983), la segunda también hidroliza preferentemente la posición *sn*-2 del glicérido (Villeneuve y Foglia, 1997) y la lipasa de *Candida parapsilosis* hidroliza más rápidamente la posición *sn*-2, además de presentar especificidad sobre algunos AGLs insaturados de cadena larga (Riaublanc y cols., 1993).

Matori y cols. (1991) han analizado la especificidad posicional de más de treinta lipasas mediante la hidrólisis de la trioleína. Asignan un índice de especificidad posicional (PSI) en función de la cantidad de isómeros de los diglicéridos obtenidos con cada una de ellas, separados por cromatografía en capa fina:

$$PSI = \frac{1,2(2,3)DG - 1,3DG}{1,2(2,3)DG + 1,3DG} 100 \quad [1.9]$$

y las clasifican en tres tipos: específicas *sn*-1,3 (PSI = 100), no específicas (entre -30 y 30) y lipasas de un grupo intermedio con valores de entre 70 y 80; en sus

resultados no encuentran valores entre 100 y 80, ni entre 70 y 30. Este último grupo de lipasas, teóricamente, hidrolizan los enlaces ésteres de las posiciones 1, 3 a una velocidad entre 5.7 y 9 veces más rápida que la de hidrólisis de la posición 2, lo que parece indicar, según estos autores, que estos preparados enzimáticos son una mezcla de lipasas de los dos primeros grupos. Ota y cols. (1996), aplicando un método similar, encuentran bastantes lipasas con valores del índice PSI entre 80 y 100.

Fevrier y cols. (2001) evaluaron la regioselectividad de diez lipasas comerciales basándose en la esterificación entre el ácido caprílico y los alcoholes propílico e isopropílico en hexano, resultando que la lipasa inmovilizada Lipozyme IM[®] de *Rhizomucor miehei* no sólo era fuertemente 1,3 específica sino que además proporcionaba el mayor rendimiento.

1.7.2.3.3.- Especificidad por los ácidos grasos o acil-especificidad

Casi todas las lipasas muestran algún grado de selectividad por un ácido graso particular o, más bien, por una clase de ácidos grasos. A menudo exhiben una habilidad particular para actuar sobre ácidos grasos cuyas longitudes de cadena o grados de insaturación están en rangos bien definidos. Un caso extremo es el de la lipasa de *Geotrichum candidum* que únicamente reacciona con ácidos grasos que contengan un doble enlace cis en la posición 9 (Jensen y cols., 1983). Foglia y Sonnet (1995) han ampliado este estudio sobre la selectividad de la lipasa de *G. candidum* y han comprobado que discrimina a los ácidos grasos con más de 18 átomos de carbono que contienen insaturaciones entre las posiciones 6 y 12. En concreto, han observado que esta lipasa discrimina fuertemente al ácido γ -linolénico, discriminación que es incluso mayor en reacciones de esterificación y que se mantiene aún con la lipasa inmovilizada. Sonnet y cols. (1993) han utilizado esta discriminación de *G. candidum* para realizar hidrólisis y esterificaciones selectivas y enriquecer un aceite de semilla de onagra en ácido erúcico.

Este tipo de selectividad de las enzimas está condicionada por dos factores:

- 1) el impedimento estérico entre la estructura tridimensional del centro activo de la lipasa y la molécula de sustrato
- 2) los desplazamientos electrónicos en la molécula de sustrato.

El impedimento estérico es el factor más condicionante y en él influyen tres características del ácido graso: ramificaciones, insaturaciones y longitud de la cadena.

La presencia de ramificaciones en posiciones cercanas al grupo carboxilo hace disminuir la velocidad de reacción. Así, con la presencia de un grupo etilo en el carbono siguiente al carboxilo, hay una pérdida completa de reactividad, Miller y cols. (1988). También la presencia de dobles enlaces en posiciones cercanas al grupo carboxilo hace disminuir la actividad de la lipasa, Miller y cols. (1988), Bloomer y cols. (1992). Sin embargo, la lipasa de *C. viscosum* puede catalizar reacciones con PUFAs a altas velocidades, Osada y cols. (1990 a y b). En cuanto a la longitud de la cadena, en general, las lipasas reaccionan más rápidamente con los sustratos de cadena corta. Sin embargo, hay lipasas que reaccionan rápidamente con ácidos grasos de cadena larga, saturados o no, si bien con estos ácidos se requiere cierta flexibilidad de la cadena para interactuar con el centro activo. Por ejemplo, en el caso de las lipasas de *Mucor miehei*, la actividad de interesterificación se incrementa notablemente del ácido acético al octanoico, pero es casi independiente de la longitud de la cadena entre el octanoico y el esteárico, que presentan más flexibilidad en sus cadenas Miller y cols. (1988).

La selectividad de las lipasas por los ácidos grasos no está determinada sólo por la estructura química del sustrato sino también por las propiedades físicas de la emulsión o interfase en la que actúa. Así por ejemplo, la actividad de las lipasas con varios triglicéridos **depende de la temperatura**: cuando se incrementa ésta, las velocidades de hidrólisis de los ácidos de cadena larga es mayor que la de los correspondientes de cadena corta (Malcata y cols., 1992).

Esta preferencia de la lipasa por un ácido graso particular o la discriminación sobre otros permite obtener productos enriquecidos en uno u otro tipo particular de ácido graso. Por ejemplo, la habilidad de las lipasas de *Mucor miehei* y *Candida cylindracea* para discriminar los PUFAs n-3, permite la concentración de éstos a partir de aceites marinos (Hills y cols., 1990). Igualmente, la especificidad por los ácidos grasos de cadena corta de la lipasa de *Candida antarctica* puede proveer un método útil para incrementar la proporción de triglicéridos de cadena media en diferentes aceites mediante reacciones de interesterificación (Villeneuve y Foglia, 1997).

Esta especificidad sobre ácidos grasos depende también del tipo de reacción catalizada. Así, Shimada y cols. (1997d) observaron que la lipasa de *Rhizopus delemar* actúa con una actividad moderada sobre DHA y GLA en reacciones de acidólisis pero muy débilmente en reacciones de hidrólisis, siendo en éstas, por tanto, mucho más estricta esta selectividad.

1.7.2.3.4.- Estereoespecificidad

Este tipo de especificidad consiste en la habilidad de las lipasas para distinguir entre las posiciones *sn-1* y *sn-3* de los triglicéridos. Se trata de la discriminación de la enzima entre moléculas de sustrato enantiómeras. En la bibliografía se encuentran muchos ejemplos que muestran la acción catalítica de las lipasas sobre grasas y aceites para producir compuestos quirales, Alcántara y cols. (1998), como por ejemplo la resolución de mezclas racémicas, Cambou y Klivanov (1984 a), Kirchner y cols. (1985), la producción de ésteres y alcoholes ópticamente activos, Cambou y Klivanov (1984 b), la resolución enzimática de isómeros de alcoholes, Langrand y cols. (1985 y 1986), Deleuze y cols. (1987) o la hidrólisis estereoespecífica de triglicéridos y de ésteres, Rogalska y cols. (1990), Battistel y cols. (1991), Berger y cols. (1992 a y b), Ebert y cols. (1996)

Rogalska y cols. (1993) realizaron un estudio de la estereoespecificidad de 23 lipasas tanto de origen animal como microbiano, actuando en la hidrólisis de los triglicéridos trioctanoína y trioleína (sustratos proquirales). La **mayoría** presentaron **preferencia por la posición sn-1** (12 con trioctanoína y 16 con trioleína). Incluso, utilizando trioctanoína como sustrato, observaron una total estereoselectividad por la posición *sn-1* con las lipasas de *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas aeruginosa* y, en cambio, la de *Candida antarctica* B por la posición *sn-3*, si bien esto no se observó con trioleína como sustrato. Curiosamente, sólo una de las lipasas ensayadas, la de *Candida antarctica* A presentó una clara preferencia en la hidrólisis sobre *sn-2*. De sus resultados concluyen que no parece justificarse una relación entre la estereopreferencia de una lipasa y su origen. Ésta y sus variaciones dependerán del sustrato y de las condiciones de la lipólisis, siendo probablemente específicas de **cada enzima individual**.

Villeneuve y cols. (1995) aportaron un procedimiento para la determinación de las especificidades de las lipasas mediante la hidrólisis de triglicéridos quirales y de

sus racémicos. Con este procedimiento observaron que la lipasa SP435L de *Candida antarctica* (Novo) podría mostrar estereo-especificidad *sn*-3, si bien ésta depende de la composición en ácidos grasos del triglicérido, dada su marcada especificidad por los ácidos de cadena corta.

Iwasaki y cols. (2001) ensayaron interesterificaciones entre la tricaprilina y ésteres etílicos de EPA y DHA mediante la lipasa de *Rhizomucor miehei*, encontrando una estereo-preferencia de esta lipasa por la posición *sn*-1 con respecto a la posición *sn*-3.

1.7.3. REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS

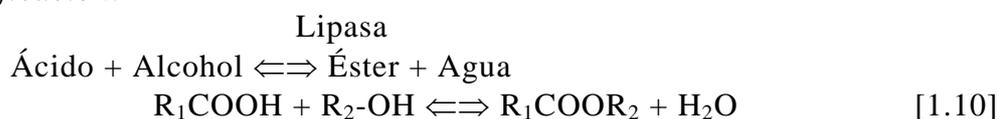
Aunque las reacciones catalizadas por lipasas se han utilizado desde finales del siglo XIX, no es hasta finales de los años 70 y la década de los 80 cuando hay una investigación y experimentación sistemática.

Las lipasas, que son primordialmente responsables de la hidrólisis de los acilglicéridos, aceptan, sin embargo, una gran variedad de sustratos: ésteres de baja y alta masa molecular, amidas, ésteres de poliácidos o polialcoholes, etc. Además de la hidrólisis, las lipasas también son capaces de catalizar la reacción de esterificación. Todo esto se traduce en que una misma lipasa es capaz de catalizar una gran variedad de reacciones.

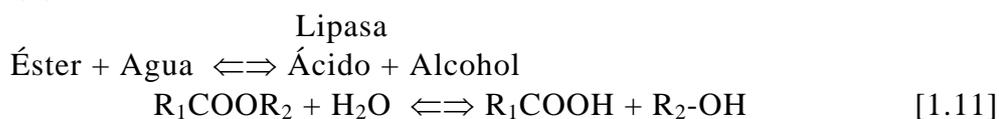
1.7.3.1. Tipos de reacciones

Hay cinco tipos de reacciones reversibles que afectan al enlace éster de grasas y aceites (Formo, 1954):

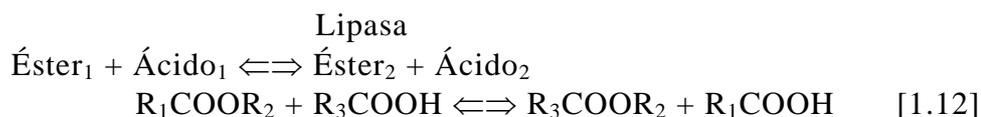
- *Esterificación:*



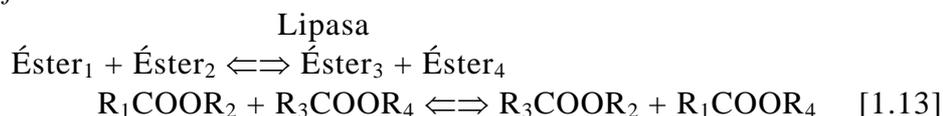
- *Hidrólisis:*



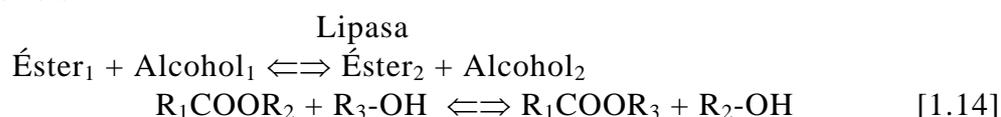
- *Acidolisis:*



- *Interesterificación:*

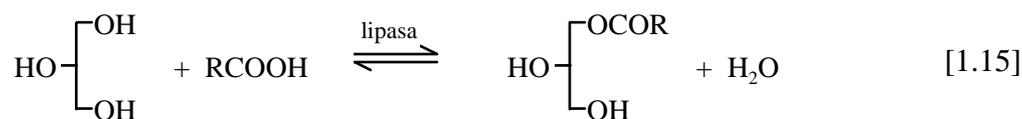


- *Alcoholisis:*



1.7.3.1.1.- Esterificación

Es la reacción entre un ácido graso y un alcohol para dar un éster. En el caso de que el alcohol sea la glicerina, la reacción será:



Los productos típicos de reacción son monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG) (isómeros *sn*-1,2 ó 2,3 y *sn*-1,3), triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres no esterificados (AGL).

En muchas aplicaciones las lipasas se utilizan para la modificación y/o derivatización de grasas y aceites o sustancias relacionadas mediante la esterificación de glicerina y glicéridos parciales, sustituyendo a los procedimientos químicos clásicos. Así por ejemplo, los triglicéridos de cadena media se producen por esterificación de ácidos grasos con glicerina a altas temperaturas (200-250°C) y presiones en presencia de un catalizador inorgánico. Esta reacción química es tediosa, no selectiva, consume una gran cantidad de energía y los productos obtenidos tienen que ser purificados posteriormente. Sin embargo, por vía enzimática, las mezclas de reacción contienen únicamente los sustratos, los productos de reacción (entre los que figura el agua) y la lipasa. La esterificación se realiza en condiciones suaves de presión y temperatura y se evitan así los inconvenientes derivados de la síntesis química clásica (Gandhi, 1997).

El contenido en agua y su actividad, así como la dispersión, actividad y estabilidad de la lipasa tienen un importante papel sobre el equilibrio en reacciones de este tipo. (Mukherjee, 1990). Las variables más estudiadas han sido el tipo de lipasa y de disolvente y la concentración o actividad termodinámica del agua (Lortie, 1997). Tsujisaka y cols. (1977) han puesto de manifiesto la versatilidad de las lipasas para catalizar las reacciones de esterificación. El rendimiento de la reacción se mejora desplazando el equilibrio mediante la eliminación del agua formada. En la síntesis de glicéridos es muy difícil encontrar un disolvente común para los ácidos grasos libres y algunos alcoholes tales como la glicerina, o sus ésteres, pero puede agitarse vigorosamente la mezcla, estando la lipasa activa en la interfase.

Se han utilizado muchas estrategias para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos como por ejemplo disolventes miscibles con el agua, sustancias que disminuyen la actividad del agua (como sales y polialcoholes) y sustratos como líquidos puros o en fase gaseosa totalmente libres de agua.

Por otra parte, la actividad de las lipasas no se limita a la esterificación típica de un ácido y un alcohol, sino que actúan sobre un amplio espectro de sustratos catalizando también la síntesis de péptidos, amidas, etc. (Gandhi, 1997).

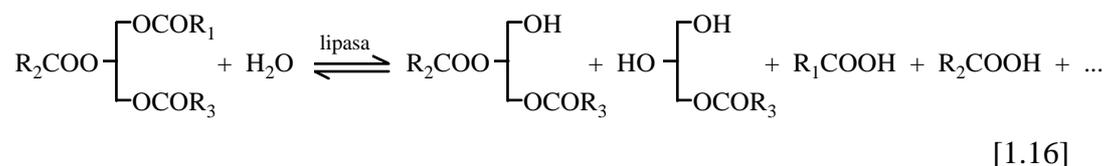
Entre los muchos trabajos realizados para determinar el mecanismo y la cinética de la esterificación catalizada por lipasas y los factores que influyen en ella, pueden citarse los de Dordick (1989), Mukherjee (1990), Lortie y cols. (1993), Tsai y cols. (1993), Yong y Al-Duri (1996), Gandhi (1997) y Lortie (1997).

Así pues, la producción de ésteres catalizada por enzimas ofrece vías interesantes tanto a escala laboratorio como a escala industrial. Las suaves condiciones de reacción permiten la transformación de sustratos lábiles y la estereoespecificidad de las enzimas permite la producción de derivados ópticamente puros con altos rendimientos, sin la necesidad de costosos procedimientos de separación (Lortie, 1997).

Por otro lado, aprovechando la acil selectividad de las lipasas, la esterificación se ha aplicado a la concentración de PUFAs como el GLA y el DHA, Hills y cols. (1990), Foglia y Sonnet (1995), Shimada y cols. (1997 a, 2001 a,b).

1.7.3.1.2.- Hidrólisis

Es la descomposición de una grasa o un éster en su(s) ácido(s) constituyente(s) y en el alcohol, en presencia de agua (reacción inversa de la esterificación). En el caso en que el éster sea un triglicérido, la reacción será:



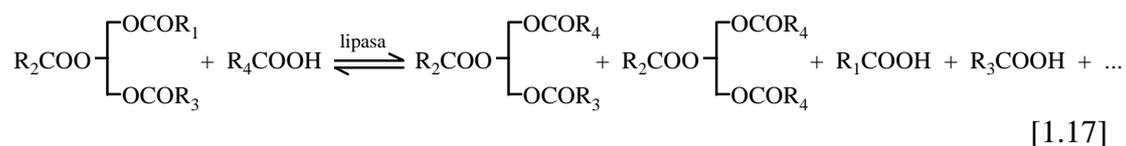
Es la reacción natural catalizada por las lipasas. Se utiliza para la obtención de ácidos grasos libres a partir de triglicéridos naturales de aceites vegetales (Kawano y cols., 1994; Osada y cols., 1990a y b; Tanigaki y cols., 1993; Rooney y Weatherley, 2001) o grasas animales y, en menor extensión, de aceites marinos (Hoshino y cols., 1990; Tanaka y cols., 1992, 1993; Maehr y cols., 1994; Shimada y cols., 1997b, 2001a). Pueden encontrarse algunos ejemplos de reacciones de hidrólisis catalizadas por lipasas en la revisión de Gandhi (1997).

En la práctica industrial las grasas son hidrolizadas por tratamiento en contracorriente con vapor a altas temperaturas (250°C) y presiones (60 bar); en estas condiciones, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se descomponen. En cambio, la hidrólisis enzimática tiene lugar en condiciones muy suaves sin descomposición de los ácidos grasos. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo a temperatura ambiente o a temperaturas y presiones moderadas y puede, por consiguiente, ser usada para obtener ácidos grasos a partir de aceites inestables que contienen ácidos grasos conjugados o altamente insaturados.

La hidrólisis de grasas y aceites catalizada por lipasas se emplea en numerosos sectores, como por ejemplo en la fabricación de pieles, tratamiento de basuras, fabricación de detergentes, industria alimentaria, aplicaciones médicas, farmacéuticas, cosméticos, análisis estructural de triglicéridos, industria papelera, resolución de racémicos, fraccionamiento de ácidos grasos, etc. (Gandhi, 1997).

1.7.3.1.3.- Acidolisis

Es la reacción entre un éster y un ácido en la que se produce la sustitución del grupo acilo del éster por el del ácido libre. Si el éster es un triglicérido la reacción será:



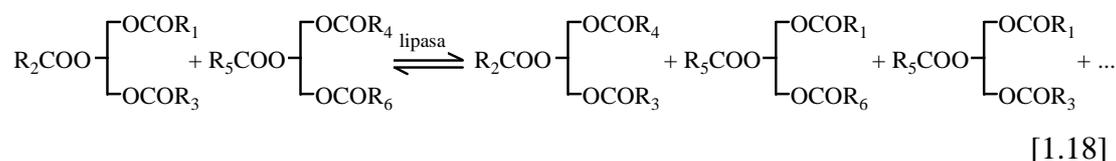
La acidolisis puede interpretarse como un proceso en dos etapas que requiere previamente la eliminación de un ácido graso del triglicérido, hidrólisis, y posteriormente la introducción del ácido graso libre en la posición libre del glicérido parcial, esterificación, Ainsworth y cols. (1996). Se forman así nuevos triglicéridos cuyas propiedades pueden ser diferentes de los de partida.

Puede llevarse a cabo en presencia o no de un disolvente orgánico. En ausencia de disolvente se requieren habitualmente altas temperaturas, lo que requerirá una lipasa termoestable. Las altas temperaturas pueden provocar isomerización y productos no deseados (Bloomer, 1992), cuya formación y acumulación puede reducirse trabajando con mucha cantidad de lipasa para reducir el tiempo de reacción (Bloomer y cols., 1991).

Entre otras aplicaciones, este tipo de reacciones se han utilizado para concentrar EPA y DHA en los glicéridos de aceites marinos (Yamane y cols., 1992 y 1993; Adachi y cols., 1993), para la preparación de aceites vegetales enriquecidos en PUFAs n-3 (Li y Ward, 1993b; Huang y Akoh, 1994) o en ácidos grasos de cadena media (Long y cols., 1997).

1.7.3.1.4.- Interesterificación

Es la reacción entre dos ésteres entre los que se produce un intercambio de un grupo acilo por otro. Si los esteres son triglicéridos, la reacción será:



También puede interpretarse como un proceso en dos etapas: eliminación de ácidos grasos de los triglicéridos (hidrólisis) e introducción de los ácidos grasos liberados en las posiciones libres de los glicéridos parciales formados (esterificación) (Ainsworth y cols., 1996). Se forman así nuevos triglicéridos cuyas propiedades pueden ser diferentes de los de partida por entrecruzamiento de ácidos grasos.

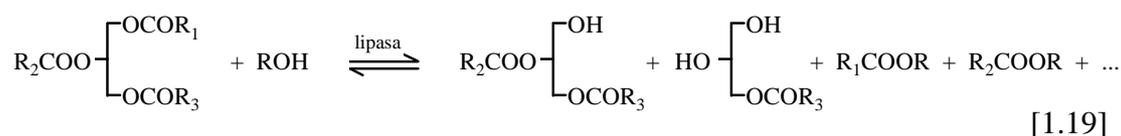
Así, por ejemplo, se han obtenido triglicéridos enriquecidos con PUFAs n-3 mediante interesterificación de aceite de hígado de bacalao con ésteres etílicos usando Lipozyme como catalizador (Haraldsson y cols., 1989).

La interesterificación enzimática puede llevarse a cabo en medio orgánico para facilitar el contacto entre la lipasa y la grasa o en sistemas libres de disolvente. Sin embargo, sin disolvente la velocidad de hidrólisis es pequeña, aunque el producto requiere pocos tratamientos para su purificación y uso con fines alimentarios. Lee y Akoh (1996) obtuvieron triglicéridos estructurados con EPA en posiciones específicas mediante la interesterificación entre triglicéridos de cadena media y el éster etílico del EPA.

Actualmente se encuentra en fase experimental la interesterificación enzimática de grasas y aceites para la producción de grasas tipo margarinas, con la idea de reemplazar el proceso de hidrogenación habitual que puede provocar la formación de isómeros *trans* (Seriburi y Akoh, 1998).

1.7.3.1.5.- Alcoholisis

Es la reacción entre un éster y un alcohol produciéndose la sustitución de un grupo alquilo del éster por el del alcohol. Si el éster es un triglicérido, la alcoholisis podrá esquematizarse en la forma:



Puede interpretarse como un proceso en dos etapas que requiere previamente la eliminación de un ácido graso del triglicérido (hidrólisis) y, posteriormente, la esterificación del ácido graso liberado y del alcohol, Ainsworth y cols. (1996).

Si el alcohol utilizado es glicerina, la reacción da lugar a una mezcla de mono-, di- y triglicéridos. En el procedimiento clásico la reacción es catalizada por ácidos y bases (Formo, 1954), mientras que por la vía enzimática pueden obtenerse diferentes tipos de productos seleccionando la lipasa usada según su especificidad.

Si los productos deseados son ésteres de ácidos grasos, el proceso es más barato que la síntesis de ácidos grasos libres ya que los triglicéridos de aceites usados hasta ahora como materia prima son relativamente baratos. No obstante, los triglicéridos naturales contienen diferentes ácidos grasos, lo que da lugar a que se obtengan mezclas de ésteres. En estos casos se usan lipasas con especificidad hacia determinados sustratos para concentrar determinados ácidos grasos (Mukherjee, 1990).

Debido a que en la alcoholisis no se produce agua no es necesario prever su eliminación. Sin embargo, el problema de la alcoholisis enzimática es que se necesita un gran exceso de alcohol si se quiere obtener un alto rendimiento en ésteres, exceso que después habrá que recuperar. Stevenson y cols. (1994) prepararon mediante alcoholisis ésteres alquílicos de ácidos grasos a partir de varios tipos de grasas y aceites (incluidos aceites de pescado ricos en PUFAs). Estos autores utilizaron gel de sílice y otros adsorbentes para extraer el polialcohol (glicerina) de la mezcla de reacción, obteniendo así altos rendimientos.

Actualmente, están en desarrollo procesos de obtención (mediante alcoholisis enzimática de triglicéridos) de 2-monoglicéridos de ácidos esenciales como productos intermedios para la producción de triglicéridos estructurados (Soumanou y cols., 1998a, b).

1.7.3.2.- Variables más importantes para la catálisis en medio no acuoso

La biocatálisis convencional se ha llevado a cabo tradicionalmente en soluciones acuosas debido a la idea preconcebida de que las enzimas son activas catalíticamente en agua y que los disolventes orgánicos sirven únicamente para destruir el poder catalítico de las enzimas. Esta noción es totalmente equivocada. El uso de las enzimas en entornos no acuosos no está restringido a situaciones artificiales, sino que muchas enzimas y complejos enzimáticos, incluyendo lipasas, esterasas, deshidrogenasas, etc., funcionan en entornos hidrofóbicos. La concentración de agua

en la vecindad de estas enzimas es significativamente menor que en el núcleo de la disolución acuosa, por ello, no es sorprendente que sean catalíticamente activas en disolventes orgánicos (Dordick, 1989).

Desde una perspectiva biotecnológica hay muchas ventajas potenciales con el uso de las enzimas en medios orgánicos frente a los acuosos. Algunas de estas ventajas, según Zaks y Klivanov (1985) y Dordick (1989), se han resumido en la tabla 1.5.

Tabla 1.5.- Ventajas potenciales del empleo de enzimas en medio orgánico frente al medio acuoso

1. Incremento de la solubilidad de sustratos apolares.
 2. Desplazamiento del equilibrio termodinámico a favor de la esterificación frente a la hidrólisis.
 3. Reducción de las reacciones secundarias provocadas por el agua.
 4. La inmovilización es a menudo innecesaria: las enzimas son insolubles en los medios orgánicos. La recuperación de las enzimas es posible por simple filtración.
 5. Facilidad de recuperación de los productos a partir de los disolventes de bajos puntos de ebullición.
 6. Se refuerza la estabilidad térmica de las enzimas: se requiere agua para inactivarlas a altas temperaturas.
 7. Eliminación de la contaminación microbiana.
-

Así, la catálisis enzimática en medio no acuoso ha alcanzado una rapidísima expansión. En principio se emplearon en disoluciones bifásicas (medio orgánico-agua) con pequeña proporción de agua e incluso como catalizadores insolubles en medios casi anhidros (Zaks y Klivanov, 1985).

Zaks y Klivanov (1985) incluso han planteado transesterificaciones catalizadas por lipasas que no ocurren en medio acuoso y sí en medio orgánico y concluyen que quizás todas las lipasas pueden funcionar en medios orgánicos y que únicamente se trata de encontrar las condiciones adecuadas.

La cuestión acerca de cómo son de activas las enzimas en disolventes orgánicos no se puede responder directamente, ya que los datos de velocidad para catálisis

acuosa no son comparables. Con las lipasas en medio acuoso, las constantes de velocidad para esterificación e interesterificación en medios acuosos son difíciles de determinar, dado que predomina la hidrólisis. Deetz y Rozzell (1988) pusieron de manifiesto que puede mantenerse una alta actividad enzimática en medio orgánico si son optimizadas la cantidad de agua, el estado iónico de la enzima (pH) y las características del soporte. Dordick (1992) ha estimado que la eficiencia catalítica de las enzimas en medio orgánico es de 2 a 6 veces menor que la eficiencia de las enzimas nativas en agua.

Recientemente, Pencreach y Baratti (2001) compararon la actividad hidrolítica de 32 lipasas en agua y en heptano para una misma reacción. Los resultados sugieren una fuerte influencia de la limitación conformacional de la enzima en el medio orgánico. Así, enzimas inmovilizadas como Novozyme y Lipozyme presentan en medios orgánicos su conformación activa más estable, por lo que sus actividades catalíticas se incrementan notablemente.

1.7.3.2.1.- Influencia del disolvente

La influencia de la naturaleza del disolvente ha sido extensamente estudiada e interpretada desde diferentes puntos de vista (Dordick, 1989 y 1992 y Lortie, 1997). Esta naturaleza del disolvente orgánico puede afectar a la catálisis enzimática, según Dordick, de tres maneras:

- 1^a) El disolvente puede causar inhibición o inactivación por interacción directa con la enzima. En este caso, el disolvente altera la conformación nativa de la proteína, distorsionando los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, produciendo una reducción de actividad y de estabilidad. Por otro lado, la insolubilidad de la enzima en el disolvente orgánico permite, sin embargo, que la enzima preserve bloqueada su propia orientación para la actividad catalítica. De hecho, muchas enzimas son estables en medios orgánicos a pesar de una agitación vigorosa.
- 2^a) Los disolventes influyen sobre la movilidad de sustratos y productos hacia el centro activo de la enzima.
- 3^a) El disolvente puede interaccionar directamente con el agua esencial en la vecindad de la enzima. Sin afectar directamente a la enzima, los disolventes

muy polares tenderán a retirar el agua necesaria para la actividad enzimática (Miller y cols., 1988).

El procedimiento más simple para mejorar el rendimiento de la enzima es elegir correctamente el disolvente más apropiado para una reacción dada. Para esta elección se deben tener en cuenta varios factores. Según Dordick (1992) lo más importante es que el disolvente debe ser inerte tanto con los reactivos como con los productos. Otros factores adicionales que pueden influir son la densidad, viscosidad, tensión superficial, toxicidad, inflamabilidad, coste, etc.

Se han ensayado varios parámetros relacionados con las propiedades físico-químicas de los disolventes para correlacionar estas propiedades con la actividad enzimática. El más usado es $\log P$, donde P es el coeficiente de partición del disolvente entre el 1-octanol y el agua:

$$P = [\text{disolvente}]_{\text{octanol}}/[\text{disolvente}]_{\text{agua}} \quad [1.20]$$

P es por tanto una medida de la hidrofobicidad del disolvente. Dordick (1989) ha revisado estos trabajos observando que existe una buena correlación entre la hidrofobicidad del disolvente y la actividad del catalizador. Así, los disolventes más hidrófobos o con valores mayores de $\log P$ (tabla 1.6) refuerzan la actividad enzimática. En cambio, los disolventes con valores de $\log P < 2$ no son adecuados para la biocatálisis. Este resultado se explica porque cuanto menor es la hidrofobicidad del disolvente mayor es su capacidad para retirar de la enzima el agua esencial para la catálisis.

Tabla 1.6.- Valores de log P (ecuación [2.20]) de los disolventes orgánicos más habituales (Catoni y cols., 1996 y Fomuso y Akoh, 1998)

Disolvente	log P
Isooctano	4,5
Heptano	4,0
Hexano	3,5
Ciclohexano	3,2
Pentano	3,0
Tetracloruro de carbono	3,0
Tolueno	2,5
Cloroformo	2,0
Benceno	2,0
Éter dietílico	0,8
Acetona	-0,23
Acetonitrilo	-0,33

Valivety y cols. (1991) sugieren que el parámetro más útil para la elección del disolvente orgánico es la solubilidad del agua en el disolvente. Estos autores ensayaron 20 disolventes para la esterificación del ácido decanoico y dodecanol y determinaron las velocidades de reacción iniciales y las constantes de equilibrio con cada disolvente. Las velocidades y constantes de equilibrio mayores las obtuvieron con n-hexadecano, n-hexano e isooctano. Por tanto, la esterificación está más favorecida en los disolventes menos polares. Obtuvieron una buena correlación entre las constantes de equilibrio de la esterificación y la solubilidad del agua en el disolvente: cuanto menor es la solubilidad del agua más favorecida está la esterificación. Estos autores sugieren que esta solubilidad depende probablemente de la capacidad de los disolventes para el intercambio de pares electrónicos (dadores y aceptores), por lo que además de utilizar el parámetro *log P* sugieren como alternativa, el uso del índice de aceptación de pares electrónicos o la polarizabilidad.

Catoni y cols. (1996) plantearon la esterificación de anhídrido acético y alcoholes racémicos secundarios en presencia de la lipasa *Pseudomonas* sp y ensayaron una serie amplia de disolventes orgánicos. En su estudio confirmaron que

el parámetro $\log P$ es el más adecuado para correlacionar las características físico-químicas del medio con la actividad enzimática. Ésta dependería principalmente de la hidrofobicidad del disolvente frente a otras características físico-químicas del mismo. Así, en la línea de lo expuesto por Dordick (1989), la correlación entre el $\log P$ y la actividad enzimática es un fenómeno general que puede ser explicado por diferencias en la habilidad de los disolventes orgánicos para distorsionar la capa de agua esencial alrededor de la enzima.

Janssen y cols. (1992) plantearon la esterificación de ácido decanoico y varios polialcoholes, catalizada por la lipasa *Cromobacterium viscosum*, en presencia de agua y **varios disolventes**. En disolventes polares ($\log P < 1$), se obtuvieron altas fracciones molares de monoésteres y bajas de triésteres, mientras que en disolventes apolares ($\log P > 3$), se obtuvieron menores diferencias (la fracción molar de diéster no es muy dependiente de la polaridad del disolvente). Estos autores concluyeron que para la síntesis de productos polares es más favorable un disolvente polar, mientras que para la síntesis de productos apolares es mejor elegir un disolvente apolar. Así, la adición de disolventes a la mezcla reaccionante da la posibilidad de influir en la distribución de productos en el equilibrio. Según estos autores, además del efecto que los disolventes ejercen sobre la actividad y estabilidad de la enzima, también parecen influir sobre la posición del equilibrio de estas reacciones. Pero en muchas reacciones de esterificación puede haber sustratos polares, como la glicerina, por lo que estos sistemas son bifásicos. Para obtener altas conversiones en el equilibrio son necesarias una alta concentración de glicerina y baja de agua por lo que Janssen y cols. (1993) argumentan que para obtenerlas es esencial utilizar disolventes orgánicos en los que la solubilidad de los productos sea más alta que la de los reactivos. Esto permite una eficiente extracción de los productos hacia la fase orgánica produciendo una mayor conversión.

Por otra parte, Ebert y cols. (1996) a partir de sus experiencias sobre la **influencia de los disolventes orgánicos en la quimioselectividad** de las enzimas, observaron que el medio de reacción ejerce una fuerte influencia sobre esta selectividad enzimática a través de diferentes mecanismos. La formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el disolvente orgánico y el sustrato (solvatación del sustrato por el disolvente) puede provocar la inversión de la quimioselectividad. Esta solvatación del sustrato por el disolvente también puede inducir la

estabilización de los enlaces de hidrógeno intramoleculares que alteran la reactividad de los grupos nucleofílicos del sustrato, por lo que, en definitiva, aumentaría su influencia sobre la selectividad de la encima.

Aires-Barros y cols. (1989) plantearon una alternativa para la extracción de ácidos carboxílicos de disoluciones acuosas mediante reacciones de esterificación catalizadas por lipasas convirtiendo los ácidos en sus ésteres correspondientes que son más hidrófobos. Un alcohol de cadena larga, inmiscible con el agua, sirve como reactivo en la esterificación y como disolvente en la extracción del éster. Realizan, por tanto, un proceso acoplado de **esterificación-extracción** catalizado por una lipasa. En estas condiciones, el coeficiente de distribución para la extracción de ácidos carboxílicos con alcoholes de cadena larga se incrementa al menos 5 veces por el acoplamiento de la extracción, estando un 80-95% del ácido extractado en forma de éster. La velocidad de esterificación no se incrementa a mayores concentraciones de enzima, lo que sugiere que la cinética está limitada por fenómenos de transporte y/o interfaciales.

Fluidos supercríticos

La catálisis enzimática se ha extendido también a sistemas en fase gaseosa y a disolventes supercríticos. La mejora de la estabilidad térmica de la enzima en medio no acuoso es también importante en estos sistemas citados, ya que se incrementa el rango de temperaturas en que los biocatalizadores son activos.

Catoni y cols. (1996) han observado que la utilización como medio de reacción de dióxido de carbono supercrítico permite obtener una alta enantioselectividad y alta conversión. En este medio, la hidrofobicidad del disolvente no juega un papel fundamental en la reacción biocatalítica. En este caso, dados los bajos valores de la viscosidad y de la tensión superficial, el mayor rendimiento de la enzima podría explicarse en términos de mejora en las propiedades de transferencia de materia (alta difusividad) y mayor estabilidad de la enzima con respecto a la misma reacción llevada a cabo en disolventes orgánicos. Otra ventaja importante de los fluidos supercríticos es la facilidad de recuperación de los productos sin trazas de disolvente (crucial para la industria alimentaria).

Nakamura y Toshino (1992) obtuvieron también que la interesterificación enzimática en fluidos supercríticos tiene casi la misma productividad que la llevada a

cabo en disolventes orgánicos, pero, además, la primera puede ser llevada a cabo en un tiempo extremadamente más corto y en ausencia de disolventes que pudieran resultar nocivos.

Sin disolvente

Ergan y cols. (1988) llevaron a cabo la síntesis de triglicéridos, catalizada por la lipasa inmovilizada Lipozyme IM-20, con las cantidades estequiométricas de los sustratos (ácido oleico y glicerina), una muy limitada fase acuosa, en ausencia de disolvente y añadiendo tamices moleculares para eliminar el agua producida en la reacción y mejorar la conversión. De esta manera consiguieron un 90% de trioleína en la mezcla final, demostrando la posibilidad de llevar a cabo la esterificación en ausencia de disolvente. Estos mismos autores (en los trabajos publicados en 1990 y 1991) plantearon la misma esterificación, en ausencia de disolvente, pero ensayando diversas temperaturas, relaciones ácidos grasos/glicerina y diversas enzimas, confirmando la viabilidad de la síntesis.

Akoh (1993) también ha realizado la síntesis catalizada por lipasas de glicéridos parciales en ausencia de disolvente. Este autor ha obtenido monoglicéridos conteniendo ácidos grasos específicos en posiciones específicas utilizando lipasas inmovilizadas *sn*-1,3 específicas y no específicas. De las enzimas utilizadas, la SP 382 de *Candida antarctica* fue la que mejores resultados dio.

Goma-Doncescu y Legoy (1997) han planteado la reacción entre alcoholes de cadena larga y ésteres metílicos para la producción de nuevos ésteres. La reacción es catalizada por la lipasa inmovilizada termoestable Lipozyme en ausencia de disolvente. La reacción se lleva a cabo por simple agitación de los dos sustratos, a varias relaciones entre los reactivos y en el rango de temperaturas de 55-65°C. Obtuvieron altas velocidades de transesterificación aún con bajas concentraciones de enzima. La ausencia de disolventes orgánicos, permitió a estos autores denominarlos "productos ecológicos" con aplicaciones sin ningún problema en cosmética, farmacia y alimentación.

Ison y cols. (1994) también han realizado reacciones de interesterificación en sistemas sin disolventes, estudiando la relación entre la estructura microscópica de los soportes utilizados para la inmovilización de la lipasa y la cinética observada. Han observado que en estos sistemas sin disolvente, la selección del **soporte** para la

inmovilización de la enzima es determinante para la efectividad del sistema, debido a la existencia de limitaciones en la transferencia de materia interna.

1.7.3.2.2.- Influencia del contenido de agua

Las propiedades químicas y físicas de una enzima dependen en gran medida del papel directo e indirecto del agua en todas las interacciones (electrostáticas, enlaces de hidrógeno, Van der Waals e hidrofóbicas) que ayudan a mantener la conformación de la enzima catalíticamente activa. La eliminación total del agua distorsiona drásticamente la estructura de la proteína nativa e inactiva la enzima. Sin embargo, la cuestión real no es si el agua es imprescindible, sino ¿cuánta agua es necesaria? Una molécula de enzima necesita una o varias monocapas de agua para ser activa. Si estas moléculas de agua están alrededor de la molécula de enzima, el resto (el núcleo del agua) puede ser reemplazado por un disolvente orgánico sin que afecte negativamente a la enzima. Dado que la cantidad absoluta del agua contenida en estas monocapas es muy pequeña, esta situación es equivalente a un funcionamiento de la enzima en un medio orgánico casi anhidro (Zaks y Klibanov, 1985).

Zaks y Klibanov, (1985) confirmaron la necesidad de una cierta cantidad de agua para la actividad enzimática y que el factor principal por el que el disolvente afecta a la enzima no parece ser la interacción directa disolvente-enzima sino la interacción del disolvente con el agua enlazada a la enzima. El efecto catalítico en algunos medios orgánicos es del mismo orden de magnitud que en medios acuosos, por lo que las enzimas parecen tener en estos disolventes aún todo su poder catalítico inherente. Esto sugiere que las conformaciones de la enzima en disolventes orgánicos y en agua son casi idénticas.

En un trabajo de 1988, Zaks y Klibanov (1988b) investigaron la dependencia entre la **actividad catalítica de varias lipasas y el contenido en agua en varios disolventes**. Las conclusiones más importantes que obtuvieron son: 1) todas las enzimas ensayadas funcionan como catalizadores en medios orgánicos; 2) la actividad catalítica de cada enzima en cada disolvente se incrementa notablemente con el contenido en agua, siempre que se opere con contenidos en agua inferiores a la solubilidad del agua en el disolvente orgánico; 3) la cantidad absoluta de agua que cada enzima necesita para la catálisis varía significativamente de un disolvente a otro; 4) las enzimas suspendidas en disolventes hidrofóbicos necesitan mucha menos

agua para su máxima actividad que las que operan en medios hidrofílicos; 5) para un contenido de agua limitado, la actividad enzimática en disolventes hidrofóbicos es mucho mayor que la mostrada en los hidrofílicos. En general, la cantidad de agua enlazada a la enzima se incrementa con el aumento en el contenido de agua en el medio orgánico (Kim y Lee, 1996).

Ya en un trabajo anterior, Zaks y Klivanov (1984) obtuvieron que en la catálisis en medio orgánico, al **deshidratar parcialmente las lipasas**, éstas mostraron nuevas propiedades catalíticas: por un lado mantienen alta su actividad catalítica a altas temperaturas (demostrando que el agua es también necesaria para la inactivación térmica) y, por otra parte, en entornos con poca cantidad de agua, la estructura de la enzima queda más rígida y pierde habilidad para actuar sobre sustratos grandes, modificándose, por tanto, su especificidad frente al sustrato.

Así, es posible mantener una enzima completamente hidratada y activa con una pequeñísima proporción de agua con respecto al volumen de reacción, pero la cantidad de agua necesaria para mantener la actividad enzimática depende de la enzima utilizada, Dordick (1989).

Miller y cols. (1988) (de los laboratorios de Novo Industries, Inc., Princeton, USA) caracterizaron a su producto Lipozyme describiendo su especificidad frente al sustrato, disolventes y modo de empleo para la síntesis comercial de ésteres. Para ellos, el papel del agua es primordial para mantener la integridad conformacional de las proteínas. Así, una pérdida de agua provoca un cambio conformacional y la hace inactiva. Este cambio, dependiendo de cómo se haya llevado a cabo, puede ser reversible. Ponen como ejemplo que Lipozyme se inactiva en tetrahidrofurano (THF) y en dimetilformamida (DMF) por deshidratación. Al recuperar la lipasa y lavarla bien con hexano, ninguna de ellas se activa en hexano, pero al añadirle una mínima cantidad de agua, la lipasa antes expuesta a THF recupera su actividad, mientras que permanece inactiva la expuesta a DMF. Por tanto, parece que la pérdida de agua en el primer caso sí es reversible, mientras que en el segundo caso el cambio conformacional es irreversible.

Chulalaksananukul y cols. (1990) estudiaron la influencia del **agua adsorbida sobre la enzima en la velocidad inicial de reacción** en la síntesis de oleato de etilo a partir de ácido oleico y etanol. Esta velocidad inicial aumenta inicialmente con el

contenido de agua, alcanza un máximo y después disminuye hasta cero. El contenido óptimo de agua está en torno a una relación agua/enzima inmovilizada igual a 0,1 en peso, si bien la actividad máxima con este contenido de agua depende de la temperatura. No obstante, al aumentar el contenido en agua por encima de este valor, la actividad disminuye rápidamente hasta anularse por completo para relaciones agua/enzima inmovilizada del orden de 0,5 a 0,7, dependiendo de la temperatura.

Así, en muchos casos hay un contenido de agua óptimo que maximiza la velocidad de reacción en medio orgánico mientras que, habitualmente, la actividad decrece drásticamente cuando el contenido de agua está por encima del valor óptimo. De ahí la importancia de la eliminación o reducción del agua en exceso. Camacho Páez y cols. (2003) demostraron que, para relaciones agua/lipasa elevadas, la actividad enzimática disminuye debido a que el agua va llenando los poros del soporte donde la lipasa está inmovilizada e impide que los sustratos hidrófobos alcancen el centro activo de la enzima.

También, las experiencias de nuestro grupo en la síntesis de triglicéridos ricos en PUFAs por esterificación de glicerina y concentrados de PUFAs catalizada por la lipasa inmovilizada Novozym 435[®] de *Candida antarctica*, (Esteban Cerdán y cols., 1997), ponen de manifiesto que cualquier adición de agua al medio de reacción hace descender el rendimiento de triglicéridos debido a un incremento del grado de hidrólisis. Los mejores rendimientos en triglicéridos se obtuvieron sin añadir agua al medio de reacción e incluso deshidratando la enzima inmovilizada (que contiene un 2-3% en peso de agua), lo que sugiere de nuevo que el agua que la enzima necesita para mantener su actividad es mínima y actúa en torno al centro activo de la lipasa.

1.7.3.2.3.- Influencia del soporte de inmovilización de la lipasa

Una de las grandes ventajas de la catálisis en medios no acuosos es que la enzima puede ser inmovilizada por simple **adsorción sobre un soporte** inerte (Brockman y cols., 1973). Como un componente integral del catalizador, el soporte puede influir en el microentorno de la enzima y así sobre su actividad y estabilidad. Es, por tanto, una elección importante aunque, en el caso más simple, las enzimas podrán funcionar en disolventes orgánicos como polvo en suspensión. Como se ha descrito anteriormente, según los trabajos de Ison y cols. (1994) con sistemas sin

disolvente, la selección del soporte para la inmovilización de la enzima es determinante para la efectividad del sistema.

Akoh y Huang (1995) ensayaron doce **lipasas comerciales** para catalizar la acidólisis de trioleína con ácido caprílico en hexano. Comprobaron que las enzimas no inmovilizadas fueron incapaces de incorporar ácido caprílico a la trioleína; sólo las lipasas inmovilizadas (Lipozyme IM60[®] e IM20, de *Rhizomucor miehei* y SP435 y SP382 de *Candida antarctica*) incorporaron ácido caprílico en distintos porcentajes. La lipasa más efectiva fue Lipozyme IM60[®].

La inmovilización de una lipasa influye en su actividad y dos de los factores más importantes son el tipo de soporte y la técnica de inmovilización. Será importante la **hidrofobicidad del soporte** si la inmovilización es por **atrapamiento** (en el seno de un gel). Yokozeky y cols. (1981) compararon la actividad de la lipasa *Rhizopus delemar* inmovilizándola por atrapamiento en varias resinas hidrófobas e hidrófilas. La actividad más alta la mostró la lipasa inmovilizada en resinas hidrófobas, mientras que las inmovilizadas en resinas hidrófilas dieron actividades muy bajas. Este resultado parece debido a que el carácter hidrófobo o hidrófilo del gel afecta a la difusión de sustratos hidrófobos en el interior de estos geles. Sin embargo, cuando la inmovilización se produce por **adsorción** sobre la superficie del soporte, tanto los de carácter hidrófobo como los de carácter hidrófilo han resultado efectivos en muchos casos, ya que en estos casos la superficie del soporte queda recubierta por la película enzimática.

Chao y Rhee (1993) desarrollaron una técnica de inmovilización para **favorecer la hidrofobicidad del entorno de la lipasa** y, por tanto, mejorar su actividad en las reacciones de interesterificación. La lipasa se inmovilizó covalentemente con glutaraldehído y con varios espaciadores consistentes en cinco ácidos carboxílicos amino-alquílicos de 3, 5, 6, 7 y 8 grupos alquilo, sobre un silicato de magnesio. Cuando la lipasa se inmovilizó directamente sobre el soporte inorgánico con glutaraldehído, la actividad aumentó 35 veces con respecto a la lipasa libre y cuando se incorporaron estos espaciadores hidrófobos la actividad llegó a ser de 67 a 88 veces mayor que la de la lipasa libre, obteniéndose el mejor resultado cuando el espaciador fue el ácido 7-aminoheptanoico. Este aumento de la actividad parece debido a la hidrofobicidad que confieren estos espaciadores al entorno de la lipasa. En estas condiciones la concentración de sustrato (de carácter hidrófobo) en las proximidades de la

lipasa puede ser más alta que cuando la lipasa está libre y los sustratos son más accesibles a su centro activo.

En los trabajos de Soumanou y cols. (1998a y b) citados anteriormente (apartado 1.7.3.1.5), estos autores sintetizaron lípidos estructurados con ácidos grasos de cadena media (ácido caprílico) en las posiciones 1 y 3 y ácidos grasos insaturados de cadena media (ácidos oleico o linoleico) en la posición 2 mediante la esterificación con de los monoglicéridos obtenidos por alcoholisis de triglicéridos. Las lipasas de *Rhizomucor miehei* y de *Rhizopus delemar* fueron inmovilizadas sobre **diferentes soportes**. Se estudiaron los grados de esterificación para Lipozyme (preparado comercial de *Rhizomucor miehei* sobre resina) y para los preparados de ambas lipasas inmovilizadas sobre celite y sobre EP-100, utilizando como medio el n-hexano y manteniendo baja la actividad del agua. Las concentraciones finales de triglicéridos estructurados deseados (MLM) más altas se encontraron con Lipozyme (89,1%) y con la lipasa *Rhizopus delemar* inmovilizada sobre EP-100 (91,2%).

Tal y como se expuso en el apartado 1.7.2.2.2, una opción de presentar las lipasas inmovilizadas es mediante un **reactor de membrana**. Guit y cols. (1991) utilizaron este reactor para llevar a cabo la hidrólisis de triacetina catalizada por la lipasa de *Candida cylindracea*. La lipasa es previamente disuelta en un buffer de fosfato de potasio y cargada por ultrafiltración en la membrana del reactor, observando que la lipasa mantiene su actividad a pesar de la inmovilización. La actividad y estabilidad son semejantes a otros procesos similares y parecen ser independientes del tipo de membrana utilizada. Esto supone que el enlace de la lipasa no es muy específico y que probablemente su conformación esté muy afectada por la inmovilización. Este tipo de reactor parece adecuado para reacciones estereoselectivas catalizadas por lipasas y para la producción de compuestos de alto valor, ya que se trata de un método de inmovilización muy eficiente que aumenta el tiempo de estabilidad de las lipasas con una alta actividad.

Posteriormente, Gan y cols. (2000) pusieron a punto un **reactor de membrana, continuo y de contacto directo** para la hidrólisis enzimática al que se alimenta una emulsión agua-aceite, comparándolo con un tanque con agitación convencional. Encontró una mejor transferencia de materia debido a la influencia del dinamismo del sistema sobre la emulsión bifásica.

1.8.- PURIFICACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS

1.8.1.- LIPASAS EMPLEADAS EN LA PURIFICACIÓN DE PUFAS

1.8.1.1.- Actividad

El primer aspecto a tener en cuenta a la hora de seleccionar una enzima con un fin determinado será la actividad que esta enzima presente. La actividad se expresa en unidades de actividad (gramos de enzima que son necesarios para que reaccione una determinada cantidad de sustrato en unas condiciones determinadas), pero la actividad de las lipasas cambia según la reacción para la que se utilicen. Wu y cols. (1996) ensayaron numerosas lipasas (*Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscusum*, *Pseudomonas fluorescens*, lipasa pancreática porcina PPL, *Rhizomucor miehei* y *Rhizopus* sp.) en diferentes reacciones (hidrólisis, esterificación y transesterificación) para evaluar la actividad relativa que presentaban unas con respecto a otras. Observaron que la lipasa de *Candida rugosa* era la que mayor actividad presentaba en la reacción de hidrólisis, mientras que la de *Pseudomonas fluorescens* fue la que mostró mayor actividad para la reacción de esterificación. Para la transesterificación las lipasas más activas fueron las de *Candida rugosa* y *Rhizopus* sp.

1.8.1.2.- Selectividad

El segundo aspecto imprescindible a tener en cuenta es la especificidad de la lipasa. También cambia con las condiciones de reacción empleadas pero se pueden hacer algunas generalizaciones. En la tabla 1.7 se muestran algunas de las lipasas más utilizadas, así como sus especificidades más conocidas.

Para purificar PUFAs, la especificidad más interesante es la acil-especificidad (especificidad por determinados ácidos grasos o grupos acilo). En algunas ocasiones, en las que los PUFAs no están homogéneamente distribuidos en las diferentes posiciones del triglicérido, la especificidad posicional (especificidad por las posiciones 1 y 3 ó 2 de la glicerina o los glicéridos) también puede resultar de interés.

Tabla 1.7.- Selectividades posicional y con respecto al grupo acilo de las lipasas más habituales en aplicaciones relacionadas con purificación de PUFAs.

Fuente de la lipasa	Especificidad por grupo acilo	Especificidad posicional
<i>Pancreática porcina</i>	C > M, L	1,3
<i>Penicillium camembertii</i>	MG, DG > TG	1,3
<i>Penicillium roquefortii</i>	C, M >> L	1,3
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C, M > L	1,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L > C > n-3	1,3 >>> 2
(Rhizo)mucor miehei Ej.: Lipozyme IM60, IM49 de (Novo)	C > M, L > DHA	1 > 3 >> 2
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >> C >> GLA, DHA	1,3 >> 2
<i>Alcaligenes sp</i>	C, M, L > PUFAs	1,3 >> 2
<i>Aspergillus niger</i>	C, M, L > n-3	1,3 >> 2
<i>Geotrichum candidum</i>	C, M, L > PUFAs	
<i>Mucor javanicus</i>	M, L >> C	1,3 > 2
<i>Rhizopus japonicus</i>	C, M, L	1,3 > 2
<i>Rhizopus javanicus</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Rhizopus niveus</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Rhizopus sp.</i>	M, L > C	1,3 > 2
<i>Candida lipolytica</i>	C, M, L	1,3 > 2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M, L > C > n-3	1,3 > 2
<i>Pseudomonas sp.</i>	C, M, L > n-3	1,3 > 2
<i>Pseudomonas cepacia</i>	C, M, L > n-3	
<i>Candida cylindracea</i>	C, M, L >> n-3 (DHA)	
<i>Candida rugosa</i>	C, M, L >> GLA, DHA	
<i>Candida antarctica</i> Ej.: Novozyme SP435 (Novo)	C, M, L >> n-3 (DHA)	1,3,2
<i>Candida sp.</i> Ej.: SP382 de (Novo)	C, M, L	1,3,2
<i>Chromobacterium viscosum</i>	C, M, L	-

C: cadena corta, M: cadena media, L: cadena larga

En la tabla resumen, puede apreciarse como numerosas lipasas que proceden de microorganismos presentan especificidad posicional 1,3, mientras que, hasta donde sabemos, muy pocas presentan especificidad por la posición 2.

Por otro lado, se encuentran numerosas lipasas que discriminan a los PUFAs, especialmente al GLA y el DHA, pero muy pocas discriminan a los ácidos grasos saturados y no a los PUFAs. En este sentido, Halldorsson y cols. (2004) comparan la selectividad respecto al EPA y al DHA de 12 lipasas comerciales en la hidrólisis de una mezcla de ésteres etílicos. Proponen esta reacción como una buena medida de la especificidad de las lipasas por ser una reacción rápida (facilita una conversión suficientemente alta como para observar las especificidades), contiene el agua necesaria para la actividad enzimática sin complicaciones de la esterificación en medios orgánicos donde es necesario optimizar la cantidad de agua añadida (particular para cada lipasa). Por otro lado utiliza ésteres etílicos que no presentan las complicaciones de regioselectividad de las hidrólisis con triglicéridos. Observan que todas las lipasas discriminan el EPA y el DHA en mayor o menor medida aunque las que más los discriminan en su conjunto son las de *Geotrichum candidum*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica* y *Rhizopus delemar*, en orden decreciente de actividad y, por tanto, de grados de concentración obtenidos. La lipasa de *Rhizopus javanicus* es la que más discriminaba el DHA en particular y las lipasas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens*, además de ser las más activas, son las que más discriminan el EPA respecto al resto de ácidos grasos. En ese mismo trabajo, han observado que unas primeras lipasas digestivas, cultivadas “in vivo” en intestino de salmón y trucha, podían discriminar los ácidos grasos saturados respecto a los PUFAs e incluso presentar especificidad por la posición 2 durante su actividad lipolítica. En este mismo trabajo, incluso describen como algunas lipasas de *Pseudomonas* bacterianas no comercializadas discriminan al EPA con respecto al DHA durante su acción hidrolítica.

Prácticamente todas las lipasas utilizadas en la purificación de PUFAs son de origen microbiano. Excepcionalmente, Foglia y Villeneuve (1997) utilizan la lipasa del latex de *Carica papaya* (vegetal) para catalizar la interesterificación entre tributirina (T4:0) y aceite de soja hidrogenado (12% C16:0 y 88% C18:0). Esta enzima presenta la ventaja de ser más barata que las de origen microbiano, dado que su obtención es menos costosa.

1.8.2.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE ACEITES MARINOS

Un aceite marino típico, como el de sardina, puede tener una composición lipídica TG/DG/MG/AGL: 97/0/0/0, con un 22,4% de EPA y 6,7% de DHA (Osada y cols., 1990a). La hidrólisis enzimática de estos aceites libera ácidos grasos (AGL)

dando lugar a una mezcla de éstos con MG, DG y con los TG remanentes. Estos autores hidrolizaron aceite de sardina mediante la lipasa TOYO (*Chromobacterium viscosum*) y obtuvieron una mezcla de composición TG/DG/MG/AGL: 10,4/10,4/3,4/75,6 p/p.

1.8.2.1- Especificidad de las lipasas

Mediante una hidrólisis selectiva catalizada por determinadas lipasas es posible **concentrar PUFAs en los triglicéridos remanentes**. Con ese objetivo, Hoshino y cols. (1990) han examinado seis lipasas para concentrar los PUFAs n-3 del aceite de hígado de bacalao y del aceite de sardina refinado. Todas las lipasas incrementan el contenido de PUFAs en los glicéridos remanentes y fueron las lipasas de *Candida cylindracea* y de *Aspergillus niger* las que dieron los glicéridos con mayor incremento en PUFAs n-3. En los resultados obtenidos parecen influir factores como la especificidad 1,3 de la lipasa de *A. niger*, la especificidad por el sustrato de ambas lipasas, la reacción inversa, etc. Con las dos lipasas se obtuvo un contenido máximo total en PUFAs n-3 del orden del 50%. Todas las lipasas ensayadas incrementaron el contenido en DHA en mayor o menor grado, sin embargo, el incremento en EPA fue escaso. Esto demuestra que el enlace éster del EPA es hidrolizado con más facilidad que el del DHA, lo que parece debido a que el DHA tiene un doble enlace más próximo al grupo carboxílico que el EPA, (en posición 4 frente a la posición 5 del EPA), lo que dificulta la hidrólisis del DHA más que la del EPA. Este resultado está en la línea de los resultados obtenidos por Miller y cols. (1988) (apartado 7.2.3.3) sobre los efectos de las insaturaciones sobre la velocidad de esterificación catalizada por la lipasa inmovilizada de *Mucor miehei*; esta velocidad fue mayor cuando el primer doble enlace estaba en posición 3 que cuando estaba en posición 2 (con respecto al grupo carboxilo).

Así, Hoshino y cols. (1990) concluyeron que es posible obtener TG con un contenido en PUFAs n-3 mayor del 40%, por hidrólisis selectiva catalizada por lipasas, seguida de la eliminación de los AGL, DG y MG por extracción y destilación molecular. Sin embargo, debido a que los grados de hidrólisis necesarios eran elevados, la recuperación de estos triglicéridos concentrados en PUFAs n-3 no superó el 20-30% de su contenido inicial.

Tanaka y cols. (1992) concentraron también **DHA en los glicéridos** mediante hidrólisis con lipasas de aceite de atún (con un 25,1% de DHA sobre ácidos grasos totales). Ensayaron varias lipasas con y sin especificidad posicional: *Candida cylindracea*, *Pseudomonas, sp.*, y *Chromobacterium viscosum* como no específicas, y *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* y *Rhizopus javanicus* como específicas *sn-1,3*. Con la lipasa de *Candida cylindracea* el DHA no se hidrolizó fácilmente, por lo que su concentración en los triglicéridos remanentes fue mayor. El contenido de DHA (porcentaje en DHA sobre ácidos grasos totales) creció con el grado de hidrólisis hasta cuando la hidrólisis alcanzó el 70%. La mezcla de glicéridos contenía un 75% de TG, 24% de DG y 1% de MG. En los TG se alcanzó un contenido en DHA del 52,4% y en los DG un 55,3%. El DHA presente en los DG deriva de los TG hidrolizados conteniendo 1 ó 2 moléculas de DHA. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son fácilmente hidrolizados y los TG que no contienen DHA son también más fácilmente hidrolizados que los que lo contienen, es decir, la lipasa reconocería previamente toda la estructura molecular del TG con la presencia del DHA, presentando cierta especificidad sobre toda la molécula de TG además de la especificidad sobre el grupo acilo lo que ellos denominarían “**especificidad triglicérida**” de la lipasa de *Candida cylindracea*.

Estos mismos autores, en una publicación posterior (Tanaka y cols., 1993) sintetizaron previamente TG con glicerina y una mezcla de ácido oleico y DHA (TG-*DDD*, TG-*DDO*, TG-*DOO*, TG-*OOO*) y posteriormente hidrolizaron los TG formados analizando los productos mediante cromatografía de capa fina y HPLC para separar las especies moleculares de TG. La velocidad de hidrólisis dependió fundamentalmente de la presencia de DHA en la molécula. El ácido oleico se hidrolizó mucho más fácilmente que el DHA, debido, probablemente, a que en este último el grupo metilo terminal se cierra sobre el grupo carboxílico protegiéndolo de la hidrólisis. Así, modifica la forma de la molécula de TG de modo que incluso el ácido oleico se hidroliza peor en una molécula en la que existe DHA.

Tanaka y cols. (1994) obtuvieron triglicéridos ricos en DHA mediante un proceso más elaborado. En primer lugar **hidrolizaron** aceite de atún mediante la lipasa de *Chromobacterium viscosum* para obtener los ácidos grasos libres. A continuación separaron los ácidos grasos de la mezcla obtenida mediante **precipitación (y filtración) selectiva** en acetona de las sales sódicas de los AGL. De

esta manera el DHA se concentró en la disolución, que contenía los ácidos grasos restantes, pasando del 13,7% en la mezcla de hidrólisis hasta el 57%. Esta fracción se hace reaccionar por **acidolisis** con la mezcla de glicéridos remanentes para incrementar el contenido de TG ricos en DHA. Para ello es necesario que la mezcla de ácidos grasos concentrada disponga de un contenido en DHA más alto que el de la mezcla glicérida remanente.

En la misma línea, Shimada y cols. (1994) describieron la obtención de **TG ricos en PUFAs** a partir de aceite de atún mediante hidrólisis catalizada por las lipasas de *Candida cylindracea* y de *Geotrichum candidum*. Esta última manifestó relativamente poca reactividad sobre los enlaces ésteres del EPA y DHA: el EPA pasó de un 8,2% en el aceite original a un 9,5% y el DHA se concentró desde el 30,3% hasta el 39,1%, con un 33,5% de grado de hidrólisis. La lipasa de *C. cylindracea* fue útil para concentrar el DHA pero no el EPA. Estos autores estudiaron los factores que influyen en el grado de hidrólisis (y en el porcentaje de TG). El grado de hidrólisis aumentó con la cantidad de enzima hasta un determinado valor a partir del cual permaneció constante. La cantidad de agua óptima fue el 50% en volumen de la mezcla reaccionante y la temperatura óptima fue de 30°C. A partir de un tiempo de reacción determinado, la composición lipídica de la mezcla reaccionante permaneció constante, obteniéndose en los glicéridos un 91,4% de TG, un 7,1% de MG y un 1,5% de DG.

En otro trabajo, estos mismos autores (Shimada y cols., 1995) ampliaron los estudios anteriores sobre la hidrólisis selectiva de aceites con contenido en PUFAs con la lipasa de *Geotrichum candidum*. Comprobaron esta lipasa mostraba una notable especificidad por los ácidos grasos y por los glicéridos en su hidrólisis. Estos autores propusieron que la formación de TG ricos en PUFAs tiene lugar por un mecanismo que implica: a) la hidrólisis selectiva de los ácidos grasos (no actúa sobre los PUFAs) del esqueleto del glicérido, produciéndose glicéridos parciales y b) paralelamente a esta hidrólisis, se produce la esterificación entre los glicéridos parciales y los ácidos grasos libres, produciéndose, además, la transesterificación entre glicéridos parciales. Así, la velocidad de hidrólisis de ésteres sin PUFAs es más rápida que la de ésteres con PUFAs y la reactividad de los glicéridos con PUFAs es $MG > DG > TG$, por lo que los triglicéridos ricos en PUFAs son escasamente hidrolizados. Estas especificidades de la lipasa provocan una acumulación de

triglicéridos ricos en PUFAs en la mezcla de reacción durante la hidrólisis del aceite de atún. A la vista de estos resultados, parece que la lipasa de *G. candidum* presenta también la “especificidad triglicérida” definida por Tanaka y cols (1993) para la lipasa de *Candida cylindracea*.

Continuando en esta línea, Wanasundara y Shahidi (1998a) ensayaron la hidrólisis enzimática parcial de aceites marinos, ensayando numerosas lipasas de diferentes organismos (*Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus niveus*) para estudiar la discriminación que estas lipasas pudieran presentar hacia los PUFAs n-3. La lipasa de *Candida cylindracea* se mostró como la más apropiada para concentrar los PUFAs en la fracción de acilgliceroles parciales. De esta manera se alcanzaron contenidos del 43,5% en PUFAs n-3 (9,7% EPA, 8,6% de ácido doicosapentaenoico, DPA y 24,0% DHA) partiendo de aceite de grasa de foca y del 54,5% (18,5% EPA, 3,6% DPA, 17,3% DHA) partiendo de aceite de arenque.

Tal como se indica anteriormente (apartado 1.8.1.2), Halldorsson y cols. (2004) verificaron la discriminación de determinadas lipasas entre los PUFAs y los ácidos grasos más saturados, en la reacción de hidrólisis. Aunque confirman las observaciones de autores anteriores en el sentido de que distinguen entre el EPA y el DHA, concentrando mejor el DHA en los triglicéridos, observaron como dos *Pseudomonas* bacterianas prefieren el DHA al EPA, y pueden concentrar el EPA en los glicéridos.

1.8.2.2.- Factores más importantes que afectan a la hidrólisis

Wanasundara y Shahidi (1998b) aplican métodos estadísticos a la optimización de algunas condiciones de reacción (**tiempo, concentración de lipasa y temperatura**) para el aumento del contenido en PUFAs n-3 en aceites marinos con la lipasa que habían seleccionado en el trabajo anterior (Wanasundara y Shahidi, 1998a). Así, optimizando las condiciones para la lipasa de *Candida cylindracea*, incrementaron el contenido en PUFAs n-3 hasta un 54,3% partiendo de aceite de foca (aplicando 308 Ua/g aceite durante 40 horas a 37°C) y de 54,5% partiendo de aceite de arenque (aplicando 340 Ua / g aceite durante 45 horas a 38°C).

Pero, además, de los **principales factores** que afectan a las reacciones enzimáticas en general (la temperatura, el pH, la relación entre sustratos, el disolvente orgánico, el tiempo de incubación, la cantidad de lipasa, etc.) algunos autores estudian la influencia de otros factores específicos para las reacciones de hidrólisis.

Kolossvary (1996), además de estudiar la influencia de los principales parámetros de reacción sobre la actividad hidrolítica de *Rhizopus sp.*, observó que determinados aditivos la potenciaban considerablemente. La medida de actividad se realizó mediante la hidrólisis enzimática del aceite de oliva. La actividad máxima de 17,9 Ua/mg se obtuvo al añadir 41,8 mg/ml de goma arábiga y 0,6 mg/ml de taurocolato sódico a 40°C y pH 8,3.

Ono y cols. (1997) ajustan la **actividad del agua** para utilizar la lipasa Lipozyme IM en la concentración de DHA y AA mediante la hidrólisis parcial selectiva de diferentes fosfolípidos. Ajustan la actividad de la lipasa utilizando una disolución saturada de sales (LiCl, K₂CO₃ y K₂SO₄) en un desecador a 25°C durante 24 horas. Concluyen calificando este método como “prometedor” para la obtención de fosfolípidos ricos en DHA, aunque encuentran una limitación en concentrar exclusivamente el AA.

Kosugi y cols. (1997) estudian los cambios experimentados en la especificidad enzimática de *Rhizomucor miehei* frente a los PUFAs para la reacción de hidrólisis de ésteres etílicos con diferentes **concentraciones de sustratos**. Las diferencias en el grado de hidrólisis y la afinidad de los sustratos entre los diferentes preparados de lipasa fueron superiores durante la hidrólisis de sustratos a una concentración 100 mM que a 1mM. Estos autores atribuyen estas observaciones a las ventajas de la transferencia de materia con los sustratos 1 mM debido a que con la concentración superior se produce una mayor agregación molecular de los lípidos que influye sobre la actividad y especificidad de las lipasas.

Shimada y cols. (1998a) optimizan la hidrólisis selectiva de aceite de borraja, para la discriminación de GLA con la lipasa de *Candida rugosa*. Partiendo del aceite que contiene un 22% de GLA, al utilizar un 50% y un 90% **de agua** en la mezcla de reacción (a 35°C y durante 15 horas), alcanzan contenidos de GLA que no superaban el 46% y del 49% respectivamente, incluso aunque el grado de hidrólisis se

incrementara por aumentar los tiempos de incubación y la cantidad de lipasa. Estos autores sugieren que los AGLs acumulados en la mezcla afectan la aparente especificidad de la lipasa e interfieren en el aumento del **contenido en GLA**. Glicéridos conteniendo 22, 35 y 46% de GLA fueron hidrolizados con esta lipasa y el grado de hidrólisis disminuyó con el contenido en GLA de los glicéridos sin que la relación de incremento de GLA cambiara. Así, se encontró que la especificidad aparente de la lipasa estaba condicionada por la **estructura de los glicéridos** a hidrolizar. Partiendo del aceite del 46% en GLA, obtuvieron un aceite de un 54% y un 59% de GLA para un 20% y un 60% de hidrólisis respectivamente. Finalmente proponen las **hidrólisis repetidas** como un método eficaz para la producción mayores concentraciones de GLA.

En los últimos años han aparecido los primeros estudios sobre la aplicación de **lipasas inmovilizadas** a reacciones de hidrólisis enzimática. La influencia del tipo de inmovilización resulta drástica por lo que la aplicación de las lipasas inmovilizadas por diferentes métodos ha sido estudiadas por numerosos autores.

Noureddini y cols. (2002) inmovilizan la lipasa de *Pseudomonas cepacia* por oclusión en el interior de una **matriz de un gel** para aplicarla a la hidrólisis enzimática de aceite de soja. La lipasa ocluida en tetrametoxisilano/isobutiltrimetoxisilano mostró la actividad más alta. La estabilidad térmica de la lipasa mejoró considerablemente (es estable a más de 70°C mientras que la enzima libre perdía su actividad al sobrepasar los 40°C) y mantenía por encima del 95% de su actividad inicial después de 12 reacciones de 1 hora.

1.8.2.3- Hidrólisis enzimática no discriminativa

Shimada y cols. (1997b y c) y Vacek y cols. (2000) proponen la hidrólisis enzimática no discriminadora de PUFAs como un procedimiento de generación de ácidos grasos que sirvan de partida para otros procesos enzimáticos.

Shimada y cols. (2001a) recapitulaban sobre las ventajas de utilizar la **hidrólisis enzimática como alternativa** a la obtención de ácidos grasos libres por **saponificación** de los glicéridos pues la hidrólisis enzimática evita el calentamiento de los aceites con grandes cantidades de etanol en condiciones alcalinas fuertes. Según estos autores, las principales ventajas de la hidrólisis enzimática son: se evitan riesgos de isomerización de los PUFAs, las aguas residuales no contienen

etanol (menores valores de la DQO), no es necesario volver a acidificar la mezcla de reacción para la recuperación de los ácidos grasos hidrolizados y éstos se pueden recuperar fácilmente mediante destilación molecular simple. Estos autores también plantean la posibilidad de enriquecer el contenido en PUFAs en la fracción de ácidos grasos hidrolizados mediante hidrólisis, pero no encontraron una lipasa con una especificidad suficiente para lograr este objetivo. Tan sólo algunas lipasas, como las procedentes de *Pseudomonas*, actúan hidrolizando los PUFAs suficientemente bien y proporcionando altos grados de hidrólisis. El resto discriminan a los PUFAs en la fracción de triglicéridos sin hidrolizar.

Sólo este último año, tal como se indicó anteriormente (apartado 1.8.1.2.), Halldorsson y cols. (2004), en el trabajo en el que comparan la **selectividad** por ácido graso de numerosas **lipasas** disponibles comercialmente atendiendo a los ácidos grasos más frecuentes presentes en los aceites de pescado en sus correspondientes formas de ésteres etílicos, han encontrado unas enzimas presentan lo que denominan “selectividad inversa” en la hidrólisis. Así, con estas enzimas lipolíticas, cultivadas en intestinos de salmón y trucha, se concentraron los PUFAs en la fracción de ácidos grasos libres hidrolizados. Aun siendo muy interesante dicha característica, los autores no precisan más detalles por el momento.

Algunos autores han aplicado esta hidrólisis enzimática no discriminativa como etapa previa de un proceso más amplio de purificación de PUFAs.

Linder y cols. (2002) aplican un proceso en dos etapas comenzando por una **hidrólisis** enzimática **selectiva** de un aceite de salmón extraído sin disolvente, llevada a cabo bajo condiciones suaves utilizando la lipasa 1,3-estereoespecífica Novozyme SP435. Se obtuvo una modificación de la composición de las clases lipídicas controlando el grado de hidrólisis (40% a las 24 horas). El producto de la hidrólisis se sometió a una **filtración** mediante una membrana hidrofílica que retuvo la mayor parte de los ácidos grasos saturados. Esto permitió aumentar el contenido de PUFAs en las aguas madres de un 39,2 % hasta un 43,3%. El 90% de los AGLs de las aguas madres fueron **re-esterificados** con glicerina utilizando la lipasa 1,3-específica IM60 sin que se modificara el contenido en PUFAs obtenido por filtración de membrana.

Gómez-Meza y cols. (2003) ensayaron la concentración de PUFAs de aceite de sardina mediante hidrólisis enzimática no selectiva seguida de la concentración de los PUFAs por el método de los compuestos de inclusión de urea. En este sentido, ensayaron la hidrólisis con varias lipasas comerciales de *Pseudomonas*, tres **inmovilizadas**: PS-CI (10% de proteína sobre cerámica), PS-CII (2% de proteína sobre cerámica) y PS-DI (3% de proteína sobre diatomita); y dos **solubles**: AK-20 (de *P. fluorescens*) y PS-30 (de *P. cepacia*), todas suministradas por Amano. La forma inmovilizada PS-CI produjo el grado de hidrólisis más elevado para el EPA y el DHA (81,5 y 72,3% de su contenido inicial en el aceite) después de 24 horas de reacción, en las que se obtuvo un 78% de rendimiento total de hidrólisis.

1.8.3.- ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA SELECTIVA

Es necesario conocer las variables que influyen en la naturaleza y pureza de los productos a obtener (glicéridos, AGLs, etc.), en la proporción relativa de los mismos, en el contenido en los PUFAs de interés (EPA, DHA, etc.) en cada una de esas fracciones y en el rendimiento alcanzado en su recuperación. Estas variables son, fundamentalmente, el tipo de lipasas utilizadas (actividad y especificidad), su cantidad, su inmovilización o no, el tipo y cantidad de soporte empleado, la presencia o no de disolvente, el tipo y cantidad de disolvente a emplear, la relación alcohol / ácidos grasos, el tipo de alcohol, la composición de los ácidos grasos de partida, la temperatura de reacción, el contenido de agua (inicial y durante el transcurso de la reacción), la agitación o mezcla de los reactivos y el tiempo de reacción. Dada la interdependencia entre algunas variables de reacción, el estudio de las mismas no puede ser demasiado individualizado, ya que debe de hacerse teniendo en cuenta los valores de todas las variables interrelacionadas.

1.8.3.1.- Especificidad de las lipasas: principales variables

Tsujisaka y cols. (1977) realizaron ya experimentos de síntesis de glicéridos a partir de glicerina y diversos ácidos grasos en presencia de cuatro tipos de lipasas. Aún cuando su investigación fundamental se centró en la esterificación con ácido oleico y la **especificidad posicional** de las lipasas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* (que resultaron posicionalmente específicas *sn*-1,3) y las de *Geotrichum candidum* y *Penicillium cyclopium* (que resultaron no específicas), también investigaron la viabilidad de la síntesis de glicéridos con otros ácidos. Mientras las

dos primeras lipasas sintetizaron glicéridos no sólo a partir de ácidos grasos sino también de ácidos aromáticos, las dos últimas sólo formaron glicéridos con ácidos de cadena larga. Igualmente, observaron que la especificidad posicional que mostraban las citadas lipasas era la misma que presentaban en las hidrólisis respectivas.

Ergan y cols. (1988) realizaron la síntesis de triglicéridos a partir de ácido oleico y glicerina en presencia de Lipozyme de *Mucor miehei* que está **inmovilizada** sobre una resina de intercambio iónico. La actividad de la enzima permaneció estable a lo largo de la reacción y las enzimas pudieron reutilizarse cuatro veces más sin que se observase inactivación. Este resultado indica que es fundamental desde un punto de vista económico que las lipasas se utilicen inmovilizadas.

Ergan y cols. (1989, 1990) estudiaron la producción de glicéridos a partir de glicerina y ácido oleico en medio no acuoso catalizada por la enzima inmovilizada de *Mucor miehei*, IM-20. Observaron que esta lipasa, referenciada como específica *sn*-1,3, aparentemente no se mostró como tal, por lo que posiblemente la especificidad dependa del tipo de reacción. En recipiente abierto y a 60°C, al añadir la lipasa, el consumo de ácido oleico se inició rápidamente, formándose inicialmente MG y DG. La formación de TG se inició lentamente, al cabo de una hora de reacción, consumiéndose los MG y DG formados. Al cabo de 48 h los TG alcanzaron el 86% y sólo quedaba un 5% de ácido oleico no esterificado. Aún cuando la reacción se mantuvo hasta las 600 h, no hubo cambios significativos.

1.8.3.2.- Eliminación de agua

En bibliografía existen varios procedimientos para eliminar el agua que se va formando en la esterificación y desplazar así el equilibrio hacia la formación de productos. Ergan y cols. (1989, 1990) han comparado varios de estos procedimientos: evaporación libre (operando en discontinuo a 60°C), vacío, adición de tamices moleculares y burbujeo de aire seco. Los dos primeros parecen ser los más eficaces, aunque con vacío se obtiene un rendimiento algo mayor que con la evaporación libre.

Ergan y cols. (1988) realizaron la síntesis de triglicéridos a partir de ácido oleico y glicerina, en presencia de Lipozyme, escaso contenido de agua y añadiendo tamices moleculares a diferentes tiempos y en varias cantidades. Observaron que en este caso

la cantidad de tamices añadida no es el parámetro importante, sino el instante de la reacción en que se añaden.

Por otro lado, estos mismos autores (Ergan y cols., 1989, 1990) estudiaron el efecto de la temperatura y de la relación entre los sustratos en la producción de glicéridos a partir de glicerina y ácido oleico en medio no acuoso. Los rendimientos en la síntesis de glicéridos operando a 60°C y con el recipiente abierto para la eliminación del agua fueron comparables a los obtenidos a 34°C y usando los tamices moleculares. Si el recipiente permanece tapado, la conversión disminuye y al cabo de 600 h aún queda un 15% de ácido oleico no esterificado pero estos autores demostraron que la eliminación del agua por simple evaporación resulta eficiente para la síntesis de TG. En recipiente abierto, para relaciones glicerina/ácido oleico bajas (inferiores a 0,7) toda la glicerina se consumió y el único producto fue trioleina (y el ácido en exceso). Para la relación estequiométrica se obtuvo una mezcla formada por un 86% de TG, 9% de DG y 5% de ácido oleico. Para relaciones glicerina/ácido oleico mayores el rendimiento en TG fue disminuyendo y aumentando el de DG y MG. Por lo tanto actuando sobre la relación glicerina/ácidos grasos pueden modificarse el tipo de glicéridos que se obtienen. También ensayaron temperaturas entre 40 y 80°C, en recipientes abiertos. El rendimiento en TG se mantuvo constante a partir de 50°C, pero la reacción se hizo más rápida a medida que aumentó la temperatura, debido a la mayor eficacia en la eliminación de agua.

Sin embargo, de forma excepcional, tal y como se detallará más adelante, Shimada y cols. (1997a y 1998b) efectuaron eficientemente la esterificación de ácidos grasos, incluso en presencia de grandes concentraciones de agua, utilizando alcoholes grasos como sustratos para las lipasas. Según estos autores, esto se consigue gracias a que los productos de esterificación (ésteres de alcoholes grasos) son poco hidrolizados por las lipasas. De esta manera, utilizando alcoholes de cadena larga y la lipasa *Rhizopus delemar*, se obtuvieron altos grados de esterificación, con concentraciones de hasta el 20 % de agua.

Posteriormente, Yan y cols. (2002) diseñaron un nuevo procedimiento eficiente para **eliminar el exceso de agua a temperaturas compatibles** con la actividad enzimática. El procedimiento consiste en eliminar el agua formando con ella un azeótropo en un medio con un 26% de etil-metilcetona, 55% de hexano (4:1 v/v) y 19% en agua; a continuación se elimina este azeótropo a 59°C mediante una membrana permeable al vapor. El

procedimiento se aplicó con buenos resultados en ensayos de esterificación con la lipasa de *Candida antarctica*.

1.8.3.3.- Uso de disolvente orgánico

Numerosos autores (Hills y cols., 1990, Foglia y cols., 1997, Huang y cols., 1997, entre otros) demostraron que los disolventes orgánicos son un medio efectivo y muy adecuado para las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas. Sin embargo, todos los métodos que se emplean para la eliminación del agua formada, salvo la adición de tamices moleculares, ocasionan problemas con estos disolventes. Así, por ejemplo, mantener el reactor destapado a una temperatura relativamente alta conlleva la pérdida del disolvente por evaporación y el uso de una bomba de vacío elimina también los disolventes orgánicos volátiles e implica riesgos de explosión.

Oh y cols. (1996) analizaron el efecto de la **longitud de la cadena** del hidrocarburo usado como **disolvente** orgánico en el rendimiento de la síntesis de triglicéridos en microemulsiones, catalizada por lipasas. La esterificación de glicerina con ácido dodecanoico, catalizada por Lipozyme, se llevó a cabo en una serie de microemulsiones basadas en los hidrocarburos en el rango del n-octano al n-hexadecano y determinaron las cantidades relativas de mono-, di- y triglicéridos formados. Observaron que con los hidrocarburos de cadena más corta (octano y decano) el producto principal eran los monoglicéridos (apenas había trazas de triglicéridos). El rendimiento en TG se incrementó usando hidrocarburos más largos y por tanto con hexadecano obtuvieron la mayor cantidad relativa de TG. Argumentan que esta fuerte dependencia de la longitud de la cadena del hidrocarburo sobre la proporción MG/TG es debida a la mayor o menor solubilidad de los productos de reacción en los disolventes. Los hidrocarburos de cadena corta son mejores disolventes para mono- y diglicéridos que sus homólogos de cadena más larga. Así, cuando hay una buena solubilidad de MG y DG (como en octano y decano), los monoglicéridos formados inicialmente en la interfase disolvente orgánico/agua, serán rápidamente retirados de esa interfase, por lo que no serán transformados a di- y triglicéridos. En disolventes en los que los MG se disuelven peor, éstos quedarán en las cercanías de la interfase, siendo utilizables para posteriores esterificaciones.

1.8.3.4.- Esterificación de AGLs con alcoholes de cadena larga: purificación de PUFAs

Está demostrado que los PUFAs pueden ser enriquecidos en la fracción de ácidos grasos mediante la esterificación con un alcohol de los ácidos grasos obtenidos de un aceite rico en PUFAS, usando una lipasa que actúa sobre los PUFAs a menor velocidad que sobre el resto de los ácidos grasos.

A continuación se va a analizar con mayor profundidad esta reacción de esterificación catalizada por lipasas con acil-selectividad, que es la que, según Shimada y cols. (2001a), ofrece el método más viable para la obtención de concentrados de PUFAs n-3. Este análisis es un resumen de los principales resultados obtenidos en formación de ésteres con el objetivo de concentrar los PUFAS en la fracción de ácidos grasos libres sin esterificar, haciendo hincapié en las variables de operación más importantes.

Hills y cols. (1990) utilizaron la lipasa de rape (*Brassica napus* L) y Lipozyme (*Mucor miehei*) para el enriquecimiento del ácido γ -linolénico y DHA por esterificación selectiva de ácidos grasos procedentes de aceite de onagra y de aceite de hígado de bacalao con butanol. Estas enzimas discriminan fuertemente los ácidos citados, esterificando a los que los acompañan y aumentando la concentración de γ -linolénico y DHA en la fracción no esterificada. Así, con Lipozyme, se consiguen concentrar el γ -linolénico de 9,5 a un 85% y el DHA de un 9,4 a un 45%, parando las reacciones antes de llegar al equilibrio (a las 6 horas) para obtener un contenido en ácidos grasos libres de un 7%.

Shimada y cols. (1997a) aprovecharon la poca actividad de la lipasa de *Rhizopus delemar* sobre el DHA en la esterificación con diferentes alcoholes para concentrar este ácido en la fracción no esterificada de un aceite de atún. El 84% del DHA se recuperó en el 28% de los ácidos grasos totales, aumentando su concentración desde un 23 hasta un 73% sobre ácidos grasos totales, con alcohol láurico como sustrato, en una proporción 2:1 mol/mol y en presencia de agua en proporción 1:6 g/g respecto a la mezcla de sustratos. Explican que los alcoholes de cadena larga sean mejores sustratos debido a que sus ésteres formados son peores sustratos para las lipasas conforme aumenta su longitud. Por tanto, estos alcoholes permitirán la adición al medio del agua inicial necesaria para que la actividad de la lipasa sea máxima sin

que el equilibrio se desplace hacia la hidrólisis. Eligen concretamente el alcohol láurico por motivos económicos. Para elevar aún más el contenido en DHA, se aplicaron esterificaciones sucesivas, llegando hasta un 89% de pureza en DHA y recuperando el 71% del DHA original.

Pronto, Shimada y cols. (1998b) consiguieron **escalar** 10 veces las condiciones de operación de trabajos anteriores para la purificación de GLA mediante una reacción de esterificación en la que usaban la lipasa *Rhizopus delemar*, demostrando la aplicabilidad industrial de estos procesos. El mayor inconveniente fue la recuperación de la enzima no inmovilizada para su posterior reutilización, lo que era necesario para reducir la cantidad de enzima empleada y los costes del proceso.

Schmitt-Ruzieres y cols. (1999) insistieron en la purificación del **GLA** a partir de aceite de borraja mediante una esterificación enzimática selectiva pero utilizaron la lipasa de ***Candida rugosa* inmovilizada** sobre resinas de intercambio iónico. Probaron diferentes soportes para la inmovilización (Amberlite IRC50, IRA35, IRA93 y Duolite A7, A368, A568) a diferentes temperaturas (30, 40, 50°C) e hicieron un seguimiento en el tiempo de los principales parámetros de actividad y selectividad enzimática. De esta manera confirmaron el enriquecimiento en GLA de la fracción de ácidos grasos no esterificados y observaron que la inmovilización modificaba la actividad de la lipasa.

En la misma línea, Jonzo y cols. (2000) obtuvieron concentrados de **DHA** a partir de aceite de sardina mediante la esterificación selectiva de sus AGLs (obtenidos por saponificación) **utilizando colesterol**. En esta esterificación prueban varias formas inmovilizadas y purificadas de *Candida rugosa* inmovilizadas sobre Duolite A-568 y obtienen un enriquecimiento del DHA en los ácidos grasos libres no esterificados de entre 3 y 4 veces el contenido inicial del aceite con una recuperación del 95% en dicha fracción.

Lee y Parkin (2001) extienden a **otras enzimas** los estudios de Shimada y cols. (2001a) en los que inmovilizaban la lipasa de *Candida antarctica* para realizar ensayos de esterificación en sistemas orgánicos sin disolvente con diferentes adiciones de agua. De esta manera estudian la especificidad sobre los PUFAs que presentan numerosas lipasas (*Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei* y *Candida rugosa*, además de la de *Candida antarctica*), inmovilizadas o no sobre celite. Observaron que las lipasas muestran diferencias en su actividad y en su selectividad para con los ácidos grasos cuando están inmovilizadas sobre resinas y concluyen en que las influencias de estos factores no pueden ser predichas.

Finalmente, Halldorsson y cols. (2003) purificaron DHA, separándolo del EPA, a partir de aceites de pescado, empleando la lipasa de *Rhizomucor miehei* (relación lipasa/sustrato 10% p/p) mediante la esterificación selectiva con glicerol. El agua producida la eliminaron mediante vacío a 40°C y operaron en ausencia de disolvente. Ensayaron diferentes aceites y conversiones, observando en qué grado el DHA y el EPA eran discriminados en la fracción de ácidos grasos sin esterificar. Así por ejemplo, con aceite de atún (5% de EPA y 25% de DHA) y tras un grado de esterificación del 90%, el residuo de ácidos grasos libres pasó a contener un 78% en DHA (con un 79% de recuperación) y sólo un 3% de EPA. La recuperación del EPA en la fracción de acilglicéridos fue de un 91%.

1.8.4.- PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN DOS ETAPAS

Se encuentran numerosas referencias de autores que purifican los PUFAs utilizando diferentes combinaciones reacciones enzimáticas tales como hidrólisis seguida de acidolisis (Huang y cols., 1999), alcoholisis seguida de esterificación (Torres y cols., 2003) y, sobretodo, hidrólisis seguida de esterificación (Huang y cols., 1997; Shimada y cols., 1997b y c; Rakshit y cols. 2000).

Shimada y cols. (1997b y c) proponen un método enzimático de purificación de DHA y GLA (respectivamente) basándose en las ventajas de la obtención vía enzimática de un preparado de ácidos grasos a partir de aceites de origen marino. El método consta de dos etapas: hidrólisis del aceite y esterificación selectiva de los ácidos grasos obtenidos.

Con el objetivo de purificar DHA a partir de aceite de atún, Shimada y cols. (1997b), en primer lugar, hidrolizaron el aceite con la lipasa AK de *Pseudomonas sp*, que mostró una actividad algo mayor sobre el DHA que sobre el EPA. Tras 48 horas de agitación, a 40°C, de una mezcla equivalente en peso de aceite de atún y agua, a la que se le añadieron 500 unidades de esta lipasa, el 83% del DHA del aceite se quedó en la fracción de ácidos grasos, siendo el grado de hidrólisis de un 79%. Seguidamente se realizó una esterificación selectiva (30°C durante 20 h), a 4 g de mezcla de estos ácidos grasos con alcohol láurico en una proporción 1:2 mol/mol, añadiendo 1 g de agua y utilizando 1000 unidades de lipasa *Rhizopus delemar*. El contenido de DHA en la fracción de ácidos grasos sin esterificar aumentó desde un 24 a un 72%, obteniéndose un 83% de recuperación. Mediante esterificaciones sucesivas se consiguió incrementar la pureza hasta un 91%, recuperándose un 88%

del DHA. Se comprobó que no se produce transesterificación y que todos los ésteres láuricos del DHA formados se produjeron por esterificación.

Para purificar GLA, en primer lugar, Shimada y cols. (1997c) hidrolizaron 3 g de un aceite de borraja con 2 g de agua y 5000 unidades de *Pseudomonas* (Liposam), a 35°C y 500 rpm, durante 24 horas. En estas condiciones se alcanzó un 91% de hidrólisis, recuperándose un 92,1% del GLA. A continuación, los ácidos grasos libres resultantes se esterificaron con alcohol láurico en las mismas condiciones descritas en el trabajo anterior. Así se obtuvieron un 74,4% de ácidos grasos esterificados, aumentando su contenido en GLA de un 22,5 a un 70,2% en peso y recuperándose un 75% del GLA total inicial. Tras una segunda esterificación, el GLA fue purificado hasta un 93,7%, con un 67,5% de recuperación. Posteriormente, en el trabajo de Shimada y cols. (1998b), citado en el apartado anterior, estos autores escalaron 10 veces las condiciones de operación para la purificación de GLA mediante todo un proceso que incluía una hidrólisis con *Pseudomonas sp.* previa a la esterificación con *Rhizopus delemar*. Los resultados obtenidos fueron similares a los de trabajos anteriores a menor escala.

Huang y cols. (1997) utilizaron un procedimiento semejante para concentrar el ácido GLA procedente de aceite de borraja (23,6% GLA). Después de una primera etapa de **hidrólisis** en isoocetano catalizada por la lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre polipropileno microporoso, de la que separaron los glicéridos no hidrolizados, llevaron a cabo una **esterificación selectiva** de los AGLs del aceite de borraja saponificado y n-butanol en presencia de Lipozyme IM-20, de la que separaron los AGLs no esterificados. Finalmente realizaron una acidólisis de los productos separados en las dos reacciones previas: los glicéridos no hidrolizados y los AGLs sin esterificar. En la hidrólisis la lipasa discrimina el GLA por lo que aumenta su contenido hasta un 51,7% en la fracción no hidrolizada. Por otro lado, en la esterificación, el contenido en GLA de los AGLs sin esterificar aumentó hasta un 87%. Tras la reacción de acidólisis se obtienen glicéridos con un 65% de GLA.

Estos mismos autores (Huang y cols., 1999) utilizaron la **hidrólisis** enzimática selectiva (con discriminación de los PUFAs) como un procedimiento de obtención de glicéridos enriquecidos en PUFAs, de forma que sirvan de sustrato de partida para una **acidólisis** con un extracto de ácidos grasos libres rico en GLA. Este extracto rico en GLA era obtenido paralelamente por saponificación del mismo aceite y por

fraccionamiento de los ácidos grasos libres por el método de los complejos de urea. La hidrólisis parcial del aceite de borraja (23,4% en GLA) la realizaron utilizando la lipasa de *Candida rugosa* (discriminadora de los PUFAs). Por este procedimiento, el contenido de GLA en los glicéridos no hidrolizados aumentó hasta un 52,1%. Por saponificación y el método de los complejos de urea el contenido en GLA en los ácidos grasos libres aumentó de un 26 a un 94%. Finalmente, mediante la acidólisis de los glicéridos parciales enriquecidos en GLA con el concentrado de ácidos grasos obtuvieron un 90% de triglicéridos con un 75% en GLA.

Rakshit y cols. (2000) estudian el enriquecimiento del contenido en EPA y DHA de un aceite de atún mediante un proceso de **hidrólisis y posterior esterificación**. Utilizan una lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, inmovilizada sobre Dowex MWA-1, estudiando las posibles distribuciones del EPA y DHA debidas a las selectividades a favor o en contra de dichos PUFAs. La hidrólisis del aceite en condiciones estequiométricas llevó más del 80% del EPA y DHA a la fracción de AGLs cuando el grado de hidrólisis fue alrededor del 60%. Tras esta primera especificidad preferencial para grados de hidrólisis moderados, la lipasa presentó un comportamiento no selectivo para grados de hidrólisis más avanzados. La esterificación de los AGLs extraídos mediante la completa hidrólisis del aceite resultó ser más eficaz con alcoholes de cadena larga tales como el octanol que permitió un buen enriquecimiento (45% de DHA y 11,3% de EPA) y rendimientos de los PUFAs en la fracción de AGLs sin esterificar (80% y 70% respectivamente) al alcanzar un 55% de esterificación.

1.8.5.- SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN

Cuando aplicamos una reacción enzimática selectiva se obtiene una mezcla de productos de naturaleza y de composición distinta a la de partida que habrá que separar para obtener la fracción más rica en los ácidos grasos o grupos acilo de interés. Además, no podrán realizarse reacciones enzimáticas en varias etapas (ni llevar a cabo procesos con diferentes reacciones encadenadas ni repeticiones sucesivas de una misma reacción que permitan mejores rendimientos) si no separamos las fracciones deseadas de las no deseadas antes de pasar a la etapa siguiente.

Las técnicas más usuales para la separación de los productos son la destilación molecular, la cromatografía en columna o extracción en fase sólida y la neutralización de los AGLs sin saponificación de los ésteres.

La **neutralización de los AGLs** es la técnica más referenciada debido a su bajo coste y a su alta eficacia. Shimada y cols. (1997b y c y 2001a), Huang y cols. (1999), Rakshit y cols. (2000), Halldorsson y cols. (2001), Linder y cols. (2002) y Torres y cols. (2003), entre otros, neutralizan los AGLs con una disolución hidroetanólica de KOH poco concentrada, de forma que los ésteres no se saponifican. A continuación los ésteres pueden ser extraídos con hexano y los ácidos grasos libres quedan disueltos en forma de jabones en la fase hidroalcohólica. Esta fase hidroalcohólica es acidificada añadiendo HCl, de forma que los jabones vuelvan a transformarse en ácidos grasos libres. Una vez realizada esta transformación, los ácidos grasos libres pueden ser extraídos bastante puros con n-hexano.

Entre otros autores, Torres y cols., en algunos de sus trabajos de acidólisis catalizadas por lipasas (2002a y b), separan los productos de reacción vía extracción en fase sólida recuperando los triglicéridos mediante una **columna cromatográfica (extracción en fase sólida)** sobre columnas de sílica gel. Así, preparan la columna humedeciendo con hexano la sílica, aplican la muestra en la columna y la van diluyendo bajo vacío (5 mmHg) con mezclas de hexano/eter dietílico de polaridad creciente: primero hexano/eter dietílico (200:3, vol/vol) donde se arrastrarían las impurezas, y luego (96:4, vol/vol) donde se arrastrarían los TGs. Los volúmenes de eluatos a emplear varían en función de la concentración y el volumen de la muestra a purificar.

La **destilación molecular** en monocapa es el método más novedoso empleado en separación de mezclas de productos de reacción por numerosos autores que van desde Shimada y cols. (1998b) hasta Torres y cols. (2003b). En este último trabajo estos autores estudian las presiones y las temperaturas más adecuadas para limpiar de ésteres etílicos los productos de una alcoholisis. Primero la mezcla de productos se desgasificó mediante una destilación a 100°C y 9.3 mbar que eliminaba los compuestos más volátiles. Después se destilaba a 130°C y 0,04 mbar produciendo un residuo (58% en peso) con menos del 1% de los ésteres etílicos y una proporción en gliceroles similar a la del producto de partida.

2.-Materiales y métodos

2.1.- MATERIALES: BIOMASA, ACEITES Y LIPASAS EMPLEADAS

2.1.1.- BIOMASA

La biomasa de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* (cepa UTEX 640, procedente de la colección Austin, Texas) se obtuvo en las instalaciones del Departamento de Ingeniería Química, en un fotobiorreactor tubular externo, tipo airlift, de 100 m de longitud y 0,06 m de diámetro. El medio de cultivo utilizado fue el de Mann y Myers (1968), con pH controlado a 7,7 mediante inyección, a requerimiento, de dióxido de carbono puro y temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, mantenida constante mediante un baño termostatzado. La biomasa se cosechó una vez que se alcanzaron estados estacionarios estables, a una velocidad de dilución de $0,04\text{ h}^{-1}$ y diluyendo durante las diez horas centrales del día. En estas condiciones se optimizó tanto la productividad en biomasa como la productividad en EPA (Molina Grima y cols., 1994b; Acién Fernández y cols., 1998; Camacho Rubio y cols., 1998). La biomasa cosechada se centrifugó, liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso.

Entre las distintas partidas de biomasa liofilizada disponibles (todas ellas con un perfil en ácidos grasos bastante similar) se seleccionaron aquellas que tenían un mayor contenido en los ácidos grasos poliinsaturados deseados y un menor contenido en carotenoides. Éstos se analizaron (por triplicado) por el método de Whyte (1987) modificado (Rodríguez-Ruiz y cols., 1998).

Así, la composición en ácidos grasos de la biomasa de *P. tricornutum*, determinada por triplicado por cromatografía gaseosa, puede verse en tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Caracterización de la biomasa de *Phaeodactylum tricornutum*. Perfil en ácidos grasos (% en peso sobre ácidos grasos totales y sobre el peso seco total de la biomasa).

ÁCIDOS GRASOS	Porcentaje en peso sobre AG totales (%)	Porcentaje en peso sobre biomasa seca (%)
14:0	7,6	0,60
16:0	16,9	1,33
16:1n7	18,1	1,42
16:2n4	4,1	0,32
16:3n4	6,6	0,51
16:4n1	0,9	0,07
18:0	0,6	0,05
18:1n9	1,6	0,13
18:1n7	1,5	0,12
18:2n6	2,5	0,19
18:3n3	0,8	0,06
18:4n3	0,6	0,05
20:4n6	2,2	0,17
20:4n3	0,8	0,06
20:5n3 (EPA)	22,8	1,79
24	0,9	0,07
22:5n3	2,8	0,22
22:6n3 (DHA)	2,7	0,21
Otros	6,0	0,47
TOTAL	100,0	7,85

2.1.2.- ACEITES

El aceite de hígado de bacalao (Acofarma, Barcelona) presenta las siguientes características medias suministradas por el fabricante: densidad = 0,925; índice de refracción = 1,4788; índice de acidez = 0,16; índice de iodo (Hanus) = 150,31; índice de saponificación = 187; fracción de insaponificables = 1,46%.

El aceite sintético EPAX 4510TG (Pronova Biocare) y el aceite de onagra (Acofarma, Barcelona) también presentan una densidad de 0,925 g/ml. (El resto de sus características no fueron suministradas por los fabricantes).

Se caracterizó (por CG) la composición en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) de los aceites utilizados y de sus correspondientes

especies lipídicas (por CCF seguida de CG) para tomarlos como referencia en el análisis de los productos de los ensayos realizados con los mismos.

En la tabla 2.2 se muestra la caracterización media detallada del aceite de hígado de bacalao utilizada para la formación de un extracto de AGLs por saponificación.

Tabla 2.2.- Caracterización del aceite de hígado de bacalao (AHB).
Perfiles en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) del aceite y de las diferentes especies lipídicas que lo componen (así como los porcentajes en peso de las mismas).

ÁCIDOS GRASOS	AHB	Cromatografía en capa fina		
		MG	FFA	TG
14:0	3,1	0,0	0,0	3,6
16:0	10,0	0,0	15,9	11,1
16:1n7	7,5	26,0	11,1	8,3
16:2n4	0,5	0,0	0,0	0,3
16:3n4	0,3	0,0	0,0	0,4
16:4n1	0,3	0,0	0,0	0,3
18:0	2,3	0,0	0,0	2,5
18:1n9	17,3	0,0	6,5	19,2
18:1n7	5,4	33,9	33,3	6,1
18:2n6	1,3	0,0	5,7	1,3
18:3n3	0,6	0,0	0,0	0,6
18:4n3	1,6	0,0	0,0	1,1
20:1n9	12,9	23,4	16,4	13,9
20:4n6	0,4	0,0	0,0	0,3
20:4n3	0,7	0,0	0,0	0,4
20:5n3 (EPA)	9,5	0,0	0,0	6,4
22:1n9	9,5	16,7	11,0	10,4
21:5n3	0,5	0,0	0,0	0,4
22:5n3	1,3	0,0	0,0	0,8
22:6n3 (DHA)	11,1	0,0	0,0	7,2
Otros	3,9	0,0	0,0	5,3
X (%)		0,6	1,8	97,6

MG Fracción de monoglicéridos

AGL Fracción de ácidos grasos libres

TG Fracción de triglicéridos

X Porcentaje en peso de cada banda respecto al total

* No aparecen diglicéridos

En la tabla 2.3 se muestra la caracterización media detallada del aceite comercial EPAX4510TG utilizada para los ensayos previos de hidrólisis para la determinación de sus condiciones de partida.

Tabla 2.3.- Caracterización del aceite comercial EPAX4510TG. Perfiles en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) del aceite y de las diferentes especies lipídicas que lo componen (así como los porcentajes en peso de las mismas).

ÁCIDOS GRASOS	EPAX	Cromatografía en capa fina				
		MG	AGL	DG12	DG13	TG
14:0	0,4	0,0	0,8	0,0	0,0	0,5
16:0	4,2	0,0	7,1	7,2	10,5	5,2
16:1n7	1,8	0,0	3,0	2,8	0,0	2,1
16:2n4	0,4	0,0	0,5	8,1	0,0	0,3
16:3n4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
16:4n1	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5
18:0	4,6	0,0	7,2	8,3	0,0	6,1
18:1n9	8,4	28,9	12,7	13,7	14,6	10,0
18:1n7	4,5	0,0	7,8	9,3	0,0	5,8
18:2n6	1,0	0,0	1,6	0,0	0,0	1,0
18:2n4	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3n3	0,8	0,0	1,2	0,0	0,0	0,7
18:4n3	3,7	0,0	2,8	2,5	0,0	3,3
20:0	0,8	0,0	1,0	0,0	0,0	0,9
20:1n9	4,4	0,0	6,4	9,8	0,0	5,2
20:4n6	2,4	0,0	1,3	0,0	0,0	2,6
20:4n3	1,6	0,0	1,3	0,0	0,0	1,3
20:5n3 (EPA)	42,6	51,1	28,3	26,8	34,9	36,7
22:1n9	3,4	0,0	5,4	6,8	0,0	4,1
21:5n3	1,4	0,0	1,0	0,0	0,0	1,1
22:5n3	2,5	0,0	2,3	0,0	0,0	1,8
22:6n3 (DHA)	8,2	21,0	3,5	4,7	0,0	7,2
Otros	1,0	0,0	4,3	0,0	40,0	3,2
X (%)		1,0	1,0	2,9	2,9	92,2

Resto de simbología idéntica a la de la tabla 2.2

En los ensayos de hidrólisis para la selección de la mejor lipasa y de sus mejores condiciones de operación se despreciaron todos los ácidos grasos minoritarios (con un contenido inferior al 1%) y se agruparon las bandas de MGs, DGs1,2 y DGs1,3 para efectuar un análisis global de los glicéridos parciales (PGs).

En la tabla 2.4 se muestra la caracterización media simplificada del aceite comercial EPAX4510TG utilizada para estos ensayos.

Tabla 2.4.- Caracterización del aceite comercial EPAX4510TG. Perfiles en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) mayoritarios (superiores al 1%) del aceite y de las diferentes especies lipídicas que lo componen (así como los porcentajes en peso y molares y los pesos moleculares medios de las mismas). Se agrupan los diferentes glicéridos parciales en un solo análisis.

ÁCIDOS GRASOS	EPAX	Cromatografía en capa fina		
		AGL	PG	TG
16:0	4,5	14,5	9,2	4,9
16:1n7	1,9	0,0	0,0	1,9
18:0	4,9	15,9	10,6	6,1
18:1n9	8,8	11,6	15,9	10,3
18:1n7	4,8	0,0	8,9	5,7
18:2n6	1,0	0,0	0,0	1,1
18:4n3	3,9	0,0	0,0	3,3
20:1n9	4,7	11,8	9,3	5,8
20:4n6	2,5	0,0	0,0	2,7
20:4n3	1,7	0,0	0,0	1,7
20:5n3 (EPA)	45,0	46,2	46,1	41,5
22:1n9	3,6	0,0	0,0	4,0
21:5n3	1,5	0,0	0,0	1,5
22:5n3	2,6	0,0	0,0	2,3
22:6n3 (DHA)	8,6	0,0	0,0	7,2
X (%) *		1,7	5,5	92,8
PM medio **	299,0	291,1	291,7	298,1
Y (% molar) ***		1,6	5,4	93,0

AGL: Fracción de ácidos grasos libres

PG: Fracción de glicéridos parciales (monoglicéridos, diglicéridos 1,2 y diglicéridos 1,3)

TG: Fracción de triglicéridos

* Porcentaje en peso de cada banda respecto al total

** Peso molecular medio de los AG de cada banda

*** Porcentaje molar de cada banda respecto al total

En la tabla 2.5 se muestra la caracterización media del aceite de onagra.

Tabla 2.5.- Caracterización del aceite de onagra. Perfil en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) y porcentaje en peso de las diferentes especies lipídicas que lo componen.

<u>Ac. Graso</u>	<u>Aceite de onagra</u>	<u>Banda</u>	<u>%</u>
12:0	0,1	MG	0,0
14:0	0,1	AGL	2,6
16:0	6,0	DG12	0,8
18:0	1,9	DG13	1,4
18:1n9	7,9	TG	95,2
18:2n6	76,7		
18:3n6 (GLA)	9,4		
18:4n3	0,5		
Otros	0,4		

MG: Fracción de monoglicéridos
 AGL: Fracción de ácidos grasos libres
 DG12: Fracción de diglicéridos 1,2
 DG13: Fracción de diglicéridos 1,3
 TG: Fracción de triglicéridos

Los pesos moleculares medios de las fracciones lipídicas del extracto de *P. tricornutum*, del aceite de hígado de bacalao, del aceite de onagra y del EPAX4510TG se calcularon teniendo en cuenta sus perfiles lipídicos. Los pesos moleculares medios de estos aceites fueron 296, 307, 279 y 299 g/mol, respectivamente.

2.1.3.- LIPASAS

A lo largo de este trabajo se han utilizado las siguientes lipasas:

- Lipozyme IM de *Mucor miehei* / *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)
- Novozym 435 de *Candida antarctica* / *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk, A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)
- Lipasa D de *Rhizopus oryzae* (Amano Pharmaceutical Co., Japón)

- Lipasa M de *Mucor javanicus* (Amano Pharmaceutical Co., Japón)
- Lipasa AK ó Amano 20 (Amano Pharmaceutical Co., Japón) ó EU-084c (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K) de *Pseudomonas fluorescens*.
- Lipasa EU-034 de *Pseudomonas stutzeri* (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.)
- Lipasa EU-088 de *Pseudomonas cepacia* (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.)
- Lipasa EU-031c de *Alcaliginese spp.* (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.)
- Lipasa QLM-ex (Meito Sangyo, Japón) ó EU-032c (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.) de *Alcaligines spp.*
- Lipasa OF-ex (Meito Sangyo, Japón), AYS (Amano Pharmaceutical Co., Japón) ó EU-029c-old (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.) de *Candida cylindracea (rugosa)*.
- Lipasa EU-093 de *Rhizopus delemar* (Europa Bioproducts, Cambridge, U.K.)

A continuación se describen las características suministradas por los fabricantes de algunas de las lipasas empleadas.

La lipasa Lipozyme IM es de las más utilizadas por su compromiso entre alta actividad catalítica, estabilidad (gracias a estar inmovilizada en una resina) además de presentar tanto especificidad posicional como acilespecificidad. Es una lipasa inmovilizada que procede de *Mucor miehei*, cuyo código genético ha sido transferido a *Aspergillus oryzae*. Es un producto granular con un tamaño de partícula entre 0,2-0,6 mm y una densidad de 340-450 kg/m³. El soporte usado para la inmovilización es una resina macroporosa de intercambio aniónico de tipo fenólico, que enlaza fuertemente a la enzima por adsorción. Se suministra con un contenido en agua del 2-3%. El rango de temperaturas recomendado por el fabricante es de 30-70°C. Esta lipasa es particularmente útil, según el fabricante, para reacciones de interesterificación en las posiciones *sn*-1,3 del enlace éster de los triglicéridos y puede trabajar igualmente bien en medios sin disolvente o con disolventes orgánicos inertes, tales como éter de petróleo y n-hexano.

Novozym 435 es también una preparación enzimática granulada. Es una lipasa inmovilizada termoestable. Procede de *Candida antarctica*, cuyo código genético ha

sido transferido a *Aspergillus oryzae*. La enzima producida por este microorganismo está inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa. El producto consiste en partículas esféricas con un diámetro en el rango de 0,3-0,9 mm y densidad de 430 kg/m³. El producto se suministra con un contenido en agua del 1-2%. Debido a la inactivación térmica que puede sufrir a elevadas temperaturas, el fabricante recomienda trabajar en el rango de 40-60°C. Según el fabricante, esta lipasa es especialmente útil en la síntesis de ésteres, su especificidad posicional depende de la naturaleza de los reactivos y trabaja igualmente bien sin disolvente y con disolventes inertes, tales como éter de petróleo o n-hexano.

La lipasa AK se suministra también con un contenido en agua inferior al 10 %. Actividad (método JIS a pH 7,0 y 37°C): 28887 u/g. La temperatura óptima recomendada por el fabricante es de 55°C (rango de 35-60°C) y su pH óptimo es de 8 (rango de estabilidad 4~10). Hidroliza los ácidos grasos de cadena corta más rápidamente que los de cadena larga de los triglicéridos. Puede considerarse específica *sn*-1,3 ya que utilizando trioleína como sustrato, la lipasa libera los grupos acilo de las posiciones 1(3) del triglicérido unas 8,3 veces más rápidamente que los de la posición 2. Su actividad se inhibe con la presencia de iones Zn²⁺ y Cu²⁺. Es utilizable como ingrediente de productos de limpieza caseros.

La lipasa AYS procede de *Candida rugosa*. Actividad (método de Amano a pH 7,0): 30000 u/g. Hidroliza ácidos grasos de cadenas corta, media y larga en cualquier posición de los triglicéridos (no presenta especificidad posicional). Es utilizable en la industria alimentaria y en la manipulación de grasas y aceites). Temperatura óptima: 45°C; pH óptimo 7,0 (rango de estabilidad 5~8). Se inhibe su actividad con la presencia de iones Ag⁺ y Pb²⁺. Se inactiva por calentamiento a 85°C durante 10 minutos.

En la siguiente tabla se presentan las temperaturas y pH óptimos de trabajo facilitadas por Europa Bioproducts para las lipasas que han suministrado.

Tabla 2.6.- Condiciones óptimas de operación suministradas por los fabricantes para algunas de las lipasas empleadas.

Código	Microorganismo	T ^a óptima (°C)	pH óptimo
D	<i>Rhizopus oryzae</i>	37	7
M	<i>Mucor javanicus</i>	40	7
AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	55	8
OF-ex	<i>Candida cyclindracea</i>	40	5-9
EU-093	<i>Rhizopus delemar</i>	40	6-7
QLM-ex	<i>Alcaligines spp.</i>	60	7-8
EU-034	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	50	7-8
EU-088	<i>Pseudomonas cepacia</i>	50	7

En la siguiente tabla se presentan las especificidades encontradas en bibliografía y verificadas por sus proveedores para algunas de las lipasas utilizadas.

Tabla 2.7.- Principales especificidades encontradas en bibliografía y especificaciones de fabricantes para algunas de las lipasas empleadas.

Fuente de la lipasa	Especificidad por grupo acilo	Especificidad posicional
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L > C > n-3	1,3 >>> 2
(<i>Rhizo</i>) <i>mucor miehei</i>	C > M, L > DHA	1 > 3 >> 2
<i>Rhizopus delemar</i>	M, L >> C >> GLA, DHA	1,3 >> 2
<i>Alcaligines sp</i>	C, M, L > PUFAs	1,3 >> 2
<i>Mucor javanicus</i>	M, L >> C	1,3 > 2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M, L > C > n-3	1,3 > 2
<i>Pseudomonas sp.</i>	C, M, L > n-3	1,3 > 2
<i>Candida rugosa</i>	C, M, L >> GLA, DHA	
<i>Candida antarctica</i>	C, M, L >> n-3 (DHA)	1,3,2

C: AG cadena corta, M: AG cadena media, L: AG cadena larga

Las lipasas D, M, AK (EU-084c), EU-034, QLM (EU-032c), OF (EU-029c-old) y EU-093 se suministran en forma de polvo y con un contenido en agua inferior al 10%. En algunos experimentos se utilizaron inmovilizadas sobre Celite 545 AW coarse (Fluka Chemie). Esta **inmovilización** se realizó en nuestro laboratorio aplicando un método basado en el de Soumanou y cols. (1998).

Este método consiste en lavar el soporte (Celite) con agua (Milli-Q) hasta que el pH sea igual a 7 y a continuación secarlo en una estufa a 80 °C durante una noche. Por otra parte se prepara una disolución tampón fosfato (pH =7), mezclando 1,681 g de KH_2PO_4 con 1,333 g de K_2HPO_4 en 1 litro de agua Milli-Q. 1g de lipasa y 1,5 g de Celite se suspenden en 20 ml de esta disolución y se agita a 150 rpm y 5 °C durante 8 h. A continuación se añaden 5 ml de acetona y se filtra a vacío con una placa de vidrio con porosidad número 4. La torta (lipasa inmovilizada) se lava en el Büchner 3 veces con disolución tampón y se deja secar a temperatura ambiente durante 48 h. Finalmente se almacena a 5 °C.

Las condiciones de inmovilización se trataron de mejorar realizando las modificaciones siguientes al método de Soumanou y cols. (1998) original: la agitación se aumentó a 180 rpm, los 5 ml de acetona se añadieron a -24 °C y el lavado de la torta en el Büchner se hizo con 2 x 10 ml de disolución tampón a 0 °C.

Por otro lado, buscando un mejor aprovechamiento de las lipasas en los procesos de inmovilización, para las más interesantes, se han ensayado diferentes relaciones Celite/lipasa. Las relaciones ensayadas han sido: 2,5:1 y 4:1 (p/p), para los procedimientos 1 y 2, respectivamente.

2.2.- EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA BIOMASA DE PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

Inicialmente se lleva a cabo la extracción de lípidos de *Phaeodactylum tricornutum* obtenido mediante el procedimiento de Kates, (1988), modificado de Bligh & Dyer, (1959). La hidrólisis enzimática de este extracto con diversas lipasas muestra dificultades en el proceso, al menos en el análisis de los productos obtenidos (véanse apartados 2.6.2.2 y 2.6.4.1.2), debido a la complejidad del sustrato y a los disolventes utilizados en su extracción.

Para disminuir los problemas derivados de trabajar con estos extractos de *P. tricornutum* (aún existentes con el uso de hexano como disolvente) se efectuaron pruebas de tratamiento de los extractos con volúmenes equivalentes de disoluciones hidroetanólicas de diferente relación etanol/agua (20, 30, 40% v/v). De estas mezclas se separan dos fases, transfiriéndose la mayor parte de los pigmentos (más polares) a la fase hidroetanólica y quedando la mayor parte del extracto lipídico limpio disuelto en la fase hexánica.

Sin embargo, para que el extracto lipídico pueda ser utilizado como sustrato de partida para la hidrólisis enzimática, no sólo se considera importante poner a punto la purificación de los extractos lipídicos (retirada de no lípidos e insaponificables) sino que también la extracción de lípidos se haga mediante un procedimiento que evite la utilización de disolventes como cloroformo y metanol.

Para la extracción de lípidos a partir de biomasa liofilizada de *P. tricornutum*, se elige al etanol (96% v/v) como sistema extractivo (ensayado junto con otros sistemas extractivos por Molina Grima y cols., 1994, con biomasa de *Isochrysis galbana*). Se ha realizado una extracción sólido-líquido en un sistema monofásico, para, posteriormente, realizar una extracción líquido-líquido añadiendo agua y n-hexano para obtener un sistema bifásico y extraer los lípidos purificados en la fase hexánica.

2.2.1.- EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS CON ETANOL (96% v/v)

La biomasa de *P. tricornutum* de partida, es previamente liofilizada y molida según los diferentes lotes de donde iba proviniendo. Los diferentes lotes son

analizados por separado, y se les obtiene su correspondiente perfil lipídico. Aquellos lotes con mayor contenido en EPA, son seleccionados para ser utilizados y la biomasa es homogeneizada antes de someterse a extracción.

Para el ensayo tipo, se parte de 10 g de biomasa de *P. tricornutum* que se mezcla con un volumen determinado de disolvente extractante y se agita, a temperatura ambiente, durante un tiempo determinado. El disolvente extractivo empleado es alcohol etílico (96% v/v) PA (Panreac). Se filtra y retira el extracto. El residuo se lava o se extrae nuevamente, juntando finalmente los extractos.

Las variables a tener en cuenta son el volumen de disolvente extractivo, el lavado de la torta, las etapas de extracción, otros tipos de disolvente, el tiempo de extracción y la cinética de la misma.

2.2.1.1.- Volumen de disolvente: etapas extractivas

Se realizan una serie de experimentos estándar de extracción sólido líquido con etanol durante 24 horas (tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio) ensayándose diferentes volúmenes de etanol (50, 100, 150 y 200 ml) para determinar su eficacia. Se extraen muestras a las 5, 10 y 20 horas de agitación.

Si se alcanza el estado estacionario de transferencia de lípidos desde la biomasa al disolvente, se puede proceder a la recuperación del extracto tras la filtración de la misma mezcla. Si la biomasa, no resulta agotada en su contenido lipídico, puede volverse a poner en contacto con otro nuevo volumen de disolvente, y alcanzar otra nueva etapa de equilibrio. Esto puede repetirse tantas veces como merezca la pena hasta que se de por alcanzado el agotamiento lipídico de la biomasa.

2.2.1.2.- Influencia del tiempo: criterio de corte

Para parar cada etapa extractiva y poder dar lugar a la siguiente, es necesario un criterio de corte que dependerá del porcentaje de lípidos extraídos en el último periodo de tiempo empleado para la extracción (% / hora). A los volúmenes que dieron mejores resultados extractivos se les realiza un estudio cinético más profundo. Repitiendo los ensayos y tomando muestras en intervalos de tiempo más reducidos se puede determinar su curva de agotamiento y, a partir de ella, obtener su ecuación cinética correspondiente. Obteniéndose buenos coeficientes de correlación, a partir de esta ecuación, podrán predecirse, mediante extrapolación o interpolación, el

porcentaje de lípidos extraído en cada momento. De esta forma, podemos saber cuando la eficacia de la extracción (pendiente de la curva de agotamiento) es demasiado baja y fijar ese instante como el más adecuado para pararla y proceder a la siguiente etapa extractiva.

2.2.1.3.- Tipo y volumen de disolvente en la segunda etapa

Se prueban diferentes disolventes extractivos para esta segunda etapa (etanol, acetona, n-hexano y etanol/hexano 3:1 v/v) además del etanol, ya utilizado en la primera etapa. Para determinar el volumen de disolvente de la segunda etapa se realizan ensayos estándar de la primera etapa seguidos de una segunda etapa, y se extraen muestras cada cierto tiempo. El tiempo de la primera extracción es el definido por el criterio de corte de la misma. La segunda etapa debe dejarse tiempo suficiente para que llegue a su agotamiento.

2.2.1.4.- Cinética de la segunda etapa: criterio de corte

Una vez seleccionados los mejores volúmenes y tipos de disolvente a utilizar en la segunda etapa, se procede al estudio de la curva y ecuación cinética de los mismos. Para ello se repiten los ensayos que mejores resultados han dado, reduciendo el tiempo de la toma de muestras. Así, se determina su curva de agotamiento y, a partir de ella, se obtiene su ecuación cinética correspondiente. A partir de esta ecuación, podrán predecirse, mediante extrapolación o interpolación, el porcentaje de lípidos extraído en cada momento de esta segunda etapa y saber cuando la eficacia de la extracción (pendiente de la curva de agotamiento) es demasiado baja para fijar el momento más adecuado de su parada y proceder a la siguiente etapa extractiva.

2.2.1.5.- Número de etapas

Este procedimiento de etapas extractivas se repetirá tantas veces como sea necesario hasta que se de por alcanzado el agotamiento lipídico de la biomasa estudiando la evolución de los rendimientos de las sucesivas etapas a lo largo del tiempo hasta que el tiempo y esfuerzo empleado en el cambio de operación no sean rentables para el grado de agotamiento conseguido.

2.2.2.- PURIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS EXTRAÍDOS

La purificación de los componentes lipídicos extraídos se realiza por transferencia de los mismos a la fase hexánica de un sistema ternario bifásico generado al añadir agua Milli-Q (obtenida por doble ultrafiltración) y n-hexano a la disolución etanólica.

2.2.2.1.- Determinación del porcentaje de agua en el hidroalcohol

Contando con el agua ya presente en el sistema extractivo inicial, (4% del etanol), se ensayan adiciones de agua hasta completar un 20%, 30%...80% de la disolución hidroalcohólica.

En todos los casos, se mezclan con el n-hexano alícuotas del extracto etanólico (con su correspondiente agua añadida) en una proporción disolución hidroalcohólica/hexano 1:1 (v/v). La fase hexánica se separa y se evalúa por cromatografía gaseosa el rendimiento de la extracción líquido-líquido, expresado en términos de ácidos grasos presentes en el extracto hexánico, lípidos, con respecto a los presentes en la biomasa de partida.

Se ve conveniente comprobar una segunda etapa para estudiar el efecto de la aplicación en extracciones sucesivas de las mejores condiciones obtenidas para esta primera etapa.

2.2.2.2.- Curva de equilibrio y rendimientos teóricos por etapas

Fijando la concentración de agua en hidroalcohol para un intervalo amplio de relaciones de disolventes (hexano/hidroalcohol), podrá obtenerse una curva de equilibrio de distribución de los lípidos entre las dos fases líquidas.

A partir de esa curva de equilibrio, fijada una relación hexano/hidroalcohol, podrá predecirse el número de etapas teóricas necesarias para llegar a una concentración de lípidos en hidroalcohol o rendimiento extractivo determinado. Esta determinación puede realizarse a partir de los puntos de corte entre la curva de equilibrio y las sucesivas rectas de reparto. Las rectas de reparto se irán obteniendo a partir de la relación entre los volúmenes de disolventes (pendiente) y las sucesivas

concentraciones de lípidos retenidas en el hidroalcohol las cuales, en cada etapa, se irán reduciendo por agotamiento.

2.2.2.3.- Extracción en etapas de equilibrio

Para una concentración de agua en el hidroalcohol fija, se elige una relación hexano/hidroalcohol y se ensayan extracciones sucesivas hasta que la eficacia extractiva del n-hexano empleado sea despreciable (agotamiento del procedimiento).

Hay que recuperar la fase hidroalcohólica para someterla a una segunda etapa de extracción líquido-líquido y ésta debe quedar completamente separada de los restos de disolución de lípidos en la fase hexánica, por lo que las fases deben quedar lo más claramente definidas. Para facilitar la operatoria, será necesario partir de concentraciones mucho más diluidas que las empleadas en la curva.

Sin embargo, mediante este procedimiento podemos comprobar experimentalmente la fiabilidad del método de cálculo de etapas teóricas a partir de la curva de equilibrio. Esta comprobación nos determinará el grado de certeza y precisión del método teórico y así poder aplicarlo a disoluciones más concentradas (las procedentes directamente de la extracción sólido-líquido).

2.3.-EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

2.3.1.- OBTENCIÓN DE ACIDOS GRASOS LIBRES A PARTIR DE ACEITE DE HÍGADO DE BACALAO Y DE EPAX 4510TG.

El aceite EPAX4510TG y el aceite de hígado de bacalao se han utilizado para obtener extractos de ácidos grasos, con alto contenido en PUFAs n-3. Estos extractos se han obtenido mediante saponificación de los aceites y posterior extracción de sus ácidos grasos en medio ácido con n-hexano. (Robles Medina y cols., 1995a).

2.3.1.1.- Saponificación de aceites

La saponificación de los aceites se ha llevado a cabo en un reactor encamisado de 2,5 L de capacidad útil. 350 g de aceite y 700 ml de disolución hidroalcohólica de NaOH se agitan a 200 rpm y a una temperatura de 60°C, durante 30 min bajo atmósfera de argón. La disolución hidroalcohólica se ha preparado disolviendo 120 g de NaOH (Panreac, PA) y 1,25 g de EDTA (Panreac, PA) en 400 ml de agua Milli-Q y 400 ml de etanol (96% v/v, Panreac, PA). Terminada la saponificación se añaden 140 ml de agua y 275 ml de HCl del 35% (p/p, Panreac, PA) en pequeñas porciones y con agitación suave del medio, hasta pH entre 1 y 2.

2.3.1.2.- Extracción con n-hexano

Una vez finalizada la saponificación, los ácidos grasos libres se extraen en el mismo reactor. Para ello se añaden 875 ml de n-hexano (Panreac, PA) y la mezcla se agita durante 15 min. La mezcla se deja reposar hasta que se produce una separación nítida de las dos capas: la superior es la fase hexánica y contiene prácticamente todos los ácidos grasos libres y la inferior es la fase hidroalcohólica. Esta última fase, una vez separada, vuelve a ser sometida a extracción con 200 ml de n-hexano en un embudo de decantación para aumentar el rendimiento de la extracción de los ácidos grasos. Ambos extractos se unen, se lavan con agua destilada hasta neutralidad y se llevan a un volumen conocido, del cual se toman tres alícuotas para analizar la composición en ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (CG). El n-hexano se elimina por evaporación a vacío en un rotavapor y se evalúan los ácidos grasos obtenidos. La disolución de ácidos grasos se guarda en un frasco color topacio, se desplaza el aire con argón y se conserva a -20°C.

2.3.2.-OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL

También se han obtenido extractos de ácidos grasos con alto contenido en PUFAs n-3 a partir de la biomasa liofilizada de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Estos extractos se han obtenido mediante un proceso de tres etapas: a) saponificación directa de la biomasa microalgal; b) extracción de insaponificables y c) extracción de los ácidos grasos.

2.3.2.1.- Saponificación directa de la biomasa microalgal

El procedimiento seguido está basado en la optimización y escalamiento realizado por Ibáñez González y cols. (1998). 100 g de biomasa liofilizada se tratan con una disolución formada por 160 g de KOH (Panreac, PA) al 85% (p/p) (relación 1,6 g/g de biomasa) y 1400 ml de etanol al 96% (v/v) (relación 14 ml/g de biomasa). Se utiliza un reactor encamisado de 2,5 L, termostaticado a 60°C. El aire se desplaza con argón, se tapa el reactor y se agita durante 1 hora. El reactor se envuelve con papel de aluminio para proteger los ácidos grasos de la luz.

Una vez concluida la saponificación, la suspensión se filtra a vacío (filtro de porosidad 3). El residuo que queda en el filtro se lava con 2 litros de etanol (96%, v/v) uniéndose ambos filtrados. El proceso es lento debido a la torta acumulada en el filtro. Una vez concluido el filtrado y el lavado, se mide el volumen de la disolución alcohólica obtenido (V_{da}).

2.3.2.2.- Extracción de insaponificables

En la disolución hidroalcohólica anterior los ácidos grasos se encuentran disueltos en forma de sales potásicas (jabones). Entre otras impurezas, la más abundante son los lípidos insaponificables, carotenoides principalmente. Estos lípidos se extraen con n-hexano, quedando los jabones en la fase hidroalcohólica. Para ello, en primer lugar se adiciona agua hasta alcanzar un 40% p/p en agua de manera que la polaridad de la disolución hidroalcohólica aumente. De esta manera puede incrementarse el rendimiento de la extracción de carotenoides con n-hexano (Ibáñez González y cols., 1998).

La cantidad de agua a añadir depende del volumen de la disolución alcohólica (V_A) y se obtiene mediante la ecuación:

$$\frac{V_A \cdot \rho_A \cdot 0,04 + m_{H_2O}}{V_A \cdot \rho_A + m_{H_2O}} = 0,40 \quad [2.1]$$

donde ρ_A es la densidad del alcohol (0,789 g/ml) y m_{H_2O} la masa de agua a añadir.

La extracción con n-hexano se realiza en cinco etapas con una relación n-hexano/disolución hidroalcohólica de 0,37:1 (v/v) en cada etapa (Ibáñez González y cols., 1998).

Después de añadir el n-hexano, la mezcla se agita durante unos 20 minutos, se deja que ambas fases se separen por decantación y se retira la fase hexánica que contiene los carotenoides. Esta disolución se lleva al rotavapor donde se recupera gran parte del n-hexano. Finalizada la extracción se vuelve a medir el volumen de la disolución hidroalcohólica resultante.

2.3.2.3.- Extracción de los ácidos grasos

A la disolución hidroalcohólica que contiene las sales potásicas de los ácidos grasos y de la que se han extraído los carotenoides, se añade poco a poco HCl del 35%, con agitación constante, hasta que la disolución hidroalcohólica tenga un pH 1-3. De esta disolución los AGLs se extraen con n-hexano mediante un proceso de cuatro etapas, utilizando una relación n-hexano/disolución hidroalcohólica de 0,2 ml/ml en cada etapa (Ibáñez González y cols., 1998). El volumen de la disolución hidroalcohólica es el volumen de la disolución que procede de la etapa anterior (V_A más el agua añadida) más el volumen de ácido añadido y se opera de igual modo que en la extracción de carotenoides.

Los extractos de ácidos grasos libres se juntan y se concentran llevándolos hasta un volumen conocido para tomar alícuotas (tres habitualmente) y analizar su composición en ácidos grasos por cromatografía gaseosa. La disolución de ácidos grasos se guarda en un frasco color topacio, se desplaza el aire con argón y se conserva a -20°C.

Tanto la extracción de insaponificables como la de ácidos grasos se realizaron en un embudo de decantación de 1 litro de capacidad, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón para evitar la oxidación de los PUFAs.

2.4.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TRIGLICÉRIDOS

Puesto que el objetivo es la purificación de PUFAs, la hidrólisis de triglicéridos catalizada con lipasas se ha aplicado a tres sustratos: el EPAX4510TG, rico en EPA (40-45%), el aceite de hígado de bacalao (10-12% DHA, 8-10% EPA) y el aceite de onagra, rico en GLA (10-12%). Una vez obtenidas con estos aceites las condiciones experimentales óptimas, éstas se aplicarán a extractos lipídicos procedentes de *P. tricornutum*.

De esta forma, los pasos a seguir en este estudio han sido:

1. Reacciones de hidrólisis con diferentes lipasas en diferentes condiciones para la determinación de las condiciones de partida más adecuadas.
2. Hidrólisis de diferentes aceites y extractos lipídicos para la caracterización de las lipasas con el objetivo de elegir las más adecuadas.
3. Estudio de la reacción de hidrólisis de las lipasas más adecuadas para la elección de la lipasa más adecuada.
4. Obtención de las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática con esa enzima.
5. Estudio cinético de la reacción de hidrólisis con las lipasas más adecuadas.

La hidrólisis de extractos lipídicos tiene lugar en la forma



Los ensayos se llevaron a cabo de la siguiente manera: en un matraz erlenmeyer de 50 ml con tapón de rosca, se introducen cantidades variables (entre 100 y 2000 mg) de extracto lipídico y de agua Milli-Q, en una relación 1:1 p/p. Se realizaron experimentos añadiendo n-hexano (entre 5 y 10 ml) y sin disolvente. A continuación se le añade la lipasa (entre 5 y 50 mg) para iniciar la reacción. Se pone atmósfera de N₂, se cierra herméticamente el matraz y se coloca en un agitador orbital (Shaking Incubator SWB 20, Haake Mess-Tecnik GmbH u. Co., Germany), termostatzado a la

temperatura deseada, con agitación de 200 oscilaciones por minuto durante el tiempo de reacción preestablecido. La reacción se detiene añadiendo 6-8 ml de n-hexano y se agita para la disolución y homogeneización de la mezcla de reacción. Seguidamente, si la lipasa está inmovilizada, se retira la enzima filtrando a vacío en placa de vidrio de porosidad 4. Las impurezas y restos de agua se decantan en un embudo de decantación. El matraz se lava con 5-6 ml de n-hexano, se vuelve a filtrar a vacío y se lleva al embudo de decantación. La parte superior (95% del total) se extrae con una pipeta Pasteur. El embudo Büchner se lava con 5-6 ml de hexano y se vuelve a decantar junto con los restos de la primera decantación. Se vuelve a extraer la parte superior (95%) y todo el volumen extraído se enrasa hasta 25 ml. La mezcla de reacción (hidrolizado) se guarda en un frasco de color topacio, se cierra en atmósfera de argón y se almacena a -20°C.

Cuando se utilizan lipasas solubles en agua, estas no se separan por filtración y los extractos de los productos de reacción se pasan directamente al embudo de decantación. Si en el decantador se formase una emulsión estable en la interfase, se pueden añadir 1-2 ml de disolución saturada de NaCl y centrifugar para reducir las pérdidas. En este caso, la volumetría ya no sería un método fiable de evaluación del grado de hidrólisis conseguido.

En estos ensayos se han analizado las siguientes variables:

- Tipo de lipasa: En el estudio de la hidrólisis se ensayaron las lipasas expuestas en la tabla 2.8.
- Sustrato de partida: Se han utilizado los aceites de hígado de bacalao, onagra, aceite comercial de origen marino EPAX45TG y varios extractos de lípidos de *P. tricornutum* obtenidos por diferentes procedimientos.
- Cantidad de extracto: En los ensayos iniciales se utilizaron 2 g de extracto lipídico en cada prueba para los ensayos de hidrólisis sin disolvente. También se probó a disminuir la cantidad de extracto hasta 100 mg.

Tabla 2.8.- Lipasas empleadas en el estudio sobre la hidrólisis

LIPASA	ORGANISMO
Lipozyme IM	<i>Mucor miehei / Aspergillus oryzae</i>
D	<i>Rhizopus oryzae</i>
M	<i>Mucor javanicus</i>
AK ó EU-084c	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
QLM ex ó EU-032	<i>Alcaligines spp.</i>
EU-088	<i>Pseudomonas cepacia</i>
EU-034	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
EU-031	<i>Alcaliginese spp.</i>
OF ex, AYS ó EU-029c-old	<i>Candida rugosa</i>

- Disolvente: Se hacen ensayos de solubilidad de lípidos con diferentes disolventes: isooctano, metil ter-butyl éter, éter de petróleo, triclorometano, tolueno y diclorometano, todos ellos de calidad PA (Panreac). De entre todos ellos se seleccionó el n-hexano (ver apartado 3.1.1.1) intentando utilizar la mayor cantidad posible que afectara poco al resultado de la hidrólisis (5-10 ml de n-hexano en ensayos con 100 mg de aceite). También se realizan ensayos con mayores cantidades de aceite.
- Temperatura: Se buscó una temperatura única de trabajo que estuviera comprendida dentro del intervalo óptimo de las diferentes enzimas a utilizar. Se eligió 37 ° C por ser la temperatura media corporal en los mamíferos. Una vez seleccionada la lipasa a utilizar para la hidrólisis de los aceites, se ensayaron también las temperaturas de 40 y 45 °C para optimizar la operación con esta lipasa.
- Relación aceite/agua: Inicialmente se utilizó una relación de 1:1 g aceite /g agua y más adelante, una vez seleccionada la lipasa más efectiva, se ensayaron las relaciones 1:2 y 1:3, para intentar aumentar una mayor conversión en el equilibrio.
- Cantidad de lipasa: Se ensayaron varias cantidades de las diferentes lipasas entre 5 y 50 mg.

- Tiempo de hidrólisis: Se hicieron pruebas a 1, 2, 23, 24, 48, 100 y 150 horas.

Se comprueba experimentalmente que el efecto de la cantidad de lipasa y el tiempo de incubación sobre el grado de hidrólisis es el mismo por lo que se estudian conjuntamente agrupándolos en un factor único. Se define la intensidad de tratamiento como el producto de ambos factores.

2.5.- REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN

Para acometer la esterificación se debe partir de un extracto de AGLs. Éstos pueden obtenerse bien por saponificación alcalina, o bien mediante una hidrólisis enzimática (selectiva o no). Así, para iniciar los experimentos de esterificación enzimática, se utilizaron extractos de AGLs obtenidos mediante saponificación alcalina. Este procedimiento ya ha sido puesto a punto en nuestro laboratorio (Carsten y cols., 1996; Molina Grima y cols., 1996; Robles Medina y cols., 1998; Ibáñez González y cols., 1998) (apartado 2.3). En trabajos anteriores se han conseguido esterificaciones con altos rendimientos, que fueron independientes de que los ácidos grasos procedieran de aceites marinos o de microalgas (Esteban Cerdán y cols., 1998; Robles Medina y cols., 1999).

Por tanto, dado que el objetivo es la purificación de EPA, se ha partido de dos aceites: el EPAX4510TG, que tiene un 40-45% de EPA, y el aceite de hígado de bacalao con un 10-12% de DHA y un 8-10% de EPA (véanse tablas 2.2 - 2.4). Una vez que se obtuvieron las condiciones experimentales óptimas con estos aceites, se aplicaron a extractos de ácidos grasos procedentes de *P. tricornutum*.

De esta forma, los pasos a seguir en este estudio fueron:

1. Obtención de los extractos de ácidos grasos por saponificación alcalina.
2. Ensayo de las lipasas preseleccionadas en unas condiciones preestablecidas y elección de las lipasas más adecuadas.
3. Ensayo de las lipasas más adecuadas en cuanto a su comportamiento en la esterificación en diferentes condiciones y elección de la más adecuada.
4. Optimización de las condiciones de esterificación con la lipasa seleccionada.
5. Estudio cinético de la esterificación con esta lipasa.
6. Aplicación de las condiciones obtenidas a la purificación de EPA a partir de extractos de ácidos grasos procedentes de *P. tricornutum*.

La esterificación de ácidos grasos libres tiene lugar en la forma



Un ensayo típico se lleva a cabo de la siguiente manera: en un matraz erlenmeyer de 50 ml con tapón de rosca se introducen cantidades variables (entre 178 y 1780 mg) de extracto de ácidos grasos libres con alcohol (etanol 96% v/v o alcohol láurico) en una relación 1:2 mol/mol (entre 222 y 2220 mg, respectivamente). En algunos ensayos se han añadido cantidades variables de agua Milli-Q (entre 0,1 y 0,2 ml) y n-hexano (entre 4 y 10 ml). Finalmente se añade la lipasa a ensayar. El matraz se cierra herméticamente en atmósfera de N₂ y se coloca en el agitador orbital termostatzado a una temperatura determinada (Shaking Incubator SWB 20, Haake Mess-Tecnik GmbH u. Co., Germany). Esta mezcla se agita a 400 r.p.m. durante el tiempo de reacción preestablecido.

La reacción se detiene añadiendo 6-8 ml de hexano y se agita para disolver y homogeneizar la mezcla de reacción. Seguidamente, se filtra a vacío en placa de vidrio de porosidad 4 para retirar la enzima y las impurezas; los restos de agua se separan en un embudo de decantación. El matraz se lava con 5-6 ml de hexano, se vuelve a filtrar a vacío en una placa de vidrio de porosidad 4 y se lleva al embudo de decantación. La parte superior (95%) se extrae con una pipeta Pasteur. El embudo Büchner se lava con 5-6 ml de hexano y se vuelve a decantar junto con los restos de la primera decantación (5%). Se vuelve a extraer la parte superior (95%) y todo el volumen extraído se enrasa hasta 25 ml. La mezcla de reacción se recoge en un frasco de color topacio, se cierra con atmósfera de argón y se almacena a -20°C.

En estos ensayos se han analizado las siguientes variables:

- Tipo de lipasa: Las lipasas que se han ensayado en este estudio de la esterificación selectiva se seleccionaron teniendo en cuenta la experiencia previa y la revisión bibliográfica realizada. Las lipasas seleccionadas fueron las expuestas en la tabla 2.9.

Tabla 2.9.- Lipasas empleadas en el estudio sobre la esterificación selectiva

LIPASA	ORGANISMO
Lipozyme IM	<i>Mucor miehei</i> / <i>Aspergillus oryzae</i>
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i> / <i>Aspergillus oryzae</i>
D	<i>Rhizopus oryzae</i>
M	<i>Mucor javanicus</i>
AK ó EU-084c	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
EU-034	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
QLM ex ó EU-032	<i>Alcaligines spp.</i>
OF ex, AYS ó EU-029c-old	<i>Candida rugosa</i>
EU-093	<i>Rhizopus delemar</i>

- Sustrato de partida: Como sustratos se han utilizado los extractos de ácidos grasos de aceite hígado de bacalao y del aceite comercial de origen marino EPAX4510TG.
- Cantidad de extracto de AGLs: Aunque los primeros ensayos se basaron en los experimentos de Shimada y cols. (1997b), utilizando 4 g de extracto para cada prueba, para el resto se disminuyó la cantidad hasta 400 mg.
- Tipo de alcohol: Se han ensayado etanol 96% v/v (PA, Panreac) y alcohol láurico (PA, Panreac).
- Tipo de inmovilización: La mayor parte de las enzimas ensayadas son suministradas sin inmovilizar. Se han inmovilizado las lipasas AK de *Pseudomonas fluorescens*, D de *Rhizopus oryzae* y EU-093 de *Rhizopus delemar*. Esta inmovilización se ha hecho por dos métodos diferentes, basados ambos en el método propuesto por Soumanou y cols. (1998). Se modificó la cantidad de soporte utilizado para la inmovilización, que (tal y como se describe en el apartado 2.1.3) osciló entre 1,5 y 4 veces el peso de enzima a inmovilizar.
- Cantidad de agua: El comportamiento de las diferentes enzimas se ha ensayado en ausencia de agua y añadiendo distintas cantidades de la misma al inicio de la reacción (además de la contenida en el alcohol). Estas

cantidades han oscilado entre 0,1 y 0,2 ml de agua por cada 40 mg de lipasa. En el estudio del comportamiento de las lipasas más interesantes en diferentes condiciones de operación se ensayan en ausencia de agua y añadiendo 0,1 ml de agua por cada ensayo. En la optimización de las condiciones de la lipasa seleccionada se ensaya en ausencia de agua así como añadiendo cantidades que oscilan entre 0,1 y 0,2 ml de agua por cada 40 mg de lipasa.

- Cantidad de disolvente: La lipasa más interesante se ha ensayado tanto en ausencia de disolvente como con volúmenes de hexano de 4, 10 y 20 ml.
- Temperatura: Se eligen las temperaturas de 40°C y 55°C comprendidas dentro del intervalo óptimo de actuación de las lipasas a comparar. Una vez seleccionada la lipasa, se probará a menor temperatura (30°C).
- Estequiometría de los sustratos: Se ha utilizado una relación estequiométrica fijada en 1:2 mol ácidos grasos libres /mol alcohol, una vez seleccionada la lipasa más efectiva, se prueban otras relaciones (1:1, 1:3 y 1:4).
- Cantidad de lipasa (m_L): Se han ensayado distintas cantidades, que oscilan entre 2,5 y 400 mg.
- Tiempo de esterificación (t): Se ha hecho pruebas a 24 y 48 horas.

De la misma manera que para la hidrólisis, se comprueba experimentalmente que el efecto de la cantidad de lipasa y el tiempo de incubación sobre el grado de esterificación es el mismo por lo que se pueden estudiar conjuntamente con la intensidad de tratamiento.

2.6.- MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1.- DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La determinación cuantitativa y cualitativa de los ácidos grasos libres y de los que se encuentran esterificando la glicerina en los glicéridos obtenidos, se llevó a cabo mediante la transformación de todos ellos en ésteres metílicos y su posterior análisis por cromatografía de gases.

2.6.1.1.- Metilación de las muestras

Los ácidos grasos presentes en las diversas alícuotas son analizados como ésteres metílicos siguiendo el método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roy (1984), modificado por García-Sánchez y cols. (1993) y posteriormente por Rodríguez-Ruiz y cols. (1998).

La metodología seguida es la siguiente:

En un tubo de vidrio de cierre hermético deben introducirse aproximadamente 1 mg de muestra. Para el análisis de los aceites y los extractos hexánicos de ácidos grasos (procedentes del aceite de hígado de bacalao, del EPAX4510TG o de la biomasa de *P. tricornutum*) las alícuotas tomadas deben ajustarse a una concentración aproximada de 1 mg/ml, para tomarse muestras de 1 ml.

- A estas muestras se añaden:
 - o 1 ml de mezcla metilante, que está formada por metanol (Panreac, PA) y cloruro de acetilo (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) en la relación 10:0.5 (v/v). La mezcla es muy exotérmica, por lo que el cloruro de acetilo debe añadirse con precaución sobre el metanol. En el caso de que la muestra proceda del raspado de una capa fina se añadirán 2 ml de esta mezcla metilante para asegurar la eficacia de la transmetilación.
 - o 10 µl de patrón interno; como patrón se utiliza el ácido nonadecanoico, 19:0 (Sigma Aldrich, St. Louis Mo, USA), que debido a su número impar de átomos de carbono no debe encontrarse en los glicéridos naturales; su disolución se prepara disolviendo 25 mg de ácido nonadecanoico con 2 ml

de hexano (Panreac, PA). Aunque el patrón es algo más soluble en tolueno, el hexano presenta como ventaja tener una menor volatilidad, lo que permite conservar mejor el valor de la concentración de la disolución patrón en los sucesivos análisis.

- 1 ml de n-hexano (Panreac, HPLC), para formar una fase hexánica extractiva de los ésteres metílicos, en caso de no venir ya incluido en la muestra.
- La mezcla de reacción se calienta a 100°C durante 30 minutos en un termostato de bloque metálico modelo Multiplaces (Selecta) agitándolo en un agitador de tubos aproximadamente cada 10 minutos.
- Una vez finalizada la reacción, se deja que los tubos alcancen la temperatura ambiente y posteriormente se introduce en el frigorífico, para asegurar que la volatilización del n-hexano al abrir posteriormente los tubos sea mínima.
- Una vez abierto el tubo, se añade a la mezcla 1 ml de agua destilada. Se agita intensamente en un agitador de tubos; en ese momento deben observarse claramente las dos fases formadas; se separa la capa superior, hexánica, que contenía los ésteres metílicos, empleando para ello una pipeta Pasteur. En el caso de que la muestra proceda del raspado de una capa fina es necesario centrifugar (3500 rpm durante 3,5 min) antes de la separación para que el gel de sílice de la capa fina se deposite en el fondo del tubo.

Para el análisis de la biomasa liofilizada se pesa la cantidad estimada de la misma que contenga aproximadamente un miligramo de ácidos grasos (entre 9 y 10 mg para *P. tricornutum*), se añade el hexano, el patrón y la mezcla metilante, se cierra y se lleva a un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación se realiza la metilación por el procedimiento descrito anteriormente. Para la extracción con hexano de los ésteres metílicos también se centrifugará durante 3 minutos a 3500 rpm.

El aspecto de las raspaduras o la muestra y del extracto obtenido indicará la conveniencia o no de realizar alguna extracción más para arrastrar los ésteres que puedan quedar aún retenidos en el gel de sílice.

El extracto obtenido se pasa mediante una pipeta Pasteur a un vial de 2 ml de capacidad, de 32 x 11 mm, provisto de un septum para cerrarlo herméticamente. El vial se coloca en el inyector automático del cromatógrafo quedando la muestra preparada para su análisis.

2.6.1.2.- Análisis en el cromatógrafo de gases

El análisis se ha hecho en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Avondale, PA) cuyos componentes son:

- *Sistema de suministro de gases:* Consiste en tres botellas de gases a presión de N₂, H₂ y aire sintético, todos ellos de elevada pureza (99,999%). Cada botella tiene un manorreductor que permite regular el caudal de cada uno de los gases. El nitrógeno es el gas portador y su caudal se divide en cuatro partes: fase móvil de la columna, venteo (limpia la entrada del inyector de impurezas de la muestra anterior), relación de división de flujo (divide la cantidad de muestra antes de entrar a la columna) y gas auxiliar (referencia del detector). Tanto el H₂ como el aire van directos al detector y se utilizan para encender la llama.
- *Inyector automático:* está formado por dos módulos, el controlador HP G1512A configurado para comunicarse con el programa, y el inyector HP 18593B (6890 Series), que toma parte de la muestra del vial (2 µL) y la introduce en la entrada del cromatógrafo de gases. Este inyector está formado por una jeringa, un soporte de la jeringa y una bandeja giratoria con cuatro posiciones centrales (vial de la muestra, dos viales de disolvente y uno de residuo) y ocho posiciones de reserva donde se colocan diferentes viales que se irán inyectando cuando se realice una secuencia (se crea una secuencia cuando se va a inyectar más de un vial).
- *Sistema de introducción de muestra:* Se realiza a través de un septum de caucho en el que se introduce la aguja de la jeringa que contiene la muestra. La muestra llega a una cámara de vidrio rodeada por un bloque metálico de temperatura regulable, donde se evapora. En el interior de la cámara hay un filtro de lana de vidrio que retiene impurezas sólidas no evaporadas. El nitrógeno arrastra la muestra y a continuación el flujo se divide en dos partes muy desiguales, la mayor va al desecho, mientras que la menor pasa a la

columna. La relación de división de flujo que se utiliza es 1:100. La inyección de la muestra se realiza de forma automática.

- *Sistema de termostatación:* El horno controla la temperatura de la columna, del sistema de introducción de muestras y del detector.
- *Columna:* Es donde se produce la separación de los ésteres metílicos, debido a las diferencias de volatilidad y solubilidad de los solutos. La fase móvil es nitrógeno de alta pureza y la fase estacionaria es un líquido, polietilen-glicol, unido a una silicona fenólica. Se utiliza una columna capilar de sílice Omegawax™ (Supelco, Bellefonte, PA, USA), de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno con 0,20 µm de espesor de película de fase estacionaria de alta porosidad SP-2-4136.
- *Detector:* Es un detector de ionización de llama (FID). Está basado en la relación directa que existe entre la conductividad eléctrica de un gas y la concentración de partículas cargadas que existen en el mismo. Lo forma un sistema de electrodos, el negativo en la base de la llama y el positivo rodeándola. La llama es provocada por la combustión del hidrógeno con aire y en ella se produce la ionización de las moléculas orgánicas.
- *Programa HP ChemStation Plus Family Rev. A.06.03 [509]:* Está instalado en un ordenador. El programa controla el cromatógrafo de gases y el inyector automático. Adquiere los datos y realiza un análisis cualitativo y cuantitativo de los cromatogramas.

Las condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases han sido:

Flujo de nitrógeno

Gas portador: 1 cm³ /min.

Gas auxiliar: 35 cm³ /min.

Venteo (purga del septum): 4,5 cm³ /min.

Relación de división de flujo: 1:100

Flujo de hidrógeno: 30 cm³ /min.

Flujo de aire: 300 cm³ / min.

Presión de la cabeza de la columna: 20 psi.

Para obtener una buena separación de los ésteres metílicos presentes en la muestra es necesario trabajar con gradiente de temperatura. En nuestro caso, debido a la gran variedad de ácidos grasos presentes en las muestras (diferencias en el número de carbonos y de insaturaciones), el rango de temperaturas o diferencia entre las temperaturas inicial y final es bastante amplio (90°C). Después de ensayar diferentes métodos se escogió aquel que permitió una perfecta resolución de los picos en un tiempo de análisis mínimo. El programa de temperaturas para el horno, el inyector y el detector es la siguiente:

Programa de temperatura:

Horno:

Temperatura inicial: 150°C.

Tiempo inicial: 3 min.

Rampa: 10°C/min.

Temperatura final: 240°C.

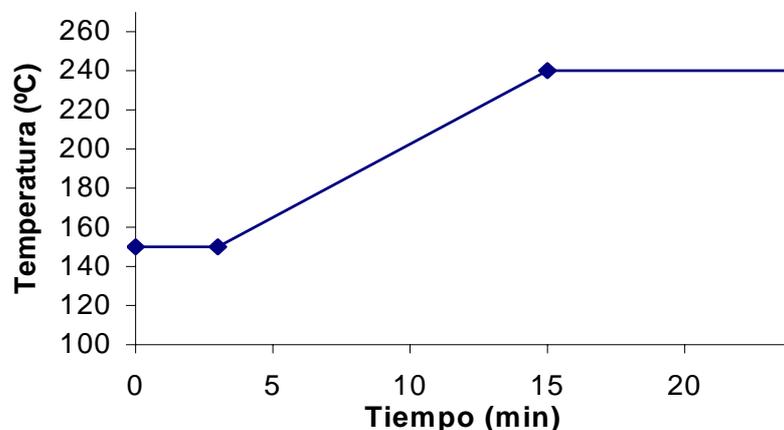
Tiempo: 12 min.

Temperatura del inyector: 240°C.

Temperatura del detector: 260°C.

Este programa de temperaturas se muestra en la figura 2.1, donde se observa que la duración total de un análisis fue de 24,8 min.

Figura 2.1. Programa de temperaturas del horno del cromatógrafo de gases para el análisis de ácidos grasos.



2.6.1.3.- Análisis de cromatogramas

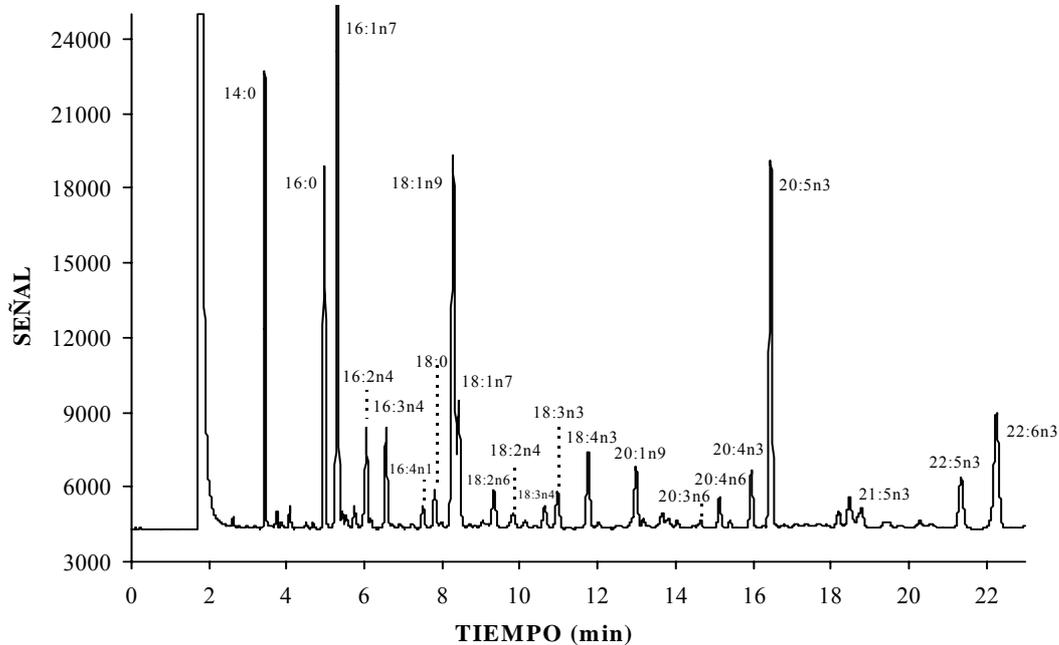
Este análisis nos permite conocer el perfil cualitativo y cuantitativo de los ésteres y, por tanto, de los ácidos grasos presentes en la muestra.

a) Análisis cualitativo

El análisis cualitativo de los ácidos grasos se realizó comparando los tiempos de retención de los ácidos grasos en los cromatogramas correspondientes a los productos de las reacciones, con los de la mezcla patrón PUFAs n-3, número de catálogo 1177, de Matreya (Pleasant Gap, PA, EEUU). Esta mezcla patrón está formada por los siguientes ácidos grasos: 14:0, 16:0, 16:1n7, 16:2n4, 16:3n4, 16:4n1, 18:0, 18:1n9, 18:1n7, 18:2n6, 18:3n3, 18:4n3 (ácido estearidónico, SA), 20:1n9, 20:3n6, 20:4n6 (ácido araquidónico, AA), 20:4n3, 20:5n3 (ácido eicosapentaenoico, EPA), 21:5n3, 22:5n3 y 22:6n3 (ácido docosahexaenoico, DHA) (Véase figura 2.2). Además se identificó el 22:1n9 entre el EPA y el 21:5n3. Los picos correspondientes a ésteres poco habituales para los que no se dispone de patrón de referencia se agrupan bajo la denominación “Otros”.

Los ácidos grasos que se tienen en cuenta variarán según los ácidos grasos mayoritarios que presente el aceite empleado. Serán aquellos que marcan un valor detectado superior al 1% en el análisis del aceite de partida.

Figura 2.2.- Cromatograma de gases correspondiente al patrón de ácidos grasos de Matreya (Pleasant Gap, PA, EEUU), utilizado para la identificación o análisis cualitativo de los ácidos grasos.



b) Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo se realizó generalmente utilizando el ácido nonadecanoico (19:0) como patrón interno. Como ya se ha indicado, cada muestra contiene 10 μ L de disolución del patrón (0,125 mg de 19:0).

La respuesta del cromatógrafo de gases a los distintos ácidos grasos (AG) puede ser distinta según la naturaleza de éstos. Por ello se define un factor de respuesta, f_x , para cada ácido graso. Tal y como se comprueba en trabajos previos (Camacho Páez, 2000), algunos ácidos grasos de cadena corta como el ácido caprílico o el cáprico presentan un factor de respuesta muy diferente, debido probablemente a la gran diferencia de peso molecular con el patrón.

Sin embargo, dado que ni el caprílico ni el cáprico se encuentran en los aceites que se analizan en este trabajo (los ácidos grasos analizados pues son mayoritariamente de cadena media y larga, no muy diferente a la del patrón de referencia), con fines prácticos, se puede considerar que la respuesta del detector es

aproximadamente la misma para todos los ácidos grasos. De esta manera, el factor de respuesta será considerado igual a la unidad para todos los ácidos grasos de nuestros análisis.

La cantidad de cada uno de los ácidos grasos, expresada en mg, viene dada por la ecuación:

$$\text{Acido graso}_x \text{ (mg)} = 0,125 \frac{\text{Area}_x}{\text{Area}_{PI}} \quad [2.2]$$

siendo 0,125 la cantidad en mg de patrón interno (19:0) añadido a la muestra.

Para la determinación de la composición de ácidos grasos de la muestra se establece la proporción correspondiente entre el área de un éster de un ácido graso determinado y la suma de las áreas del resto de los ésteres exceptuado el patrón. Obtenemos así el porcentaje de dicho éster (ácido graso) en la muestra analizada (AG_i, %).

$$\text{AG}_i = \frac{\text{Área del éster del ácido graso } i}{\text{Área total de los ésteres (salvo patrón)}} 100 \quad [2.3]$$

La cantidad global de ácidos grasos en el cromatograma se calcula como suma de cada uno de los ácidos grasos (exceptuando al patrón).

2.6.2.- SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Las reacciones de esterificación dan lugar a una mezcla de ésteres etílicos o láuricos y ácidos grasos libres sin esterificar, y las reacciones de hidrólisis originan mezclas de glicéridos (monoglicéridos, 1,2-diglicéridos, 1,3-diglicéridos y triglicéridos) y ácidos grasos libres. La separación de todos estos componentes se realiza mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCF).

2.6.2.1.- Productos derivados de aceites comerciales

Para esta separación se utilizan placas de gel de sílice de 20 x 20 cm (Precoated TLC Plates, SIL G-25; Macherey-Nagel, Aldrich, Alemania). El espesor de la capa es 250 μm , el tamaño medio de partícula 2-25 μm y el tamaño medio de poro 60-80 Å.

Como fase móvil se emplea habitualmente una mezcla de cloroformo/acetona/metanol en relación 95:4,5:0,5 v/v/v que permite obtener una buena separación de los DG(1,2) y los DG(1,3).

El procedimiento se inicia activando directamente las placas por calentamiento a 105°C durante 30 minutos y, a continuación, se marcan en la placa los límites de los caminos por los que van a ascender las diferentes muestras mediante líneas grabadas en la sílica con un doble rayado vertical de 1 mm de espesor. Cuando la placa se ha enfriado en el interior de una cubeta, con atmósfera deshidratada mediante gel de sílice (3-6 mm) con indicador de CoCl_2 , se deposita con una micro-jeringa una alícuota de la muestra directamente sobre una línea colocada a 1,5 cm del borde inferior de la placa. Se forma así una banda estrecha de muestras de longitud variable según el número de muestras analizadas en la misma placa (unos 3,8 cm cuando se analizan 5 muestras). La carga aproximada de cada banda debía ser de 2 mg aproximadamente para que las manchas fuesen visibles y no se solapasen. Frecuentemente el volumen en el que se encontraba esta masa será demasiado grande, por lo que era necesario concentrar la muestra eliminando parte del disolvente mediante una corriente de N_2 . Si es necesario depositar varias capas de muestra en una misma banda, entre cada capa depositada se secará con nitrógeno.

La placa cargada se llevará a la cámara de desarrollo, que ha sido previamente equilibrada con la fase móvil (se ha saturado de disolvente para que las fases líquida y gaseosa se encuentren en equilibrio). Para ello se introducirá el disolvente (unos 100 ml) en la cámara una hora antes de colocar la placa y las paredes se recubren con papel de filtro para favorecer el proceso. La placa se colocará con ligera inclinación cuidando que la línea de depósito de muestras esté claramente por encima del nivel de la fase móvil. El desarrollo se producirá por capilaridad vertical ascendente. Este desarrollo se interrumpirá cuando el frente de fase móvil se encuentra a 1 cm del

borde superior (unos 45 minutos). Se saca la placa de la cámara, se seca primero al aire y, posteriormente, pulverizando nitrógeno.

Para el “revelado” de la placa (localización de la situación de los solutos) se ensayan tres procedimientos: 1) con vapores de yodo, utilizando una pipeta Pasteur con lana de vidrio y yodo resublimado, a través de la que se hace pasar una corriente de nitrógeno que se dirigía sobre la placa, lo que permitía poner en contacto la placa con vapores de yodo; 2) pulverizando la placa (spray) con una disolución de ácido fosfomolibdico en etanol (10% pt/v) y calentamiento hasta la visualización de las bandas; 3) se utiliza una placa impregnada con indicador fluorescente y se observa bajo radiación UV (254 nm). Así se visualizan las diferentes manchas (bandas). Las bandas se observan bien con los tres procedimientos por lo que el procedimiento habitual utilizado fue el de los vapores de yodo debido a su mayor sencillez.

Así, el yodo se fija a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, dando lugar a un producto coloreado, que determina la aparición de manchas en las posiciones de la placa a las que se han transferido los diferentes productos de reacción. Estas manchas determinaban la parte de gel de sílice que se raspa para su posterior análisis por cromatografía gaseosa. El inconveniente de este tipo de revelado es que los glicéridos, ésteres y ácidos grasos libres que sólo tengan ácidos grasos saturados no se revelan, pero suelen estos compuestos estar con los correspondientes compuestos que sí presentan ácidos grasos insaturados, por lo que normalmente también son analizados.

La posición de cada banda viene caracterizada por el llamado **factor de retraso** (R_F) que se define como la relación entre la distancia recorrida por el soluto y la distancia recorrida por la fase móvil.

Este factor es característico de cada soluto para un sistema cromatográfico dado y depende fundamentalmente de la fase móvil utilizada.

Con la fase móvil utilizada mayoritariamente (cloroformo/acetona/metanol 95:4,5:0,5 (v/v/v)) se obtienen cinco bandas que, de menor a mayor R_F , corresponden a: monoglicéridos (MG $R_F=0,12$), ácidos grasos libres (AGL $R_F=0,33$), 1,2-diglicéridos (1,2-DG $R_F=0,49$), 1,3-diglicéridos (1,3-DG $R_F=0,59$) y triglicéridos (TG $R_F=0,82$) más ésteres etílicos o láuricos (EE o EL). En la tabla 2.10 se muestran los factores de retraso medios obtenidos en este trabajo de estos productos.

Tabla 2.10.- Factores de retraso (R_F) de los productos de la reacción de esterificación separados por cromatografía en capa fina.

Fracción lipídica	Factor de retraso, R_F
Monoglicéridos, MG	0,12
Ácidos grasos libres, AGL	0,33
Diglicéridos (1,2), DG(1,2)	0,49
Diglicéridos (1,3), DG(1,3)	0,59
Triglicéridos, TG	0,82

Fase móvil: cloroformo/acetona/metanol, 95:4,5:0,5, v/v/v

Los patrones de referencia utilizados para la identificación de MG, DG, TG y ácidos grasos libres (AGL) se muestran en la tabla 2.11.

Tabla 2.11.- Patrones (Sigma) para la identificación de lípidos y ácidos grasos por cromatografía en capa fina.

Especie a identificar	Sustancia patrón	Código
MG	Monostearoyl-rac-glycerol (C18:0)	
	1-Monooleoyl-rac-glycerol (C18:1, [cis]-9)	M-7765
DG	1,2-dioleoyl-sn-glycerol (C18:1, [cis]-9)	D-2037
	1,3-diolein (C18:1, [cis]-9)	D-3627
	Triolein (C18:1, [cis]-9)	
TG	1,2,3-tri[cis-9-octadecenoyl] glycerol	T7140
	Triarachidonin (C20:4; 5,8,11,14)	
AGL	Oleic acid free acid ([cis]-9-octadecenoic acid)	O-1008
	Arachidonic acid (5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)	A-9673
	Linolenic acid (9,12,15-octadecatrienoic acid)	L-2376
	Linoleic acid (cis-9, cis-12-octadecadienoic acid)	L-1376
	Eicosapentanoic acid (cis-5,8,11,14,17), EPA	E-2011
	Docosahexaenoic acid (cis-4,7,10,13,16,19), DHA	D-3785

En los casos en que se pretendió distinguir los triglicéridos de los ésteres etílicos se utilizó como fase móvil éter de petróleo/éter dietílico/ácido acético 90:10:1 (v/v/v) con un tiempo de desarrollo mayor.

En caso de buscar una cuantificación de las manchas, se marcará el contorno de cada mancha y se raspará. Las raspaduras obtenidas de cada banda en la placa son traspasadas a tubos de ensayo independientes con tapón de rosca.

Los ácidos grasos presentes en las diversas fracciones son transformados a ésteres metílicos mediante el método de transesterificación directa descrito anteriormente y analizados por cromatografía de gases.

El análisis de los cromatogramas según el procedimiento descrito dará el perfil en ácidos grasos, la masa de cada uno de ellos y la masa total de ácidos grasos presentes en la muestra.

La cuantificación de los cromatogramas correspondientes a las cinco posibles bandas obtenidas para cada muestra en el caso de la hidrólisis, o las dos manchas obtenidas en el caso de la esterificación, permite la determinación del rendimiento de las reacciones (R, %), y del porcentaje de cada tipo de glicérido en la mezcla (%MG, %DG, %TG, etc.)

$$R = \frac{\text{Masa total de AG en el cromatograma de la fracción formada}}{\text{Masa total de ácidos grasos en todos los cromatogramas}} 100 \quad [2.4]$$

$$\text{Tipo Glicérido} = \frac{\text{Masa de ácidos grasos en el cromatograma del tipo de glicérido}}{\text{Masa total de AG en todos los cromatogramas de glicéridos}} 100 \quad [2.5]$$

así, por ejemplo, el porcentaje de TG vendrá dado por

$$TG = \frac{\text{Masa de ácidos grasos en el cromatograma de triglicéridos}}{\text{Masa total de AG en todos los cromatogramas de glicéridos}} 100 \quad [2.6]$$

Cuando no sea relevante la determinación de las diferencias de composiciones y proporciones de los MG, 1,2-DG, 1,3-DG podrán englobarse las tres fracciones en

una sola bajo el nombre de glicéridos parciales (PG). En este caso, se unían sus raspaduras y eran analizadas en conjunto.

Para los casos en los que no sea necesario una cuantificación de las manchas ni el conocimiento de su perfil lipídico (CCF cualitativa), se utilizan otras placas de gel de sílice de 5 x 10 cm (Precoated TLC Plates, SIL G-25; Macherey-Nagel, Aldrich) con un espesor de capa de sólo 50 µm aunque con un tamaño medio de partícula y de poro similares a las placas de CCF cuantitativa. El procedimiento era similar aunque se deposita menos cantidad de muestra (aproximadamente 1 mg por placa) y no se raspan las manchas que aparecen en el revelado.

2.6.2.2.- Productos derivados de extractos de *P. tricornutum*

Como se ha dicho anteriormente, los extractos lipídicos de *P. tricornutum* presentan una naturaleza muy complicada y están acompañados de pigmentaciones muy acusadas. Todo esto ocasiona numerosas dificultades analíticas.

La primera dificultad se deriva de la variedad del tipo de disolvente en que esos extractos están disueltos (cloroformo, metanol, etanol, hexano, etc.), lo que influye sobre los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina. Al analizar estos extractos directamente se observan más de 11 bandas pigmentadas de límites poco definidos, que no pueden analizarse por cromatografía gaseosa. Para solucionar estos problemas, el disolvente en el que venían disueltos los extractos se evapora y se vuelven a disolver en hexano. Parte de los extractos no se pueden disolver en el hexano, quedando un residuo pegado al fondo de los tubos de ensayo, con abundancia de pigmentos. Este residuo se analizó por separado y se comprobó que mantenía un perfil lipídico similar al del resto del extracto, por lo que se decidió despreciarlo.

Posteriormente, en el desarrollo de las placas, puede quedar una banda pigmentada en el lugar de la placa donde las muestras son depositadas. Tras su análisis se comprobó que su perfil era similar al del resto del extracto, por lo que también se procedió a despreciarlo.

Mediante la redisolución en hexano, se evitan muchas interferencias y la eliminación de una buena parte de las bandas pigmentadas que aparecen si los extractos se analizan directamente, reduciéndose el número de bandas a 8, que son

menos coloreadas. En la tabla 2.12 se muestra la caracterización media del extracto de partida, tras evaporar el cloroformo y volverlo a disolver en hexano para su análisis.

Tabla 2.12.- Perfiles en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) de las diferentes fracciones lipídicas (obtenidas por CCF) del extracto lipídico de *P. tricornutum* obtenido con cloroformo-metanol. Se evapora el disolvente y se vuelve a disolver en hexano para su análisis.

ÁCIDOS GRASOS	EPT	Cromatografía en capa fina							
		1	2	3	4	5	6	7	8
10:0	1,2	75,1	100,0	4,4	43,8	74,0	8,7	100,0	31,0
12:0	2,1	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14:0	7,6	0,0	0,0	13,8	4,3	0,0	2,4	0,0	11,5
16:0	12,0	9,6	0,0	17,4	12,8	0,0	0,0	0,0	15,7
16:1n7	15,7	0,0	0,0	24,0	11,4	0,0	11,2	0,0	23,0
16:2n4	5,1	0,0	0,0	5,1	4,8	26,0	3,7	0,0	3,9
16:3n4	6,9	0,0	0,0	4,8	23,0	0,0	2,4	0,0	0,0
16:4n1	1,8	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	0,6	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1n9	1,4	0,0	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1n7	0,9	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2n6	2,6	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3n3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4n3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4n6	2,7	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4n3	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n3 (EPA)	25,7	15,3	0,0	12,7	0,0	0,0	16,3	0,0	14,8
22:5n3	1,8	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6n3 (DHA)	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Otros	8,3	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	55,3	0,0	0,0
X		4,0	2,8	43,8	6,2	3,8	25,1	2,6	11,7

EPT Extracto de *P. tricornutum*
 1,...8 Bandas coloreadas de la CCF
 X Porcentaje en peso de cada banda respecto al total

Sólo los extractos disueltos en hexano desde su origen proporcionan las 5 bandas tradicionales y reconocidas (MG, AGL, 1,2-DG, 1,3-DG y TG). En la tabla 2.13 se muestran los perfiles en ácidos grasos del extracto lipídico de *P. tricornutum* obtenido con etanol-hexano.

Tabla 2.13.- Perfiles en ácidos grasos (porcentaje en peso sobre ácidos grasos totales) de las diferentes especies lipídicas (separadas por CCF) constituyentes del extracto lipídico de *P. tricornutum* obtenido con etanol-hexano.

ÁCIDOS GRASOS	EPT	Cromatografía en capa fina						
		RES	BASE	MG	AGL	DG12	DG13	TG
10:0	1,2	2,1	3,8	28,3	1,3	21,9	40,1	3,4
12:0	2,1	0,0	0,0	0,0	4,9	0,0	0,0	0,0
14:0	7,6	7,3	7,8	0,0	13,7	0,0	0,0	7,7
16:0	12,0	14,2	20,6	27,9	18,9	11,7	0,0	8,5
16:1n7	15,7	14,2	14,2	0,0	25,3	16,4	0,0	25,9
16:2n4	5,1	13,7	6,3	0,0	2,6	16,3	0,0	4,9
16:3n4	6,9	5,2	11,4	0,0	2,2	0,0	0,0	3,4
16:4n1	1,8	7,7	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	2,6
18:0	0,6	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
18:1n9	1,4	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	3,2
18:1n7	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2n6	2,6	3,3	4,0	0,0	1,9	0,0	0,0	2,0
18:3n3	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4n3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4n6	2,7	2,8	2,2	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
20:4n3	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n3 (EPA)	25,7	24,0	13,7	15,0	16,7	0,0	0,0	16,8
22:5n3	1,8	3,4	7,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
22:6n3 (DHA)	1,8	2,2	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Otros	8,3	0,0	6,2	43,8	2,3	33,8	59,9	21,6
X		26,2	13,6	2,1	26,4	2,5	1,5	27,6

X Porcentaje en peso de cada banda respecto al total
 RES Residuo pegado en los tubos de ensayo
 BASE Banda base de deposición de la muestra en la placa

Sin tener en cuenta la fracción de residuo pegada en los tubos de ensayo ni la banda base de deposición de la muestra, las 8 bandas obtenidas a partir de los extractos disueltos en cloroformo pudieron asociarse a las cinco bandas de los extractos en hexano por comparación de sus porcentajes relativos y de sus contenidos en EPA. En la tabla 2.14 se muestra dicha asociación.

Tabla 2.14.- Análisis de extractos lipídicos obtenidos por diferentes métodos. Comparación de las bandas de ácidos grasos obtenidos por CCF a partir de la redisolución en n-hexano de los extractos de *P. tricornutum* obtenidos con el sistema cloroformo/metanol, con las bandas tradicionales obtenidas para extractos obtenidos directamente en n-hexano.

Fracciones másicas			
8 BANDAS		5 BANDAS	
1	4,0	3,4	MG
2	2,8	-	pigmentos
3	43,3	43,9	AGL
4	6,2	4,2	DG12
5	3,8	2,5	DG13
6	25,1	46,0	TG
7	2,6	-	pigmentos
8	11,7	-	TG
Contenido en EPA			
8 BANDAS		5 BANDAS	
1	15,0	15,0	MG
2	-	-	pigmentos
3	12,7	16,7	AGL
4	0,0	0,0	DG12
5	0,0	0,0	DG13
6	16,3	16,8	TG
7	-	-	pigmentos
8	14,8	-	TG

X: Porcentaje en peso de materia de cada banda respecto al total

EPA: Porcentaje en peso de EPA respecto a AG totales en cada banda

Como puede observarse en la tabla 2.14, las bandas 2 y 7 son básicamente pigmentos. La banda 1 parece corresponderse con los monoglicéridos: se sitúan en la parte inferior con un 3-4% del total y un contenido en EPA del orden del 15%. La banda 3 parece corresponderse con los AGLs: se sitúan en segundo lugar ascendente con una cantidad de materia del orden del 44% del total y un contenido en EPA del 12-17%. La banda 4 y los diglicéridos 1,2 se sitúan en tercer lugar ascendente y la banda 5 y los diglicéridos 1,3 en la cuarta posición. Se trata de manchas minoritarias (6-4% y 4-2,5% respectivamente) y su contenido en EPA no se cuantifica en el CG. Las bandas 6 y 8 parecen corresponderse con los triglicéridos: en la posición más elevada, constituyen del 37 al 46% de la materia total y parece tener un contenido en EPA del orden del 16%.

Para separar por CCF los triglicéridos de los ésteres puede utilizarse éter de petróleo/éter dietílico/ácido acético 90:10:1 (v/v/v) como fase móvil.

Cuando se trabajó con extractos lipídicos de la microalga *P. tricornutum* se tenían tres fracciones distintas: lípidos neutros (glicéridos), glucolípidos y fosfolípidos. La separación por cromatografía en capa fina de los distintos compuestos de cada una de estas fracciones requirió el empleo de diferentes fases móviles, Kates (1988). Así, para los lípidos neutros se empleó la habitual cloroformo/acetona/metanol y cloroformo/etanol/acético/agua 170:25:25:6 (v/v/v/v) para los glucolípidos y los fosfolípidos.

2.6.3.- FRACCIONAMIENTO LIPÍDICO

El fraccionamiento de los lípidos del extracto microalgal obtenido se realiza mediante cartuchos de sílice “Sep-Pak Classic” (Waters, UK). Estos cartuchos son minicolumnas de un solo uso empaquetadas por compresión de sílice (relleno hidrófilo). La sílice tiene un tamaño de poro de 125 Å y un tamaño de partícula de 55-105 µm.

El fraccionamiento de los lípidos de las microalgas en estos cartuchos conduce a tres grandes grupos de lípidos, de diferentes polaridad: lípidos neutros o apolares, glucolípidos (de polaridad media) y fosfolípidos (de alta polaridad) (López Alonso y cols., 1998).

En primer lugar la columna se fija a un soporte y a continuación se vierte en la columna aproximadamente 30 mg de extracto lipídico con una pipeta Pasteur. Debajo de la columna se coloca un matraz redondo para recoger el eluyente. La extracción de los lípidos neutros se realiza inyectando con una jeringa 30 ml de cloroformo; a continuación se tapa el matraz, se rotula y se sustituye por otro matraz para recoger la fracción de los glucolípidos. Éstos se eluyen inyectando 30 ml de acetona y 20 ml de cloroformo con un 15 % de metanol. Finalmente, en un tercer matraz, se recogen los fosfolípidos que se extraen tras inyectar 30 ml de metanol.

Cada uno de los matraces, con las respectivas fracciones lipídicas, se llevaba a sequedad bajo corriente de argón en un rotavapor, después se resuspendían cada una de las fracciones lipídicas en 2 ml de cloroformo y se transferían a su

correspondiente tubo de ensayo con tapón de rosca. Como resultado del proceso del fraccionamiento se tenían tres tubos de ensayo con las correspondiente fracciones lipídicas (LN, GL y PL). De cada fracción se tomaban 100 µl para su análisis por cromatografía de gases y el resto se guardaba en el arcón congelador a -24°C hasta su posterior análisis por CCF. En la tabla 2.15 se muestran los resultados de este fraccionamiento.

Tabla 2.15.- Fraccionamiento lipídico (en lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos, por cromatografía en columna y análisis en CG) del extracto de lípidos de *P. tricornutum*: porcentajes en peso totales y de EPA en cada una de estas fracciones respecto al total y perfiles en ácidos grasos (% en peso sobre ácidos grasos totales) del extracto lipídico y de cada una de las fracciones.

ÁCIDOS GRASOS	Fraccionamiento lipídico			Extracto
	LN	GL	LP	
10:0	0,2	1,6	2,8	1,2
12:0	2,4	0,0	0,0	2,1
14:0	6,8	6,9	7,6	7,6
16:0	9,7	17,0	21,5	12,0
16:1n7	16,1	13,7	13,2	15,7
16:2n4	4,4	8,4	1,7	5,1
16:3n4	5,0	16,0	1,4	6,9
16:4n1	1,6	2,7	0,0	1,8
18:0	0,6	0,3	1,4	0,6
18:1n9	1,5	0,7	1,4	1,4
18:1n7	0,7	1,6	2,5	0,9
18:2n6	2,2	2,0	8,6	2,6
18:3n3	0,4	0,9	0,0	0,5
18:4n3	0,4	0,4	0,0	0,3
20:4n6	2,8	1,7	2,5	2,7
20:4n3	0,5	0,0	1,5	0,6
20:5n3 (EPA)	29,0	17,8	10,8	25,7
22:5n3	0,5	3,1	7,4	1,8
22:6n3 (DHA)	1,5	1,4	10,0	1,8
Otros	13,6	3,5	4,8	8,3
X	78,5	14,9	6,6	
X _E	88,5	10,3	2,8	

X Porcentaje en peso de cada banda respecto al total

X_E Porcentaje en peso de EPA en cada banda respecto al EPA total

LN Fracción de lípidos neutros

GL Fracción de glucolípidos

LP Fracción de fosfolípidos

2.6.4.- DETERMINACIONES VOLUMÉTRICAS

Los rendimientos de las reacciones de hidrólisis y esterificación se han determinado mediante volumetría ácido-base. Con este método directo y rápido se valoran los ácidos grasos libres formados o sin esterificar contenidos en los productos de reacción.

La valoración se realiza a una alícuota de la mezcla de reacción, previamente enrasada con hexano a 25 ml; a esta alícuota se le añade un volumen determinado de alcohol como diluyente y unas gotas de fenolftaleína como indicador. A continuación se procede a la valoración mediante el goteo controlado de una disolución de NaOH sobre la muestra a analizar hasta el viraje del indicador a tonalidad rosácea intensa. Para disminuir los errores de carbonatación, la disolución de NaOH se prepara en el momento de la valoración a partir de una disolución más concentrada que se conserva bien cerrada a 4°C. El viraje del indicador nos revela la neutralización de los ácidos grasos libres contenidos en la mezcla de reacción.

2.6.4.1.- Grado de hidrólisis:

En el caso de tratarse de un producto de hidrólisis se valoran los ácidos grasos libres formados durante la reacción. Para ello se valora la mezcla tras la reacción y antes de la misma tanto por volumetría ácido-base como por cromatografía en capa fina seguida de cromatografía de gases.

En primer lugar se valora un blanco con 25 ml de etanol (96% v/v) y unas gotas de fenolftaleína, gastándose un volumen V_o . A continuación se valora tanto la disolución de la mezcla inicial de reacción, gastándose un volumen V_b , como la disolución de la mezcla de productos tras la reacción, gastándose un volumen V_g . El volumen gastado en valorar los FFA producidos en la hidrólisis será $V_g - V_b$.

La valoración volumétrica del grado de hidrólisis (V_{AB} , %) se calcula mediante la ecuación

$$V_{AB} = \frac{V_g - V_b}{V_t} \times 100 \quad [2.7]$$

donde V_t es el volumen teórico que se gastaría en valorar todos los ácidos grasos libres producidos en la hidrólisis completa de todas las especies (triglicéridos,

diglicéridos, monoglicéridos, etc). V_t se calcula dividiendo los mili-equivalentes de ácidos grasos existentes en la muestra (calculados a partir de la masa de aceite valorada y su peso molecular medio) entre la normalidad del agente valorante.

El grado de hidrólisis (GH) se determinaría como la media aritmética del valor determinado mediante valoración volumétrica (V_{AB}) y la fracción másica de AGLs formados, determinada mediante CCF (X_A).

2.6.4.1.1.- Grado de hidrólisis de aceites comerciales

En este caso para determinar V_{AB} se toma una alícuota de 1ml de productos de reacción, se le añaden 25 ml de alcohol y unas gotas de fenolftaleína y se mide el volumen gastado de una disolución de NaOH (0,025 N y 0,005N para ensayos en los que se utilizan 2 g y 100 mg de aceite, respectivamente).

2.6.4.1.2.- Grado de hidrólisis de extractos de *P. tricornutum*

Los extractos lipídicos de *P. tricornutum* presentan pigmentaciones muy acusadas, lo que ocasiona complicaciones para la apreciación del viraje del indicador. El agente valorante es también una disolución de NaOH (0,025 N y 0,005N para ensayos en los que se utilizan de 2 g y 100 mg de aceite respectivamente) y se añadieron 25 ml de etanol 96% v/v para valorar 0,25 ml de mezcla de reacción.

En los casos en los que no se aprecia el viraje de la fenolftaleína, fue necesario emplear un medidor de pH.

2.6.4.2.- Grado de esterificación:

El grado de esterificación es el porcentaje de ácidos grasos iniciales que forman ésteres con el alcohol. Se mide tanto por volumetría ácido-base como por cromatografía en capa fina seguida de cromatografía de gases.

El procedimiento volumétrico consiste en valorar la acidez residual (ácidos grasos libres sin esterificar) del esterificado. Previamente se ha medido la acidez de la mezcla de reacción inicial en las mismas condiciones en que se medirá después la acidez residual. Para ello, se toma 1 ml de los 25 ml a los que se ha enrasado la mezcla de reacción, se le añaden 25 ml de etanol y unas gotas de fenolftaleína y se

valora con disolución de NaOH 0,025 N. La valoración volumétrica del grado de esterificación (V_{AB}' , %) se calculará mediante la expresión:

$$V_{AB}' = \frac{V_o - V_b}{V_o} 100 \quad [2.8]$$

donde V_b y V_o son los volúmenes de NaOH 0,025 N gastados en la valoración del esterificado final y de la mezcla inicial, respectivamente.

Finalmente, el grado de esterificación (GE) se determinaría como la media aritmética de valor obtenido volumétricamente (V_{AB}') y la fracción másica de ésteres formados, determinada mediante CCF (X_L).

2.6.5.- ANÁLISIS DE PRODUCTOS DE ESTERIFICACIÓN MEDIANTE SEPARACIÓN DE LOS ÉSTERES Y LOS AGLS

Los ésteres formados y los ácidos grasos libres sin esterificar procedentes de una reacción de esterificación pueden separarse transformando los ácidos grasos libres en sus sales potásicas. Así, los ésteres pueden ser extraídos en la fase hexánica limpios de los ácidos grasos libres, que quedan disueltos en forma de jabones en la fase acuosa. (Shimada y cols., 1997b y c y 2001a; Huang y cols., 1999; Rakshit y cols., 2000; Halldorsson y cols., 2001 y Linder y cols., 2002)

Para realizar esta separación se toma una alícuota de los productos de reacción que contenga aproximadamente 7 mg. Esta masa, contenida en un determinado volumen de disolución en hexano, se lleva a sequedad. Si este volumen es pequeño esta operación podía realizarse bajo corriente de nitrógeno, en caso contrario se utilizaba un rotavapor (Heidolph).

A continuación se añade una disolución hidroetanólica de KOH, se añade 1ml de n-hexano, se agita vigorosamente y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para evitar la formación de una emulsión estable. En caso de formación de una emulsión, se puede añadir 1 ml de disolución saturada de KCl y seguidamente centrifugar la muestra a 3200 rpm hasta separar las fases. A continuación se separa la capa hexánica y se determina el grado de pureza conseguido en los ésteres extraídos mediante análisis de alícuotas de los mismos por CCF cualitativa.

Una relación etanol/agua demasiado alta hace que queden restos de ácidos grasos libres sin neutralizar que contaminan la fracción de los ésteres. Una relación etanol/agua demasiado baja facilita la formación de emulsiones con los jabones que quedan en suspensión en la fase hexánica, por lo que también quedarían contaminados los ésteres.

Por otro lado la concentración y el volumen de la potasa a utilizar también son determinantes de la neutralización “selectiva” de los AGLs (sin saponificación de los ésteres). Aunque volúmenes y concentraciones altas de potasa añadido mejoren la neutralización, un volumen de potasa excesivamente alto favorecerá la formación de emulsiones que dificultarán su separación y una concentración alta puede provocar la saponificación de los ésteres. Así, se ensayaron diferentes volúmenes (0,5, 1 y 2 ml), concentraciones de KOH (0,3, 0,5, 0,7 y 1 N) y diferentes contenidos en etanol (20, 30, 50 y 70%). Tras estos experimentos se observó que el procedimiento que más limpios deja los extractos de ésteres láuricos consiste en añadir 0,5 ml de potasa 0,5 N, con un 30% de etanol, a cada muestra a analizar.

Una mala siguiente extracción de los ésteres con hexano dejaría contaminada la fracción de ácidos grasos libres, lo que lleva a optimizar las etapas de extracción y los volúmenes de hexano a utilizar. Repitiendo tres veces el proceso extractivo con la adición de 0,5 ml de n-hexano por etapa, se asegura la extracción superior al 99 % de los ésteres.

A continuación, la fase hidroalcohólica resultante de esta extracción es acidificada añadiendo 0,75 ml de HCl 0,5 N de forma que los jabones pasen de nuevo a ácidos grasos libres. Seguidamente se realiza la extracción por etapas de los mismos utilizando n-hexano. Agitando vigorosamente se aumentan los rendimientos extractivos aunque después hay que centrifugar para decantar bien las fases. Para obtener buenos rendimientos extractivos, se optimizaron también el número de etapas de extracción y el volumen de hexano en cada etapa. Así, mediante 3 extracciones con 1 ml de n-hexano en cada una se consigue extraer más del 95% de los ácidos grasos, descartándose la fase hidroalcohólica residual.

La determinación cuantitativa y cualitativa de los ácidos grasos libres y de los ésteres se lleva a cabo aplicando directamente el método de transesterificación

directa y su posterior análisis por cromatografía de gases a alícuotas tomadas de las fracciones ya separadas (sin necesidad de CCF).

La cuantificación de los cromatogramas correspondientes al análisis por cromatografía gaseosa de las dos fracciones separadas para cada muestra permite la determinación de su perfil en ácidos grasos, la masa de cada uno de ellos y la masa total de ácidos grasos presentes en cada muestra, que determina el grado de esterificación (GE, %).

$$GE = \frac{\text{Masa total de ácidos grasos en el cromatograma de ésteres}}{\text{Masa total de ácidos grasos en los dos cromatogramas}} * 100 \quad [2.9]$$

2.6.6.- MÉTODOS SEPARATIVOS: SEPARACIÓN DE ÉSTERES Y AGLS TRAS LA ESTERIFICACIÓN

Una vez parada la reacción de esterificación y recogidos los productos de reacción, en algunos casos se separan los AGLs y los ésteres mediante la adición de una disolución de KOH de manera que se neutralicen los primeros sin que se saponifiquen los segundos. Así, los ésteres son extraídos con hexano limpios de los AGLs, los cuales quedan disueltos en forma de jabones en la fase acuosa. Una vez extraídos los ésteres, los AGLs se extraen con n-hexano acidificando la disolución acuosa con HCl. Para realizar esta separación se escalaron las condiciones optimizadas para los métodos de análisis, aplicándolas a la masa total de reacción. De esta manera, por cada 175 mg iniciales de AGLs (ensayo típico de esterificación) se añaden 12,5 ml de potasa 0,5 N, con un 30% de etanol y se repite tres veces el proceso extractivo con la adición de 12,5 ml de n-hexano por etapa para extraer más del 99% de los ésteres. A continuación, de la fase hidroalcohólica resultante de esta extracción es acidificada añadiendo 18,75 ml de HCl 0,5 N y mediante 3 extracciones con 25 ml de n-hexano se extraen el 95% de los AGLs.

Esta separación permitiría realizar etapas sucesivas de esterificación a la fracción de ácidos grasos libres sin esterificar de forma que vaya aumentando progresivamente el porcentaje de EPA en la misma.

Por otro lado, los ácidos grasos convertidos en ésteres pueden recuperarse como AGLs mediante la hidrólisis de los mismos. Esto se realizaría, tal y como se describe

en apartado 2.3 para la obtención de extractos de ácidos grasos concentrados a partir de aceites, saponificando los ésteres con NaOH y, tras volver a acidificar con HCl, extrayendo los ácidos grasos con n-hexano.

3.-Resultados y Discusión

3.1.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Distintos tipos de triglicéridos se han sometido a una hidrólisis catalizada con distintas lipasas con el objetivo de buscar selectividad de las lipasas hacia el EPA u otros PUFAs o, en su defecto, conseguir un grado de hidrólisis lo suficientemente alto como para que este método pudiera sustituir a la obtención de ácidos grasos libres por saponificación alcalina directa, como etapa previa a la esterificación enzimática.

El objetivo último del proyecto en el que se encuentra ubicado este trabajo es obtener concentrados de EPA a partir de la fracción lipídica de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Sin embargo, dada la escasa cantidad de aceite que contiene la biomasa de *P. tricornutum* y la gran complejidad de la composición de sus extractos lipídicos, era poco viable la utilización de los mismos en todos los experimentos. Además, aunque la hidrólisis enzimática de triglicéridos dependa de su composición en ácidos grasos, no tiene porqué depender de la procedencia del aceite. Por lo tanto, antes de emplear triglicéridos procedentes de microalgas, se han empleado otros aceites que resultaban más fáciles de obtener y de manipular. Así, con estos aceites se han determinado las condiciones de partida más adecuadas, se han ensayado las diferentes enzimas disponibles y se han optimizado las condiciones de operación del proceso para posteriormente aplicar estas condiciones a extractos lipídicos de la biomasa microalgal.

3.1.1.- ESTUDIOS PREVIOS

En primer lugar se ensayaron varias enzimas en la hidrólisis enzimática de diferentes aceites, aplicando diferentes condiciones para determinar unas condiciones experimentales de partida en las que posteriormente comparar las lipasas disponibles.

3.1.1.1.- Hidrólisis enzimática del aceite EPAX4510TG

En primer lugar, para comparar entre varias lipasas y obtener unas condiciones de operación adecuadas se empleó el aceite comercial EPAX4510TG (Pronova Biocare, Noruega), dado el alto contenido de este aceite en EPA (42,6%, tabla 2.3).

3.1.1.1.1.- *Comparación de los resultados obtenidos con varias lipasas*

Tras la revisión bibliográfica efectuada y teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo de investigación, se seleccionaron inicialmente tres lipasas: Lipozyme IM (Novo Nordisk) y las lipasas M y D (Amano Enzyme). Para estos ensayos se emplearon unas condiciones típicas, representativas de las utilizadas por diversos autores (por ejemplo Shimada y cols., 1997c), modificando algunas de las variables más relevantes. En la tabla 3.1.1 se muestran los resultados obtenidos en la hidrólisis de EPAX4510TG con estas tres lipasas.

En esta tabla y en las que se muestran a continuación se muestran los porcentajes relativos de los distintos tipos de glicéridos (monoglicéridos, MG, diglicéridos 1,2, DG12, diglicéridos 1,3, DG13 y triglicéridos, TG) y de ácidos grasos libres (AGL) obtenidos en la hidrólisis y que se pueden separar por cromatografía en capa fina (CCF). También se muestra el grado de hidrólisis determinado mediante volumetría ácido-base (V_{AB} , apartado 2.6.4.1.1) y el grado de hidrólisis (GH) calculado como el valor medio de este último y del porcentaje de AGLs determinado por CCF. Junto a los porcentajes de cada uno de los glicéridos y de los AGLs se muestra el contenido de cada una de estas fracciones en EPA, expresado como porcentaje en peso de EPA sobre ácidos grasos totales en cada una de las fracciones.

Tabla 3.1.1.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG (tabla 2.3) con distintas lipasas y modificando el tiempo: fracción en peso y contenido en EPA (% en peso sobre AG totales) de cada una de las especies lipídicas, grado de hidrólisis según volumetría. Condiciones de operación: 2 g de aceite, 25 mg de lipasa, relación agua/aceite 1:1 p/p, sin disolvente, 37 °C y 200 rpm.

t (h)	Cromatografía en capa fina										V _{AB} ^{**} (%)	GH ^{***} (%)
	MG*		AGL*		DG12*		DG13*		TG*			
	X	EPA	X _A	EPA	X	EPA	X	EPA	X _{TG}	EPA		
0	1,0	0,0	1,0	7,8	2,9	9,7	2,9	34,9	92,2	36,1		
<u>Lipozyme IM (inmovilizada)</u>												
1	0,0	0,0	8,0	19,4	2,5	70,6	2,0	85,7	87,4	35,5	4,2	6,1
<u>Lipasa M (no inmovilizada)</u>												
1	2,4	27,6	15,4	7,2	13,2	10,4	5,4	35,7	63,6	22,0	9,8	12,6
2	3,0	21,1	25,4	13,8	15,9	12,0	3,3	18,0	52,5	18,3	17,3	21,3
<u>Lipasa D (no inmovilizada)</u>												
1	0,0	0,0	25,6	34,4	24,2	41,7	4,1	76,0	46,2	44,2	21,8	23,7
2	1,9	58,1	31,1	38,2	25,7	38,3	2,3	100	38,9	42,2	25,1	28,1
23	1,1	82,7	51,0	36,1	14,8	47,2	1,9	100	31,2	42,2	44,8	47,9
24	1,0	80,9	49,5	36,9	14,6	47,3	2,7	68,8	32,3	41,4	46,5	48,0

* Análisis por cromatografía gaseosa de las diferentes especies lipídicas separadas por CCF

X: Porcentaje relativo en peso de cada una de las especies lipídicas respecto al total

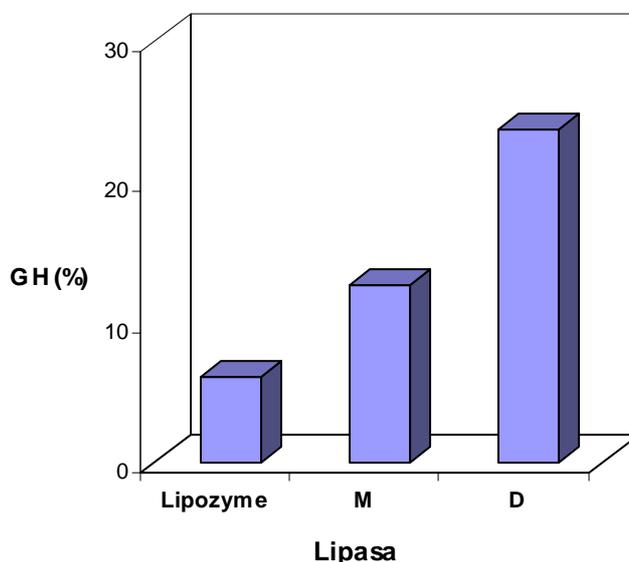
EPA: Contenido (% en peso) de EPA sobre ácidos grasos totales. MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; DG12: diglicéridos 1,2; DG13: diglicéridos 1,3; TG: triglicéridos

** V_{AB}: Grado de hidrólisis determinado mediante valoración volumétrica ácido-base.

*** GH: valores medios entre los determinados por valoración volumétrica (V_{AB}, %) y los determinados mediante CCF (X_A, %)

Los grados de hidrólisis obtenidos con las tres lipasas ensayadas tras 1 h de hidrólisis se han representado en la figura 3.1.1. Se observa que la lipasa menos activa es Lipozyme IM, mientras que la más activa es la lipasa D. Además de la actividad propia de cada una de las lipasas, estos resultados también pueden explicarse si se tiene en cuenta que en todos los casos se han puesto 25 g de lipasa y que mientras Lipozyme IM se pone inmovilizada, las lipasas M y D se ponen sin inmovilizar, por lo que las concentraciones de enzima activa son mayores que en Lipozyme IM. Esto hace que no se contradigan las observaciones de Fevrier y cols. (2001) que consideraban Lipozyme la lipasa que mayores rendimientos proporcionaba de entre muchas lipasas comerciales.

Figura 3.1.1.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG con distintas lipasas: influencia del tipo de lipasa sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 2 g de aceite EPAX4510TG, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, sin disolvente, 37 °C, 200 rpm, 1 hora.

En la tabla 3.1.1, con las lipasas M y D, se observa que a medida que aumenta el tiempo aumenta el grado de hidrólisis. Con la lipasa D parece haberse alcanzado un grado de hidrólisis constante a las 23 h, ya que éste permanece constante en torno al 48%. Entre los glicéridos parcialmente hidrolizados, son los 1,2 DG los que se obtienen en mayor proporción. Esto se explica debido a que estas lipasas presentan especificidad para la hidrólisis de los ácidos grasos situados en las posiciones 1 y 3. Según el índice de especificidad posicional (PSI, apartado 1.7.2.3.2) descrito por Matori y cols. (1991) las lipasas D y M tendrían un valor medio de 75 y 54 respectivamente mostrándose la *sn*-1,3 especificidad más acusada para la primera. Aunque para Lipozyme aún no se observa, porque el GH alcanzado no es suficientemente elevado, esta especificidad había sido observada ya por Okumura y cols. (1975) para Lipozyme y para *Rhizopus delemar*. En trabajos previos de nuestro grupo (Camacho Páez y cols., 2000) y de posteriores autores como Fevrier y cols. (2001) también se habían comprobado las especificidades *sn*-1,3 de estas lipasas.

La posible selectividad de estas lipasas hacia el EPA se puede observar si se comparan los porcentajes de EPA en las fracciones de AGLs y TGs, que son los glicéridos que se obtienen en mayor proporción. Se observa que el porcentaje de EPA en los TG es algo mayor que en los AGLs, aunque estas diferencias no son excesivamente significativas, sobre todo con la lipasa D, que es con la que se alcanzaron los mayores grados de hidrólisis.

3.1.1.1.2.- Influencia del disolvente

La lipasa D mostró los mejores resultados en la hidrólisis del EPAX4510TG. Por lo tanto se eligió esta lipasa para realizar un estudio previo de la influencia de la presencia de un disolvente orgánico. Las principales razones para la adición de un disolvente a la mezcla de reacción son: el disolvente preserva a los PUFAs de su posible oxidación, se mejora la transferencia de reactivos y productos en el seno de la mezcla de reacción y disminuye la viscosidad de esta mezcla, con lo que, entre otras ventajas, se mejora la “manejabilidad” de la mezcla. Se seleccionó n-hexano por ser un disolvente menos tóxico que otros, con buena capacidad de disolución de grasas y alcoholes (en concreto, buena solubilidad de los PUFAs), con alta volatilidad (para ser eliminado si fuera necesario) y porque da lugar a pocos problemas de operación y análisis en el caso de trabajar con extractos lipídicos naturales. Sin embargo, se sigue considerando la no adición de disolvente para mejorar la biocompatibilidad del proceso. En la tabla 3.1.2 y en la figuras 3.1.2 y 3.1.3 se muestran los resultados obtenidos en estos experimentos.

En estas figuras se ha representado el grado de hidrólisis (GH) frente al producto de la cantidad de enzima por el tiempo; esta variable representa la **intensidad de tratamiento (IT)**. En la tabla 3.1.3 (influencia de la cantidad de enzima y del tiempo de hidrólisis) se observa que el GH aumenta tanto con la cantidad de enzima como con el tiempo y en la figura 3.1.3 puede observarse mejor cómo este aumento se produce en el mismo grado al aumentar cualquiera de los dos factores. En general, para las reacciones enzimáticas, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima activa, por lo que si no se produce desnaturalización de la misma, la verdadera variable intensiva en lugar de ser sólo el tiempo, sería el producto de éste por la concentración o cantidad de enzima utilizada.

Tabla 3.1.2.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la **lipasa D** (no inmovilizada) modificando las cantidades de disolvente y sustrato: fracción en peso y contenido en EPA (% en peso sobre AG totales) de cada una de las especies lipídicas, grado de hidrólisis según volumetría. Condiciones de operación: relación agua/aceite 1:1 p/p, 37°C y 200 rpm.

Aceite (mg)	Hexano (ml)	Lipasa D (mg)	Tiempo (h)	MG*		AGL*		DG12*		DG13*		TG*		V _{AB} (%)	GH (%)
				X _A	EPA	X	EPA	X	EPA	X	EPA	X _{TG}	EPA		
			0	1,0	0,0	1,0	7,8	2,9	9,7	2,9	34,9	92,2	36,1		
2000	0	25	1	0,0	0,0	25,6	34,4	24,2	41,7	4,1	76,0	46,2	44,2	21,8	23,7
2000	5	25	1	1,2	0,0	12,7	11,2	11,3	24,1	2,3	43,6	72,4	29,6	10,4	11,6
2000	0	25	24	1,0	80,9	49,5	36,9	14,6	47,3	2,7	68,8	32,3	41,4	46,5	48,0
2000	5	25	24	2,0	30,4	33,1	22,6	19,0	23,6	1,6	0,0	44,2	28,0	33,4	33,3
100	5	10	24	2,9	15,1	38,8	24,1	10,3	19,7	1,8	21,3	46,2	33,2	36,1	37,4
100	10	10	24	1,2	0,0	32,2	24,2	13,3	23,7	0,9	0,0	52,3	35,5	33,7	33,0

* Análisis por cromatografía gaseosa de las diferentes especies lipídicas separadas por CCF

X: Porcentaje relativo en peso de cada una de las especies lipídicas

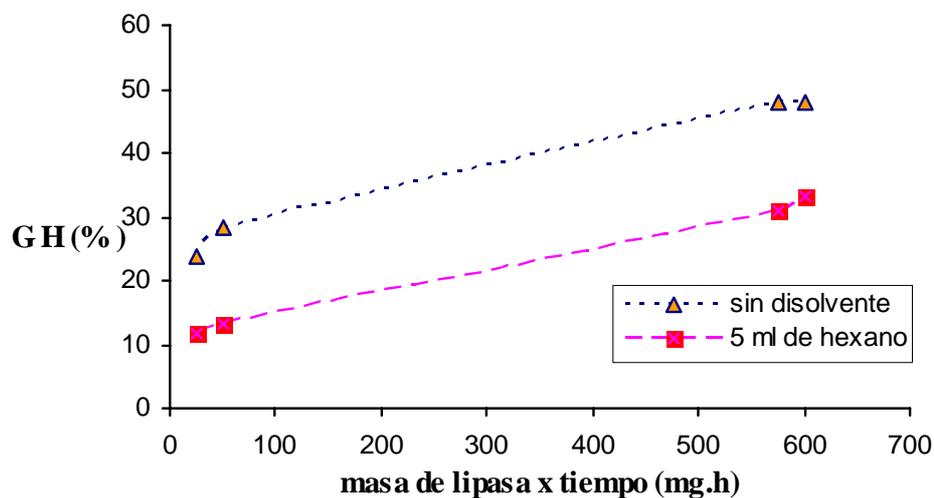
EPA: Porcentaje en peso de EPA sobre ácidos grasos totales.

MG: monoglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; DG12: diglicéridos 1,2; DG13: diglicéridos 1,3; TG: triglicéridos

V_{AB}: Grado de hidrólisis determinado mediante valoración volumétrica ácido-base.

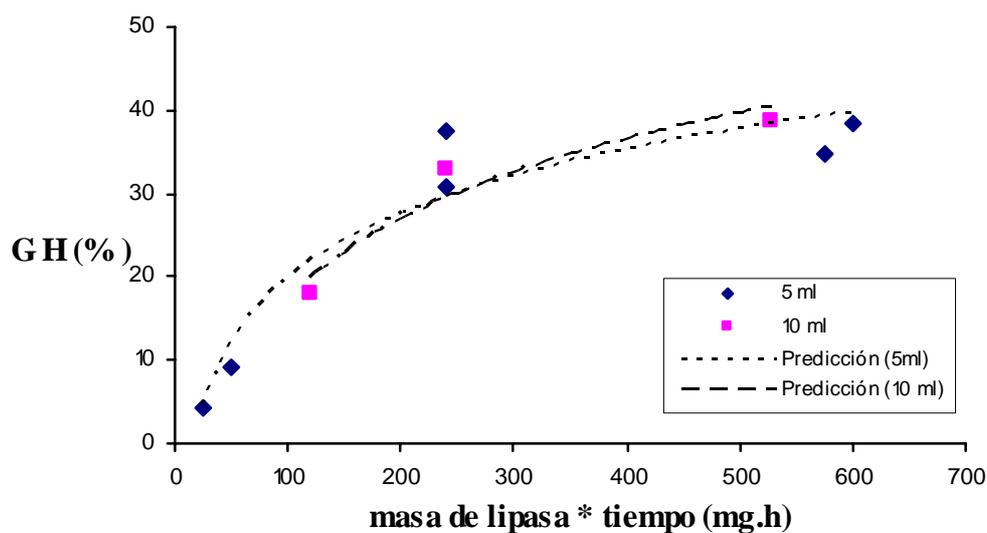
GH: Grado de hidrólisis: valores medios entre los determinados por valoración volumétrica (V_{AB}, %) y los determinados mediante CCF (AGL, %)

Figura 3.1.2.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*: influencia del disolvente (n-hexano) y de la intensidad de tratamiento (m_zt) sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 37 °C, 200 rpm.

Figura 3.1.3.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*: influencia de la cantidad de disolvente (n-hexano) y de la intensidad de tratamiento (m_zt) en el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 100 mg aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 37 °C y 200 rpm.

En la tabla 3.1.2 y en la figura 3.1.2 se observa que la adición de disolvente disminuye el grado de hidrólisis del aceite. Este resultado puede ser debido a la gran disminución de la concentración de sustrato que se produce cuando se adiciona el disolvente. En dicha tabla, en los ensayos en los que además de añadir disolvente se reduce la cantidad de sustrato a 100 mg (disminución de concentración de sustratos del orden de 20 veces más) no se aprecia este efecto de disminución del GH. Esto puede ser debido a que a su vez la proporción lipasa-sustratos ha aumentado del orden de 8 veces, lo cual probablemente suponga un efecto antagónico.

Sin embargo en la tabla 3.1.2 y en la figura 3.1.3 se observa que un aumento en la cantidad de disolvente desde 5 hasta 10 ml parece no influir sobre el grado y la velocidad de hidrólisis. Esto indica que en este rango de concentraciones esta variable deja de ser determinante sobre la velocidad de hidrólisis, por lo que, de añadir disolvente, habrá que añadir cantidades pequeñas pero suficientes para facilitar la manejabilidad de la mezcla de reacción. Por lo tanto, para cada una de las posibles formas de operación (tanque agitado o lecho con la lipasa inmovilizada) y con cada uno de los sustratos empleados habría que determinar la cantidad de disolvente mínima a utilizar.

3.1.1.1.3.- Influencia de la cantidad de lipasa y del tiempo de hidrólisis

En la tabla 3.1.3 se muestra la influencia de la cantidad de lipasa D y del tiempo de tratamiento en el grado de hidrólisis. Se observa que, lógicamente, tanto un aumento de la cantidad de lipasa como del tiempo de hidrólisis hacen aumentar el grado de hidrólisis.

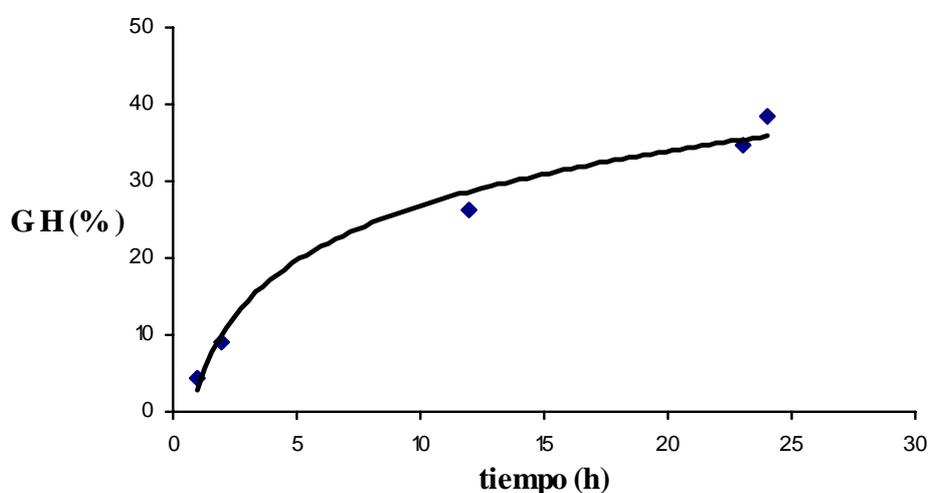
Tabla 3.1.3.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la lipasa **D** (no inmovilizada) modificando la cantidad de lipasa y el tiempo: fracción en peso y contenido en EPA (% en peso sobre AG totales) de cada una de las especies lipídicas, grado de hidrólisis según volumetría. Condiciones de operación: relación agua/aceite 1:1 p/p, 37°C y 200 rpm.

Aceite (mg)	Hexano (ml)	Lipasa D (mg)	Tiempo (h)	Cromatografía en capa fina										V _{AB} (%)	GH (%)
				MG*		AGL*		DG12*		DG13*		TG*			
				X _A	EPA	X	EPA	X	EPA	X	EPA	X _{TG}	EPA		
			0	1,0	0,0	1,0	7,8	2,9	9,7	2,9	34,9	92,2	36,1		
100	10	5	24	1,8	23,5	16,2	33,9	11,6	26,3	1,0	0,0	69,4	29,9	19,6	17,9
100	10	10	24	1,2	0,0	32,2	24,2	13,3	23,7	0,9	0,0	52,3	35,5	33,7	33,0
100	10	25	24	1,2	0,0	38,8	26,3	12,4	20,8	1,6	21,2	46,1	33,7	38,6	38,7
100	5	25	1	1,4	0,0	3,8	13,2	2,2	40,3	2,9	47,8	89,8	36,9	4,9	4,3
100	5	25	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0	-
100	5	25	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,4	-
100	5	25	23	0,8	0,0	36,5	25,7	19,0	18,9	0,8	0,0	43,1	35,1	33,0	34,7
100	5	25	24	0,8	0,0	40,6	28,0	12,1	30,4	0,8	0,0	45,7	36,2	36,3	38,5
2000	5	25	1	1,2	0,0	12,7	11,2	11,3	24,1	2,3	43,6	72,4	29,6	10,4	11,6
2000	5	25	2	1,8	31,4	12,0	9,0	11,3	23,6	2,0	47,2	72,9	30,2	14,1	13,1
2000	5	25	24	2,0	30,4	33,1	22,6	19,0	23,6	1,6	0,0	44,2	28,0	33,4	33,3

Simbología idéntica a la de la tabla 3.1.2.

En la figura 3.1.4 se muestra con más claridad la influencia del tiempo sobre el grado de hidrólisis. Puede observarse que la velocidad va disminuyendo a medida que aumenta el grado de hidrólisis. A las 23-24 h parece que el grado de hidrólisis sigue aumentando, aunque ya la velocidad es pequeña.

Figura 3.1.4.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*: influencia del tiempo sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 100 mg de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 5 ml de disolvente, 37 °C, 200 rpm.

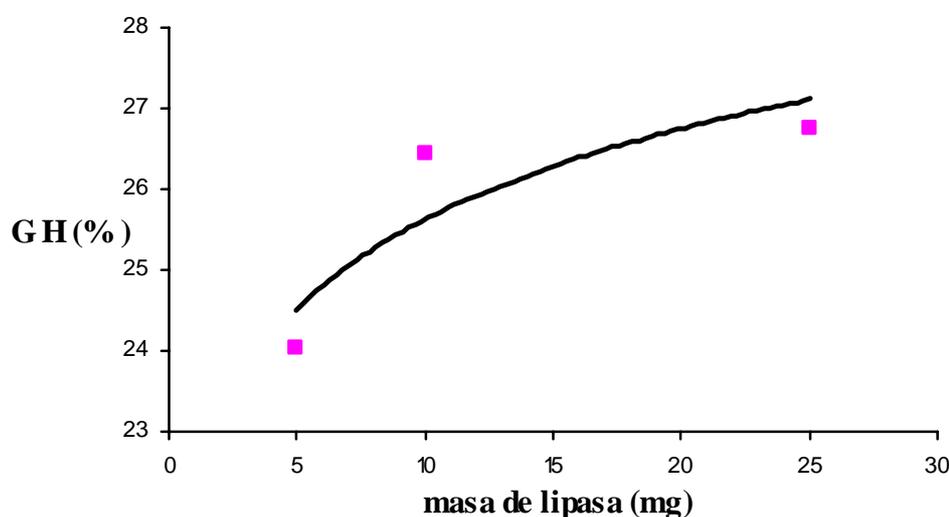
También se hicieron experimentos con cantidades crecientes de la lipasa M. En la tabla 3.1.4 y en la figura 3.1.5 se observa que, en el rango seleccionado, el grado de hidrólisis aumenta muy ligeramente al aumentar la cantidad de lipasa, lo que indica que en estas condiciones no es eficaz pasar de 5 mg de lipasa M.

Tabla 3.1.4.- Hidrólisis del EPAX4510TG (tabla 2.3) catalizada por la lipasa M (sin inmovilizar) modificando la cantidad de lipasa: fracción en peso y contenido en EPA (% en peso sobre AG totales) de cada una de las especies lipídicas, grado de hidrólisis según volumetría. Condiciones de operación: 100 mg de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 10 ml de hexano, 37 °C, 200 rpm y 24 h.

Lipasa M (mg)	Cromatografía en capa fina										V _{AB} (%)	G H (%)
	MG*		AGL*		DG12*		DG13*		TG*			
	X	EPA	X	EPA	X	EPA	X	EPA	X	EPA		
0	1,0	0,0	1,0	7,8	2,9	9,7	2,9	34,9	92,2	36,1		
5	1,7	24,6	24,1	28,5	15,0	22,8	1,3	0,0	57,9	32,2	24,0	24,0
10	1,4	16,8	25,6	23,7	13,3	21,4	1,0	0,0	58,8	34,5	27,3	26,4
25	1,2	0,0	26,0	24,3	13,9	27,7	1,3	0,0	57,7	36,6	27,6	26,8

Simbología idéntica a la de la tabla 3.1.1.

Figura 3.1.5.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG la lipasa M de *Mucor javanicus*: influencia de la cantidad de lipasa (m_z) sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 100 mg de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, sin disolvente, 37 °C, 24 horas.

Para ver si estas lipasas muestran algún tipo de **selectividad** hacia el EPA, de nuevo conviene comparar los porcentajes de EPA de los AGL y de los TG. Algunos autores, como Shimada y cols. (2001a) o Halldorsson y cols. (2004), encontraron que

numerosas lipasas como las de *Geotrichum candidum*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* discriminan el EPA y/o el DHA en mayor o menor medida, debido a que esta lipasa hidroliza el enlace éster de los PUFAs a menor velocidad que el enlace éster del resto de los ácidos grasos. En concreto, según Halldorsson y cols. (2004) eran las dos últimas las que mayor selectividad ofrecían sobre el EPA.

En las tablas 3.1.2 a 3.1.4 se observa que ninguna de las enzimas probadas (de *Rhizopus oryzae* y de *Mucor javanicus*) presenta una especificidad total por el EPA. Sin embargo con ambas lipasas, para los grados de hidrólisis obtenidos, se observa que el contenido de EPA en los triglicéridos es aproximadamente un 10% superior al contenido de EPA en los AGLs, lo que podría significar cierta acil-especificidad de estas lipasas hacia el EPA en esta reacción, es decir que la velocidad a que estas lipasas hidrolizan al EPA parece ser menor que la velocidad media de hidrólisis del resto de los ácidos grasos. De cualquier forma esta selectividad es poco práctica, ya que descartar totalmente la fracción de AGLs, por su menor contenido en EPA, supone la pérdida de una gran cantidad de EPA, ya que el contenido de EPA en estos AGLs no es en ningún caso despreciable. Esta ausencia de una selectividad significativa de estas lipasas hacia el EPA ha propiciado que la hidrólisis enzimática se optimice más pensando en aumentar el grado de hidrólisis que en la posible selectividad de las lipasas hacia el EPA.

En las tablas 3.1.1 a 3.1.4 se observa que las lipasas no inmovilizadas M y, sobre todo, D, proporcionan grados de hidrólisis importantes sobre el EPAX4510 (se llegó hasta un 26 y 48% a las 24 horas, respectivamente), aún sin haber optimizado sus condiciones de operación. Estos resultados permiten esperar grados de hidrólisis mayores y alientan la posibilidad de alcanzar altos rendimientos en la hidrólisis enzimática, lo que permitiría utilizar esta vía para obtener AGLs en lugar de la saponificación alcalina.

En las tablas anteriores también puede apreciarse que, en general, todas las especies lipídicas que forman los productos de reacción (ácidos grasos y glicéridos) presentan porcentajes en PUFAs inferiores al del aceite de partida (43-45%). Si tenemos en cuenta que este último contenido en EPA se determinó directamente por CG, mientras que para la determinación de los porcentajes en EPA de cada fracción lipídica es preciso separar previamente esas fracciones por CCF, es posible suponer

que los PUFAs se oxidan parcialmente durante esta separación previa, lo que origina una disminución de su contenido en todas las fracciones lipídicas con respecto al contenido total de ácidos grasos. No debe descartarse una posible oxidación de los PUFAs que están como AGLs a mayor velocidad que cuando están como glicéridos, lo que nos haría confundirla con una discriminación de los mismos, que en realidad no se produce. Puesto que la CCF es por el momento insustituible como procedimiento analítico para la separación de los distintos tipos de lípidos, algunos de los análisis donde la oxidación era más acusada se repitieron posteriormente, minimizando el tiempo de exposición de las bandas durante el análisis. Tal y como se puede ver en el anexo de resultados (tablas A1.70 a A1.75), los nuevos análisis mejoraron notablemente el contenido en EPA de las fracciones lipídicas con respecto al del aceite, lo que confirmaba que efectivamente existía cierta oxidación de los PUFAs en la CCF. De esta manera, esta circunstancia se tuvo en cuenta en los estudios posteriores en los que los tiempos de exposición de las bandas durante el análisis serían mínimos.

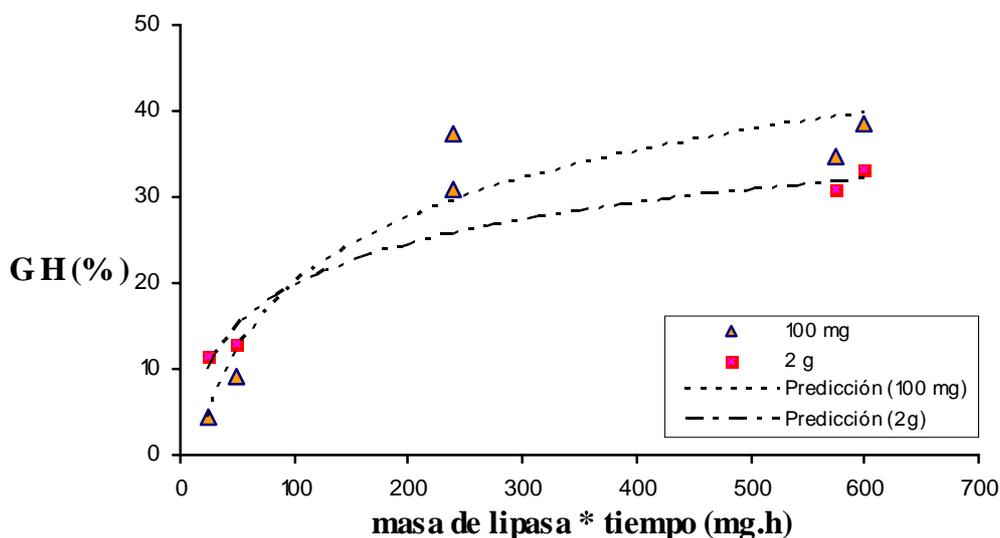
Por otro lado, algunos glicéridos parciales muestran en ocasiones porcentajes de EPA muy altos, pero corresponden a fracciones de glicéridos muy pequeñas, por lo que estos resultados analíticos son poco significativos.

3.1.1.1.4.- Influencia de la cantidad de sustrato

Como se ha podido observar (tablas 3.1.2 – 3.1.4), se han introducido ensayos en los que la cantidad de sustrato ha sido reducida 20 veces con respecto a la inicial. Esto se ha realizado para poder trabajar con cantidades mínimas de extracto y que las condiciones fueran aplicables a los extractos de *P. tricornutum*, disponibles sólo en pequeñas cantidades.

En la figura 3.1.6, basada en la tabla 3.1.2, se han representado los grados de hidrólisis de experimentos realizados con la lipasa D en las mismas condiciones, pero con dos cantidades de aceite diferentes.

Figura 3.1.6.- Hidrólisis del aceite EPAX4510TG con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*: influencia de la cantidad de aceite (100 y 2000 mg de EPAX4510TG) y de la intensidad de tratamiento sobre el grado de hidrólisis.



Condiciones de operación: relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 5 ml de disolvente, 37 °C y 200 rpm.

A bajas intensidades de tratamiento se observa que el grado de hidrólisis (GH) y la velocidad de hidrólisis son mayores para la cantidad de sustrato superior pero, a intensidades de tratamiento elevadas, el GH obtenido con cantidades de sustrato altas es ligeramente menor al obtenido con cantidades bajas. Este resultado indica que con 2 g de sustrato se está operando con exceso de sustrato con respecto a la cantidad de lipasa utilizada. Sin embargo, las diferencias entre los grados de hidrólisis obtenidos con ambas cantidades de sustrato son pequeñas y lógicamente la cantidad o concentración de productos obtenidos es mucho mayor cuando se han empleado 2 g de aceite, ya que el GH se expresa como porcentaje de AGLs formados con respecto a los presentes inicialmente como glicéridos.

3.1.1.2. Hidrólisis enzimática de aceite de onagra

Utilizando las mejores condiciones encontradas para la hidrólisis de EPAX, también se han realizado una serie de ensayos de hidrólisis de aceite de onagra. La composición de este aceite se muestra en la tabla 2.5; se observa que es un aceite muy rico en ácido linoleico, por lo que puede resultar interesante cuando se desea obtener este ácido graso esencial con un grado de pureza alto. Con este aceite también se ha medido el grado de hidrólisis alcanzado empleando diversas lipasas en cantidades variables. En este caso no se ha determinado el porcentaje de EPA en cada una de las fracciones de glicéridos y de ácidos grasos libres, ya que este aceite prácticamente no contiene EPA.

Para la hidrólisis de este aceite se ensayaron las lipasas que se muestran en la tabla 3.1.5. En ella se observa que con algunas lipasas (*Alcaliginese*, AK y Lipozyme IM) se obtuvieron grados de hidrólisis mayores del 70% en 24 h, lo que permitiría utilizar la vía enzimática, en lugar de la saponificación alcalina, para obtener ácidos grasos libres.

Algunos de los mayores rendimientos en AGL se han obtenido con lipasas sin inmovilizar (*Alcaliginese*, 74,2%, y *R. delemar*, 59,6%), lo que puede tener relación, además de con la actividad propia de estas lipasas, con el hecho de que con estas lipasas la concentración de enzima activa es muy probable que sea superior a las de aquellas lipasas que están inmovilizadas (Lipozyme IM, Novozym 435 y AK). Por esta razón, con estas últimas lipasas se han realizado ensayos con cantidades de enzima mayores (tabla 3.1.5), observándose, por ejemplo, que se necesitan 10 veces más cantidad de Lipozyme IM (inmovilizada) y 20 veces más cantidad de lipasa AK (también inmovilizada) que de la lipasa *Alcaliginese* (sin inmovilizar) para conseguir grados de hidrólisis similares. Este hecho pone de manifiesto que, además de la naturaleza de la enzima, la inmovilización juega un papel fundamental en la actividad enzimática por unidad de masa de lipasa (lipasa más soporte para la enzimas inmovilizadas o sólo la lipasa cuando no están inmovilizadas).

Tabla 3.1.5.- Hidrólisis del aceite de onagra (tabla 2.5) con varias lipasas modificando las cantidades de lipasa (m_z): grado de hidrólisis calculado como la media de los resultados obtenidos mediante V_{A-B} y los obtenidos por CCF. Condiciones de operación: relación aceite/agua 1:1 p/p, 5 ml de hexano, 37 °C, 200 rpm, atmósfera inerte y 24 horas.

LIPASA		Grado hidrólisis*
Tipo	m_z (mg)	(%)
<i>Alcaliginese</i>	10	74,2
<i>R. delemar</i>	10	59,6
D	10	47,9
Lipozyme IM ⁽¹⁾	10	41,5
AYS	100	5,6
Novozym 435 ⁽¹⁾	10	4,9
AK ^{IM(2)}	100	50,5
AK ^{IM(2)}	200	74,2
Lipozyme IM ⁽¹⁾	10	41,5
Lipozyme IM ⁽¹⁾	100	77,5
Novozym 435 ⁽¹⁾	10	4,9
Novozym 435 ⁽¹⁾	100	33,0

* Valores medios de los resultados obtenidos mediante V_{A-B} y los obtenidos por CCF del producto de hidrólisis (% en peso de los AGLs formados sobre ácidos grasos totales).

(1) Enzima inmovilizada por el fabricante

(2) Enzima inmovilizada en el laboratorio por el método de Soumanou y cols. (1998) modificado

Pueden compararse los grados de hidrólisis obtenidos con la lipasa D con este aceite (47,9%) y el obtenido en unas condiciones similares con el EPAX4510TG (23,7%, tabla 3.1.2). Aunque esta comparación se basa solo en este dato y por tanto no es muy significativa, parece que el aceite de onagra se hidroliza a una velocidad mayor que el EPAX4510. Esta diferencia tiene que deberse, lógicamente, a la diferente composición en ácidos grasos de ambos aceites. El EPAX4510 es muy rico en PUFAs n-3 como EPA y DHA, mientras que el aceite de onagra es muy rico en PUFAs n-6 como ácido linoleico (76,7%) y en ácido γ -linolénico (GLA) (9,4%). Por lo tanto este resultado podría explicarse debido la menor actividad de la lipasa D hacia los PUFAs n-3 con respecto a los ácidos linoleico y linolénico.

3.1.1.3. Hidrólisis enzimática de un extracto de *P. tricornutum*

Los extractos lipídicos de *P. tricornutum* tienen una composición muy compleja (lípidos neutros, glucolípidos, fosfolípidos, etc.) y variable según las condiciones de cultivo de la microalga (López Alonso y cols., 1998), así como presentan pigmentaciones muy acusadas. Esto ocasionó numerosas dificultades analíticas para la determinación del grado de hidrólisis, tanto por volumetría ácido-base como por CCF. En el apartado 2.6.2.2 se describe la forma en que se obtuvieron los extractos de lípidos de *P. tricornutum* con los sistemas cloroformo-metanol y hexano-etanol, las dificultades analíticas que se tuvieron para su caracterización y la composición en clases lipídicas y en ácidos grasos de estos extractos (tablas 2.12 a 2.14).

También los productos de la hidrólisis enzimática de estos extractos de *P. tricornutum* ocasionaron numerosas dificultades analíticas que justificaron el estudio realizado para encontrar un proceso de extracción y tratamiento de los mismos que suministrara sustratos más adecuados para nuestras reacciones enzimáticas (apartado 3.3).

Para la hidrólisis de este aceite se empleó la lipasa D, que había dado los mejores resultados en los ensayos previos con el EPAX4510TG. También se emplearon las mejores condiciones obtenidas para cada una de estas lipasas.

En este caso los grados de hidrólisis se determinaron sólo por volumetría ácido-base. Sin embargo, debido a la pigmentación del aceite hubo dificultades en la apreciación del viraje del indicador, por lo que el error experimental fue mayor que en la hidrólisis de los demás aceites. En la tabla 3.1.6 se muestran los grados de hidrólisis obtenidos en la hidrólisis del extracto de *P. tricornutum* cuya composición se muestra en la tabla 2.13.

Tabla 3.1.6.- Hidrólisis del extracto de *P. tricornutum* (tabla 2.13) con las lipasas D de *Rhizopus oryzae* y M de *Mucor javanicus*. Condiciones de operación: 100 mg de extracto, relación extracto/agua 1:1 p/p, 10 mg de lipasa, 5 ml de hexano, 37 °C, 200 rpm y 24 horas.

LIPASA	V _{AB} (%)
D	17,0
M	3,9

V_{AB}: Grados de hidrólisis obtenidos mediante volumetría ácido-base.

En esta tabla se observa que los grados de hidrólisis obtenidos han sido inferiores a los obtenidos con EPAX4510TG en las mismas condiciones. Así, por ejemplo, con la lipasa D se ha llegado sólo al 17%, mientras que con EPAX4510TG se alcanzó un grado de hidrólisis del 33,0% en las mismas condiciones (tabla 3.1.3). Las razones de estas diferencias pueden estar relacionadas con la alta composición en AGLs del extracto de partida (en torno al 40%) y la compleja composición del extracto de lípidos de *P. tricornutum*, comparada con la del aceite.

Como se ha dicho, las mezclas de reacción presentaron numerosas dificultades para su análisis por CCF debido a la pigmentación de las mismas, lo que aumentó notablemente el error de las determinaciones. No obstante, en la tabla 3.1.7 se muestran, a título de ejemplo, los perfiles de las bandas formadas en la hidrólisis de un extracto de *P. tricornutum* catalizada por la lipasa D.

Tabla 3.1.7.- Hidrólisis del extracto lipídico de *P. tricornutum* redissuelto en hexano (tabla 2.13) con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*: perfiles en ácidos grasos (% en peso respecto a AG totales) de las fracciones lipídicas resultantes. Condiciones de operación: 100 mg de extracto, relación agua/aceite 1:1 p/p, 10 mg de lipasa D de *Rhizopus oryzae* (sin inmovilizar), 5 ml de n-hexano, 37 °C, 200 rpm, 24 horas.

ÁCIDOS GRASOS	EPH	Cromatografía en capa fina				
		MG	AGL	DG12	DG13	TG
10:0	1,2	39,9	0,7	29,8	40,5	2,1
12:0	2,1	0,0	3,3	0,0	0,0	1,3
14:0	7,6	0,0	11,7	0,0	0,0	9,2
16:0	12,0	0,0	19,7	0,0	0,0	9,4
16:1n7	15,7	0,0	25,3	0,0	0,0	21,9
16:2n4	5,1	0,0	3,2	24,5	0,0	5,4
16:3n4	6,9	0,0	3,3	0,0	0,0	3,5
16:4n1	1,8	0,0	0,9	0,0	0,0	1,8
18:0	0,6	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0
18:1n9	1,4	0,0	2,3	0,0	0,0	3,0
18:1n7	0,9	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0
18:2n6	2,6	0,0	2,1	0,0	0,0	2,1
18:3n3	0,5	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
18:4n3	0,3	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
20:4n6	2,7	0,0	1,7	0,0	0,0	1,2
20:4n3	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5n3 (EPA)	25,7	0,0	13,8	0,0	0,0	12,4
22:5n3	1,8	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0
22:6n3 (DHA)	1,8	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
Otros	8,3	60,1	4,3	45,6	59,5	26,7
X		1,3	57,3	2,1	1,1	32,8

X : Porcentaje en peso de cada una de las fracciones lipídicas

EPH: extracto de lípidos de la microalga *P. tricornutum* analizado por CG directa.

En esta tabla puede observarse que la composición de EPA es similar en los AGLs y en los TGs, por lo que la lipasa D tampoco parece presentar especificidad por los PUFAs en la hidrólisis de extractos de *P. tricornutum*. La lipasa era *sn*-1,3 específica (comprobado por Camacho Páez y cols., 2002) por lo que esto significa que el EPA debe estar distribuido uniformemente en las diferentes posiciones de los triglicéridos que forman el extracto de lípidos de *P. tricornutum*.

Otra posibilidad para el estudio de la hidrólisis enzimática de extractos lipídicos de microalgas sería fraccionar el extracto lipídico de *P. tricornutum* mediante un método basado en el escalamiento de la cromatografía en columna de gel de sílice o la separación en los cartuchos “Sep-pak®” (descrito en el apartado 2.6.3) y aplicar la hidrólisis enzimática a las distintas fracciones lipídicas por separado. En esta investigación la fracción más interesante como sustrato para la hidrólisis enzimática serían los lípidos neutros, que están constituidos fundamentalmente por los triglicéridos.

En la tabla 2.15, se observa como el 78% de los lípidos está constituido por lípidos neutros en los que se encuentra el 88,5% del EPA. En el este sentido, parece lógico descartar las otras dos fracciones, de naturaleza más compleja y en los que los pigmentos son más acusados, de manera que sólo el 12% del EPA total se perdería.

3.1.2.- ELECCIÓN DE LA LIPASA MÁS ADECUADA PARA LA HIDRÓLISIS DE ACEITES

3.1.2.1.- Caracterización y elección de las lipasas más adecuadas

Una vez determinadas las condiciones de partida para la hidrólisis enzimática de aceites (triglicéridos) se puede hacer un estudio comparativo del comportamiento de un mayor número de lipasas en unas condiciones de operación comunes. Estas condiciones se eligieron teniendo en cuenta los ensayos realizados previamente con EPAX4510TG. Así, estas hidrólisis se realizaron en ausencia de disolvente, ya que, además de las ventajas de trabajar sin disolvente (menos riesgos, mayor aplicabilidad de los productos obtenidos al mercado farmacéutico o alimentario, etc.), como se muestra en la figura 3.1.2, la adición de disolvente disminuye el grado de hidrólisis. También, en estos experimentos se han empleado 2 g de EPAX4510TG, que es la mayor de las cantidades empleadas en los experimentos previos en condiciones similares. En estos experimentos se ha modificado la intensidad de tratamiento (masa de enzima \times tiempo) entre valores que son del orden de los empleados en los experimentos anteriores y se han ensayado valores superiores para obtener grados de hidrólisis más elevados. Las lipasas de este estudio se seleccionaron teniendo en cuenta el estudio bibliográfico realizado y la experiencia previa y ambos hechos indicaban que con ellas podía obtenerse una gran actividad hidrolítica o alguna especificidad con los PUFAs.

En la tabla 3.1.8 se muestran las lipasas ensayadas, las condiciones y los resultados de estas hidrólisis: porcentajes en peso de cada una de las fracciones lipídicas, proporción de EPA en cada fracción y rendimiento en la recuperación de EPA en la fracción de AGLs. Estos rendimientos también se han representado en la figura 3.1.7 en función de la intensidad de tratamiento. En la tabla 3.1.9 se muestran los factores de concentración del EPA en los AGLs y en los glicéridos parciales. F_{C1} se ha calculado dividiendo el contenido en EPA de los AGLs (C_{EA}) entre el contenido en EPA del aceite de partida (45,0%, tabla 2.4) y F_{C2} se ha calculado dividiendo el contenido en EPA de los glicéridos parciales (C_{EP}) entre dicho contenido en EPA del aceite de partida. Ambos parámetros indican si la enzima presenta alguna especificidad hacia el EPA en esta reacción de hidrólisis.

Tabla 3.1.8.- Hidrólisis enzimática del aceite EPAX4510TG (tabla 2.4) con distintas lipasas modificando el tiempo: fracción en peso y contenido en EPA de cada una de las especies lipídicas y rendimiento de EPA en la fracción de AGLs. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 37 °C y 200 rpm.

Lipasa	Tiempo (h)	Fracciones lipídicas*			Contenido en EPA**			X _{EA} *** (%)
		AGL (%)	PG (%)	TG (%)	AGL (%)	PG (%)	TG (%)	
ACEITE	0	1,7	5,5	92,8	46,2	46,1	41,5	
D	1	25,6	28,3	46,2	34,8	46,7	44,2	20,9
<i>(Rhizopus oryzae)</i>	24	49,5	18,2	32,3	37,7	52,2	41,4	44,9
	100	71,2	3,3	25,4	42,4	51,6	41,8	71,0
M	1	12,4	21,6	66,0	24,3	37,0	40,0	8,1
<i>(Mucor javanicus)</i>	24	36,5	25,9	37,6	38,8	37,3	35,0	38,3
	100	49,2	19,6	31,2	30,4	37,7	37,7	43,9
Lipozyme IM	1	5,0	4,5	90,6	10,0	50,4	38,9	1,3
<i>(Mucor miehei)</i>	24	14,9	14,0	71,1	30,7	36,8	40,1	11,9
	100	20,6	7,1	72,3	30,3	52,7	37,8	16,8
EU-034	1	10,7	17,2	72,1	14,0	38,2	44,5	3,7
<i>(Pseudomonas stutzeri)</i>	2	20,5	22,6	56,9	24,4	42,8	43,1	12,7
	24	34,4	20,0	45,6	33,5	40,4	40,6	30,3
	100	42,7	16,5	40,8	36,7	49,3	47,5	36,3
AK	1,2	23,7	29,9	46,5	22,2	43,5	43,2	13,7
<i>(Pseudomonas fluorescens)</i>	24	49,2	22,1	28,7	31,4	54,7	44,7	38,2
	100	75,2	8,9	15,8	38,9	60,5	44,7	70,2
EU-088	1,3	14,3	34,6	51,2	13,0	43,2	43,5	4,7
<i>(Pseudomonas cepacia)</i>	24	49,6	22,9	27,5	34,3	53,5	43,3	41,4
	100	76,0	9,3	14,6	38,5	57,0	45,2	71,0
OF	1,5	1,7	5,5	92,8	46,2	46,1	41,5	1,8
<i>(Candida rugosa)</i>	24	36,5	25,9	37,6	38,8	37,3	35,0	38,3
	100	47,8	11,0	41,2	48,2	44,2	40,6	51,6
QLM	1,7	17,1	24,4	58,5	10,7	48,3	43,3	4,7
<i>(Alcaligines)</i>	24	51,2	20,0	28,9	25,1	54,0	44,5	35,2
	100	68,5	16,2	15,3	39,5	58,7	44,9	62,3
EU-031	1,8	2,1	13,8	84,1	14,1	39,7	38,3	0,8
<i>(Alcaligines)</i>	24	6,0	12,9	81,1	19,7	40,8	40,8	3,0
	100	15,5	8,1	76,4	12,7	16,3	38,3	6,0

* Porcentaje en peso de cada banda con respecto al total

** Porcentaje en peso de EPA con respecto a ácidos grasos totales en cada banda

AGL Fracción de ácidos grasos libres

PG Fracción de glicéridos parciales

TG Fracción de triglicéridos

X_{EA}*** Rendimientos de EPA recuperado en la fracción de AGLs con respecto al contenido total de este ácido.

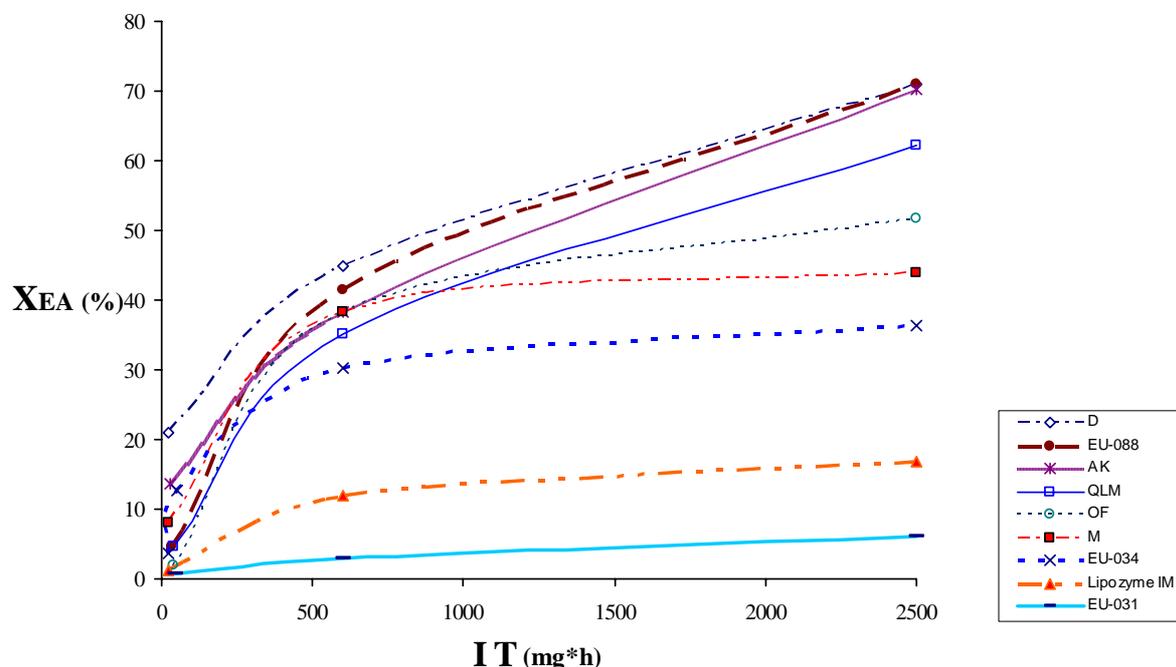
Tabla 3.1.9.- Hidrólisis enzimática del aceite EPAX4510TG (tabla 2.4) con distintas lipasas modificando el tiempo: factores de concentración del EPA, con respecto al contenido inicial del aceite, en la fracción de ácidos grasos libres y en los glicéridos parciales. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 37 °C y 200 rpm.

Lipasa	Tiempo (h)	Factores de concentración	
		F _{C1} *	F _{C2} **
D (<i>Rhizopus oryzae</i>)	1	0,77	1,04
	24	0,84	1,16
	100	0,94	1,15
M (<i>Mucor javanicus</i>)	1	0,54	0,82
	24	0,86	0,83
	100	0,68	0,84
Lipozyme IM (<i>Mucor miehei</i>)	1	0,22	1,12
	24	0,68	0,82
	100	0,67	1,17
EU-034 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	1	0,31	0,85
	2	0,54	0,95
	24	0,75	0,90
AK (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	100	0,82	1,10
	1,2	0,49	0,97
	24	0,70	1,22
EU-088 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	100	0,86	1,34
	1,3	0,29	0,96
	24	0,76	1,19
OF (<i>Candida rugosa</i>)	100	0,86	1,27
	1,5	1,03	1,02
	24	0,86	0,83
QLM (<i>Alcaligines</i>)	100	1,07	0,98
	1,7	0,24	1,07
	24	0,56	1,20
EU-031 (<i>Alcaliginese</i>)	100	0,88	1,30
	1,8	0,31	0,88
	24	0,44	0,91
	100	0,28	0,36

F_{C1}*: factor de concentración del EPA en la fracción de AGLs con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite.

F_{C2}** : factor de concentración del EPA en la fracción de glicéridos parciales con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite.

Figura 3.1.7.- Hidrólisis enzimática de EPAX4510TG con distintas lipasas: influencia del tipo de lipasa y de la intensidad de tratamiento sobre el rendimiento de EPA en la fracción de AGLs.



Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 25 mg de lipasa, 37 °C y 200 rpm.

En la tabla 3.1.8 se observa que las lipasas que han proporcionado los mayores grados de hidrólisis (porcentajes de AGLs) son la lipasa EU-088 de *Pseudomonas cepacia*, la lipasa AK de *P. fluorescens*, la lipasa D de *R. oryzae* y la lipasa QLM de *Alcaligenes sp*, todas ellas con grados de hidrólisis entre el 68 y el 76% a las 100 h de hidrólisis. Con estas mismas lipasas es también con las que se han obtenido los mayores rendimientos en EPA, tal y como se observa en la tabla 3.1.8 y en la figura 3.1.7. Lógicamente todas las lipasas aumentan el grado de hidrólisis y el rendimiento en EPA a medida que aumenta el tiempo o la intensidad de tratamiento. Por lo tanto, estas cuatro lipasas son las más apropiadas para obtener AGLs con alto contenido en EPA.

Con respecto a los factores de concentración (tabla 3.1.9), en primer lugar se observa que los valores de F_{C1} (factores de concentración en los AGLs) son todos menores que la unidad (excepto para la lipasa de *Candida rugosa*), lo que indica que la mayoría de las lipasas ensayadas hidrolizan al EPA a una velocidad menor que la

velocidad media de hidrólisis del resto de los ácidos grasos. Se observa también que los valores de F_{C1} aumentan con el tiempo, tendiendo a la unidad, lo que indica que efectivamente el EPA se hidroliza a menor velocidad, pero que con tiempos suficientemente largos también se hidrolizará. Es decir, que para grados de hidrólisis elevados no hay ninguna selectividad o que para conseguir alguna discriminación hay que parar las reacciones a tiempos cortos lejos del equilibrio. La enzima que parece discriminar más al EPA en la hidrólisis es la QLM de *Alcaligenes*, con un valor de F_{C1} a las 24 h de 0,56 y un grado de hidrólisis del 51,2% (el rendimiento de EPA en los glicéridos es del 65%). También la lipasa EU-031 de *Alcaligenese* parece discriminar el EPA en la hidrólisis, ya que F_{C1} tiene un valor de 0,44 a las 24 h; sin embargo su grado de hidrólisis es tan sólo del 6%, por lo que el EPA permanece en los glicéridos acompañado del resto de los ácidos grasos.

Con respecto a los factores F_{C2} sorprende que en muchos casos no sean mayores que la unidad, teniendo en cuenta que F_{C1} es prácticamente siempre menor que uno. La razón de estos valores reducidos de los factores es la posible oxidación de los PUFAs durante su análisis por CCF, tal y como se indica en el apartado 3.1.1.1.3. En cualquier caso los valores de F_{C2} son siempre mayores a los de F_{C1} , lo que vuelve a poner de manifiesto que efectivamente el EPA se hidroliza a menor velocidad que la mayoría del resto de los ácidos grasos.

Las lipasas que presentan mayores valores de F_{C2} son la QLM, que a las 100 horas presenta un valor de 1,30, EU-088, que a las 100 horas presenta un valor de 1,27, y la lipasa AK que a las 24 y 100 horas presenta valores de 1,22 y 1,34, respectivamente. Ambas lipasas, por tanto, parecen concentrar el EPA en la fracción de glicéridos parciales. Sin embargo, estos valores de F_{C2} no van acompañados de valores de F_{C1} suficientemente pequeños (en todos los casos son mayores de 0,8). Esto significa que el EPA se concentra en los glicéridos parciales (mono y diglicéridos) pero no en el conjunto total de glicéridos. Por lo tanto, si tenemos en cuenta que es difícil separar los glicéridos parciales de los triglicéridos, desde un punto de vista práctico no es demasiado útil que el EPA se concentre sólo en los glicéridos parciales (valores elevados de F_{C2}).

De las nueve lipasas ensayadas, algunas de ellas (Lipozyme IM, EU-034 de *Pseudomonas stutzeri*, EU-088 de *Pseudomonas cepacia*, EU-031 de *Alcaliginese* y QLM de *Alcaligines*) presentan valores de F_{C1} inferiores a 0,35 a una hora de reacción, por lo que puede considerarse que discriminan el EPA a tiempos de reacción cortos. De cualquier forma, la selectividad inicial encontrada vuelve a resultar insuficiente, ya que en este caso los grados de hidrólisis son pequeños y por tanto la mayor parte del EPA queda en los glicéridos acompañados aún por una gran cantidad de otros ácidos grasos. Por tanto, como se ha indicado anteriormente, la optimización de la hidrólisis se debe orientar más hacia la búsqueda de velocidades, grados de hidrólisis y rendimientos elevados de EPA en la fracción de AGLs, de manera que, tal y como describe Shimada y cols. (2001), pueda utilizarse como etapa previa a otras reacciones enzimáticas (de esterificación, por ejemplo).

3.1.2.2. Influencia de la intensidad de tratamiento sobre el grado de hidrólisis con las lipasas más adecuadas

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, las lipasas D de *Rhizopus oryzae*, AK de *Pseudomonas fluorescens*, EU-088 de *Pseudomonas cepacia* y QLM de *Alcaligines sp.* son las que proporcionaron los mayores rendimientos de recuperación de EPA en la fracción de AGLs. Por esta razón, con estas lipasas se ha realizado un estudio aún más completo, con el objetivo de seleccionar la lipasa más adecuada. En este caso se han realizado experimentos modificando los tiempos de reacción y las cantidades de lipasa; de esta manera se ha estudiado la influencia de la intensidad de tratamiento sobre el porcentaje de hidrólisis y sobre el contenido de EPA en la fracción de AGLs.

En la tabla 3.1.10 se muestra la influencia de la intensidad de tratamiento sobre el porcentaje en peso de cada una de las fracciones lipídicas obtenidas, el contenido de EPA en las mismas y el rendimiento de EPA en la fracción de AGLs.

Tabla 3.1.10.- Hidrólisis enzimática de EPAX4510TG (tabla 2.4) con distintas lipasas, modificando la cantidad de lipasa y el tiempo: fracción en peso y contenido en EPA de cada una de las especies lipídicas y rendimiento de EPA en la fracción de AGLs. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C, 200 rpm.

LIPASA	Tiempo (h)	m _z * (mg)	IT** (mg h)	Fracciones lipídicas (%)			Contenido en EPA (%)			X _{EA} (%)
				AGL	PG	TG	AGL	PG	TG	
ACEITE	0	0	0	1,7	5,5	92,8	46,2	46,1	41,5	
D <i>(Rhizopus oryzae)</i>	1	25	25	25,6	28,3	46,2	34,8	46,7	44,2	20,9
	24	25	600	49,5	18,2	32,3	37,7	52,2	41,4	44,9
	24	50	1200	62,7	2,0	35,3	39,2	55,1	39,6	62,0
	48	25	1200	65,5	2,2	32,3	41,0	57,1	41,4	64,8
	100	25	2500	71,2	3,3	25,4	42,4	51,6	41,8	71,0
	150	30	4500	72,4	3,1	24,4	39,4	45,8	43,2	70,5
AK <i>(P. Fluorescens)</i>	1,2	25	29	21,6	30,7	47,7	12,5	43,5	43,2	7,3
	24	25	600	49,2	22,1	28,7	31,4	54,7	44,7	38,2
	24	50	1200	62,2	13,6	24,2	36,1	58,4	44,5	54,6
	48	25	1200	69,5	9,2	21,4	39,6	59,9	44,6	64,7
	100	25	2500	75,2	8,9	15,8	38,9	60,5	44,7	70,2
	150	30	4500	80,1	5,7	14,2	40,8	61,6	44,7	76,8
EU-088 <i>(Pseudomonas cepacia)</i>	1,3	25	33	14,3	34,6	51,2	13,0	43,2	43,5	4,7
	24	25	600	49,6	22,9	27,5	34,3	53,5	43,3	41,4
	24	50	1200	65,9	9,8	24,3	37,5	59,5	42,7	60,4
	48	25	1200	67,3	10,0	22,7	39,3	62,4	43,3	62,2
	100	25	2500	76,0	9,3	14,6	38,5	57,0	45,2	71,0
	150	30	4500	79,8	5,8	14,3	41,6	56,9	45,4	77,2
QLM <i>(Alcaligines)</i>	1,7	25	41	17,1	24,4	58,5	10,7	48,4	43,3	4,9
	24	25	600	41,2	20,0	38,8	25,1	54,0	44,5	26,9
	24	50	1200	56,0	18,3	25,7	32,4	56,4	44,1	45,6
	48	25	1200	57,5	18,0	24,5	34,8	58,8	43,9	48,4
	100	25	2500	68,5	16,2	15,3	39,5	58,7	44,9	62,3
	150	30	4500	70,1	15,9	14,0	37,7	53,7	47,7	63,5

m_z* cantidad de lipasa añadida

IT** intensidad de tratamiento (cantidad de lipasa × tiempo incubación)

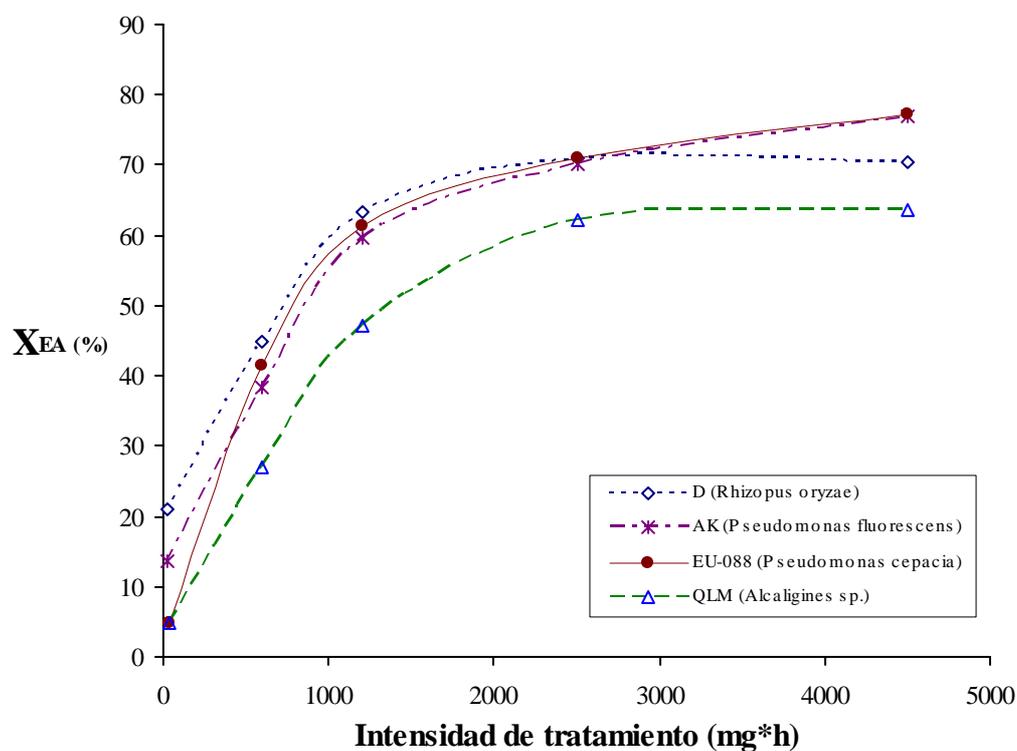
Resto de simbología como en la tabla 3.1.8

Como se observa en esta tabla, con todas las lipasas se han hecho dos experimentos a una intensidad de tratamiento de 1200 mg.h, aunque en cada experimento se han empleado tiempos y cantidades de lipasa distintos, manteniendo constante su producto (50 mg × 24 horas ó 25 mg × 48 horas); con todas las lipasas (excepto con la lipasa AK de *P. fluorescens*) en ambos experimentos se han obtenido grados de hidrólisis (porcentajes de AGLs) y rendimientos en EPA similares. Este resultado vuelve a confirmar de nuevo que efectivamente el tiempo y la cantidad de enzima son magnitudes equivalentes si no ocurre desnaturalización de la enzima y que el producto (masa de enzima × tiempo de reacción) representa la intensidad de tratamiento.

En esta tabla se observa que, para todas las lipasas, tanto el grado de hidrólisis (porcentaje de AGLs) como el rendimiento de EPA en la fracción de AGLs aumentan con la intensidad de tratamiento, aunque lo hace a menor velocidad conforme va reduciéndose la fracción de glicéridos.

Los rendimientos de EPA en la fracción de AGLs (X_{EA}) se han representado en la figura 3.1.8 y en ella se observa que, si bien la diferencia es pequeña, son las lipasas AK y EU-088 las que proporcionan mayores rendimientos en EPA (alrededor del 77%) a intensidades de tratamiento elevadas (4500 mg de lipasa × hora).

Figura 3.1.8.- Hidrólisis de EPAX4510TG con diferentes lipasas: influencia de la intensidad de tratamiento sobre el rendimiento de EPA en la fracción de ácidos grasos libres.



Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C, 200 rpm.

Con el objetivo de volver a comprobar la posible selectividad de estas lipasas hacia el EPA, se han calculado los factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y en los glicéridos parciales, con respecto al contenido inicial de este PUFA en el aceite; estos factores se muestran en la tabla 3.1.11.

Tabla 3.1.11.- Hidrólisis enzimática de EPAX4510TG (tabla 2.4) con distintas lipasas modificando el tiempo y la cantidad de enzima: factores de concentración de EPA en la fracción de AGLs y en los glicéridos parciales con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Condiciones de operación: 2 g de EPAX4510TG, relación aceite/agua 1:1 p/p, 37° C, 200 rpm.

Lipasa	Intensidad de tratamiento (mg * h)	Factores de concentración	
		F _{C1}	F _{C2}
D (<i>Rhizopus</i>)	25	0,77	1,04
	600	0,84	1,16
	1200	0,89	1,25
	2500	0,94	1,15
	4500	0,88	1,02
AK (<i>P. Fluorescens</i>)	29	0,49	0,97
	600	0,70	1,22
	1200	0,84	1,31
	2500	0,86	1,34
	4500	0,91	1,37
EU-088 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	33	0,29	0,96
	600	0,76	1,19
	1200	0,85	1,36
	2500	0,86	1,27
	4500	0,93	1,26
QLM (<i>Alcaligines</i>)	41	0,24	1,07
	600	0,56	1,20
	1200	0,75	1,28
	2500	0,88	1,30
	4500	0,84	1,19

Simbología como en las tablas 3.1.9 y 3.1.10

De nuevo se observa que los factores de concentración en AGLs (F_{C1}) están muy próximos a la unidad y tienden a uno a medida que aumenta la intensidad de tratamiento. Sólo para las intensidades de tratamiento más pequeñas tienen valores muy inferiores a uno, pero en estos casos también son pequeños los grados de hidrólisis, por lo que no se consigue una concentración significativa del EPA en los glicéridos. En este caso sí que se observa que mientras que los valores de F_{C1} son inferiores a uno, los valores de F_{C2} son mayores que uno lo que significa que el EPA se desconcentra en los AGLs para concentrarse en los glicéridos parciales.

En la tabla 3.1.10 y en la figura 3.1.8 se observaba que los rendimientos de recuperación de EPA aumentan a medida que aumenta la intensidad de tratamiento, es decir, a medida que aumenta el grado de hidrólisis, aunque este incremento se hace menor para intensidades de tratamiento elevadas. A bajas intensidades de tratamiento los rendimientos de recuperación de EPA son inferiores a los grados de hidrólisis, pero a medida que aumenta la intensidad de tratamiento ambas magnitudes se van haciendo más semejantes hasta llegar a coincidir cuando los factores de concentración tienden a la unidad.

Considerando fundamentalmente los resultados obtenidos (fracción de AGLs y rendimientos en EPA en esa fracción) con cada una de las lipasas seleccionadas que se muestran en la tabla 3.1.10, se seleccionó la lipasa AK de *P. fluorescens* para continuar el estudio de la hidrólisis enzimática del aceite EPAX4510TG. Esta lipasa es la que proporcionó mayores grados de hidrólisis y rendimientos en la recuperación de EPA (80% y 77% respectivamente a 4500 mg de lipasa × hora de reacción), aunque con la lipasa EU-088 de *Pseudomonas cepacia* los resultados fueron similares. También con ambas lipasas se obtuvieron velocidades de reacción prácticamente idénticas (figura 3.1.8).

3.1.3.- OBTENCIÓN DE LAS CONDICIONES DE HIDRÓLISIS ÓPTIMAS PARA LA LIPASA AK DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Una vez seleccionada la lipasa que proporciona los mayores grados de hidrólisis se planificaron experimentos para optimizar sus condiciones de operación. Se ha estudiado la influencia de la temperatura, de la relación aceite/agua y de la intensidad de tratamiento.

3.1.3.1.- Optimización de la relación entre sustratos

En primer lugar se modificó la relación agua/aceite para intentar aumentar el grado de hidrólisis. Esta relación influirá lógicamente sobre el grado de hidrólisis puesto que un exceso de agua debe desplazar el equilibrio de la hidrólisis hacia la formación de AGLs pero su cantidad no debe ser excesiva ya que, por ejemplo, puede darse cierta aglomeración de las enzimas en el seno del disolvente orgánico.

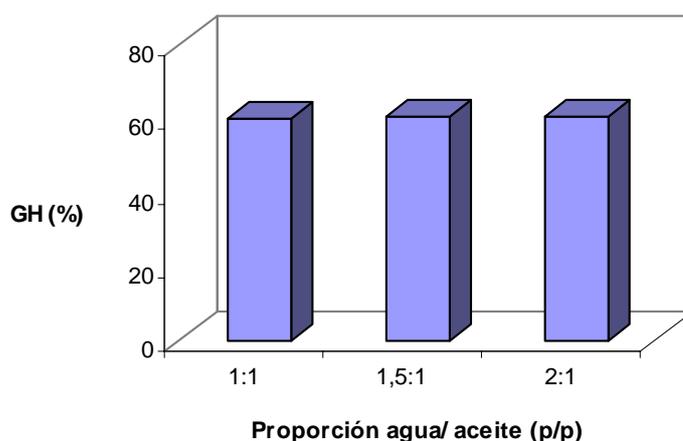
En la tabla 3.1.12 se muestran los porcentajes en peso de cada una de las fracciones lipídicas y la proporción de EPA en las mismas obtenidos en la hidrólisis de EPAX4510TG con lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* a distintas relaciones agua/aceite. Los grados de hidrólisis (porcentajes de AGLs) obtenidos a las distintas relaciones agua/aceite ensayadas se han representado en la figura 3.1.9.

Tabla 3.1.12.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* modificando la relación agua/aceite: fracción en peso y contenido en EPA de cada una de las especies lipídicas y rendimientos de EPA en la fracción de AGLs. Condiciones de operación: 2 g de aceite, 50 mg de lipasa, 24 h de reacción, 200 rpm y 37 °C.

Relación agua/aceite (p/p)	Fracciones lipídicas (%)			Contenido en EPA (%)			X_{EA} (%)
	AGL	PG	TG	AGL	PG	TG	
ACEITE	1,7	5,5	92,8	46,2	46,1	41,5	
1	59,6	13,4	27,0	34,9	58,2	44,8	51,1
1,5	60,3	14,9	24,8	36,0	55,3	44,9	52,8
2	60,3	14,7	24,9	35,8	57,6	44,9	52,3

Simbología como en la tabla 3.1.8

Figura 3.1.9.- Hidrólisis de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la relación agua/aceite sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 2 g de aceite, 50 mg de lipasa, 24 h de reacción, 200 rpm y 37 °C.

En la tabla 3.1.12 y en la figura 3.1.9 se observa que, en el rango analizado, la relación agua/aceite prácticamente no influye sobre el grado de hidrólisis. También en la tabla 3.1.12 se observa que el rendimiento en EPA no depende de esta variable. Una relación agua/aceite igual a uno en peso supone una relación molar superior a 50, por lo que si la relación estequiométrica agua/aceite es igual a 3, se está operando con una relación casi 17 veces superior a la estequiométrica; es decir que la relación agua/aceite ensayada más pequeña ya supone un gran exceso de agua. Por otra parte, se ha observado experimentalmente que una cantidad de agua excesiva (relaciones molares agua/aceite superiores a uno) da lugar a cierta aglomeración de la enzima en el seno del disolvente, lo que quizás podría estar relacionado con el hecho de que el grado de hidrólisis no aumente por encima del 60% obtenido.

En la tabla 3.1.13 se muestran los factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y de glicéridos parciales formados (PGs) con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Los valores de F_{C1} y F_{C2} son de nuevo respectivamente menores y mayores que uno, lo que indica de nuevo que la velocidad de hidrólisis del EPA es menor que la del resto de los ácidos grasos y pone de manifiesto cierta selectividad de la lipasa con respecto al EPA. Sin embargo esta selectividad es insuficiente para utilizar la hidrólisis como medio de concentrar EPA en la fracción de glicéridos, como ponen de manifiesto los altos rendimientos en EPA obtenidos en la fracción de AGLs (tabla 3.1.12).

Tabla 3.1.13.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* modificando la relación agua/aceite: factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y de PGs con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Condiciones de operación: 2 g de aceite, 50 mg de lipasa, 24 h de reacción, 200 rpm y 37 °C.

Agua/aceite (p/p)	PARÁMETROS		
	X_A * (%)	F_{C1}	F_{C2}
1	59,6	0,77	1,29
1,5	60,3	0,80	1,23
2	60,3	0,79	1,28

X_A * Porcentaje de AGLs sobre AGs totales después de hidrólisis evaluado por CCF (tabla 3.1.12)

Resto de simbología como en la tabla 3.1.9

3.1.3.2.- Optimización de la temperatura

También se modificó la temperatura de operación con el objetivo de buscar una temperatura a la que aumentara la actividad enzimática y por tanto el grado de hidrólisis. En líneas generales, cada lipasa presenta un rango óptimo de temperaturas que suele indicar el suministrador. En este trabajo los experimentos para la selección de la lipasa más adecuada se han realizado a una única temperatura de 37 °C para todas las lipasas, que es una temperatura que está comprendida dentro del intervalo óptimo de todas las enzimas ensayadas. El intervalo de temperaturas óptimo de la lipasa AK de *P. fluorescens* es 35-60°C. Para hacer esta optimización se han realizado nuevos ensayos a las temperaturas de 40 y 45°C. No se han ensayado temperaturas más altas porque no interesa trabajar a temperaturas a las que pueden ser importantes procesos como la oxidación de los PUFAs y las pérdidas de disolvente inflamable.

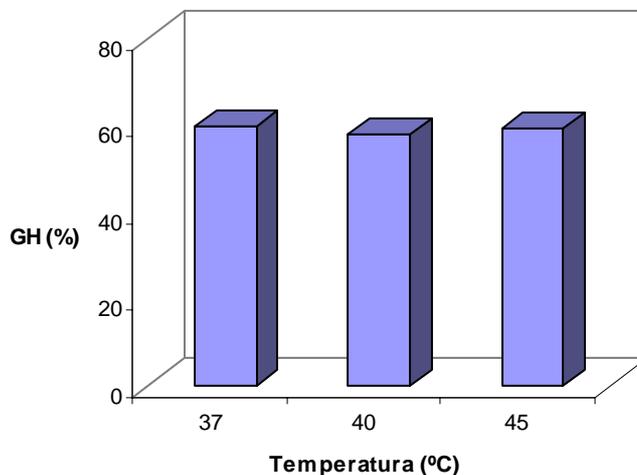
Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1.14, y en la figura 3.1.10 se han representado los grados de hidrólisis alcanzados a las tres temperaturas ensayadas.

Tabla 3.1.14.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* modificando la temperatura: fracción en peso y contenido en EPA de cada una de las especies lipídicas y rendimientos de EPA en la fracción de AGLs. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 50 mg de lipasa, 24 h y 200 rpm.

T ^a (°C)	Fracciones lipídicas (%)			Contenido en EPA (%)			X _{EA} (%)
	AGL	PG	TG	AGL	PG	TG	
ACEITE	1,7	5,5	92,8	46,2	46,1	41,5	-
37	59,6	13,4	27,0	34,9	58,2	44,8	51,1
40	58,1	16,1	25,8	37,9	59,2	47,9	50,2
45	59,5	16,0	24,5	38,4	59,3	47,7	51,8

Simbología como en la tabla 3.1.8

Figura 3.1.10.- Hidrólisis de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la temperatura sobre el grado de hidrólisis (GH).



Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 50 mg de lipasa, 24 h y 200 rpm.

En la figura 3.1.10 se observa que el grado de hidrólisis no se modifica apreciablemente al aumentar la temperatura hasta 45°C, por lo que no representa ninguna ventaja operar a temperaturas por encima de 37 °C. También en la tabla 3.1.14 se observa que los rendimientos en EPA prácticamente permanecen constantes en el intervalo de temperaturas ensayado. Estos resultados indican que para este rango de temperaturas la actividad de la lipasa AK prácticamente permanece inalterada.

En la tabla 3.1.15 se muestran los factores de concentración de EPA en la fracción de AGLs y de PGs formados con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Se observa que tampoco la modificación de la temperatura aporta cambios de selectividad a la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 3.1.15.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* variando la temperatura: factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y de PGs formados con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 50 mg de lipasa, 24 h y 200 rpm.

T (°C)	PARÁMETROS		
	X _A (%)	F _{C1}	F _{C2}
37	59,6	0,83	1,29
40	58,1	0,84	1,31
45	59,5	0,85	1,32

Simbología como en la tabla 3.1.9.

3.1.3.3.- Intensidad de tratamiento

Finalmente se ha estudiado más profundamente la influencia de la intensidad de tratamiento (producto de la cantidad de lipasa por el tiempo de incubación) sobre el grado de hidrólisis. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1.16.

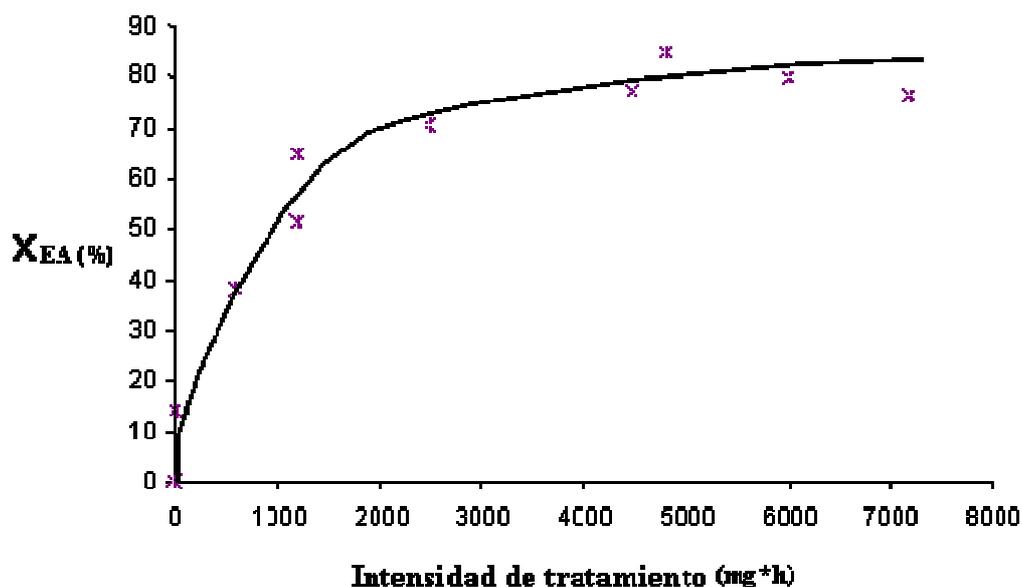
Tabla 3.1.16.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* modificando la intensidad de tratamiento (tiempo × cantidad de lipasa): fracción en peso y contenido en EPA de cada una de las especies lipídicas y rendimientos de EPA en la fracción de AGLs. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 200 rpm y 37 °C.

Tiempo (h)	m _z (mg)	IT (mg.h)	Fracciones lipídicas (%)			Contenido en EPA (%)			X _{EA} (%)
			AGL	PG	TG	AGL	PG	TG	
0	0	0	2,8	7,5	89,8	48,1	45,3	41,7	0
1,2	25	30	23,7	29,9	46,5	22,2	43,5	43,2	13,7
24	25	600	49,2	22,1	28,7	31,4	54,7	44,7	38,2
24	50	1200	59,6	13,4	27,0	34,9	58,2	44,8	51,1
48	25	1200	69,5	9,2	21,4	39,6	59,9	44,6	64,7
100	25	2500	75,2	8,9	15,8	38,9	60,5	44,7	70,2
150	30	4500	80,1	5,7	14,2	40,8	61,6	44,7	76,8
96	50	4800	82,0	3,9	14,1	43,7	58,1	30,8	84,5
120	50	6000	81,3	5,5	13,1	42,8	54,7	44,8	79,6
144	50	7200	79,1	7,0	13,9	40,8	56,0	44,2	76,2

Simbología como en las tablas 3.1.8 y 3.1.10

En la figura 3.1.11 se ha representado la variación del rendimiento en EPA (en términos de porcentaje de EPA contenido en la fracción de AGLs formados) con la intensidad de tratamiento.

Figura 3.1.11.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre el rendimiento en EPA en la fracción de AGLs obtenidos en la hidrólisis (X_{EA}).



Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 200 rpm y 37 °C.

Para la comparación de las lipasas más interesantes se habían probado intensidades de tratamiento de hasta 4500 mg.h, mientras que aquí se ha llegado hasta intensidades de tratamiento de 7200 mg.h con el objetivo de intentar aumentar el grado de hidrólisis. Sin embargo el grado de hidrólisis máximo alcanzado ha sido de un 81% (tabla 3.1.16), semejante al ya obtenido con una intensidad de tratamiento de 4500 mg.h. También se ha comprobado que el rendimiento en EPA permanece constante en torno al 79% a partir de intensidades de tratamiento de 4500 mg.h, por lo que no es necesario alcanzar mayores intensidades de tratamiento.

En la tabla 3.1.17 se muestran los factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y de PGs. Se observa que la lipasa AK de *P. fluorescens*, con rendimientos de recuperación altos, no concentra suficientemente el EPA en los

glicéridos totales (los valores de F_{C1} no son suficientemente pequeños), aunque sí lo haga en la fracción de glicéridos parciales (valores de F_{C2} de 1,44 y 1,47). Este resultado, como ya se ha comentado anteriormente, no es demasiado valioso desde un punto de vista práctico, debido a la dificultad de separar los glicéridos parciales de los triglicéridos.

Tabla 3.1.17.- Hidrólisis de EPAX4510TG (tabla 2.4) con la lipasa AK de *P. fluorescens* modificando la intensidad de tratamiento (tiempo \times cantidad de lipasa): factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs y de PGs formados con respecto al contenido inicial de EPA en el aceite. Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, 200 rpm y 37 °C.

IT (mg.h)	PARÁMETROS		
	GH (%)	F_{C1}	F_{C2}
30	23,7	0,49	0,97
600	49,2	0,70	1,22
1200*	59,6	0,77	1,29
1200**	69,5	0,88	1,33
2500	75,2	0,86	1,34
4500	80,1	0,91	1,37
4800	82,0	0,97	1,29
6000	81,3	0,95	1,21
7200	79,1	0,91	1,24

IT: * 24 h \times 50 mg ; ** 48 h \times 25 mg
Resto de simbología igual que en la tabla 3.1.9.

3.1.4.- CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS DE TRIGLICÉRIDOS DEL EPAX4510TG

Para un triglicérido heterogéneo es difícil aplicar un modelo cinético basado en el mecanismo de la reacción debido a la gran variedad de ácidos grasos presentes y a que cada uno de ellos puede tener velocidades de hidrólisis distintas. Sin embargo podemos obtener valores representativos de la constante cinética global de hidrólisis, k_{HA} , y de la constante cinética de hidrólisis para el EPA, k_{HE} , (o para cualquier otro ácido de interés), suponiendo que la velocidad de hidrólisis es proporcional al alejamiento del equilibrio (fuerza impulsora) en la forma:

$$r_{HA} = k_{HA}(Y_{Ae} - Y_A) \quad [3.1.1]$$

$$r_{HE} = k_{HE}(Y_{EAe} - Y_{EA}) \quad [3.1.2]$$

donde Y_A es la fracción molar de AGLs en disolución (inicialmente presentes en los triglicéridos de EPAX4510TG) con respecto a los ácidos grasos totales (libres y esterificados) y Y_{EA} es la fracción molar de EPA libre en cualquier instante con respecto al EPA total (libre y esterificado); Y_{Ae} y Y_{EAe} son los valores de las dos fracciones molares anteriores en el equilibrio y r_{HA} y r_{HE} son, respectivamente, las velocidades de hidrólisis global y la velocidad de hidrólisis del EPA: moles de ácidos grasos liberados (o de EPA liberado) por unidad de tiempo y unidad de masa de lipasa (moles/(h mg)).

Todas las reacciones de hidrólisis se han llevado a cabo en matraces equivalentes a tanques agitados con las lipasas dispersas. Realizando balances máxicos de AGLs, A, y de EPA libre, E, a un instante de tiempo dt se tendrá

$$r_{HA} m_z = V \frac{d[A]}{dt} \quad [3.1.3]$$

$$r_{HE} m_z = V \frac{d[E]}{dt} \quad [3.1.4]$$

donde m_z es la masa de lipasa contenida en el tanque agitado (mg), V es el volumen de reacción, $[A]$ es la concentración de AGLs en la mezcla reaccionante y $[E]$ es la concentración de EPA.

Experimentalmente se han determinado las fracciones molares de AGLs con respecto a los ácidos grasos totales (y/o grupos acilo), Y_A . La concentración de ácidos grasos (y grupos acilo) totales será igual a la concentración de ácidos grasos iniciales (grupos acilo), es decir tres veces la concentración de triglicéridos iniciales ($3[TG]_0$). La relación entre esta fracción molar y la concentración de AGLs será:

$$Y_A = \frac{[A]}{3[TG]_0}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = 3[TG]_0 \frac{dY_A}{dt} \quad [3.1.5]$$

de forma similar, y con respecto al EPA, se tendrá

$$Y_{EA} = \frac{[E]}{3[TG]_0 Y_{ET0}}$$

$$\frac{d[E]}{dt} = 3[TG]_0 Y_{ET0} \frac{dY_{EA}}{dt} \quad [3.1.6]$$

donde Y_{ET0} es la fracción molar de EPA en los triglicéridos iniciales del EPAX4510TG. Sustituyendo en [3.1.3] y [3.1.4] las ecuaciones [3.1.5] y [3.1.6] y las expresiones cinéticas [3.1.1] y [3.1.2], se tendrá

$$\frac{dY_A}{dt} = \frac{k_{HA} m_z}{3[TG]_0 V} (Y_{Ae} - Y_A) \quad [3.1.7]$$

$$\frac{dY_{EA}}{dt} = \frac{k_{HE} m_z}{3[TG]_0 Y_{ET0} V} (Y_{EAe} - Y_{EA}) \quad [3.1.8]$$

Estas expresiones relacionan las velocidades con que aumentan las fracciones molares de AGLs totales y de EPA con las variables de operación. Separando variables e integrando entre $t = 0$ (donde $Y_A = Y_{A0}$ y $Y_{EA} = Y_{EA0}$) y $t = t$, se tendrá

$$Y_A = Y_{Ae} - (Y_{Ae} - Y_{A0}) \exp\left(-\frac{k_{HA} m_z t}{3[TG]_0 V}\right) \quad [3.1.9]$$

$$Y_{EA} = Y_{EAe} - (Y_{EAe} - Y_{EA0}) \exp\left(-\frac{k_{HE} m_z t}{3[TG]_0 Y_{ET0} V}\right) \quad [3.1.10]$$

donde Y_{A0} y Y_{EA0} son las fracciones molares iniciales de AGLs totales y de EPA, respectivamente. Estas expresiones representan la variación con el tiempo de las fracciones molares de AGLs y de EPA en un reactor discontinuo mezcla perfecta. Ponen claramente de manifiesto que la variable intensiva que determina el grado de hidrólisis es el producto de la masa de enzima por el tiempo por cada mol de triglicérido inicial (relación $m_{zt}/[TG]_0V$).

En la tabla 3.1.17 se muestran las fracciones molares de AGLs totales y de EPA obtenidos con todas las lipasas con las que se obtuvieron grados de hidrólisis apreciables. Las fracciones molares de AGLs (Y_A) se han obtenido a partir de los porcentajes en peso de AGLs, de PGs y de TGs que se muestran en las tablas 3.1.10 y 3.1.16 mediante la ecuación [3.1.11].

$$Y_A = \frac{X_A \times PM_A}{X_A \times PM_A + X_{PG} \times PM_{PG} + X_{TG} \times PM_{TG}} \times 100 \quad [3.1.11]$$

donde X_A , X_{PG} y X_{TG} son las fracciones másicas de AGLs, PGs y TGs respectivamente y los PM_A , PM_{PG} y PM_{TG} son los pesos moleculares medios de los ácidos grasos contenidos en cada una de estas fracciones. Estos pesos moleculares medios se han podido calcular porque se conocen los perfiles en ácidos grasos de cada una de las fracciones. Las fracciones molares de EPA (Y_{EA}) coinciden con los rendimientos en EPA ya calculados.

Tabla 3.1.17.- Hidrólisis enzimática de EPAX4510TG con distintas lipasas modificando la intensidad de tratamiento ($m_z t$): fracciones molares de AGLs con respecto a los ácidos grasos totales, Y_A , y sobre las fracciones molares de EPA libre con respecto al EPA total (rendimiento en EPA, Y_{EA}). Condiciones de operación: 2 g de aceite, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C y 200 rpm.

Lipasa	t (h)	m_z (mg)	$m_z t$ (mg h)	X_A * (% peso)	Y_A ** (% molar)	Y_{EA} *** (%)
D (<i>Rhizopus</i>)	0	0	0	1,7	1,6	0
	1	25	25	25,6	25,3	20,9
	24	25	600	49,5	49,2	44,9
	24	50	1200	62,7	62,5	62,0
	48	25	1200	65,5	65,3	64,8
	100	25	2500	71,2	71,0	71,0
	150	30	4500	72,4	72,3	70,5
AK (<i>P. Fluorescens</i>)	0	0	0	2,8	2,7	0
	1,2	25	30	21,6	21,0	13,7
	24	25	600	49,2	48,8	38,2
	48	25	1200	69,5	69,3	64,7
	24	50	1200	59,6	59,3	51,1
	100	25	2500	75,2	75,1	70,2
	150	30	4500	80,1	80,0	76,8
	96	50	4800	82,0	81,2	84,5
	120	50	6000	81,3	81,2	79,6
144	50	7200	79,1	78,9	76,2	
EU-088 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	0	0	0	1,7	1,6	0
	1,3	25	33	14,3	13,9	4,7
	24	25	600	49,6	49,3	41,4
	24	50	1200	65,9	65,7	60,4
	48	25	1200	67,3	67,1	62,2
	100	25	2500	76,0	76,2	71,0
	150	30	4500	79,8	79,8	77,2
QLM (<i>Alcaligines</i>)	0	0	0	1,7	1,6	0
	1,7	25	41	17,1	16,5	4,9
	24	25	600	41,2	40,7	26,9
	24	50	1200	56,0	55,7	45,6
	48	25	1200	57,5	57,2	48,4
	100	25	2500	68,5	68,3	62,3
150	30	4500	70,1	69,9	63,5	

* Porcentaje en peso de AGLs con respecto a los ácidos grasos totales tras la hidrólisis.

** Porcentaje en moles de AGLs con respecto a los ácidos grasos totales tras la hidrólisis.

*** Fracción molar de EPA en los AGLs con respecto al EPA total (presente en los AGLs y en los glicéridos), que coincide con el rendimiento en EPA en la fracción de AGLs con respecto al contenido de EPA total en el aceite.

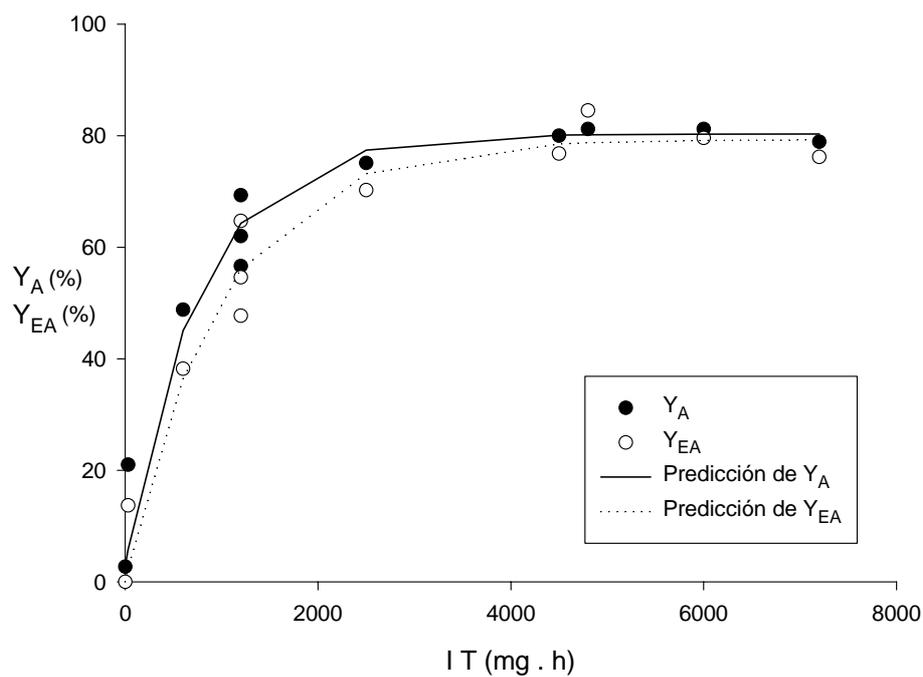
Los resultados experimentales correspondientes a los ácidos grasos totales y al EPA que se muestran en la tabla 3.1.17 se han ajustado a las ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10], respectivamente, en la forma:

$$Y_A = Y_{Ae} - (Y_{Ae} - Y_{A0}) \exp(-a_A m_z t) \quad [3.1.12]$$

$$Y_{EA} = Y_{EAe} - (Y_{EAe} - Y_{EA0}) \exp(-a_{EA} m_z t) \quad [3.1.13]$$

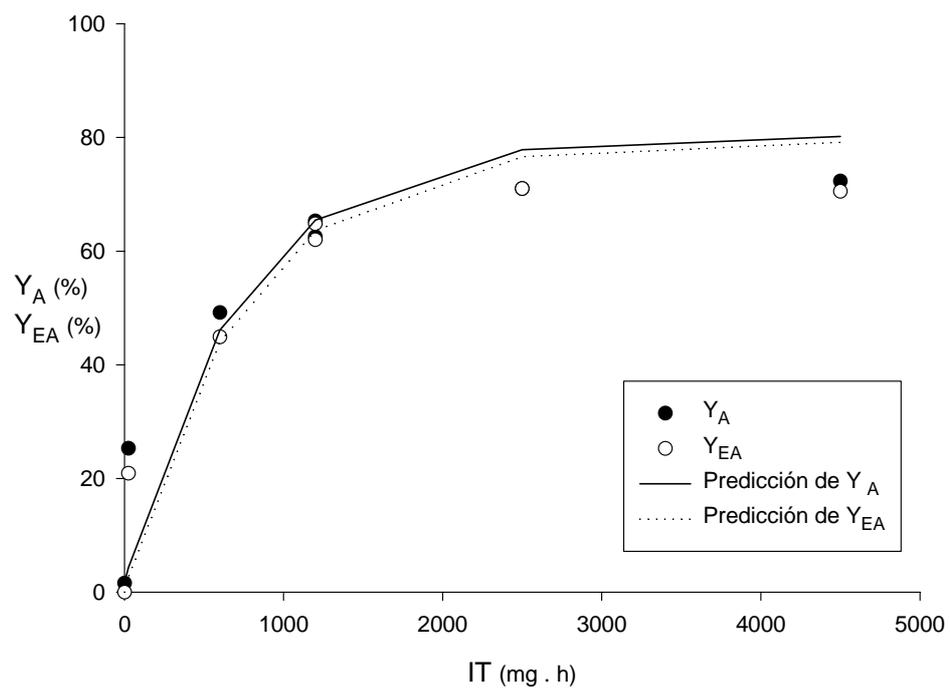
determinándose los valores de a_A y a_{EA} que hacen mínima la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los valores experimentales y los valores de Y_A y Y_{EA} calculados mediante las ecuaciones [3.1.12] y [3.1.13]. En las figuras 3.1.12 a 3.1.15 se muestran los resultados de estos ajustes. Para todas las lipasas se ha impuesto un grado de hidrólisis de equilibrio para los ácidos grasos totales (Y_{Ae}) del 80,3% y del 79,3% para el EPA (Y_{EAe}), ya que estos son los máximos valores obtenidos con la lipasa AK, y estos valores de equilibrio deben ser independientes de la lipasa empleada. Se observa que el modelo reproduce aceptablemente todos los resultados experimentales, sobre todo los obtenidos con las lipasas AK y EU-088, que es con las que se han obtenido grados de hidrólisis más elevados.

Figura 3.1.12.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la lipasa **AK de *P. fluorescens***: influencia de la intensidad de tratamiento (IT, m_zt) en la fracción molar de AGLs (Y_A) y de EPA (Y_{EA}) liberados en la hidrólisis. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10].



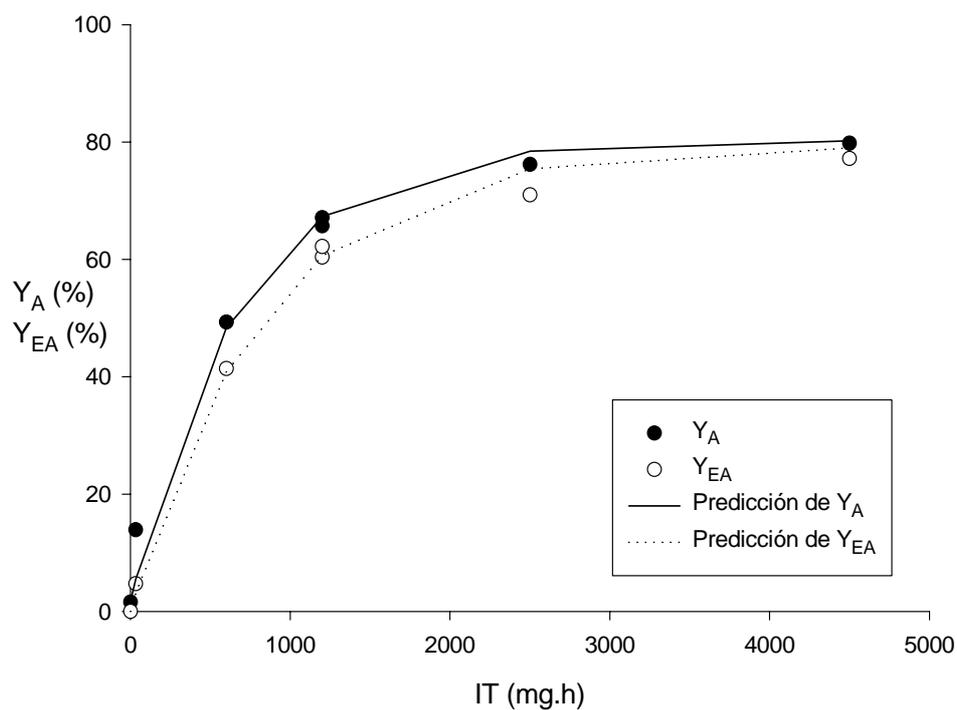
Condiciones de operación: 2 g de EPAX4510TG, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C y 200 rpm.

Figura 3.1.13.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la lipasa **D de R. oryzae**: influencia de la intensidad de tratamiento (IT, m_zt) en la fracción molar de AGLs (Y_A) y de EPA (Y_{EA}) liberados en la hidrólisis. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10].



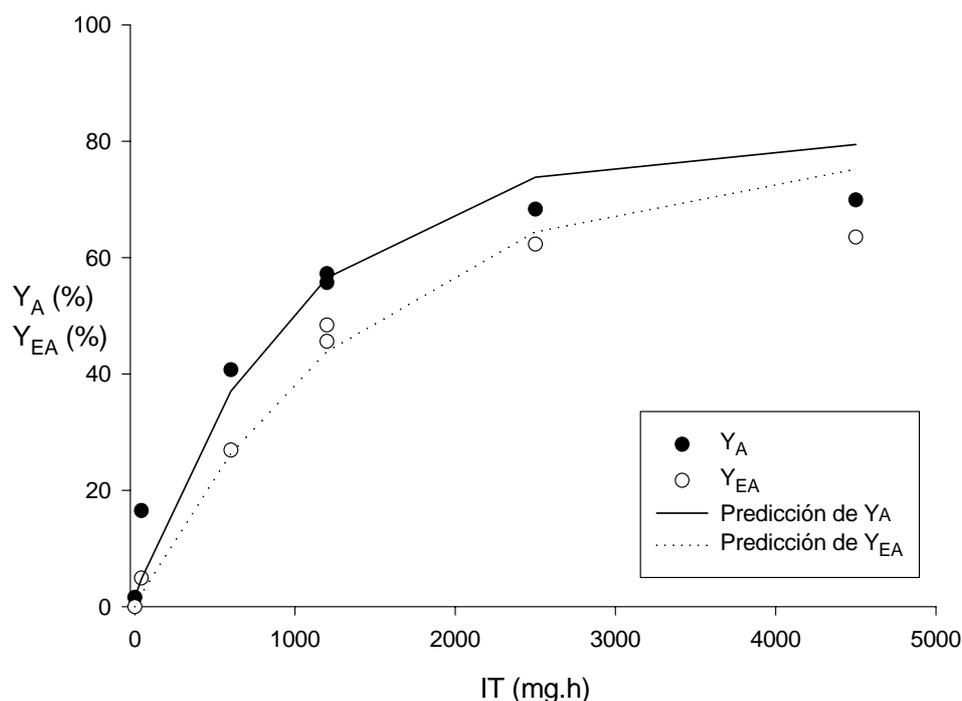
Condiciones de operación: 2 g de EPAX4510TG, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C y 200 rpm.

Figura 3.1.14.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la lipasa **EU-088 de *Pseudomonas cepacia***: influencia de la intensidad de tratamiento (IT , $m_z t$) en la fracción molar de AGLs (Y_A) y de EPA (Y_{EA}) liberados en la hidrólisis. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10].



Condiciones de operación: 2 g de EPAX4510TG, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C y 200 rpm.

Figura 3.1.15.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por la lipasa QLM de *Alcalignes*: influencia de la intensidad de tratamiento (IT, m_zt) en la fracción molar de AGLs (Y_A) y de EPA (Y_{EA}) liberados en la hidrólisis. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10].



Condiciones de operación: 2 g de EPAX4510TG, relación agua/aceite 1:1 p/p, cantidades de lipasa variables, 37° C y 200 rpm.

En la tabla 3.1.18 se muestran los valores de los parámetros a_A y a_{EA} que mejor ajustan estos resultados, así como los valores de las constantes cinéticas calculadas a partir de ellos. En dicha tabla se observa que las lipasas AK, D y EU-088 tienen constantes cinéticas muy parecidas en torno a 9 μ moles de ácidos grasos liberados/(g lipasa \times hora de reacción) y de 3 μ moles de EPA liberado/g de lipasa \times hora de reacción, por lo que el EPA se libera a una velocidad menor que la velocidad media de hidrólisis de todos los ácidos grasos. Este resultado ya se había puesto de manifiesto con los factores de concentración del EPA en los AGLs (casi siempre menores que la unidad) y en los glicéridos residuales, que siempre son algo mayores que la unidad.

Tabla 3.1.18.- Hidrólisis de EPAX4510TG catalizada por las lipasas AK de *P. fluorescens*, D de *R. delemar*, EU-088 de *Pseudomonas cepacia* y QLM de *Alcaligines*: parámetros a_A y a_{EA} que mejor ajustan los resultados experimentales (ecuaciones [3.1.12] y [3.1.13]) y constantes cinéticas aparentes (ecuaciones [3.1.9] y [3.1.10]).

LIPASAS	$a_A = \frac{k_{HA}}{3[TG]_0 V}$	k_{HA}^*	$a_{EA} = \frac{k_{HE}}{3[TG]_0 Y_{ET0} V}$	k_{HE}^{**}
	(mg.h) ⁻¹	(mmol/(g h))	(mg.h) ⁻¹	(mmol/(g h))
AK de <i>P. fluorescens</i>	0,00131	8,392	0,00102	2,940
D de <i>R. delemar</i>	0,00139	8,905	0,00135	3,892
EU-088 de <i>P. cepacia</i>	0,00150	9,609	0,00121	3,488
QLM de <i>Alcaligines</i>	0,000998	6,393	0,000672	1,937

$$k_{HA}^* = a_A \times 3 \times [TG]_0 \times V = a_A \times 3 \times (2 \text{ g} / 936,6 \text{ g/mol}) = 0,00641 a_A$$

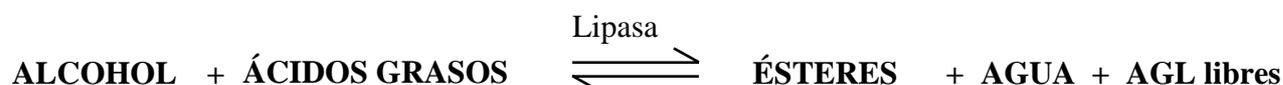
$$k_{HE}^{**} = a_{EA} \times 3 \times [TG]_0 \times V \times Y_{ET0} = a_{EA} \times 3 \times (2 \text{ g} / 936,6 \text{ g/mol}) \times (0,450) = 0,00288 a_{EA}$$

El ajuste de los resultados experimentales al modelo representado por las ecuaciones [3.1.1] y [3.1.2] permite utilizar las ecuaciones [3.1.12] y [3.1.13] para predecir los grados de hidrólisis totales y del EPA que pueden obtenerse a distintas intensidades de tratamiento, lo que puede utilizarse como criterio para el escalamiento de reactores discontinuos mezcla perfecta. Este escalamiento debería hacerse manteniendo constante el parámetro $\frac{m_z t}{[TG]_0 V}$, que representa la intensidad de tratamiento por mol de triglicérido inicial. Esta conclusión debe aplicarse estrictamente en el rango de condiciones experimentales empleadas. Así, es muy importante mantener constantes todas las variables que afectan a la velocidad de reacción para que esta velocidad sea igual en ambas escalas; así, por ejemplo, se deberían mantener inalteradas las condiciones que afectan a la velocidad de transferencia de materia, como la concentración inicial de triglicéridos y la velocidad de agitación.

3.2.- ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA

Como ya se ha indicado, el objetivo último de este trabajo es concentrar el EPA en alguna fracción de lípidos por vía enzimática. Ya se ha puesto de manifiesto que la hidrólisis enzimática de triglicéridos ricos en EPA no conduce a una concentración significativa del EPA. Por lo tanto, a continuación se planificaron una serie de experimentos para tratar de concentrar el EPA esterificando distintos alcoholes con ácidos grasos libres ricos en EPA.

La reacción de esterificación puede esquematizarse de la siguiente manera:



Los AGLs ricos en EPA empleados han sido extractos de ácidos grasos de aceites naturales de origen marino (pescado y algas) y de aceites comerciales. A continuación se describen los resultados obtenidos con cada uno de estos extractos.

3.2.1.- ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE ACEITE DE HÍGADO DE BACALAO (AHB)

En la tabla 3.2.1 se muestra el perfil medio en ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao de partida y de su correspondiente extracto de ácidos grasos libres. Como puede apreciarse, este aceite contiene una elevada proporción de EPA y DHA (del orden del 10% de cada uno).

Tabla 3.2.1.- Perfiles en ácidos grasos (% en peso sobre ácidos grasos totales) del aceite de hígado de bacalao (AHB, tabla 2.2) y del extracto de AGLs obtenido por saponificación alcalina del aceite.

ÁCIDOS GRASOS	ACEITE	EXTRACTO
14:0	3,2	3,1
16:0	10,2	10,0
16:1n7	7,7	7,5
16:2n4	0,5	0,4
16:3n4	0,3	0,1
16:4n1	0,4	0,0
18:0	2,4	2,3
18:1n9	15,6	17,0
18:1n7	5,5	6,1
18:2n6	1,3	1,4
18:3n3	0,6	0,7
18:4n3	1,6	1,7
20:1n9	13,2	13,3
20:4n6	0,4	0,4
20:4n3	0,7	0,7
20:5n3 (EPA)	9,7	10,1
22:1n9	9,8	9,8
21:5n3	0,5	0,5
22:5n3	1,3	1,3
22:6n3 (DHA)	11,4	11,5
Otros	3,8	1,8
RENDIMIENTO (%)		94

RENDIMIENTO: porcentaje de ácidos grasos recuperados en el extracto de AGLs con respecto a los contenidos en el aceite inicial.

ACEITE: perfil en ácidos grasos del AHB

EXTRACTO: perfil en ácidos grasos del extracto de AGLs del AHB

Para la esterificación de este extracto de ácidos grasos se utilizaron, en principio, dos **lipasas** cuya actividad ya había sido contrastada en los ensayos preliminares de hidrólisis: la lipasa D de *Rhizopus oryzae* y la lipasa M de *Mucor javanicus*. En el caso de la D, en trabajos previos (Gonzalez Moreno, 2004) también se había comprobado su alta actividad frente a la esterificación y con ambas lipasas se esperaba algún comportamiento específico por el EPA y/o el DHA en dicha reacción.

Para establecer las **condiciones de partida** se ha utilizado como referencia el trabajo de Shimada y cols. (1997b) de esterificación de AGLs procedentes de la

hidrólisis de aceite de atún con la lipasa de *Rhizopus delemar*. Las condiciones de partida elegidas fueron:

- 4 g de una mezcla de extracto de AGLs de AHB y alcohol, en relación 1:2 mol/mol.
- Con o sin adición de 1 ml de agua.
- Cantidad variable de lipasa no inmovilizada.
- 30°C, 400 rpm, atmósfera inerte, 24 h.

En cada ensayo se ha determinado el grado de esterificación (GE, porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción) por volumetría ácido base (V_{AB}). Mediante estos ensayos se ha determinado el tipo y la cantidad de lipasa más adecuada, la influencia del tipo de alcohol y de la presencia o ausencia de agua.

Para la esterificación se han empleado monoalcoholes líquidos para mayor simplicidad. Se han ensayado etanol 96% v/v, por el interés comercial de los ésteres etílicos formados a partir del mismo y, alcohol láurico que, según Shimada y cols. 2001, proporciona elevados grados de esterificación y selectividad en la purificación de DHA y GLA por vía enzimática. El decanol proporcionaba resultados similares pero es más caro (Shimada y col., 1997).

La posibilidad de añadir agua está motivada porque el agua influye de varias formas: por un lado es un producto de reacción, por lo que desplaza el equilibrio hacia los reactivos, y además puede tener un papel crítico en la aglomeración de las enzimas en el seno de un disolvente orgánico; por otro, las lipasas necesitan una cantidad mínima (variable según el tipo de lipasa) para desempeñar su actividad enzimática y puede jugar un papel importante como “soporte” que da estabilidad a las enzimas añadidas sin inmovilizar. Además, en la esterificación selectiva de extractos de ácidos grasos con alcoholes grasos de cadena larga (como el alcohol láurico) Shimada y cols (1997a,b,c, 1998, 2001) utilizan cantidades muy superiores a dicha cantidad mínima de agua, y realizan las reacciones de esterificación sin eliminar el agua producida durante la reacción.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 3.2.2. En ella se observa que el grado de esterificación obtenido con etanol ha sido bajo (entre el 5 y el 10%) con las dos lipasas ensayadas. Este resultado es semejante al obtenido por Shimada y cols. (1997a).

Tabla 3.2.2.- Esterificación de un extracto de AGLs de AHB con varias lipasas, con dos tipos de alcohol, en presencia o ausencia de agua y con cantidades variables de lipasa (m_2): grados de esterificación (V_{AB}' , determinados por volumetría ácido-base). Condiciones de operación: 4 g de mezcla de reacción en la relación 1:2 mol AGLs/mol alcohol, 30°C, 400 rpm y 24 horas.

ALCOHOL	H ₂ O (ml)	LIPASA -	Masa lipasa (mg)	V _{AB} ' (%)
Etanol	0	D	100	6,2
Etanol	0	M	100	8,8
Dodecanol	0	D	100	13,7
Dodecanol	0	M	100	16,2
Dodecanol	1	M	100	74,9
Dodecanol	1	M	500	78,3
Dodecanol	1	D	100	81,8

V_{AB}': Porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción, determinado por volumetría ácido-base de la mezcla final.

D: lipasa de *Rhizopus oryzae*

M: lipasa de *Mucor javanicus*

Cuando se empleó alcohol láurico (dodecanol), el grado de esterificación obtenido en las mismas condiciones que con etanol fue superior (entre un 13 y un 17%), aunque continuó siendo bajo. Sin embargo, al añadir 1 ml de agua, el GE mejoró sensiblemente, alcanzándose grados de esterificación entre el 74 y el 82%. Esto confirma que los alcoholes grasos de cadena larga necesitan cierta cantidad de agua inicial para esterificar a los ácidos grasos, como ya se ha puesto de manifiesto (Shimada y cols., 1997a). Estos autores explican este fenómeno en base a que la lipasa disuelta en agua se comporta como un micelio reversible en la mezcla de reacción (alcohol láurico y extracto de AGLs). Así, si las cantidades de agua son insuficientes se reduce el contacto de la enzima con los sustratos y se origina una baja reactividad. Además, la adición de cantidades elevadas de agua no es

demasiado perjudicial para el equilibrio de la esterificación, porque los ésteres de los alcoholes de cadena larga son tanto peores sustratos para las lipasas cuanto más larga sea la cadena de los alcoholes de que proceden. Así, aunque el alcohol láurico y los AGLs son buenos sustratos para las lipasas, sus ésteres no lo son y, por tanto, la reacción de esterificación será casi irreversible.

Las esterificaciones que dieron mayores GE fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF) seguida de cromatografía de gases (CG) para determinar los perfiles lipídicos y de ácidos grasos de los productos y éstos se compararon con el perfil del sustrato de partida (Anexo 2, tablas A2.1 – A2.5). Para cada ensayo analizado por CCF-CG se volvieron a calcular los GE como la media aritmética de los resultados obtenidos por CCF y por volumetría ácido-base (V_{AB} ').

El extracto de ácidos grasos de AHB es rico en EPA y DHA, por lo que esta esterificación podría utilizarse para comprobar si las lipasas empleadas poseen alguna especificidad hacia el EPA y/o el DHA. Para ello se han calculado los factores de concentración (F_C) de cada ácido graso como la relación entre la concentración de EPA o DHA en los AGLs que quedan sin esterificar y la concentración de EPA o DHA en el extracto de AGLs inicial. Este valor se ha calculado como la media aritmética entre el factor de concentración F_{C1} , obtenido directamente a partir del análisis (por CCF seguida de CG) de la fracción de AGLs y el factor de concentración F'_{C1} , obtenido mediante el balance de materia realizado a partir del análisis (por CCF seguida de CG) de la fracción de ésteres láuricos formados. Haciendo la media de los dos se obtiene un dato procedente de dos análisis independientes (disminución del error analítico) y compensamos los efectos de la posible mayor oxidación de los PUFAs en los AGLs que en los ésteres.

Por un lado, F_{C1} se calculará en la forma

$$F_{C1} = \frac{C_{EA}}{C_{EA0}} \quad [3.2.1]$$

donde C_{EA} es la concentración de cada PUFA (EPA o DHA) en la fracción de los AGLs sin esterificar (porcentaje en peso sobre el AGs totales, obtenido por CCF seguida de CG) y C_{EA0} es la concentración de cada PUFA en el extracto de AGLs inicial (porcentaje en peso sobre el AGs totales, obtenido por CG directa).

Por otro lado, del resultado del balance, F'_{CI} se podrá calcular con la siguiente fórmula:

$$F'_{CI} = \frac{100 - \frac{C_{EL} X_L}{C_{EA0}}}{X_A} \quad [3.2.2]$$

donde X_A es la fracción másica de estos AGLs sin esterificar, C_{EL} es el contenido en cada PUFA en los ésteres láuricos (ELs) formados y X_L es la fracción en peso de estos ELs.

El factor de recuperación (F_R) se define como el porcentaje del ácido graso de interés (EPA o DHA) recuperado en la fracción de AGLs sin esterificar con respecto al contenido del mismo en la mezcla final de AGLs y ELs. Puede calcularse a partir de la ecuación

$$F_R = \frac{C_{EA} X_A}{C_{EA} X_A + C_{EL} X_L} 100 \quad [3.2.3]$$

En la tabla 3.2.3 puede observarse que tanto el factor de concentración del EPA como el del DHA son mayores que la unidad, por lo que ambos PUFAs son discriminados por ambas lipasas en la esterificación, concentrándose ambos en la fracción de AGLs.

Tabla 3.2.3.- Esterificación de un extracto de AGLs de AHB con alcohol láurico y las lipasas D y M modificando la cantidad de lipasa: grados de esterificación (GE), factores de concentración (F_C) y factores de recuperación (F_R) de EPA y DHA. Condiciones de operación: 4 g de mezcla de reacción, relación ácidos grasos libres/alcohol láurico 1:2 mol/mol, 30°C, 400 rpm, 24 horas y 25% de agua en peso con respecto a los sustratos.

LIPASA	m_z (mg)	GE (%)	EPA		DHA	
			F_C	F_R	F_C	F_R
M	100	74,5	1,67	40,0	2,73	86,9
M	500	76,1	1,60	37,9	2,46	72,3
D	100	83,7	2,67	34,3	4,24	66,7

GE: (Grado de esterificación): porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción, calculado como la media aritmética entre los resultados obtenidos por V_{AB} y por CCF de la mezcla final.

F_C : Factor de concentración del EPA en la fracción de AGLs con respecto al contenido en el extracto inicial.

F_R : Porcentaje de EPA en la fracción de AGLs con respecto al total de EPA en la mezcla final

En la tabla 3.2.3 se observa como, para la lipasa M, no mejora el factor de concentración ni el de recuperación al aumentar la cantidad de lipasa.

En esta tabla también se observa que la lipasa D es algo más eficaz que la M para concentrar los PUFAs (DHA y EPA) en la fracción de AGLs, aunque los factores de recuperación son algo menores. Tal y como se observa en la tabla para la misma cantidad de lipasa, mientras que en el ensayo realizado con la lipasa M se obtienen unos factores de concentración de EPA y DHA de 1,7 y 2,7 respectivamente, con una recuperación del en la fracción de ácidos grasos no esterificados, en el ensayo realizado con la lipasa D se han obtenido factores de concentración de 2,67 y 4,24 para el EPA y el DHA, respectivamente. La fracción de AGLs donde se han concentrado estos PUFAs contiene entre el 17 y el 25% de los ácidos grasos totales iniciales, donde el EPA y el DHA contenidos en esta fracción constituyen aproximadamente un 34,3% y un 66,7%, respectivamente, del contenido inicial en estos PUFAs. Los resultados obtenidos para el DHA pueden compararse con los obtenidos por Shimada y cols. (1997a) con *R. delemar* quienes recuperaron el 84% del DHA en el 28% de los ácidos grasos iniciales, aumentando su concentración desde un 23 hasta un 73% sobre ácidos grasos totales. Estos autores obtuvieron un factor de concentración algo menor ($F_C = 3,17$) y una recuperación algo mayor lo que es lógico pues partían de sustratos con un extracto de AGLs de mayor contenido en DHA.

3.2.2.- ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS PROCEDENTES DE EPAX4510TG

Debido a que el objetivo fundamental de este trabajo era concentrar el EPA por vía enzimática en alguna fracción lipídica, a continuación se realizaron experimentos de esterificación enzimática en los que se utilizó como sustrato un extracto de ácidos grasos rico en EPA procedente del aceite comercial EPAX4510TG. En la tabla 3.2.4 se muestra el perfil medio en ácidos grasos del aceite de partida y de su correspondiente extracto de ácidos grasos.

Tabla 3.2.4.- Perfiles en ácidos grasos (% en peso sobre ácidos grasos totales) del aceite EPAX4510TG y del extracto de AGLs obtenido por saponificación alcalina del aceite.

ÁCIDOS GRASOS	ACEITE	EXTRACTO
14:0	0,4	0,0
16:0	4,1	4,1
16:1n7	1,7	1,7
16:4n1	0,5	0,5
18:0	4,6	4,6
18:1n9	8,0	7,8
18:1n7	5,2	5,6
18:2n6	1,0	1,0
18:3n6	0,6	0,6
18:3n3	0,7	0,7
18:4n3	3,4	3,3
20	0,6	0,6
20:1n9	4,0	4,0
20:2n6	0,9	0,9
20:4n6	2,7	2,7
20:4n3	1,7	1,7
20:5n3 (EPA)	43,1	43,1
22:1n9	4,0	4,1
21:5n3	1,4	1,4
22:5n3	2,4	2,4
22:6n3 (DHA)	7,8	7,9
Otros	1,3	1,4
RENDIMIENTO (%)		94

RENDIMIENTO: porcentaje de ácidos grasos recuperados en el extracto de AGLs con respecto a los contenidos en el aceite inicial.

ACEITE: perfil en ácidos grasos del EPAX4510TG

EXTRACTO: perfil en ácidos grasos del extracto de AGLs del EPAX4510TG

Este aceite tiene un perfil en ácidos grasos y un contenido en EPA semejantes al del extracto lipídico de *Phaeodactylum tricornutum*, por lo que es de esperar que los resultados de concentración de EPA obtenidos con él serán aplicables a la concentración de EPA a partir del extracto de AGLs de esta microalga.

Para tratar de concentrar el EPA se **eligieron** las lipasas que, según la bibliografía, presentaban, o bien una alta actividad en reacciones de hidrólisis o esterificación, o bien cierta selectividad hacia los PUFAs en estas reacciones. Estas lipasas fueron: la lipasa M de *Mucor javanicus*, D de *Rhizopus oryzae*, Lipozyme IM (de *Mucor miehei* / *Aspergillus oryzae*), Novozym 435 (de *Candida antarctica* / *Aspergillus oryzae*), EU-034 de *Pseudomonas stutzeri*, AK de *Pseudomonas fluorescens*, EU-093 de *Rhizopus delemar*, OF de *Candida rugosa* y QLM de *Alcaligenes spp.*

También en este caso para establecer las **condiciones de partida** se ha utilizado como referencia el trabajo de Shimada y cols. (1997b), si bien las cantidades de sustratos utilizadas en nuestros ensayos se han reducido 10 veces con respecto a las empleadas por Shimada y cols. (1997b). De esta manera las condiciones óptimas finales que se obtengan con el aceite EPAX4510TG serán aplicables directamente a extractos lipídicos microalgales, de los que siempre se dispone de cantidades pequeñas; lógicamente, también la cantidad de agua añadida se disminuyó en la misma proporción. Sin embargo, puesto que operar con estas cantidades pequeñas era difícil, para aumentar el volumen de reacción se decidió añadir disolvente en la relación 1 ml de n-hexano/100 mg de mezcla de sustratos. La presencia de disolvente también mejorará, como es lógico, la transferencia de materia en la mezcla reaccionante y protegerá a los PUFAs de su posible oxidación. Se elige el n-hexano por su baja toxicidad comparada con otros disolventes orgánicos, su no polaridad y buena capacidad de disolución de grasas y alcoholes y su alta volatilidad (para eliminarlo cuando sea necesario). Shimada y cols. (1997b) expresan la cantidad de lipasa empleada en unidades de actividad, sin embargo, dada la dificultad de reproducir las unidades de actividad expresadas por estos autores en nuestro laboratorio, se optó por añadir una cantidad de lipasa igual al 10% en peso de los sustratos. El rango de temperaturas óptimas recomendado por los fabricantes para todas las lipasas oscila entre 40 y 55 °C, por lo que, para uniformizar y facilitar estos primeros experimentos, todas las lipasas se han ensayado en primer lugar a

estas dos temperaturas extremas. Para comparar los resultados obtenidos con las distintas lipasas ensayadas se empleó un tiempo de 24 horas.

Así pues, la mezcla de reacción contenía: 400 mg de una mezcla de extracto de AGLs procedente de EPAX4510TG y alcohol láurico, en la relación 1:2 mol/mol, diluidos en n-hexano, cantidades variables de diferentes lipasas y 0,1 ml de agua (un 25% en peso de la cantidad de sustratos). Esta mezcla de reacción se incubó a 40 ó 55 °C, agitando a 400 rpm, en atmósfera inerte y durante 24 horas. En la tabla 3.2.5 se muestran los grados de esterificación obtenidos en dichas esterificaciones.

Tabla 3.2.5.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG (tabla 3.2.4) con alcohol láurico utilizando distintas lipasas a dos temperaturas: grados de esterificación (V_{AB}' , determinados por volumetría ácido-base). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de reacción en proporción 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 40 mg de lipasa, 400 rpm, 24 horas, 0,1 ml de agua.

LIPASA	T ^a (°C)	PRESENTACIÓN	V _{AB} ' (%)
M	40	Polvo	38,6
D	40	Polvo	53,5
Lipozyme	40	Inmovilizada	91,2
Novozym 435	40	Inmovilizada	92,1
<i>Pseudomonas</i>	40	Polvo	62,6
AK	40	Polvo	6,4
<i>R. delemar</i>	40	Polvo	70,5
OF	40	Polvo	42,1
QLM	40	Polvo	87,7

M	55	Polvo	59,1
D	55	Polvo	36,5
Lipozyme	55	Inmovilizada	76,6
Novozym 435	55	Inmovilizada	95,3
<i>Pseudomonas</i>	55	Polvo	67,8
AK	55	Polvo	39,2
<i>R. delemar</i>	55	Polvo	77,8
OF	55	Polvo	22,8
QLM	55	Polvo	33,9

V_{AB}' Grado de esterificación (porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción) obtenido por volumetría ácido-base de la mezcla final.

PRESENTACIÓN: inmovilizada o en polvo

Las lipasas que ya vienen inmovilizadas por el fabricante conllevan numerosas ventajas de operación y recuperación de las mismas, por lo que, en caso de que tuvieran selectividad hacia el EPA, serían las preferidas para utilizarlas en la concentración enzimática de este PUFA. En esta tabla se observa que las lipasas inmovilizadas Lipozyme IM (*Mucor miehei* / *Aspergillus oryzae*) y Novozym 435 (*Candida antarctica* / *Aspergillus oryzae*) produjeron grados de esterificación muy altos (superiores al 90%, excepto con Lipozyme IM a 55 °C, que fue del 77%) por lo que, aunque hubiera selectividad hacia el EPA, la mayor parte de este ácido se encontrará en forma de éster láurico y no se recuperará en un porcentaje suficiente en la fracción de AGLs. Así pues se realizaron nuevos experimentos con estas lipasas inmovilizadas en los que se trató de reducir el grado de esterificación reduciendo progresivamente la cantidad de lipasa desde 40 mg hasta 2,5 mg (20, 10, 5 y 2,5 mg). Estos ensayos, independientes ya de los ensayos de comparación de las lipasas, se realizaron sin adición de agua al considerar que las lipasas inmovilizadas no necesitarían el agua para fijar su conformación y que su presencia solo podría formar aglomeraciones innecesarias. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2.6.

Tabla 3.2.6.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por dos lipasas inmovilizadas distintas modificando la cantidad de lipasa: grados de esterificación (V_{AB}' , determinados por volumetría ácido-base). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de reacción en proporción 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 55 °C, 400 rpm, 24 horas, sin adición de agua.

LIPASA	Masa (mg)	V_{AB}' (%)
Lipozyme	20	93,6
Lipozyme	5	93,6
Lipozyme	2,5	82,1
Novozym	20	94,3
Novozym	5	95,0
Novozym	2,5	93,6
Novozym*	5	44,6

* A 40 °C durante 2 horas

V_{AB}' Grado de esterificación (porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción) obtenido por volumetría ácido-base de la mezcla final.

En esta tabla se observa que los grados de esterificación continuaron siendo altos, aun con pequeñas cantidades de lipasas. Así, por ejemplo, con 2,5 mg de Lipozyme se consiguió reducir el grado de esterificación hasta un 82%. La lipasa Novozym 435 dio porcentajes de esterificación superiores al 90%, aun con pequeñas cantidades de lipasa; por esta razón se realizó un experimento (a 40 °C) con sólo 2 horas de tiempo de reacción y 5 mg de lipasa.

Se analizaron los productos de reacción expresando los rendimientos como porcentajes en peso de cada una de las fracciones lipídicas (AGLs y de ésteres) y como proporción de EPA recuperado en cada fracción. Los factores de concentración se calcularon dividiendo el contenido de EPA en los AGLs (F_{C1}) y en los ésteres láuricos (F_{C2}) entre el contenido inicial de EPA en el extracto de ácidos grasos de partida (43,1%, tabla 3.2.4). Sin embargo, tal y como se observa en la tabla 3.2.7, ninguna de estas lipasas presentaba una selectividad apreciable hacia el EPA.

Tabla 3.2.7.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por dos lipasas inmovilizadas distintas: fracciones másicas totales (X_A y X_L), fracciones de EPA (X_{EA} y X_{EL}) y factores de concentración de EPA (F_{C1} y F_{C2}) en las diferentes especies lipídicas (AGLs y ELs). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de reacción en proporción 1:2 mol/mol, 40 mg de lipasa, 4 ml de hexano, 400 rpm y sin adición de agua.

LIPASA	Ácidos grasos libres			Ésteres láuricos		
	X_A	X_{EA}	F_{C1}	X_L	X_{EL}	F_{C2}
Lipozyme ⁽¹⁾	12,1	11,9	1,0	87,9	88,1	1,1
Novozym ⁽²⁾	45,2	47,0	0,9	54,8	53,0	0,9

(1) 2,5 mg, 55 °C y 24 horas

(2) 5 mg, 40 °C y 2 horas

X_A : Tanto por ciento de ácidos grasos con respecto al total de productos.

X_L : Tanto por ciento de ésteres láuricos con respecto al total de productos.

X_{EA} : Tanto por ciento de EPA contenido en los AGLs con respecto al total.

X_{EL} : Tanto por ciento de EPA contenido en los ELs con respecto al total.

F_{C1} : factor de concentración del EPA en la fracción de ácidos grasos libres: relación entre el contenido de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar y el contenido de EPA en el extracto de AGLs inicial.

F_{C2} : factor de concentración del EPA en la fracción de ésteres láuricos: relación entre el contenido de EPA en la fracción de ésteres láuricos y el contenido de EPA en el extracto de ácidos grasos libres inicial.

Como puede observarse en la tabla 3.2.5, las lipasas sin inmovilizar dieron por lo general grados de esterificación menores. En las tablas 3.2.8 y 3.2.9 se muestran los factores de concentración y rendimientos de los ensayos de esterificación que se realizaron con estas lipasas (lipasa M de *Mucor javanicus*, D de *Rhizopus oryzae*, EU-034 de *Pseudomonas stutzeri*, AK de *Pseudomonas fluorescens*, EU-093 de *Rhizopus delemar*, OF de *Candida rugosa* y QLM de *Alcaligines spp*) a 40 °C y 55 °C, respectivamente.

Tabla 3.2.8.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico, catalizada por distintas lipasas sin inmovilizar: fracciones másicas totales (X_A y X_L), fracciones de EPA (X_{EA} y X_{EL}) y factores de concentración de EPA (F_{C1} y F_{C2}) en las diferentes especies lipídicas (AGLs y ELs). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de reacción en proporción 1:2 mol/mol, 40 mg de lipasa, 4 ml de hexano, 40 °C, 400 rpm, 24 horas, 0,1 ml de agua.

LIPASA	Ácidos grasos libres			Ésteres láuricos		
	X_A	X_{EA}	F_{C1}	X_L	X_{EL}	F_{C2}
M	62,2	73,0	1,07	37,8	27,0	0,65
D	47,0	66,7	1,27	53,0	33,3	0,56
<i>P. stutzeri</i>	41,9	52,9	1,18	58,1	47,1	0,75
AK	83,0	90,9	1,14	17,0	9,1	0,56
<i>R. delemar</i>	27,7	38,8	1,30	72,3	61,2	0,78
OF	60,8	70,3	1,14	39,2	29,7	0,74
QLM	9,7	16,5	1,60	90,3	83,5	0,86

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.7.

Tabla 3.2.9.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico, catalizada por distintas lipasas sin inmovilizar: fracciones másicas totales (X_A y X_L), fracciones de EPA (X_{EA} y X_{EL}) y factores de concentración de EPA (F_{C1} y F_{C2}) en las diferentes especies lipídicas (AGLs y ELs). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de reacción en proporción 1:2 mol/mol, 40 mg de lipasa, 4 ml de hexano, **55 °C**, 400 rpm, 24 horas, 0,1 ml de agua.

LIPASA	Ácidos grasos libres			Ésteres láuricos		
	X_A	X_{EA}	F_{C1}	X_L	X_{EL}	F_{C2}
M	46,8	52,4	0,94	53,2	47,6	0,75
D	74,2	83,0	1,11	25,8	17,0	0,65
<i>P. stutzeri</i>	25,2	34,3	1,17	74,8	65,7	0,75
AK	67,6	84,0	1,32	32,4	16,0	0,53
<i>R. delemar</i>	22,5	38,2	1,47	77,5	61,8	0,69
OF	76,6	83,0	1,07	23,4	17,0	0,72
QLM	62,5	68,2	1,04	37,5	31,8	0,81

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.7.

En estas tablas se observa que los mayores factores de concentración del EPA en la fracción de AGLs se alcanzaron, a 40 °C, con las lipasas:

- QLM de *Alcaligines spp* (1,60 en los AGLs y 0,86 en los ELs),
- D de *Rhizopus oryzae* (1,27 en los AGLs y 0,56 en los ELs),
- EU-093 de *Rhizopus delemar* (1,30 en los AGLs y 0,78 en los ELs),

Mientras que a 55 °C los mayores factores de concentración se obtuvieron con las lipasas:

- EU-093 de *Rhizopus delemar* (1,47 en los AGLs y 0,69 en los ELs),
- AK de *Pseudomonas fluorescens* (1,32 en AGLs y 0,53 en ELs)

Además de obtener una concentración de EPA elevada también es importante obtener un alto rendimiento en la recuperación de EPA en la fracción de ácidos grasos libres. Entre las lipasas mencionadas anteriormente que mostraron mayor selectividad hacia el EPA las que proporcionaron mayores rendimientos fueron:

- la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* (84% de EPA recuperado a 55 °C)
- lipasa D de *Rhizopus oryzae* (66,7% de EPA recuperado a 40 °C)

Las demás lipasas dieron rendimientos en EPA inferiores al 50% en la fracción de ácidos grasos libres.

Así, teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron estas tres últimas lipasas para un estudio más detallado de su comportamiento. Se seleccionaron:

- la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*, porque a 55 °C se recupera un 84% del EPA inicial con un factor de concentración de 1,32, lo que permitió obtener un concentrado de EPA del 57% sobre ácidos grasos totales.
- la lipasa D de *Rhizopus oryzae*, que también dio un concentrado de EPA del 55%, con una recuperación del 66,7% (a 40 °C).
- la lipasa EU-093 de *Rhizopus delemar* que, aunque con un rendimiento en la recuperación de EPA del 38,2%, permitió obtener EPA del 63,5% de pureza, a 55 °C.

3.2.3.- ANÁLISIS DE LAS LIPASAS SELECCIONADAS: ELECCIÓN DE LA LIPASA MÁS ADECUADA

Debe tenerse en cuenta que la acil-selectividad es una característica intrínseca de las lipasas. Una lipasa será más o menos acil-selectiva cuando tienda en mayor o menor grado a discriminar o concentrar determinados ácidos grasos. Por tanto, será más selectiva cuanto mantenga su selectividad ante condiciones más adversas y tendrá un comportamiento más selectivo en unas condiciones determinadas cuando sea capaz de concentrar más perdiendo menos cantidad de producto.

En los experimentos anteriores se ha observado que ninguna de las lipasas ensayadas es totalmente selectiva hacia el EPA y además esta selectividad parcial se ha manifestado “discriminando” al EPA en mayor o menor grado cuando es esterificado por el alcohol, es decir, la selectividad hacia el EPA será tanto mayor cuanto menor sea la velocidad de esterificación del EPA con respecto a la velocidad de esterificación de los demás ácidos grasos. Está suficientemente contrastado el hecho de que la selectividad de una lipasa no tiene porque depender directamente de factores como la temperatura, la adición de agua, la cantidad de lipasa o el procedimiento de inmovilización. Estos factores afectarán más bien a la actividad de la lipasa. Sin embargo, según lo indicado antes, la selectividad de la lipasa sí depende de la composición de la mezcla de ácidos grasos en cada momento de la reacción. Para una lipasa con cierta “selectividad” hacia el EPA, a medida que aumenta el grado de esterificación mayor será la concentración de EPA libre, por lo que mayor será la velocidad de esterificación de este ácido y menor el efecto de su “selectividad” con respecto a él. Por lo tanto, para comparar la selectividad de varias lipasas no basta con hacer ensayos en unas condiciones experimentales concretas con cada lipasa, sino que convendría hacer experimentos en los que se observara la variación de los factores de concentración y recuperación del EPA con el grado de esterificación.

Así pues, se planificaron una serie de experimentos en el mismo rango de condiciones experimentales con cada una de las tres lipasas seleccionadas. Con diferentes cantidades de lipasa se perseguía obtener diferentes GEs (de los que depende la “selectividad”). También se buscaba la temperatura de trabajo más adecuada y conocer el efecto de la presencia y la ausencia de agua al inicio de la reacción. Las lipasas habían sido suministradas sin inmovilizar por lo que se consideró interesante estudiar la posibilidad de inmovilizarlas de manera que pudiera incrementarse su estabilidad y su facilidad de

recuperación. Se ensayaron variaciones del método de inmovilización para encontrar la relación lipasa/soporte más adecuada. Estas esterificaciones se realizaron con 400 mg de mezcla de extracto de ácidos grasos de EPAX4510TG y alcohol láurico, en proporción 1:2 mol/mol, disueltos en 4 ml de n-hexano, agitando a 400 rpm, en atmósfera inerte e incubando durante 24 horas. Las mezclas finales de reacción se analizaron por volumetría ácido-base y los resultados más interesantes se analizaron por CCF y CG para conocer los perfiles en ácidos grasos y el contenido en EPA de las fracciones obtenidas. El grado de esterificación (GE) se calculó como la media aritmética de los porcentajes de ésteres formados medidos por CCF y volumetría ácido-base. En la tabla 3.2.10 se muestran los resultados de los experimentos para los que el grado de esterificación fue superior al 15%.

La comparación entre las tres lipasas se ha realizado en base a varios parámetros: el grado de esterificación (GE), el factor de concentración del EPA en la fracción de ácidos grasos libres (F_C), el factor de recuperación o rendimiento de EPA en dicha fracción (F_R), el factor adimensional de concentración (F_{AC}) y el factor adimensional de eficacia (F_{AE}). Ya se han definido los tres primeros. F_C (relación entre la concentración de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar y el contenido de EPA en el extracto inicial de AGLs) se ha calculado como la media aritmética entre el valor obtenido por análisis por CG de la fracción de AGLs y el valor obtenido mediante balance de materia a partir del análisis por CG de la fracción de ELs, aplicando para el caso del EPA las ecuaciones [3.2.1] y [3.2.2] respectivamente. F_R (fracción de EPA presente en la fracción de AGLs con respecto al contenido de EPA en la mezcla de AGLs y ELs final) se ha calculado mediante la ecuación [3.2.3].

Como se ha dicho antes, una lipasa tendrá un comportamiento más selectivo en unas condiciones determinadas cuanto más concentre con una mayor recuperación del producto en la fracción deseada. Una forma de que la concentración y la recuperación se consideren en igual medida es adimensionar sus valores de manera que queden comprendidos entre 0 (mínimo) y 1 (máximo).

Tabla 3.2.10.- Esterificación del extracto de AGLs de EPAX4510TG con las lipasas seleccionadas, en diferentes condiciones de operación: grado de esterificación (GE), factores de concentración (F_C) y de recuperación (F_R) y factor adimensional de eficacia (F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos y 24 horas a 400 rpm.

CONDICIONES DE OPERACIÓN									
Lipasa (Código)	Inmovilización (Procedimiento)	Temperatura (°C)	Agua (ml)	Disolvente (ml)	m _z (mg)	GE (%)	F _C (0-2,3)	F _R (0-100)	F _{AE} (0-1)
Rd	NO	55	0,1	4	40	71,4	1,43	38,8	0,12
Rd	NO	40	0,1	4	40	77,6	1,47	38,2	0,13
Rd	1	55	NO	4	200	65,3	1,36	42,8	0,11
Rd	1	55	NO	4	400	87,9	0,70	5,9	-0,01
Rd	2	55	NO	4	60	58,8	1,36	48,8	0,13
Rd	2	55	NO	4	80	77,4	1,46	38,6	0,14
Rd	2	55	NO	4	140	91,5	0,66	5,1	-0,01

D	NO	55	0,1	4	40	53,3	1,38	66,7	0,19
D	NO	40	0,1	4	40	31,2	1,12	83,0	0,07
D	1	55	NO	4	200	95,8	2,32	1,3	0,01
D	1	55	0,1	4	200	50,5	1,29	53,4	0,12
D	1	55	0,1	4	400	70,4	1,24	50,9	0,09
D	2	55	NO	4	40	53,2	1,36	62,2	0,17
D	2	55	NO	4	200	53,0	1,37	65,1	0,18
D	2	40	NO	4	40	31,5	1,23	78,3	0,13
D	2	40	NO	4	100	56,4	1,31	61,5	0,14
D	2	40	0,1	4	100	23,1	1,12	85,6	0,07
D	2	40	0,1	4	160	25,5	1,14	83,8	0,09

GE Grado de esterificación

F_C Factor de concentración de EPA en la fracción de AGLs respecto al contenido en el extracto inicial.

F_R Porcentaje de EPA en la fracción de AGLs respecto al total de EPA en la mezcla final.

F_{AE} Factor adimensional de eficacia.

Tabla 3.2.10 (continuación).- Esterificación del extracto de AGLs de EPAX4510TG con las lipasas seleccionadas, en diferentes condiciones de operación: grado de esterificación (GE), factores de concentración (FC) y de recuperación (FR) y factor adimensional de eficacia (FAE). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos y 24 horas a 400 rpm.

CONDICIONES DE OPERACIÓN									
Lipasa (Código)	Inmovilización (Procedimiento)	Temperatura (°C)	Agua (ml)	Disolvente (ml)	m _z (mg)	GE (%)	FC (0-2,3)	FR (0-100)	FAE (0-1)
AK	NO	55	0,1	4	40	11,7	1,12	90,9	0,08
AK	NO	40	0,1	4	40	35,8	1,27	84,0	0,17
AK	1	55	NO	4	160	22,5	1,20	87,6	0,13
AK	1	55	0,1	4	60	21,6	1,16	89,2	0,11
AK	1	55	0,1	4	160	34,9	1,32	84,3	0,20
AK	1	40	NO	4	160	25,6	1,28	86,2	0,18
AK	1	40	NO	4	200	40,3	1,43	85,2	0,27
AK	1	40	NO	4	340	42,3	1,47	84,7	0,30
AK	1	40	NO	20	200	47,6	1,49	84,1	0,31
AK	1	40	0,1	4	60	20,8	1,18	87,5	0,12
AK	1	40	0,1	4	160	27,5	1,25	86,0	0,16
AK	1	30	NO	20	200	47,6	1,46	79,4	0,27
AK	2	55	NO	4	160	19,4	1,09	87,3	0,06
AK	2	55	NO	4	240	20,3	1,09	88,7	0,06
AK	2	55	0,1	4	60	14,3	1,05	90,7	0,03
AK	2	55	0,1	4	140	16,2	1,05	90,1	0,04

GE Grado de esterificación
FC Factor de concentración de EPA en la fracción de AGLs respecto al contenido en el extracto inicial.
FR Porcentaje de EPA en la fracción de AGLs respecto al total de EPA en la mezcla final.
FAE Factor adimensional de eficacia.

En este sentido, para cuantificar la concentración del EPA también se ha empleado el factor adimensional de concentración del EPA (F_{AC}), que se calcula mediante la ecuación:

$$F_{AC} = \frac{C_{EA} - C_{EA0}}{100 - C_{EA0}} \quad [3.2.4]$$

donde C_{EA} es el porcentaje de EPA en la fracción de AGLs sin esterificar y C_{EA0} es el porcentaje de EPA en el extracto de ácidos grasos inicial. Los valores de F_{AC} están comprendidos entre 0 y 1, ya que, cuando el EPA no se concentra en absoluto puesto que es esterificado a igual velocidad que los demás ácidos grasos, $C_{EA} = C_{EA0}$ y $F_{AC} = 0$; por otra parte, en un caso hipotético en el que el EPA no se esterificara en absoluto y todos los demás ácidos grasos quedaran totalmente esterificados $C_{EA} = 100$ y $F_{AC} = 1$. La introducción de F_{AC} tiene como único objetivo tener un parámetro que mida el grado de concentración del EPA en la fracción de ácidos grasos y varíe entre 0 y 1, igual que el factor de recuperación, F_R . De esta manera F_{AC} y F_R se pueden unificar en un sólo factor que sirva para comparar los resultados obtenidos con las tres lipasas y ayude a elegir la mejor.

Así, para tener en cuenta ambos factores (concentración y recuperación del EPA), se ha definido el factor adimensional de eficacia (F_{AE}) como el producto de los factores adimensionales de concentración y de recuperación, es decir:

$$F_{AE} = F_{AC} F_R = \frac{C_{EA} - C_{EA0}}{100 - C_{EA0}} F_R \quad [3.2.5]$$

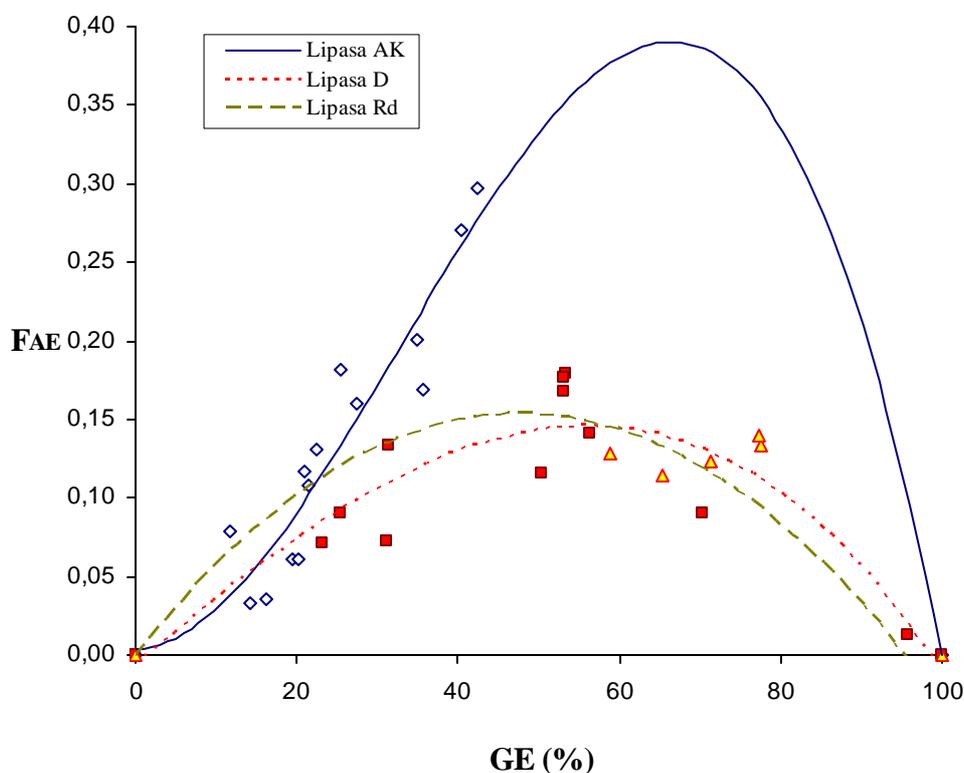
Este parámetro se ha empleado para cuantificar simultáneamente la eficacia de las lipasas para concentrar y para recuperar el EPA en la fracción de AGLs y por tanto la selectividad presentada para unas condiciones determinadas.

Como hemos dicho antes, los efectos de las variables elegidas sobre los grados de esterificación harán que la selectividad de la lipasa cambie. Así, el aumento del grado de esterificación se traducirá en una menor velocidad del aumento de los factores de concentración y una mayor velocidad en la disminución de los rendimientos de recuperación (y por lo tanto menor velocidad de aumento del F_{AE} que llegará a anularse para empezar a disminuir).

La selectividad sería la pendiente del F_{AE} que sería máxima al comienzo de la reacción y la reacción debería avanzarse mientras la selectividad fuera positiva (en el F_{AE} máximo). De esta forma, obteniendo diferentes grados de esterificación, puede determinarse la evolución del F_{AE} y, por tanto, de su selectividad.

En la tabla 3.2.10 se muestran los valores obtenidos para estos parámetros en todos los experimentos realizados con estas tres lipasas en los que el grado de esterificación ha sido mayor del 15%. Se observa que, modificando las condiciones de operación, se ha conseguido obtener un rango bastante amplio de grados de esterificación con las tres lipasas, lo que facilitará la elección de la mejor lipasa para la concentración de EPA mediante esterificaciones selectivas. En la figura 3.2.1 se ha representado la variación del factor adimensional de eficacia F_{AE} con el grado de esterificación para las tres lipasas analizadas.

Figura 3.2.1.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por las lipasas de *Rhizopus delemar*, D de *Rhizopus oryzae* y AK de *Pseudomonas fluorescens* en distintas condiciones: influencia del grado de esterificación (GE) sobre el factor adimensional de eficacia (F_{AE}).



Se observa que mientras que las lipasas D y Rd mostraron comportamientos semejantes y valores de F_{AE} máximos que en ningún caso son mayores a 0,2, la lipasa AK llegó a dar valores de F_{AE} máximos superiores a 0,3, lo que implica factores de concentración y rendimientos de EPA en la fracción de ácidos grasos relativamente elevados. Por esta razón, esta lipasa se ha considerado la más apropiada de las tres lipasas ensayadas para la purificación de EPA mediante esterificación enzimática. La figura 3.2.1 también parece indicar que con la lipasa AK, para obtener un F_{AE} máximo es preciso conseguir un GE superior al obtenido, en torno al 55-65%.

Los experimentos que figuran en la tabla 3.2.10 y en la figura 3.2.1, utilizados para comparar entre las tres lipasas preseleccionadas y elegir una de ellas, se han realizado modificando una serie de variables de operación. A continuación se presenta una discusión sobre la influencia de esas variables para tratar de profundizar en las **condiciones experimentales más adecuadas para cada una de las tres lipasas**. Las variables que se modificaron fueron (tabla 3.2.10): el método de inmovilización, la temperatura, la adición de agua, la cantidad de disolvente y la masa de lipasa.

3.2.3.1.- Lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*

En la tabla 3.2.10 se muestran los resultados de esterificación más favorables que se obtuvieron con la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*. Se habían ensayado cantidades variables de lipasa (40, 60, 160, 200 y 320 mg), inmovilizada por diferentes procedimientos (1 y 2), con y sin la adición de agua y a las temperaturas de 40 y 55 °C. A partir de estos resultados se realizó un análisis para la selección de las mejores condiciones de operación de la lipasa.

La influencia del tipo de inmovilización se muestra con más claridad en la tabla 3.2.11. En primer lugar se observa que en los experimentos realizados con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 1 se obtuvieron GE mayores. Estos resultados son lógicos puesto que en el procedimiento 1 se empleó una relación lipasa/soporte mayor a la empleada en el procedimiento 2 (0,67 frente a 0,25 g lipasa/g soporte). Los GE en estos experimentos fueron relativamente pequeños (con ambos métodos de inmovilización), por lo que al aumentar éstos aumenta el F_{AE} , tal y como indica la figura 3.2.1. En este caso el aumento del F_{AE} se debe al aumento del F_C , ya que los F_R no cambian en este intervalo de bajos valores de GE.

Tabla 3.2.11.- Esterificación de un extracto de AGLs del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* modificando el método de inmovilización: grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 24 horas a 400 rpm y 55 °C.

Condiciones de operación			Parámetros de estudio			
m_z (mg)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
160	NO	1	22,5	1,20	87,6	0,13
60	0,1	1	21,6	1,16	89,2	0,11
			22,1	1,18	88,4	0,12
Condiciones de operación			Parámetros de estudio			
m_z (mg)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
160	NO	2	19,4	1,09	87,3	0,06
60	0,1	2	14,3	1,05	90,7	0,03
			16,8	1,07	89,0	0,05

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10.

El hecho de que haya que utilizar altas relaciones lipasa/soporte (procedimiento 1 de inmovilización) parece ya poner de manifiesto que bien el soporte bien el método de inmovilización en su conjunto no parecen muy adecuados para inmovilizar esta lipasa.

Para el estudio de la influencia de la adición de agua, en la tabla 3.2.12 se comparan los resultados obtenidos en los experimentos realizados en las mismas condiciones salvo por la adición o no de 0,1 ml de agua.

Tabla 3.2.12.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* con **adición o no de agua:** grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 24 horas a 400 rpm y 160 mg de lipasa inmovilizada por el procedimiento 1.

Condiciones de operación		Parámetros de estudio			
T ^a (°C)	AGUA (ml)	GE (%)	F _C (0-2,3)	F _R (0-100)	F _{AE} (0-1)
40	NO	25,6	1,28	86,2	0,18
55	NO	22,5	1,20	87,6	0,13
		24,0	1,24	86,9	0,15
Condiciones de operación		Parámetros de estudio			
T ^a (°C)	AGUA (ml)	GE (%)	F _C (0-2,3)	F _R (0-100)	F _{AE} (0-1)
40	0,1	27,5	1,25	86,0	0,16
55	0,1	34,9	1,32	84,3	0,20
		31,2	1,28	85,2	0,18

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10.

En esta tabla, no se observa que la adición de agua tenga una influencia apreciable en los resultados obtenidos, para el rango de condiciones experimentales ensayado. Este resultado parece contradecir el obtenido en la esterificación de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao con las lipasas D y M sin inmovilizar (apartado 3.2.1); en esos experimentos aumentaba el GE al aumentar el contenido en agua. En este caso la lipasa AK está inmovilizada, lo que puede implicar que ya disponga de esa mínima cantidad de agua necesaria para mantener su actividad catalítica. De cualquier forma se trata de lipasas distintas y esa mínima cantidad de agua depende del tipo de lipasa y del disolvente (Shimada y cols. 1997a). En cualquier caso parece que son necesarios nuevos experimentos en los que, una vez fijadas el resto de las variables, se optimice la cantidad de agua a añadir.

Para estudiar la influencia de la temperatura en la tabla 3.2.13 se muestran los F_{AE} para experimentos realizados a 40 y 55 °C, en las mismas condiciones de cantidad de lipasa, adición de agua y procedimiento de inmovilización.

Tabla 3.2.13.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* modificando **la temperatura**: grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano y 24 horas a 400 rpm.

Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
160	55	0,1	1	34,9	1,32	84,3	0,20
160	55	NO	1	22,5	1,20	87,6	0,13
60	55	0,1	1	21,6	1,16	89,2	0,11
40	55	0,1	NO	35,8	1,27	84,0	0,17
				28,7	1,24	86,3	0,16
Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
160	40	0,1	1	27,5	1,25	86,0	0,16
160	40	NO	1	25,6	1,28	86,2	0,18
60	40	0,1	1	20,8	1,18	87,5	0,12
40	40	0,1	NO	11,7	1,12	90,9	0,08
				21,4	1,21	87,7	0,14

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

Tampoco en este caso parece observarse una influencia apreciable de la temperatura sobre el F_{AE} . Por esta razón se ha optado por trabajar a la temperatura más baja de 40 °C; de esta manera habrá menores pérdidas de disolvente por evaporación y mayor estabilidad de los PUFAs frente a la oxidación.

En la tabla 3.2.14, se muestran la influencia de la cantidad de lipasa sobre el GE, F_{AE} , etc., para experimentos realizados a 40 °C y con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 1.

Tabla 3.2.14.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* modificando **la cantidad de lipasa:** grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 24 horas, 400 rpm, 40 °C y con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 1.

Condiciones de operación		Parámetros de estudio			
m_z (mg)	AGUA (ml)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
320	NO	42,3	1,47	84,7	0,30
160	NO	25,6	1,28	86,2	0,18
160	0,1	27,5	1,25	86,0	0,16
60	0,1	20,8	1,18	87,5	0,12

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

Puede observarse que, para este rango de GE, el F_{AE} aumenta claramente a medida que aumentamos la cantidad de lipasa, aunque aún parece que se está lejos de los GE para los cuales el F_{AE} es máximo (figura 3.2.1).

De esta manera, las mejores condiciones de trabajo obtenidas por el momento para la lipasa AK son:

- 400 mg de extracto de ácidos grasos libres de EPAX4510TG y de alcohol láurico en la relación molar 1:2 (178 mg de extracto de ácidos grasos y 222 mg de alcohol láurico),
- 4 ml de n-hexano (relación aceite/n-hexano 44,5 mg/ml),
- 40 °C,
- 24 horas y 320 mg de lipasa AK (relación lipasa/aceite 1,80 mg/mg) inmovilizada por el procedimiento 1 (relación lipasa/soporte 0,67 p/p), si bien esta cantidad de lipasa puede resultar excesiva y podrá emplearse una cantidad menor y un tiempo mayor.

En estas condiciones se han obtenido purezas de EPA próximas al 65% y rendimientos de recuperación superiores al 84% (tabla 3.2.14).

3.2.3.2.- Lipasa D de *Rhizopus oryzae*

En las tablas 3.2.10 y 3.2.15 a 3.2.17 se muestran los mejores resultados que se obtuvieron con la lipasa D de *Rhizopus oryzae*, los cuales pueden ser utilizados para seleccionar sus condiciones de operación más favorables. Se ensayaron cantidades variables de lipasa (40, 60, 100, 140, 160, 200 y 400 mg), inmovilizada por diferentes procedimientos (1 y 2), con o sin añadir 0,1 ml de agua y a las temperaturas de 40 y 55 °C.

En la tabla 3.2.10 se observa que todos los experimentos realizados con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 1 presentaron GE superiores a los obtenidos por el procedimiento 2, lo que es lógico ya que en el procedimiento 1 se empleó una mayor relación lipasa/soporte. Sin embargo, los valores del F_{AE} obtenidos por el procedimiento 1 son inferiores a los obtenidos por el procedimiento 2, debido a que los factores de concentración son del mismo orden y los rendimientos son claramente menores en el procedimiento 1. Además, el procedimiento 2 representa un apreciable ahorro en la cantidad de lipasa utilizada para la obtención de lipasa inmovilizada.

Para el estudio de la influencia del agua, en la tabla 3.2.15 se muestran los resultados de los experimentos realizados en las mismas condiciones de cantidad de lipasa, temperatura y procedimiento de inmovilización, pero realizados en presencia y en ausencia de agua.

Se puede observar que esta lipasa es claramente más activa en ausencia de agua. Obviamente esto implica que no añadiendo agua podemos trabajar con cantidades de lipasa y tiempos de incubación menores, o bien en otras condiciones de operación que puedan abaratar el proceso. Este resultado parece contrastar con el obtenido con las lipasas D y M sin inmovilizar; en ese caso el GE aumentaba al aumentar el contenido de agua. Ahora la lipasa D está inmovilizada, por lo que la presencia de agua ya no es necesaria para formar un micelio que favorezca el contacto sustrato-enzima. Este contacto ya está facilitado por la inmovilización de la lipasa. Además, en presencia de agua tomarían protagonismo los efectos negativos de la misma, es decir, estaría favorecida la hidrólisis de los ésteres formados y también sería posible la formación de agregados de lipasa.

Tabla 3.2.15.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa D de *Rhizopus oryzae* **con adición o no de agua:** grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano y 24 horas a 400 rpm.

Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
200	55	NO	1	95,8	2,32	1,3	0,01
100	40	NO	2	56,4	1,31	61,5	0,14
				76,1	1,81	31,4	0,08
Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
200	55	0,1	1	50,5	1,29	53,4	0,12
100	40	0,1	2	23,1	1,12	85,6	0,07
				36,8	1,21	69,5	0,10

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

Se observa también que en el experimento realizado sin agua y con 200 mg de lipasa el GE fue demasiado alto, por lo que el F_{AE} disminuyó hasta 0,01 (se recuperó sólo el 1,3% del EPA). En los experimentos en los que los GE estuvieron comprendidos entre el 50 y el 60% se obtuvieron mejores valores de F_{AE} .

En todo caso, dado el objetivo de este trabajo, esta lipasa no es muy apropiada debido a que en condiciones favorables para su actividad (altos valores de GE y, por tanto, rendimientos de recuperación de EPA bajos) los factores de concentración no son demasiado elevados.

En la tabla 3.2.16 se muestran los resultados de los experimentos realizados a 40 y 55 °C en las mismas condiciones de cantidad de lipasa, cantidad de agua y procedimiento de inmovilización.

Comparando estos resultados, no parece observarse una influencia clara de esta variable, por lo que se ha optado por trabajar a 40 °C, lo que conllevará una operación más económica, con menos riesgos y menores pérdidas de disolvente por evaporación.

Tabla 3.2.16.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa D de *Rhizopus oryzae* modificando la **temperatura:** grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano y 24 horas a 400 rpm.

Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
40	55	0,1	NO	31,2	1,13	84,6	0,08
40	55	NO	2	53,2	1,36	62,2	0,17
100	55	NO	2	53,0	1,37	65,1	0,18
				45,8	1,28	70,6	0,14
Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	AGUA (ml)	Inmovilización (Procedimiento)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
40	40	0,1	NO	53,3	1,42	67,8	0,21
40	40	NO	2	31,5	1,23	78,3	0,13
100	40	NO	2	56,4	1,31	61,5	0,14
				47,1	1,32	69,2	0,16

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

En la tabla 3.2.17 se muestra la influencia de la cantidad de lipasa sobre los resultados de las esterificaciones realizadas sin adición de agua y con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 2. Se considera, tal y como ya se ha comprobado en el apartado anterior, que la temperatura en el intervalo de estudio tiene una influencia despreciable sobre los resultados.

Se observa que los F_{AE} no cambian prácticamente nada por el hecho de emplear 40 ó 100 mg de lipasa, por lo que lógicamente es más ventajoso trabajar con 40 mg de lipasa. Empleando esta cantidad de lipasa disminuye algo el factor de concentración, pero se obtiene un mayor rendimiento en la recuperación que con 100 mg.

Tabla 3.2.17.- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa D de *Rhizopus oryzae* modificando la **cantidad de lipasa**: grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, 24 horas a 400 rpm, sin la adición de agua y con la lipasa inmovilizada por el procedimiento 2.

Condiciones de operación		Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
100	55	53,0	1,37	65,1	0,18
100	40	56,4	1,31	61,5	0,14
-----		54,7	1,34	63,3	0,16
Condiciones de operación		Parámetros de estudio			
m_z (mg)	T^a (°C)	GE (%)	F_C (0-2,3)	F_R (0-100)	F_{AE} (0-1)
40	55	53,2	1,36	62,2	0,17
40	40	31,5	1,23	78,3	0,13
-----		42,4	1,29	70,3	0,15

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

Se observa también en esta tabla que inmovilizando 8 mg de lipasa sobre 32 de Celite se obtiene una actividad equivalente a la obtenida con 40 mg de lipasa sin inmovilizar al aplicar las mismas condiciones (salvo la adición de agua), obteniéndose grados de esterificación del orden de 53%.

De esta manera, las mejores condiciones de trabajo obtenidas por el momento para la lipasa D son:

- 400 mg de extracto de ácidos grasos libres de EPAX4510TG y de alcohol láurico en la relación molar 1:2 (178 mg de extracto de ácidos grasos y 222 mg de alcohol láurico),
- 4 ml de n-hexano,
- sin adición de agua
- 40 °C,
- 24 horas y 40 mg de lipasa D inmovilizada por el procedimiento 2 (relación celite-lipasa 0,25 p/p).

En estas condiciones se han obtenido purezas de EPA en torno al 58% y rendimientos de recuperación del orden del 62% (tabla 3.2.17).

3.2.3.3.- Lipasa EU-093 de *Rhizopus delemar* (Rd)

En las tablas 3.2.10 y 3.2.18 se muestran los mejores resultados que se obtuvieron con la lipasa EU-093 de *Rhizopus delemar*, los cuales pueden ser utilizados para seleccionar sus condiciones de operación más favorables. Se ensayaron cantidades variables de lipasa (40, 60, 100, 140, 200, 240, 300 y 400 mg), inmovilizada por diferentes procedimientos (1 y 2), con o sin añadir 0,1 ml de agua. Sólo se realizaron experimentos a 55 °C pues es a la temperatura que la lipasa parecía mostrar mayores factores de concentración de EPA (tablas 3.2.8 y 3.2.9 ó tabla 3.2.18).

Se observa que la lipasa no inmovilizada (tabla 3.2.18) dio GE elevados, factores de concentración aceptables, pero rendimientos de recuperación relativamente bajos. Con la lipasa inmovilizada por cualquiera de los procedimientos se obtienen valores de F_{AE} demasiado pequeños probablemente por tratarse de GEs demasiado elevados que no permiten discriminar el EPA. Por otra parte, el procedimiento de inmovilización 2 dio F_{AE} similares al procedimiento 1, pero con menores cantidades de lipasa. Como puede verse en la tabla 3.2.18, utilizando 60 mg de lipasa inmovilizada por el procedimiento 2 (12 mg de lipasa consumida en 48 mg de soporte) se obtienen los mismos efectos que con 200 mg de lipasa inmovilizada por el procedimiento 1 (80 mg de lipasa consumida en 120 mg de soporte) para las mismas condiciones.

Tabla 3.2.18- Esterificación de un extracto de ácidos grasos libres del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa EU-093 de *Rhizopus delemar* (Rd) modificando la inmovilización, la temperatura, la presencia de agua y la cantidad de lipasa: grado de esterificación (GE) y factores de concentración, recuperación y eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano y 24 horas a 400 rpm.

Condiciones de operación				Parámetros de estudio			
Inmovilización (Procedimiento)	T ^a (°C)	Agua (ml)	m _z (mg)	GE (%)	F _C (0-2,3)	F _R (0-100)	F _{AE} (0-1)
NO	40	0,1	40	71,4	1,43	38,8	0,12
NO	55	0,1	40	77,6	1,47	45,5	0,13
1	55	0,1	200	6,2	-	-	-
1	55	NO	200	65,3	1,36	42,8	0,11
1	55	0,1	400	9,0	-	-	-
1	55	NO	400	87,9	0,70	5,9	-0,01
2	55	0,1	60	5,6	-	-	-
2	55	NO	60	58,8	1,36	48,8	0,13
2	55	NO	80	77,4			
2	55	0,1	140	9,3	-	-	-
2	55	NO	140	91,5	0,66	5,1	-0,01

Simbología idéntica a la de la tabla 3.2.10

Con respecto a la influencia de la adición de agua, en esta misma tabla se observa que la lipasa no inmovilizada dio GE y F_{AE} elevados en presencia de agua. Sin embargo, cuando se ensayó con lipasa inmovilizada la adición de agua disminuyó drásticamente el GE (resultados no analizados por CCF). Ambos resultados confirman lo ya puesto de manifiesto para la lipasa D. Con la lipasa inmovilizada sin adición de agua o con la lipasa sin inmovilizar en presencia de agua se observa que en todos los casos se obtuvieron GE apreciables (superiores al 58%), aunque los F_{AE} obtenidos con esta lipasa son los más pequeños de todas las lipasas (figura 3.2.1).

Lógicamente en todos los casos el GE aumenta al aumentar la cantidad de lipasa, sin embargo, con la lipasa inmovilizada, se obtiene un valor más elevado de F_{AE} con 60 mg que con 140 mg de lipasa (empleando también las condiciones previamente seleccionadas: lipasa inmovilizada por el procedimiento 2, sin adición de agua y 55 °C).

Se observa también en esta tabla que inmovilizando 16 mg de lipasa sobre 64 mg de Celite se obtiene una actividad equivalente a la obtenida con 40 mg de lipasa sin inmovilizar al aplicar las mismas condiciones (salvo la adición de agua), obteniéndose grados de esterificación del orden de 77%.

De esta manera, las mejores condiciones de trabajo obtenidas por el momento para la lipasa de *R. delemar* son:

- 400 mg de extracto de ácidos grasos libres de EPAX4510TG y de alcohol láurico en la relación molar 1:2 (178 mg de extracto de ácidos grasos y 222 mg de alcohol láurico),
- 4 ml de n-hexano,
- sin adición de agua
- 55 °C,
- 24 horas y 60 mg de lipasa *R. delemar* inmovilizada por el procedimiento 2 (relación celite-lipasa 0,25 p/p).

En estas condiciones se han obtenido purezas de EPA en torno al 58,6% y rendimientos de recuperación del orden del 48,8%.

3.2.4.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ESTERIFICACIÓN CON LA LIPASA AK DE *P. FLUORESCENS*

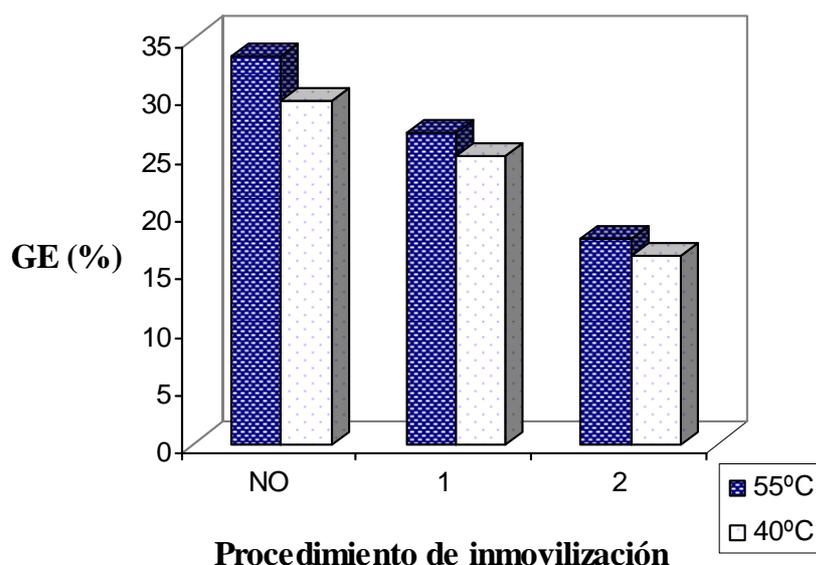
En el apartado anterior se ha seleccionado la lipasa AK para la purificación del EPA por esterificación de un extracto de AGLs con alcohol láurico. Esta lipasa es la que más concentra el EPA en la fracción de AGLs sin esterificar, ya que con ella se obtuvieron los mayores factores adimensionales de eficacia (F_{AE}) y este factor refleja tanto la concentración como el rendimiento de recuperación del EPA en la fracción de AGLs. Una vez seleccionada la lipasa, para optimizar su forma de operación habrá que buscar las condiciones que permitan obtener el factor adimensional de eficacia (F_{AE}) máximo.

En la figura 3.2.1 se observa que, con la lipasa seleccionada, el F_{AE} es máximo para un GE del orden del 55-65%. Este GE puede obtenerse mediante diferentes combinaciones de las variables de operación y en cualquier caso se podrá obtener aumentando la intensidad de tratamiento. Sin embargo, si se pretende que la intensidad de tratamiento empleada sea mínima (mínima cantidad de lipasa y tiempo) habrá que ajustar el resto de condiciones de operación de forma que permitan obtener un GE máximo y luego ajustar la intensidad de tratamiento para obtener el GE óptimo que proporcione el F_{AE} máximo.

3.2.4.1.- Procedimiento de inmovilización

La figura 3.2.2 muestra el GE obtenido con la lipasa no inmovilizada y con la lipasa inmovilizada por los dos métodos ya indicados, a 40 y 55 °C. En estos experimentos se han puesto cantidades de lipasa distintas para mantener constante la cantidad de lipasa consumida inicialmente en las inmovilizaciones, es decir: 40 mg de lipasa no inmovilizada, 100 mg de la inmovilizada por el procedimiento 1 (relación lipasa/soporte de 0,67 p/p) y 200 mg de la inmovilizada por el procedimiento 2 (relación lipasa/soporte de 0,25 p/p). También se observa que los experimentos realizados a 55 °C dieron GE algo más altos que a 40 °C, si bien las diferencias no son grandes y puede interesar operar a la temperatura más baja.

Figura 3.2.2.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia del método de inmovilización sobre el grado de esterificación (GE) a diferentes temperaturas.



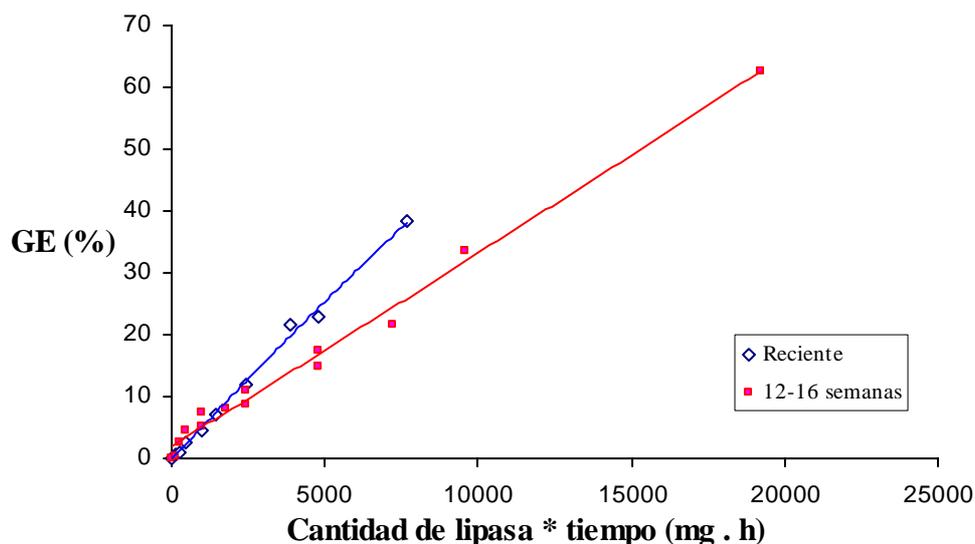
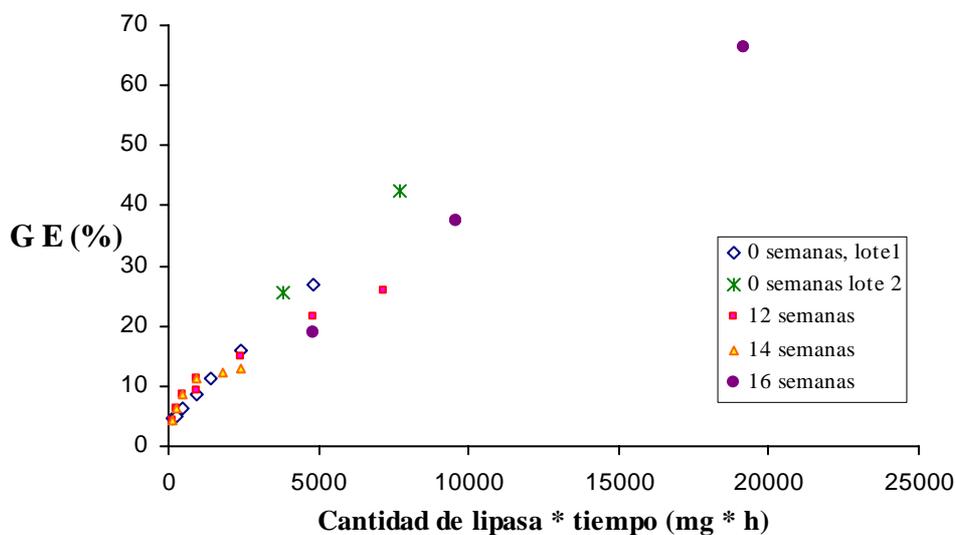
Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos, 40 mg de lipasa AK (o una cantidad aproximadamente equivalente cuando la lipasa está inmovilizada: 100 mg de la inmovilizada por el procedimiento 1 y 200 mg de la inmovilizada por el procedimiento 2), 0,1 ml de agua, relación molar AGLs/alcohol 1:2, 4 ml de hexano y 24 horas.

En esta figura se observa que la lipasa no inmovilizada dio los GE más altos, seguida de la lipasa inmovilizada por el procedimiento con la relación lipasa/soporte más alta y por último la lipasa inmovilizada con la relación lipasa/soporte más baja. Este resultado es lógico ya que sólo cuando la lipasa no está inmovilizada se puede asegurar que su cantidad es de 40 mg, mientras que cuando la lipasa se inmoviliza no se tiene certeza de que toda la que se pone en contacto con el soporte se quede retenida en él. Además, también podría ocurrir cierta pérdida de actividad cuando se inmoviliza la lipasa.

Por otro lado, se hicieron experimentos para verificar la **estabilidad de la lipasa** con el tiempo desde su inmovilización (hasta su uso) y detectar las posibles pérdidas de actividad cuando se reutiliza en sucesivas esterificaciones.

En la figura 3.2.3 se presenta la evolución del GE con la intensidad de tratamiento para diferentes lotes de lipasa con diferentes tiempos transcurridos desde su inmovilización.

Figura 3.2.3.- Esterificación de un extracto de AGLs del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia del tiempo transcurrido desde su inmovilización y la intensidad de tratamiento (m_t) sobre el grado de esterificación (GE).



Condiciones de operación: condiciones estándar, sin agua y a 40 °C

En esta figura se observa que, para una misma intensidad de tratamiento, las lipasas que habían sido inmovilizadas 12 semanas o más antes de su uso dieron grados de esterificación inferiores a los que presentaron las lipasas que habían sido utilizadas sin transcurrir más de una semana desde su inmovilización.

Por otro lado se estudió también la influencia de la reutilización de la lipasa sobre su actividad. En la tabla 3.2.19 se presentan los grados de esterificación obtenidos al reutilizar la lipasa dos veces.

Tabla 3.2.19- Esterificación de un extracto de AGLs del aceite EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* variando el número de reutilizaciones de la lipasa: grado de esterificación obtenido por volumetría ácido-base (V_{AB}). Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos en relación 1:2 mol/mol, 4 ml de hexano, sin adición de agua, 40 °C, 400 rpm e intensidad de tratamiento de 4800 mg.h (200 mg de lipasa inmovilizada por el procedimiento 1 durante 24 horas).

USO	V_{AB}' (%)
1ª utilización	25,0
2ª utilización	10,7
3ª utilización	4,1

V_{AB}' Grado de esterificación (porcentaje de ácidos grasos esterificados durante la reacción) obtenido por volumetría ácido-base de la mezcla final.

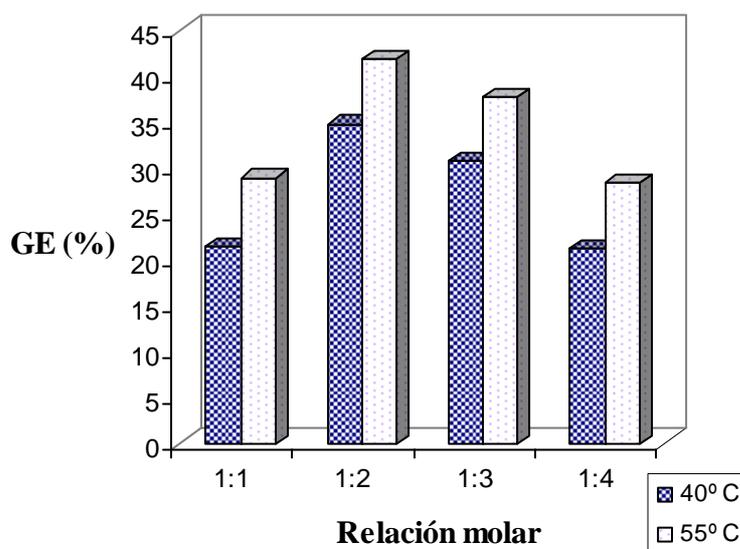
Como puede observarse en esta tabla, la actividad de la lipasa AK inmovilizada por este procedimiento disminuye drásticamente al ser reutilizada. Este resultado puede deberse a que el método de inmovilización (apartado 2.1.3) o el soporte (Celite) no son adecuados para inmovilizar esta lipasa y probablemente durante su primera utilización se haya producido un lavado del soporte. En las pruebas de inmovilización de las lipasas más interesantes (apartado anterior) ya se había visto que para AK era necesaria una relación lipasa/Celite más alta que para las otras lipasas.

En cualquier caso, o el método de inmovilización o el soporte, no parecen adecuados para esta lipasa. Por lo tanto, los experimentos que se muestran a continuación se han llevado a cabo con la lipasa sin inmovilizar.

3.2.4.2.- Relación molar y temperatura

La figura 3.2.3 muestra el GE obtenido para diferentes relaciones molares entre los sustratos y diferentes temperaturas.

Figura 3.2.3.- Esterificación de un extracto AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la relación molar AGLs/alcohol sobre el grado de esterificación (GE) a diferentes temperaturas.



Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos, 40 mg de lipasa AK no inmovilizada, 0,1 ml de agua, 4 ml de hexano y 24 horas.

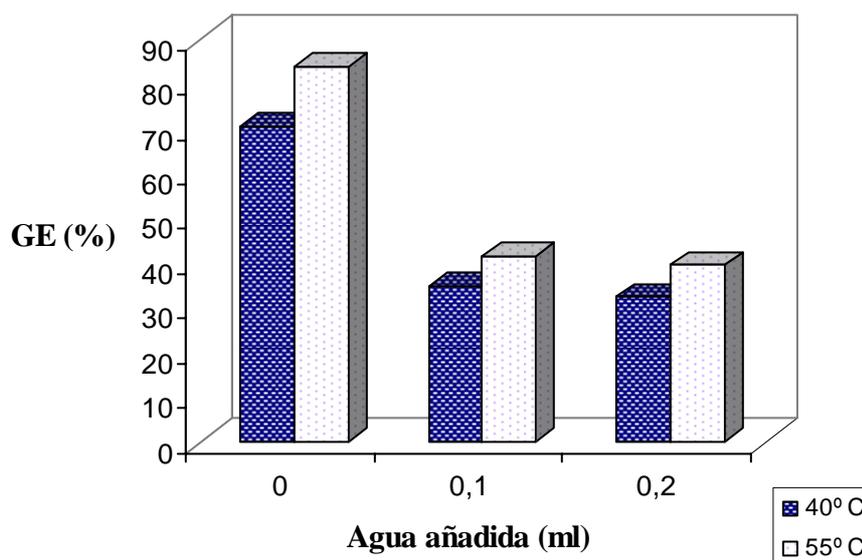
Se observa que el GE más alto fue el obtenido con una relación molar AGLs/alcohol láurico 1:2, lo que coincide con los resultados obtenidos por otros autores (Shimada y cols., 2001; Haraldsson y cols. 1998). Para contenidos más altos de alcohol el GE disminuye, lo que puede deberse al aumento de la resistencia a la transferencia de materia, ya que el alcohol aumenta la viscosidad del medio de reacción dificultando la transferencia de

reactivos y de productos hacia la lipasa. Los ensayos llevados a cabo a 55 °C dieron GE superiores a los que se llevaron a cabo a 40 °C, lo que de nuevo pone de manifiesto que esta lipasa es más activa a la temperatura más alta.

3.2.4.3.- Adición de agua y temperatura

La figura 3.2.4 muestra el GE obtenido para diferentes adiciones de agua (0, 0,1 y 0,2 ml) a dos temperaturas diferentes.

Figura 3.2.4.- Esterificación de un extracto AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la cantidad de agua añadida sobre el grado de esterificación (GE).



Condiciones de operación: 400 mg de mezcla de sustratos, 40 mg de lipasa AK no inmovilizada, relación molar AGLs/alcohol 1:2, 4 ml de hexano y 24 horas.

En esta figura se observa que el GE fue del orden de dos veces mayor cuando no se añadió agua que cuando se añadieron 0,1 ó 0,2 ml. Como ya se ha puesto de manifiesto la influencia del agua sobre la conversión de las reacciones catalizadas por lipasas es muy compleja. Así por ejemplo, como ya se ha indicado en este trabajo (apartado 3.2.1), Shimada y cols. (2001) pusieron de manifiesto que la lipasa *R. delemar* sin inmovilizar necesita una cantidad de agua apreciable para aumentar el GE. No obstante, este hecho es evidente que no ocurre con todas las lipasas o, dicho de otro modo, la cantidad de agua que

las lipasas necesitan para mantener su actividad depende del tipo de lipasa (Klivanov, 1998). Por otra parte, el resultado que muestra la figura 3.2.4 parece deberse a que la adición de agua ocasiona cierta aglomeración de la enzima, lo que puede disminuir la superficie de contacto enzima-sustrato, como efectivamente se observó experimentalmente con esta lipasa.

Con respecto a la temperatura, una vez más los ensayos llevados a cabo a 55 °C dieron valores de GE ligeramente superiores a los realizados a 40 °C. Sin embargo, cuanto mayor es la temperatura mayor es el riesgo de oxidación de los PUFAs y las pérdidas de un disolvente volátil, como es el hexano. Por lo tanto, como no es necesario llegar a GE superiores al 55-65% (donde F_{AE} es máximo), puede ser suficiente operar a 40 °C. A esta temperatura se pueden conseguir estos grados de esterificación sin añadir agua y sin emplear cantidades de lipasa elevadas.

3.2.4.4.- Relación molar sin agua e intensidad de tratamiento

En el apartado 3.2.4.2 se había puesto de manifiesto como el GE más alto fue el obtenido con una relación molar AGLs/alcohol láurico 1:2 para reacciones en las que se había añadido 0,1 ml de agua. Sin embargo, en el apartado 3.2.4.3 se puso de manifiesto que los GEs mayores se obtenían sin adición de agua. Se hicieron ensayos con diferentes relaciones entre los sustratos en ausencia de agua, para comprobar si la relación molar elegida en el apartado 3.2.4.2 seguía siendo (también en ausencia de agua) la que mayores GEs proporcionaba. En la tabla 3.2.20 se muestran estos resultados.

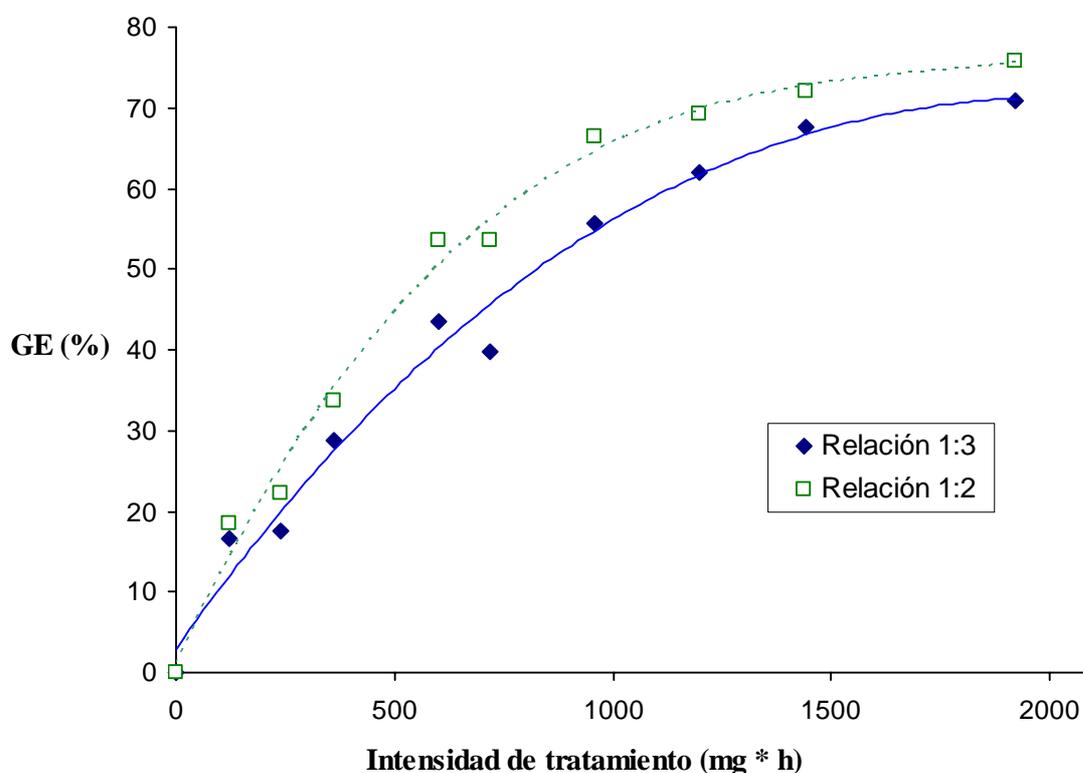
Tabla 3.2.20.- Esterificación de un extracto AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: grado de esterificación (GE) con dos relaciones molares AGLs/alcohol y diferentes intensidades de tratamiento. Condiciones experimentales: 400 mg de sustratos, 4 ml de n-hexano, 40 °C y sin agua añadida.

AGLo / alcohol (mol/mol)	Masa de lipasa, m _z (mg)	Tiempo, t (h)	IT, m _z t (mg*h)	GE (%)
1:2	5	24	120	18,6
	5	48	240	22,1
	15	24	360	33,6
	25	24	600	53,6
	15	48	720	53,6
	40	24	960	66,4
	25	48	1200	69,3
	60	24	1440	72,1
	80	24	1920	75,7
1:3	5	24	120	16,7
	5	48	240	17,6
	15	24	360	28,7
	25	24	600	43,5
	15	48	720	39,8
	40	24	960	55,6
	25	48	1200	62,0
	60	24	1440	67,6
	80	24	1920	70,8

IT: Intensidad de tratamiento (masa de lipasa × tiempo)

En la figura 3.2.5 se representa la evolución del GE con la intensidad de tratamiento para diferentes relaciones entre sustratos en ausencia de agua. En esta figura se observa que el aumento de la relación molar alcohol/AGLs de 2 a 3 hace disminuir ligeramente la velocidad de reacción, efecto coincidente con el que se puso de manifiesto en presencia de 0,1 ml de agua para el GE obtenido con una intensidad de tratamiento concreta.

Figura 3.2.5.- Esterificación de un extracto AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento y la relación molar AGLs/alcohol sobre el grado de esterificación (GE).



Condiciones experimentales: 400 mg de sustratos, 4 ml de n-hexano, 40 °C y sin agua añadida.

3.2.4.5.- Relación sustratos/disolvente

Tal y como se describe en apartados anteriores el disolvente juega un papel importante en las reacciones con lipasas. En procesos destinados a la obtención de productos naturales con aplicaciones en alimentación y salud será interesante estudiar la posibilidad de su eliminación. Por otro lado, para minimizar costes, habría que determinar el volumen mínimo a añadir, en el caso de que fuera necesario añadirlo. Tal y como puede observarse, al eliminar el disolvente se aumentan las cantidades de sustratos para que el volumen de reacción no descienda demasiado. En la tabla 3.2.21 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos relacionados con este estudio.

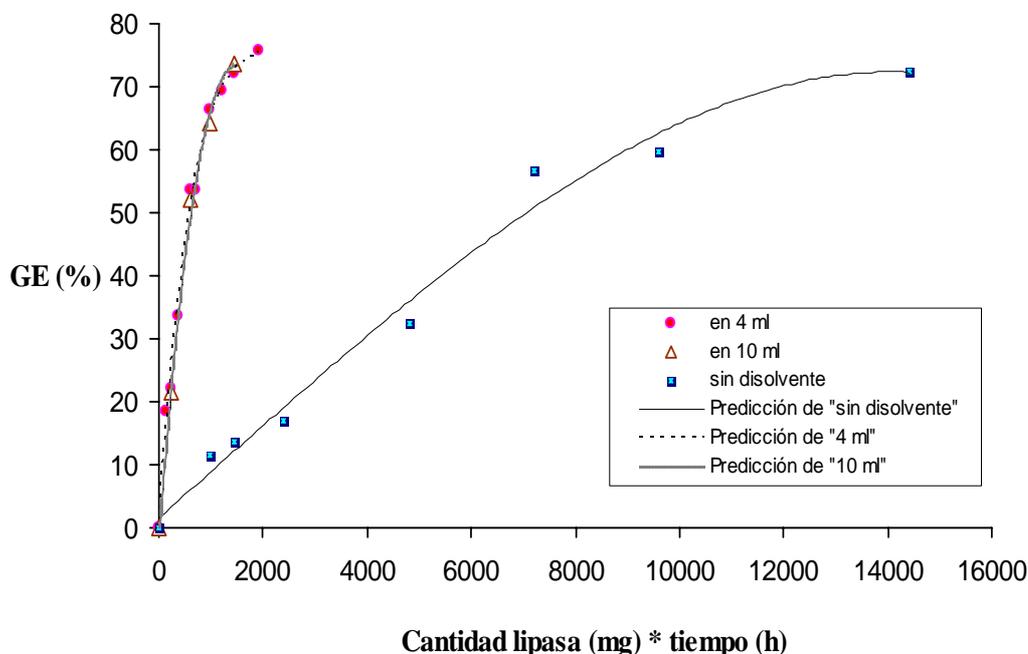
Tabla 3.2.21.- Esterificación de un extracto AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: grado de esterificación (GE) con diferentes cantidades de sustratos y hexano y diferentes intensidades de tratamiento (IT, $m_z t$). Condiciones de operación: 40 °C, relación molar AGLs/alcohol láurico 1:2 y sin agua añadida.

Disolvente (ml)	Masa de sustratos (g)	Masa de lipasa, m_z (mg)	Tiempo, t (h)	IT, $m_z t$ (mg . h)	$m_z t$ / masa de sustratos (mg . h / mg)	GE (%)
4	0,4	5	24	120	300	18,6
		5	48	240	600	22,1
		15	24	360	900	33,6
		25	24	600	1500	53,6
		15	48	720	1800	53,6
		40	24	960	2400	66,4
10	0,4	25	48	1200	3000	69,3
		10	24	240	600	21,4
		25	24	600	1500	52,1
		40	24	960	2400	64,3
Sin disolvente	4	60	24	1440	3600	73,6
		20	24	480	120	8,5
		20	48	960	240	11,4
		30	48	1440	360	13,7
		50	48	2400	600	16,8
		200	24	4800	1200	32,4
		300	24	7200	1800	56,5
200	48	9600	2400	59,7		
300	48	14400	3600	72,5		

IT: Intensidad de tratamiento (masa de lipasa \times tiempo)

En la figura 3.2.6 se muestra la evolución del GE con la intensidad de tratamiento para las diferentes cantidades de sustratos y de disolvente utilizadas.

Figura 3.2.6.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre el grado de esterificación (GE) para diferentes concentraciones de sustratos.

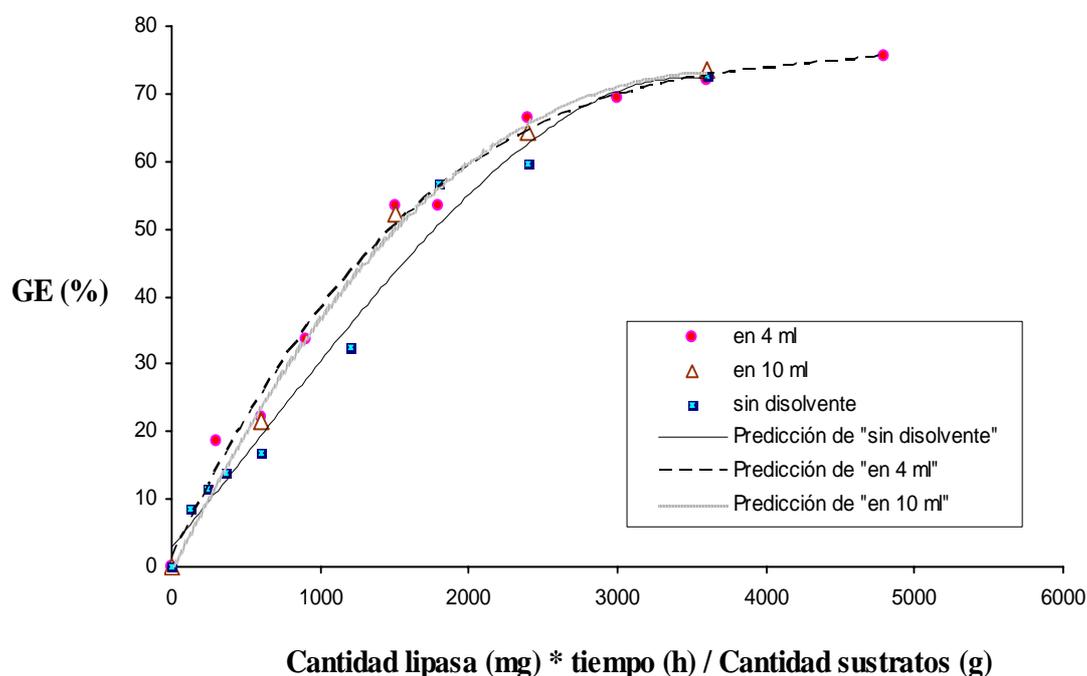


Condiciones de operación: 40 °C y sin agua añadida.

En esta figura se observa que no hay diferencias apreciables entre los GE que se obtuvieron con 4 ml y 10 ml de n-hexano, lo que indica que en este intervalo de concentraciones esta variable no influye sobre la cinética de la esterificación. También se observa que en el experimento realizado con 4 g de reactivos y sin disolvente la velocidad de esterificación por unidad de masa de lipasa es inferior a cuando se utilizan menores cantidades de sustrato. Sin embargo, esta velocidad mantiene valores apreciables hasta alcanzar el equilibrio, lo que significa que en caso necesario puede prescindirse del disolvente. Parece lógico pensar que la disminución de la velocidad de esterificación al eliminar el disolvente se debe a una mayor limitación de la velocidad de transferencia de sustratos y productos entre la lipasa y el medio de reacción (González Moreno y cols., 2004).

Al representar la evolución del GE con respecto a la intensidad de tratamiento por unidad de masa de sustrato (figura 3.2.7) se puede observar con más claridad que los ensayos con y sin disolvente conducen a resultados similares.

Figura 3.2.7.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento (m_{zt}) por unidad de masa de sustrato sobre el grado de esterificación (GE) para diferentes relaciones de AGLs/hexano.



Condiciones de operación: 40 °C y sin agua añadida.

3.2.4.6.- Grado de esterificación óptimo

El grado de esterificación óptimo de los ácidos grasos ricos en EPA es el que permite obtener valores lo más elevados posible del factor de concentración y del rendimiento de recuperación del EPA. Sería por tanto interesante poder relacionar los grados de esterificación alcanzados en los diferentes ensayos con la lipasa AK y sus correspondientes factores de concentración y rendimientos de recuperación de EPA. El procedimiento de

cálculo es el mismo al descrito en el apartado 3.2.3, a partir de las ecuaciones [3.1.1] - [3.1.5]. Así, en las figuras 3.2.8 y 3.2.9 se representan las variaciones de estos parámetros con el grado de esterificación.

Figura 3.2.8.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* en diversas condiciones de operación: influencia del grado de esterificación (GE) sobre el factor de concentración del EPA en la fracción de AGLs sin esterificar (F_C).

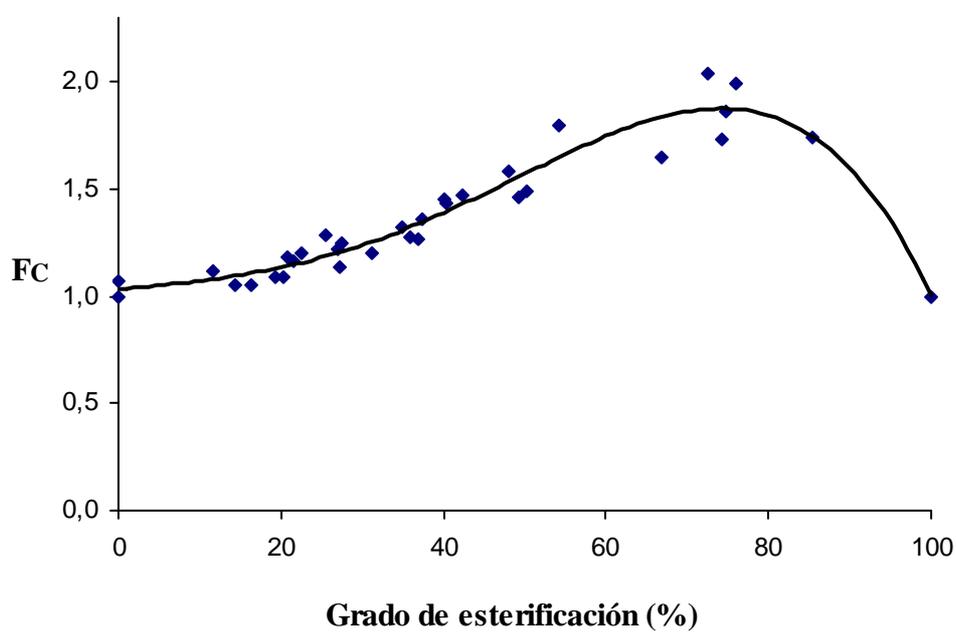
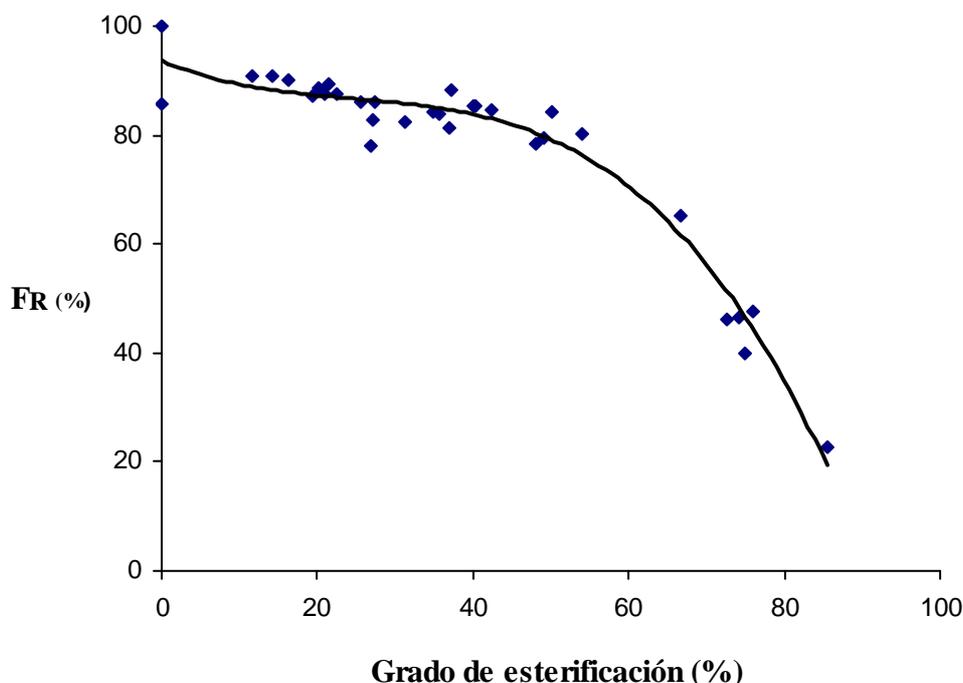


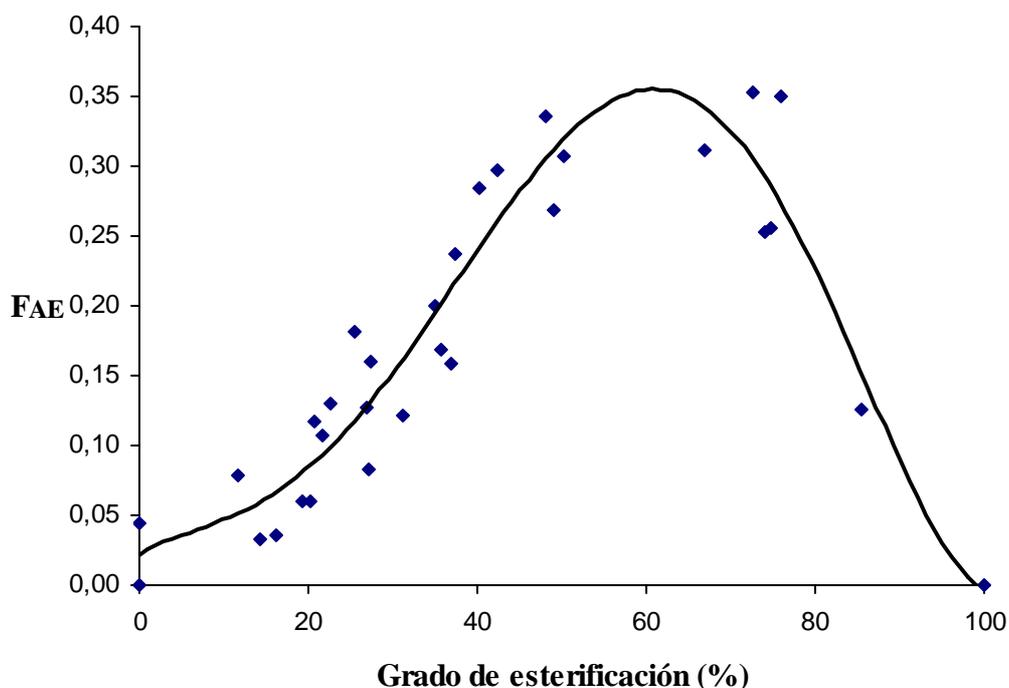
Figura 3.2.9.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* en diversas condiciones de operación: influencia del grado de esterificación (GE) sobre el factor de recuperación del EPA en la fracción de AGLs sin esterificar (F_R).



Estas figuras muestran que el factor de concentración pasa por un máximo para un grado de esterificación de un 75%, aproximadamente, y que el rendimiento de recuperación del EPA disminuye a medida que aumenta el GE, primero de forma suave y después de manera brusca. En la figura 3.2.9 se observa que cuando el GE es del 75% sólo se recupera un 45% del EPA en la fracción de AGLs.

Para obtener el GE óptimo puede correlacionarse el grado de esterificación con el factor adimensional de eficacia (F_{AE}), que tiene en cuenta tanto el factor de concentración como el rendimiento (figuras 3.2.8 y 3.2.9). Este factor se calcula para los diferentes experimentos realizados con la lipasa AK según el procedimiento descrito en el apartado 3.2.3 y la correlación de este factor con el GE se muestra en la figura 3.2.10, en la que se observa que el F_{AE} pasa por un máximo para un GE aproximado del 60%, que podría considerarse como el valor óptimo del GE.

Figura 3.2.10.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* en diversas condiciones de operación: influencia del grado de esterificación (GE) sobre el factor adimensional de eficacia para la concentración del EPA (F_{AE}).



En las figuras 3.2.8 y 3.2.9 se observa que cuando el GE es del 60% el factor de concentración y el rendimiento de recuperación del EPA tienen valores de 1,7 y 72%, respectivamente. Este factor de concentración corresponde a una concentración del EPA en la fracción de ácidos grasos libres del 73%.

En las figuras 3.2.5 ó 3.2.6 se observa que este grado de esterificación se puede conseguir con 400 mg de sustratos, una relación molar AGLs/alcohol 1:2, 4 ml de hexano, con la lipasa AK sin inmovilizar, 40 °C, sin adición de agua y con una intensidad de tratamiento de aproximadamente 800 mg de lipasa \times hora. Este experimento se realizó varias veces para comprobar que se obtiene un grado de esterificación en torno a un 60% y unos factores de concentración y recuperación del orden de los predichos. Los resultados obtenidos en este experimento fueron los siguientes:

GE	F_C	F_R (%)	F_{AE}
59,3 – 60,7	1,66-1,68	72-74	0,36

Intensidad de tratamiento = 816 mg de lipasa × h (34 mg de lipasa durante 24 horas).

Estos resultados corresponden a un extracto con una pureza del 71-73 % de EPA donde se recuperaba un 72-74% del EPA inicial.

3.2.4.7.- Esterificaciones sucesivas

La técnica de separación de los productos de reacción por neutralización de los AGLs sin saponificación de los ésteres (apartado 2.6.6) permitiría la realización de esterificaciones sucesivas. Una vez separados, aplicando nuevas esterificaciones a la fracción de AGLs sin esterificar, podríamos alcanzar mayores grados de pureza y, aplicando nuevas esterificaciones a los AGLs obtenidos a partir de los ésteres formados (mediante saponificación directa), podríamos alcanzar mayores grados de recuperación.

3.2.5.- ESTERIFICACIÓN SELECTIVA DE EXTRACTOS DE AGLs DE *P. TRICORNUTUM*

En la tabla 3.2.22 se muestra el perfil medio en ácidos grasos de la biomasa de partida y de su correspondiente extracto de ácidos grasos libres.

Tabla 3.2.22.- Perfil en ácidos grasos (% en peso sobre ácidos grasos totales y sobre peso seco de biomasa, PS) de la biomasa de *P. tricornutum* y del extracto de AGLs obtenido por saponificación alcalina de la misma.

ÁCIDOS GRASOS	Sobre AGs totales		Sobre peso seco	
	Biomasa (%)	AGLo (%)	Biomasa (%)	AGLo (%)
14:0	7,4	6,9	0,47	0,39
16:0	17,7	20,1	1,14	1,14
16:1n7	17,9	19,1	1,15	1,08
16:2n4	4,0	4,0	0,25	0,23
16:3n4	6,0	5,6	0,39	0,32
16:4n1	1,0	0,7	0,06	0,04
18:0	0,7	1,0	0,05	0,05
18:1n9	1,8	2,2	0,12	0,12
18:1n7	1,5	1,6	0,09	0,09
18:2n6	2,4	3,0	0,15	0,17
18:3n3	0,7	0,5	0,04	0,03
18:4n3	0,6	0,6	0,04	0,03
20:4n6	2,2	2,4	0,14	0,14
20:4n3	0,8	0,9	0,05	0,05
20:5n3 (EPA)	22,0	23,0	1,41	1,30
24:0	0,8	0,3	0,05	0,02
22:5n3	3,4	3,8	0,22	0,22
22:6n3 (DHA)	2,7	2,5	0,17	0,14
Otros	6,6	1,8	0,43	0,10

PS: Tanto por ciento en peso seco con respecto al peso total de biomasa

Como puede apreciarse, este extracto lipídico contiene una elevada proporción de EPA (del orden del 22%), que es el ácido graso que se pretende purificar.

Para la esterificación enzimática de extractos de *P. tricornutum* se emplearon inicialmente las condiciones experimentales optimizadas en la esterificación enzimática del aceite EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens* sin inmovilizar. En estas

condiciones se ensayaron diferentes intensidades de tratamiento, combinando diferentes cantidades de lipasa y tiempos de incubación. En la tabla 3.2.23 se muestran los grados de esterificación y porcentajes en peso de EPA sobre AGs totales para los diferentes ensayos realizados. A partir de estos resultados pueden calcularse los correspondientes factores de concentración (F_C), de recuperación de EPA (F_R) y de eficacia (F_{AE}), que también se muestran en esta tabla. El procedimiento de cálculo seguido fue el mismo que se utilizó anteriormente en las esterificaciones de extractos de AGLs de EPAX4510TG (apartado 3.2.4.5, ecuaciones [3.1.1] - [3.1.5]). Con este sustrato de partida, el máximo factor de concentración teórico (para un 100% de EPA en la fracción de AGLs) sería 4,35.

Tabla 3.2.23.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* variando la intensidad de tratamiento (tiempo y cantidad de lipasa): grado de esterificación (GE), contenido (% en peso) de EPA sobre AGs totales en la fracción de AGLs (C_{EA}) y factores de concentración, recuperación de EPA y adimensional de eficacia (F_C , F_R y F_{AE}). Condiciones de operación: 400 mg de sustratos con una relación molar 1:2, 4 ml de hexano, sin agua añadida y 40 °C.

Tiempo (h)	Lipasa (mg)	IT (mg * h)	GE (%)	C_{EA} (%)	F_C (0 - 4,35)	F_R (%)	F_{AE} (0 - 1)
24	20	480	5,2	24,9	1,04	98,4	0,01
23	34	782	26,8	33,5	1,33	97,6	0,10
24	34	816	32,1	31,9	1,39	95,1	0,11
24	51	1224	55,4	49,5	1,95	92,1	0,26
48	34	1632	63,9	59,2	2,47	89,3	0,39
48	51	2448	76,8	75,9	3,17	73,4	0,48
48	68	3264	88,1	73,4	3,06	36,5	0,23

GE Grado de esterificación

C_{EA} Contenido (% en peso de EPA) sobre el AGs totales en la fracción de AGLs (obtenidos por CG)

F_C Factor de concentración de EPA en la fracción de AGLs respecto al contenido en el extracto inicial.

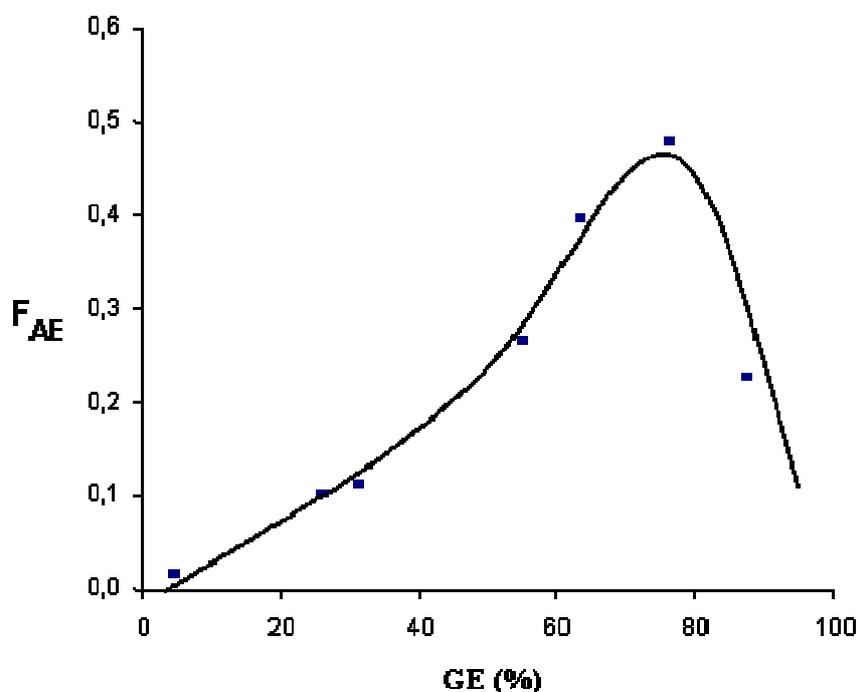
F_R Porcentaje de EPA en la fracción de AGLs respecto al total de EPA en la mezcla final.

F_{AE} Factor adimensional de eficacia.

Véase apartado 3.2.4.5 para su procedimiento de cálculo

Así, al igual que para los ensayos con EPAX4510TG, el factor adimensional de eficacia (F_{AE}) tendrá en cuenta simultáneamente tanto la pureza del EPA como el rendimiento de su recuperación obtenidos.

Figura 3.2.11.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia del grado de esterificación (GE) sobre el factor adimensional de eficacia (F_{AE}).

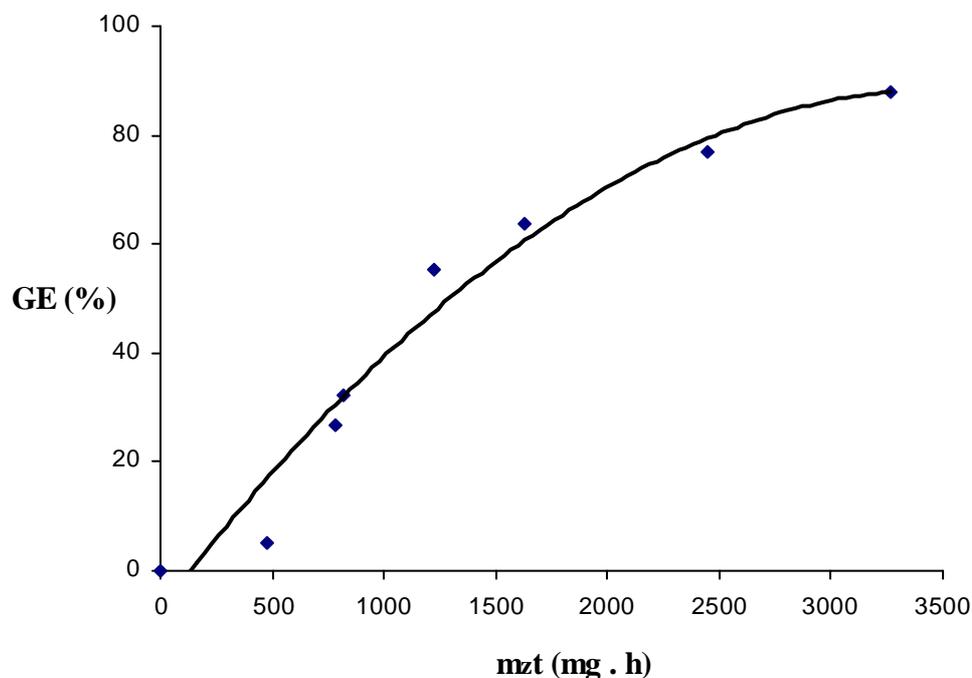


Condiciones de operación: 400 mg de sustratos con una relación molar 1:2, en 4 ml de hexano, sin agua añadida y a 40 °C.

En la figura 3.2.11 se han representado los valores del F_{AE} frente a los GE. En ella se observa que el F_{AE} alcanza un valor óptimo para un grado de esterificación aproximado del 78%.

De la misma manera que se ha hecho en las esterificaciones de los extractos de AGLs de EPAX4510TG, a partir de este grado de esterificación puede conocerse qué intensidad de tratamiento debe aplicarse para obtener tanto el GE como el F_{AE} óptimos. En la figura 3.2.12 se ha representado la variación del GE con la intensidad de tratamiento ($m_z t$) que se muestra en la tabla 3.2.23.

Figura 3.2.12.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre el grado de esterificación (GE).

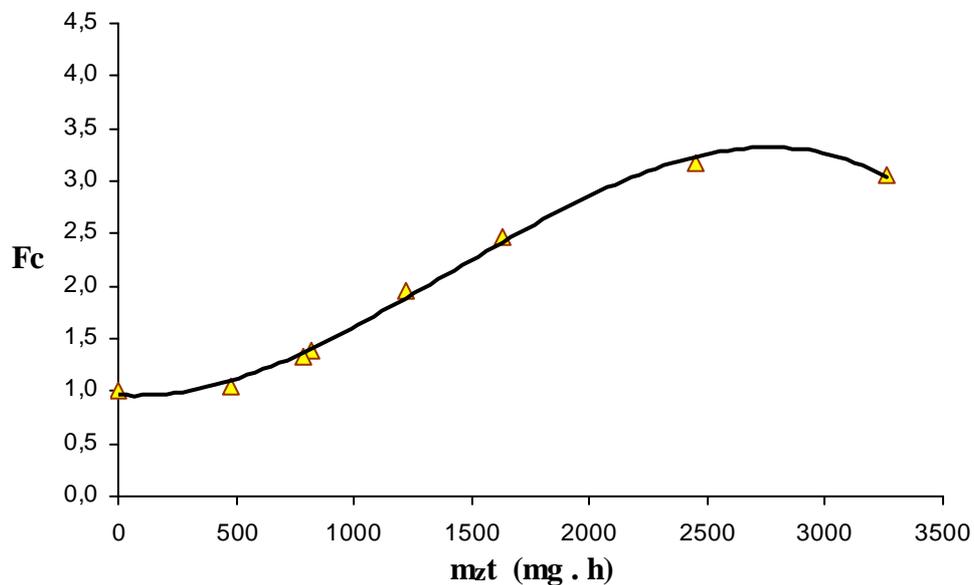


Condiciones de operación: 400 mg de sustratos con una relación molar 1:2, en 4 ml de hexano, sin agua añadida y a 40 °C.

En esta figura puede observarse como para obtener un grado de esterificación óptimo (78%) habrá que aplicar una intensidad de tratamiento de aproximadamente 2200 mg de lipasa por hora.

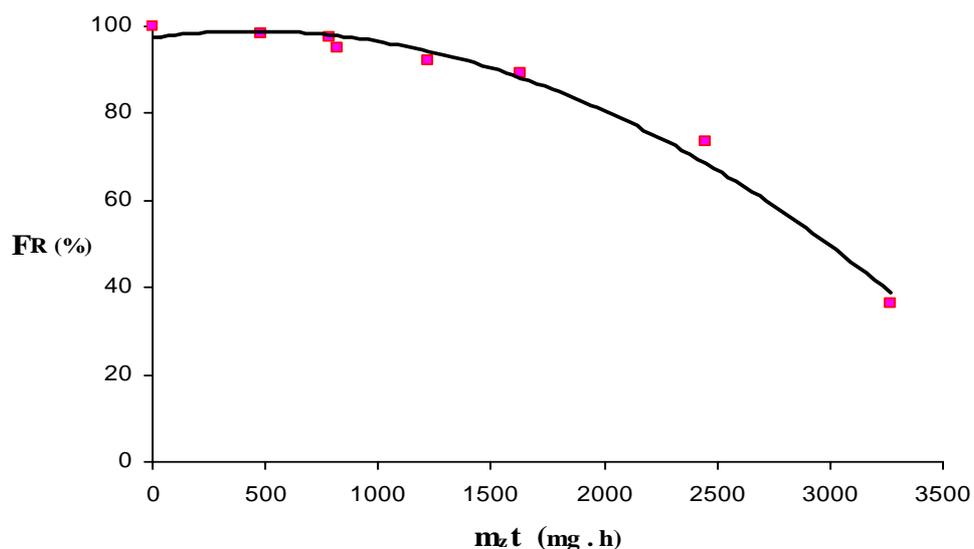
Como los factores de concentración y recuperación de EPA están relacionados con el grado de esterificación, estos factores también podrán representarse en función de la intensidad de tratamiento. En las figuras 3.2.13 y 3.2.14 se representan dichas relaciones.

Figura 3.2.13.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre el factor de concentración del EPA (F_c).



Condiciones de operación: 400 mg de sustratos con una relación molar 1:2, en 4 ml de hexano, sin agua añadida y a 40 °C.

Figura 3.2.14.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con alcohol láurico catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre el factor de recuperación del EPA (F_R).



Condiciones de operación: 400 mg de sustratos con una relación molar 1:2, en 4 ml de hexano, sin agua añadida y a 40 °C.

La figura 3.2.13 muestra que el factor de concentración aumenta con la intensidad de tratamiento hasta alcanzar un máximo en torno a 2800 mg.h, mientras que el rendimiento de recuperación del EPA (figura 3.2.14) disminuye continuamente a medida que aumenta la intensidad de tratamiento, primero suavemente y después de forma más acusada. El valor de intensidad de tratamiento que hace F_C máximo (3,3) no coincidiría con la intensidad de tratamiento óptima (el que origina un F_{AE} máximo) pues corresponde a un rendimiento de recuperación del EPA de tan sólo el 52%.

En esta figura también puede comprobarse que para una intensidad de tratamiento de 2200 mg de lipasa \times hora (valor óptimo obtenido que hace el F_{AE} máximo, según las figuras 3.2.11 y 3.2.12) el factor de concentración será del orden de 3,1 y el rendimiento de recuperación de EPA del 76%. Este factor de concentración de EPA en la fracción de AGLs no esterificados corresponde a una pureza del orden del 71%.

Se ensayaron varias veces en estas condiciones óptimas (400 mg de sustratos, una relación molar AGLs/alcohol 1:2, 4 ml de hexano, con la lipasa AK sin inmovilizar, 40 °C, sin adición de agua y con una intensidad de tratamiento del orden de 2200 mg de lipasa \times hora) para comprobar los resultados predichos. Los resultados obtenidos en este experimento fueron los siguientes:

GE	F_C	F_R (%)	F_{AE}
77,3 – 79,1	3,0-3,2	74-77	0,46-0,49

Intensidad de tratamiento = 2208 mg de lipasa \times hora (92 mg de lipasa durante 24 horas).

Estos resultados corresponden a un extracto con una pureza del 72-73 % de EPA donde se recuperaba un 73-78% del EPA inicial.

3.2.6.- CINÉTICA DE LA ESTERIFICACIÓN DE AGLS RICOS EN EPA MEDIANTE ALCOHOL LÁURICO CATALIZADA POR LA LIPASA AK DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

Los resultados experimentales correspondientes a la esterificación de los AGLs procedentes del EPAX4510TG y de la microalga de *P. tricornutum* se han ajustado al modelo utilizado también para ajustar los resultados de la hidrólisis de TG del EPAX4510TG. Este modelo, aunque empírico, permite obtener valores representativos de la constante cinética global de esterificación, k_L , y de la constante cinética de esterificación para el EPA, k_{LE} , (o para cualquier otro ácido de interés), suponiendo que la velocidad de esterificación es proporcional al alejamiento del equilibrio (fuerza impulsora) en la forma:

$$r_L = k_L(Y_{Le} - Y_L) \quad [3.2.6]$$

$$r_{LE} = k_{LE}(Y_{LEe} - Y_{EL}) \quad [3.2.7]$$

donde Y_L es la fracción molar de ácidos grasos esterificados por el alcohol láurico en disolución (inicialmente presentes como AGLs) con respecto a los ácidos grasos totales (libres y esterificados) e Y_{EL} es la fracción molar de EPA en la forma de éster láurico en cualquier instante con respecto al EPA total (libre y esterificado); Y_{Le} y Y_{LEe} son los valores de las dos fracciones molares anteriores en el equilibrio y r_L y r_{LE} son, respectivamente, las velocidades de esterificación global y de esterificación del EPA: moles de ácidos grasos esterificados (o de EPA esterificado) por unidad de tiempo y unidad de masa de lipasa (moles/(h g)).

Todas las reacciones de esterificación se han llevado a cabo en matraces equivalentes a tanques agitados con las lipasas dispersas. Realizando balances máxicos de ésteres láuricos, L, y del éster del EPA, EL, a un instante de tiempo dt se tendrá

$$r_L m_z = V \frac{d[L]}{dt} \quad [3.2.8]$$

$$r_{LE} m_z = V \frac{d[EL]}{dt} \quad [3.2.9]$$

donde m_z es la masa de lipasa contenida en el tanque agitado (mg ó g), V es el volumen de reacción, $[L]$ es la concentración de ésteres láuricos en la mezcla reaccionante y $[EL]$ es la concentración del EPA esterificado.

Las fracciones molares de ésteres con respecto a los ácidos grasos totales (y/o grupos acilo), Y_L , se han determinado experimentalmente. La relación entre esta fracción molar de ésteres y la concentración de ésteres será:

$$Y_L = \frac{[L]}{[A]_0}$$

$$\frac{d[L]}{dt} = [A]_0 \frac{dY_L}{dt} \quad [3.2.10]$$

donde $[A]_0$ es la concentración de grupos acilo totales, que será igual a la concentración de AGLs iniciales. De forma similar, para el EPA se tendrá

$$Y_{EL} = \frac{[EL]}{[A]_0 Y_{EA0}}$$

$$\frac{d[EL]}{dt} = [A]_0 Y_{EA0} \frac{dY_{EL}}{dt} \quad [3.2.11]$$

donde Y_{EL} es la fracción molar del EPA esterificado con respecto al EPA total y Y_{EA0} es la fracción molar de EPA en los AGLs iniciales. Sustituyendo las ecuaciones [3.2.10] y [3.2.11] y las expresiones cinéticas [3.2.6] y [3.2.7] en [3.2.8] y [3.2.9], se tendrá

$$\frac{dY_L}{dt} = \frac{k_L m_z}{[A]_0 V} (Y_{Le} - Y_L) \quad [3.2.12]$$

$$\frac{dY_{EL}}{dt} = \frac{k_{LE} m_z}{[A]_0 Y_{EA0} V} (Y_{ELe} - Y_{EL}) \quad [3.2.13]$$

Estas expresiones relacionan las velocidades con que aumentan las fracciones molares de ésteres láuricos totales y del éster del EPA con las variables de operación. Separando variables e integrando entre $t = 0$ (donde $Y_L = Y_{L0}$ y $Y_{EL} = Y_{EL0}$) y $t = t$, se tendrá

$$Y_L = Y_{Le} - (Y_{Le} - Y_{L0}) \exp\left(-\frac{k_L m_z t}{[A]_0 V}\right) \quad [3.2.14]$$

$$Y_{EL} = Y_{ELe} - (Y_{ELe} - Y_{EL0}) \exp\left(-\frac{k_{LE} m_z t}{[A]_0 Y_{EA0} V}\right) \quad [3.2.15]$$

donde Y_{L0} y Y_{EL0} son las fracciones molares iniciales de ésteres totales y del éster del EPA, respectivamente, que normalmente son iguales a cero. Estas expresiones representan la variación con el tiempo de las fracciones molares de ésteres totales y del éster del EPA en un reactor discontinuo mezcla perfecta. Ponen claramente de manifiesto que la variable intensiva que determina el grado de esterificación es el producto de la masa de enzima por el tiempo por cada mol de ácido graso inicial (relación $m_z t / [A]_0 V$).

En la tabla 3.2.24 se muestran las fracciones molares de ésteres láuricos totales (Y_L) y del éster del EPA (Y_{EL}) obtenidos con la lipasa AK a partir de los AGLs del EPAX4510TG y de la microalga *P. tricornutum*. Las fracciones molares de ésteres láuricos se han obtenido a partir de los porcentajes en peso de estos mismos ésteres que se muestran en las tablas 3.2.20, 3.2.21 y 3.2.23 mediante la ecuación:

$$Y_L = \frac{X_L \times PM_L}{X_L \times PM_L + X_A \times PM_A} \quad [3.2.16]$$

donde X_L y X_A son las fracciones másicas de ésteres láuricos y de AGLs, respectivamente y PM_L y PM_A son los pesos moleculares medios de cada una de estas fracciones, que se han calculado a partir de los perfiles de ácidos grasos de cada una de las fracciones. Las fracciones molares de EPA como éster láurico (Y_{EL}) se han calculado a partir del rendimiento de EPA en los AGLs que se muestra en las tablas 3.2.20, 3.2.21 y 3.2.23.

Tabla 3.2.24.- Esterificación de los extractos de AGLs de EPAX4510TG y de la microalga *P. tricornutum* con la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* variando las cantidades de disolvente y de sustrato y la intensidad de tratamiento ($m_z t$): fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , y fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} . Condiciones de operación: sin agua, 40 °C y 400 rpm.

Relación LaOH/AGLs (mol/mol)	Cantidad de disolvente (ml)	Cantidad de AGLs (g)	t (h)	m_z (mg)	$m_z t$ (mg h)	Y_L (%)	Y_{EL} (%)			
2	4	0,178	24	5	120	18,7	10,6			
			48	5	240	22,1	11,4			
			24	15	360	33,1	14,6			
			24	25	600	53,0	23,5			
			48	15	720	52,9	23,4			
			24	40	960	66,1	33,3			
			48	25	1200	69,0	36,0			
			24	60	1440	72,0	39,1			
			24	80	1920	75,7	43,2			
			24	10	240	21,4	11,3			
2	10	0,178	24	25	600	51,5	22,6			
			24	40	960	63,9	31,3			
			24	60	1440	73,5	40,7			
			20	24	480	9,3	8,0			
			20	48	960	12,0	8,8			
			30	48	1440	14,2	9,3			
			2	Sin disolvente	1,78	50	48	2400	17,1	10,1
						200	24	4800	32,0	14,2
300	24	7200				56,0	25,4			
200	48	9600				59,2	27,6			
			300	48	14400	72,4	39,5			

Y_L : fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales

Y_{EL} : fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total

Tabla 3.2.24 (continuación).- Esterificación de los extractos de AGLs de EPAX4510TG y de la microalga *P. tricornutum* con la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* variando las cantidades de disolvente y de sustrato y la intensidad de tratamiento ($m_z t$): fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_{EA} , y fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} . Condiciones de operación: sin agua, 40 °C y 400 rpm.

Relación LaOH/AGLs (mol/mol)	Cantidad de disolvente (ml)	Cantidad de AGLs (g)	t (h)	m_z (mg)	$m_z t$ (mg h)	Y_L (%)	Y_{EL} (%)
3	4	0,139	24	5	120	16,9	10,1
			48	5	240	17,8	10,3
			24	15	360	28,4	13,2
			48	15	720	39,2	16,7
			24	40	960	54,9	24,7
			48	25	1200	61,6	29,4
			24	60	1440	67,3	34,4
			24	80	1920	70,6	37,6
			24	25	600	42,9	18,2
			24	20	480	5,0	1,6
			24	34	816	30,9	4,9
			23	34	782	25,7	2,4
2 (<i>P. tricornutum</i>)	4	0,178	24	51	1224	53,2	7,9
			48	34	1632	61,5	10,7
			48	51	2448	74,9	26,6
			48	68	3264	87,5	63,5
			48	68	3264	87,5	63,5

Y_L : fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales

Y_{EL} : fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total

Los resultados experimentales correspondientes a los ésteres totales y a los ésteres del EPA que se muestran en la tabla 3.2.24 se han ajustado a las ecuaciones [3.2.14] y [3.2.15], respectivamente, en la forma.

$$Y_L = Y_{Le} - (Y_{Le} - Y_{L0}) \exp(-a_L m_z t) \quad [3.2.17]$$

$$Y_{EL} = Y_{ELe} - (Y_{ELe} - Y_{EL0}) \exp(-a_{EL} m_z t) \quad [3.2.18]$$

determinándose los valores de a_L y a_{EL} que hacen mínima la suma de los cuadrados de las desviaciones entre los valores experimentales y los valores de Y_L y Y_{EL} calculados mediante las ecuaciones [3.2.17] y [3.2.18]. En las figuras 3.2.15 a 3.2.19 se muestran los resultados de estos ajustes.

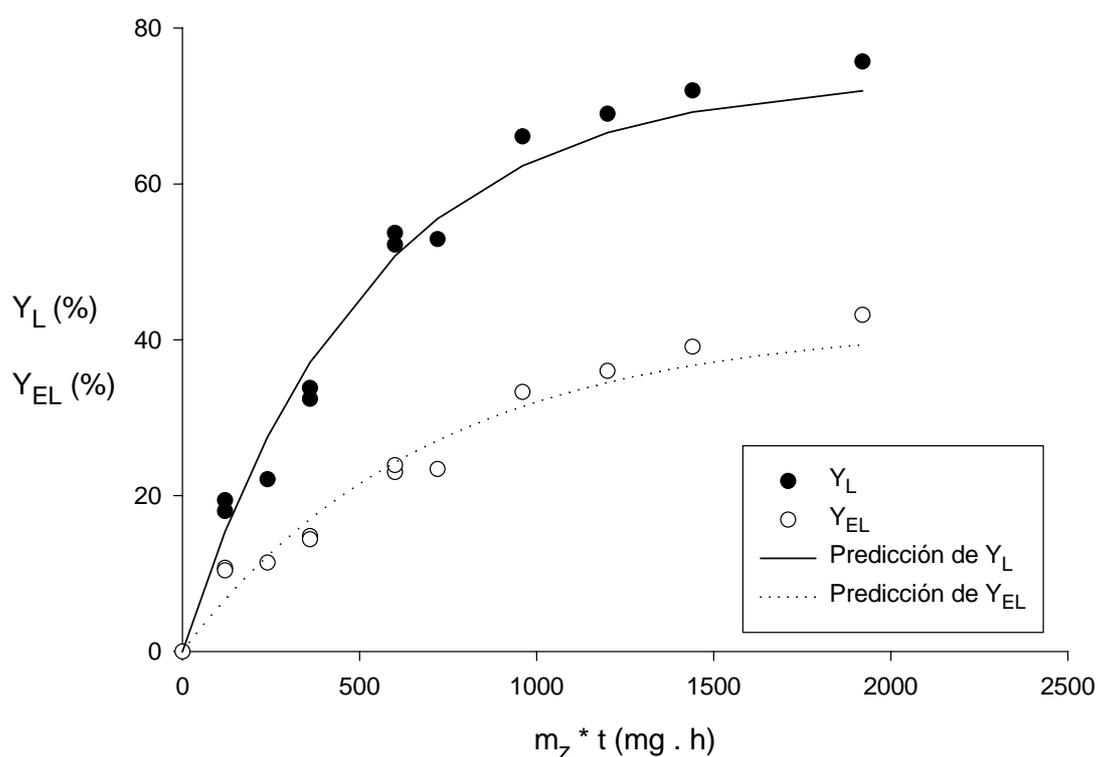
En todos los experimentos realizados con ácidos grasos procedentes del aceite EPAX4510TG se ha tomado un mismo grado de esterificación en el equilibrio (Y_{Le}) igual al 73,7%, puesto que se ha admitido que este grado de esterificación en el equilibrio depende de la composición en ácidos grasos del extracto de partida. Para el EPA el grado de esterificación de equilibrio (Y_{ELe}) se ha tomado igual al 42%. Estos grados de esterificación se han tomado como la media de los valores superiores al 70% (para la esterificación de todos los lípidos) y al 40% (para la esterificación del EPA), alcanzados a intensidades de tratamiento elevadas (tabla 3.2.24). Puesto que $Y_{L0} = Y_{EL0} = 0$, las ecuaciones [3.2.17] y [3.2.18] quedan en la forma

$$Y_L = 73,7[1 - \exp(-a_L m_z t)] \quad [3.2.19]$$

$$Y_{LE} = 42,0[1 - \exp(-a_{EL} m_z t)] \quad [3.2.20]$$

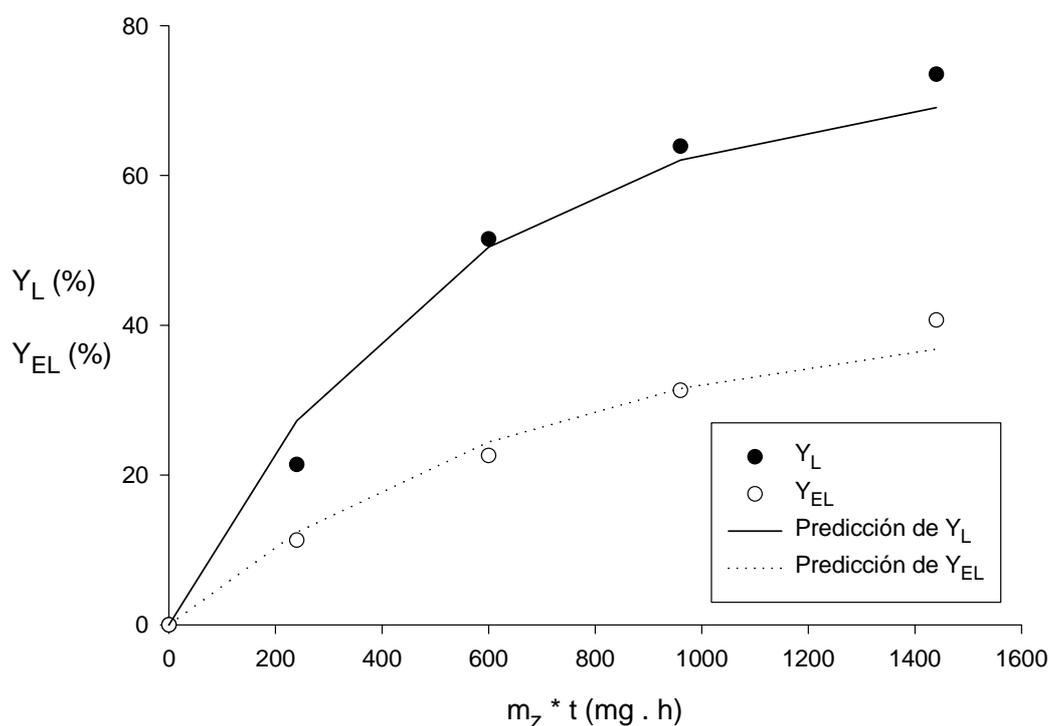
En las figuras 3.2.15 a 3.2.18 se observa que el modelo reproduce aceptablemente todos los resultados experimentales correspondientes a la esterificación de los ácidos grasos del aceite EPAX4510TG.

Figura 3.2.15.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$, (mg.h)) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L (%), y sobre las fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} (%). Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.19] y [3.2.20].



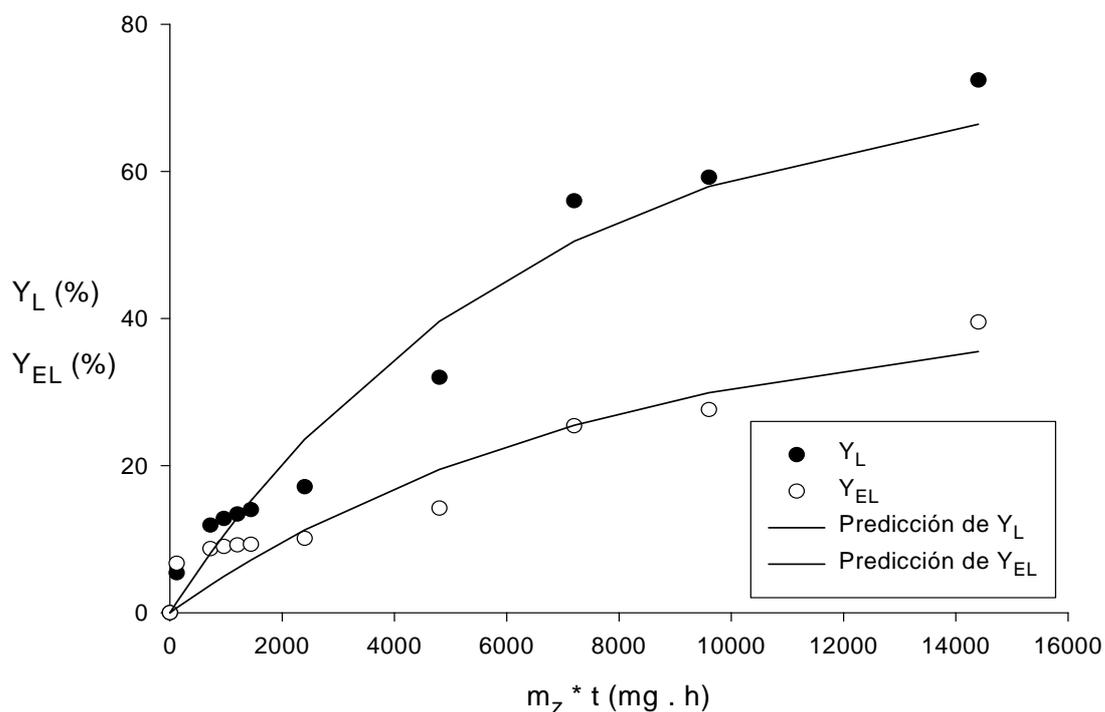
Condiciones de operación: 178 mg de ácidos grasos, 222 mg de alcohol láurico (2 mol/mol), 4 ml de hexano, sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

Figura 3.2.16.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , y sobre las fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} , modificando la **cantidad de hexano**. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.19] y [3.2.20].



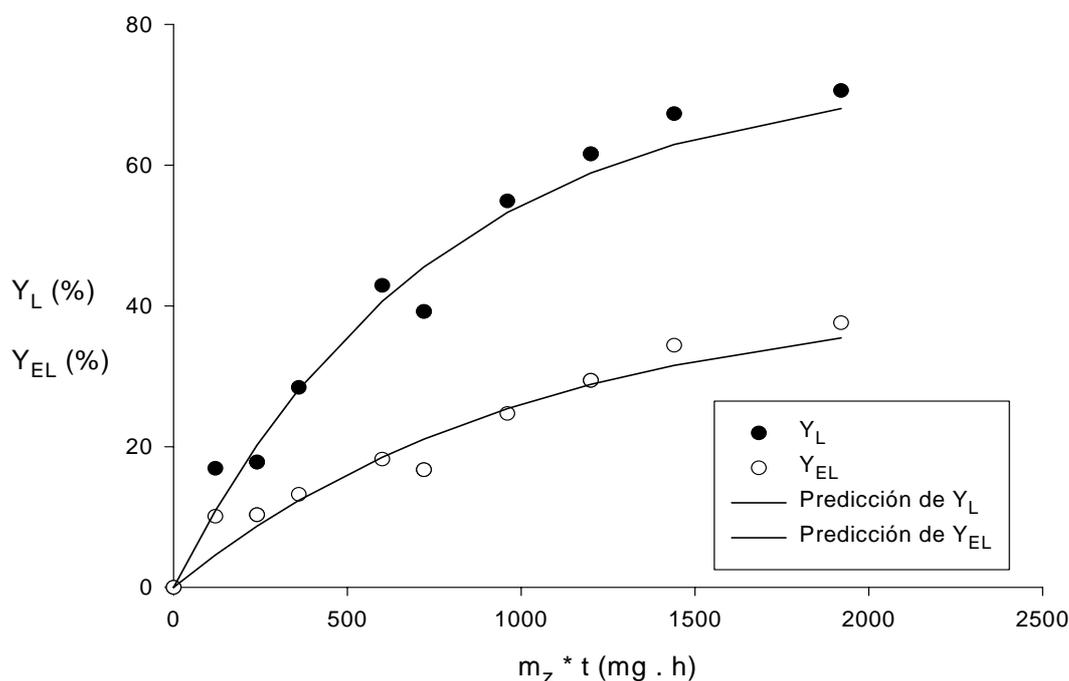
Condiciones de operación: 178 mg de ácidos grasos, 222 mg de alcohol láurico (2 mol/mol), 10 ml de hexano, sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

Figura 3.2.17.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , y sobre las fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} , modificando la **cantidad de sustratos y sin hexano**. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.19] y [3.2.20].



Condiciones de operación: 1,78 g de ácidos grasos, 2,22 g de alcohol láurico (2 mol/mol), sin disolvente, sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

Figura 3.2.18.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , y sobre las fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} , modificando la **relación molar** entre sustratos. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.19] y [3.2.20].



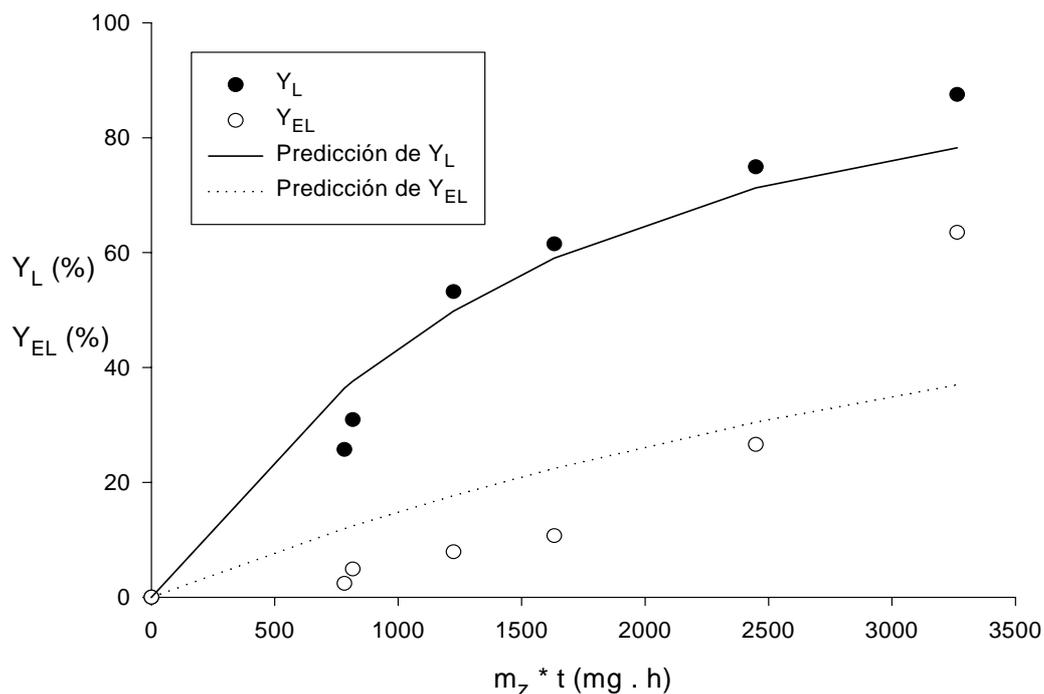
Condiciones de operación: 0,139 mg de ácidos grasos, 261 mg de alcohol láurico (3 mol/mol), 4 ml de hexano, sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

También los resultados experimentales correspondientes a la esterificación de los ácidos grasos de la microalga *P. tricornutum* se han ajustado a este modelo (figura 3.2.19), si bien en este caso los grados de esterificación de equilibrio alcanzados han sido mayores que con los ácidos grasos de EPAX4510TG. Así, en este caso, las ecuaciones que ajustan los resultados experimentales correspondientes a los ácidos grasos totales y al EPA son, respectivamente

$$Y_L = 87,5 \left[1 - \exp(-a_L m_z t) \right] \quad [3.2.21]$$

$$Y_{EL} = 63,5 \left[1 - \exp(-a_{EL} m_z t) \right] \quad [3.2.22]$$

Figura 3.2.19.- Esterificación de un extracto de AGLs de la microalga *P. tricornutum* con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento ($m_z t$) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , y sobre las fracciones molares del éster del EPA con respecto al EPA total, Y_{EL} . Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.21] y [3.2.22].



Condiciones de operación: 178 mg de ácidos grasos, 222 mg de alcohol láurico (2 mol/mol), 4 ml de hexano, sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

En la tabla 3.2.25 se muestran los valores de los parámetros a_L y a_{EL} que mejor ajustan estos resultados, así como los valores de las constantes cinéticas calculadas a partir de ellos.

Tabla 3.2.25.- Esterificación de AGLs procedentes del aceite EPAX4510TG y de la microalga *P. tricornutum* con la lipasa AK de *P. fluorescens*: parámetros a_L y a_{EL} que mejor ajustan los resultados experimentales (ecuaciones [3.2.19] a [3.2.22]) y constantes cinéticas aparentes (ecuaciones [3.2.14] y [3.2.15]).

LaOH/AGLs (mol/mol)	m_A (mg)	$[A]_0$ (mol/l)	a_L (mg.h) ⁻¹	* k_L (mmol/(g.h))	a_{EL} (mg.h) ⁻¹	** k_{LE} (mmol/(g.h))
2	178	0,150	0,00195	1,169	0,00144	0,366
2	178	0,060	0,00192	1,151	0,00145	0,368
2	1780	Sin disolvente	0,000160	0,959	0,000130	0,330
3	139	0,117	0,00134	0,627	0,000967	0,192
<i>P. tricornutum</i>	178	0,164	0,000688	0,450	0,000265	0,0373

m_A : masa inicial de AGLs

$$k_L = a_L V [A]_0 = a_L \frac{m_A}{PM_A}$$

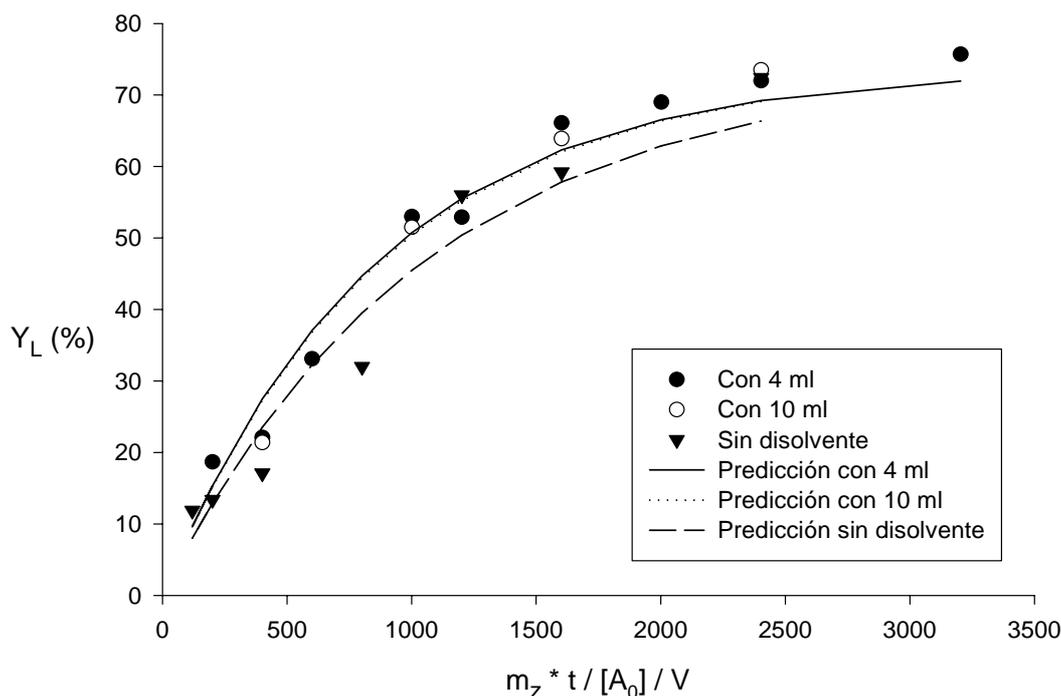
$PM_A=297$ g/mol (EPAX4510TG), 272 g/mol (*P. tricornutum*);

$$k_{LE} = a_{EL} V [A]_0 Y_{EA0} = a_{EL} \frac{m_A}{PM_A} Y_{EA0}$$

$Y_{EA0}=0,431$ (EPAX4510TG) y $0,239$ (*P. tricornutum*), $PM_E=302$ g/mol

En la tabla 3.2.25 se observa que las constantes cinéticas de esterificación de los AGLs y del EPA prácticamente no cambian cuando se aumenta la concentración de 0,06 a 0,15 mol/l y también su variación es pequeña cuando se retira totalmente el disolvente. Por lo tanto, en este caso puede resultar ventajoso operar sin disolvente. De hecho si se representan Y_L y Y_{EL} frente a la intensidad de tratamiento por unidad de masa de sustrato ($m_z t / [A]_0 V$) se obtendrán líneas casi únicas para todas las concentraciones ensayadas (figura 3.2.20).

Figura 3.2.20.- Esterificación de un extracto de AGLs de EPAX4510TG con lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento por mol de AGLs ($m_z t / [A]_0 V$) sobre las fracciones molares de ésteres láuricos con respecto a los grupos acilo totales, Y_L , para concentraciones de sustrato diferentes. Ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones [3.2.19] y [3.2.20].



Condiciones de operación: relación alcohol/AGLs = 2 mol/mol, , sin agua añadida, 40 °C y 400 rpm.

Las constantes cinéticas si disminuyen algo más apreciablemente cuando se aumenta la relación molar alcohol/AGLs y con los ácidos grasos de *P. tricornutum* (tabla 3.2.25). En el primer caso, como ya se ha comentado (apartado 3.2.4.4), puede deberse a que la adición de alcohol aumenta la viscosidad del medio y aumenta la resistencia de la transferencia de materia. La menor velocidad a la que se esterifican los ácidos grasos de la microalga *P. tricornutum* puede deberse, entre otras razones, a la gran cantidad de impurezas que aun están presentes en el extracto lipídico (de hecho se trata de un extracto aun muy coloreado). Estas impurezas pueden obstaculizar la transferencia de los sustratos hacia la enzima y su adsorción en los centros activos.

El ajuste de los resultados experimentales al modelo representado por las ecuaciones [3.2.6] y [3.2.7] permite utilizar las ecuaciones [3.2.17] y [3.2.18] para predecir los grados de esterificación totales y del EPA que pueden obtenerse a distintas intensidades de tratamiento, lo que puede utilizarse como criterio para el escalamiento de reactores discontinuos mezcla perfecta. Este escalamiento debería hacerse manteniendo constante el parámetro $\frac{m_z t}{[A]_0 V}$, que representa la intensidad de tratamiento por mol de ácido graso inicial. Esta conclusión debe aplicarse estrictamente en el rango de condiciones experimentales empleadas. Así, es muy importante mantener constantes todas las variables que afectan a la velocidad de reacción para que esta velocidad sea igual en ambas escalas; así por ejemplo se deberían mantener inalteradas las condiciones que afectan a la velocidad de transferencia de materia, como la concentración inicial de AGLs, la relación molar alcohol láurico/AGLs y la velocidad de agitación.

Por otra parte, en la tabla 3.2.26 se comparan las velocidades de esterificación de los ácidos grasos totales y del EPA calculadas utilizando las ecuaciones del modelo ([3.2.6] y [3.2.7]), determinando Y_L y Y_{EL} mediante las ecuaciones [3.2.17] y [3.2.18] y empleando las constantes cinéticas que figuran en la tabla 3.2.25. Se observa que a medida que aumenta la intensidad de tratamiento disminuye la relación entre las velocidades de esterificación de los ácidos grasos totales y del EPA, lo que se traduce en una disminución de la selectividad de la lipasa en el transcurso de la reacción, tal y como se comentaba en el apartado 3.2.3.

Tabla 3.2.26.- Esterificación de AGLs procedentes del aceite EPAX4510TG y de la microalga *P. tricornutum* con la lipasa AK de *P. fluorescens*: influencia de la intensidad de tratamiento sobre las velocidades de esterificación de los ácidos grasos totales, r_L , y del EPA, r_{LE} calculadas mediante las ecuaciones [3.2.6] y [3.2.7] y las constantes cinéticas que se muestran en la tabla 3.2.25.

$m_z t$ (mg.h)	$r_L 10^{-4}$ (mol/(h.g))	$r_{LE} 10^{-4}$ (mol/(h.g))	r_L/r_{LE}
120	6,82	1,29	5,272
240	5,4	1,09	4,959
360	4,27	0,92	4,665
600	2,67	0,65	4,127
720	2,12	0,55	3,882
960	1,33	0,39	3,435
1200	0,83	0,27	3,039
1440	0,52	0,19	2,689

3.3.- EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA BIOMASA DE *P. TRICORNUTUM*.

El objetivo de este estudio fue extraer los lípidos contenidos en la biomasa de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* y obtener así un extracto de lípidos que sirviera como sustrato de partida para las reacciones de hidrólisis enzimática. La extracción de los lípidos se ha realizado en dos etapas:

- A) *Extracción de lípidos*: extracción de los lípidos de la biomasa liofilizada de *P. tricornutum* mediante etanol (96% v/v).
- B) *Purificación del extracto lipídico*: purificación del extracto lipídico anterior mediante el sistema bifásico mezcla hidroalcohólica-hexano, quedando los lípidos purificados en la fase hexánica.

3.3.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

La biomasa de *P. tricornutum* se analizó por lotes para homogeneizarla y seleccionarla en función de su contenido en EPA. En la tabla 2.1 se mostraba el perfil medio en ácidos grasos de la biomasa de *P. tricornutum* seleccionada (porcentaje en peso de cada ácido graso sobre ácidos grasos totales y sobre peso seco total de la biomasa), analizada por triplicado por cromatografía de gases directa. En ella se observa que el EPA es el ácido graso mayoritario, con un 22,8% en peso sobre ácidos grasos totales y un 1,8% en peso sobre la biomasa seca total.

3.3.2.- EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE LA BIOMASA

En todos los ensayos 10 g de biomasa se mezclaron con un volumen determinado de etanol (96% v/v) y se agitó magnéticamente a 500 rpm, a temperatura ambiente y durante un tiempo determinado. Transcurrido este tiempo se filtró y el residuo se lavó o se sometió a una nueva extracción, obteniéndose un nuevo extracto. Después de tomar alícuotas para su análisis, los diferentes extractos se mezclaron para constituir el extracto final (E). En la tabla 3.3.1 se muestran, a título de ejemplo, los perfiles lipídicos obtenidos para algunas de las extracciones realizadas.

Tabla 3.3.1.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum* con etanol (96% v/v): perfil en ácidos grasos de varios extractos de lípidos obtenidos en distintas condiciones.

ÁCIDOS GRASOS	BIOMASA	Extractos			
		E1	E2	E3	E4
14:0	7,6	7,0	7,1	7,2	7,2
16:0	16,9	15,4	16,4	16,2	16,1
16:1n7	18,1	18,6	18,3	18,6	19,2
16:2n4	4,1	4,3	4,4	4,4	4,5
16:3n4	6,6	7,5	6,7	7,1	6,7
16:4n1	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9
18:0	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6
18:1n9	1,6	1,9	1,9	1,9	1,5
18:1n7	1,5	1,4	1,3	1,3	1,5
18:2n6	2,5	2,6	2,7	2,8	2,8
18:3n3	0,8	0,6	0,5	0,6	0,7
18:4n3	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
20:4n6	2,2	2,3	2,3	2,2	2,3
20:4n3	0,8	0,6	0,7	0,6	0,6
20:5n3 (EPA)	22,8	24,0	23,4	23,9	23,7
24	0,9	0,5	0,4	0,3	0,5
22:5n3	2,8	1,3	1,3	1,3	1,4
22:6n3 (DHA)	2,7	2,5	2,4	2,4	2,5
Otros	6,0	7,4	7,6	7,0	6,7

E: Extracto lipídico total

En esta tabla se observa que los perfiles de los extractos coinciden bastante aproximadamente entre sí y con el perfil de la biomasa de partida, por lo que el rendimiento de extracción del EPA será prácticamente igual que el rendimiento de la extracción de lípidos. Por lo tanto, a partir de ahora no se mostrarán estos perfiles en ácidos grasos y la discusión de la extracción se basará en los rendimientos en lípidos totales (porcentaje de lípidos extraídos con respecto a los lípidos iniciales contenidos en la biomasa microalgal) obtenidos en las distintas condiciones de extracción.

El rendimiento en la extracción de lípidos está relacionado con la concentración de lípidos obtenida en cada ensayo. Esta concentración depende, no sólo del rendimiento obtenido, sino también de la relación masa de biomasa/volumen del disolvente extractor.

El estudio realizado ha tenido como objetivo optimizar las variables más relevantes para aumentar el rendimiento de la extracción de los lípidos. Estas variables fueron:

- el tiempo de extracción,
- el método de lavado de la torta,
- el volumen de disolvente extractante,
- la posibilidad de realizar la extracción en varias etapas,
- el número adecuado de etapas y
- la cinética de la extracción.

En primer lugar se realizó una **extracción mediante una sola etapa** seguida de un sólo lavado de la torta. En la tabla 3.3.2 se muestran los rendimientos de extracción y las concentraciones de lípidos alcanzadas en este primer ensayo para los extractos, los líquidos de lavado y el extracto final.

Tabla 3.3.2.- Extracción de lípidos de *P. tricorutum* con etanol (96% v/v): rendimientos y concentraciones de lípidos alcanzadas. Condiciones de operación: 10 g de biomasa de *P. tricorutum*, **200 ml de etanol 96% (v/v), 60 min**; lavado con **100 ml de etanol 96% (v/v)**; el extracto y el líquido de lavado se unen para formar el extracto final.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN * (g/l)	RENDIMIENTO ** (%)
Extracto	1,92	48,0
Líquido de lavado	0,27	3,5
E1	1,48	56,0

*Concentración de lípidos saponificales disueltos medida en la muestra por CG directa

** Porcentaje en peso de lípidos extraídos: ácidos grasos extraídos con respecto a los contenidos en la biomasa microalgal (referido al volumen de alcohol recuperado)

En esta tabla se observa que el rendimiento obtenido en esta primera extracción fue pequeño (56,0%), tanto en el extracto inicial (48,0%) como en el líquido de lavado (3,5%).

3.3.2.1.- Aumento del tiempo de extracción y modificación del procedimiento de lavado

Para aumentar el rendimiento de la extracción se planificó una nueva extracción en la que se aumentó el tiempo de extracción y el lavado con etanol 96% (v/v) fue más intenso. Además, tras este lavado inicial se realizó un nuevo lavado con hexano para aumentar el rendimiento de la extracción. En la tabla 3.3.3 se muestran los rendimientos de extracción y las concentraciones de lípidos alcanzadas en este segundo ensayo de extracción.

Tabla 3.3.3.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum* con etanol (96% v/v): rendimientos y concentraciones de lípidos alcanzadas en las condiciones siguientes: 10 g de biomasa de *P. tricornutum*, 200 ml de etanol 96% (v/v), **120 min.** Lavado: (i) el residuo de biomasa se agita **2 min con 70 ml de etanol 96% (v/v)**; (ii) el residuo se vuelve a lavar pasando 30 ml de etanol 96% (v/v) por el filtro; (iii) el residuo se agita con 30 ml de n-hexano. El líquido de lavado con etanol (96% v/v) se mezcla con el extracto inicial para formar el extracto final.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (g/l)	RENDIMIENTO (%)
Extracto inicial	2,2	56,0
Líquido de lavado con etanol	0,7	8,3
Líquido de lavado con hexano	0,3	4,1
E2	1,6	62

Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

Puede apreciarse que el rendimiento de la extracción inicial de lípidos aumenta con el tiempo, pues se obtiene un rendimiento inicial en lípidos del 56% si el tiempo es de 120 minutos, un 8% superior que el obtenido en 60 minutos.

Con respecto al lavado, en este caso se ha empleado la misma cantidad total de etanol (96%), pero en primer lugar el residuo de biomasa se ha agitado con el 70% de este volumen y finalmente se ha hecho otro lavado con el 30% restante. Así, el rendimiento obtenido mediante este segundo procedimiento de lavado es significativamente superior (8,3%) al obtenido mediante el lavado simple de la torta (3,5%). Este aumento de rendimiento se produjo incluso aunque la biomasa estaba más agotada en lípidos. También

se ha observado que la eficacia del lavado aumenta apreciablemente cuando se hace agitando el residuo de biomasa en lugar de haciendo pasar el líquido de lavado por la torta.

También en esta tabla se observa que el hexano parece un disolvente eficaz para extraer algunos de los lípidos residuales; mediante este tercer lavado con hexano se aumentó el rendimiento de la extracción hasta un 4,1%.

3.3.2.2.- Extracción en dos etapas y lavado con hexano o etanol

A continuación se realizó un nuevo experimento en el que se disminuyó el volumen de disolvente extractante. En la tabla 3.3.4 se muestran las condiciones, los rendimientos y las concentraciones de lípidos alcanzadas en esta extracción. En este experimento, además, se realizó una segunda etapa de extracción y se ensayaron dos disolventes diferentes (etanol 96% v/v y n-hexano) en el lavado final para comprobar si el agotamiento del disolvente extractor de la primera etapa puede estar limitado por la naturaleza del disolvente.

Tabla 3.3.4.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum* con etanol (96% v/v): rendimientos y concentraciones de lípidos alcanzadas en dos etapas de extracción siguientes: (i) 10 g de biomasa de *P. tricornutum*, **150 ml de etanol 96% (v/v)**, 120 min; (ii) nueva extracción del residuo de biomasa con **100 ml de etanol 96% (v/v) durante 60 minutos**. Lavado: el residuo de biomasa procedente de la segunda extracción se divide en dos partes, lavándose la primera con 25 ml de etanol 96% v/v, y la segunda con 25 ml de n-hexano. Los dos extractos y el líquido de lavado obtenido con etanol se mezclan para constituir el extracto final.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (g/l)	RENDIMIENTO (%)
Primer extracto	3,54	63,9
Segundo extracto	1,24	15,7
Líquido de lavado con etanol	0,20	2,5
Líquido de lavado con hexano	0,06	0,8
E3	3,00	83,0

Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

En esta tabla se observa en primer lugar que el rendimiento de la primera extracción no disminuyó al disminuir el volumen de disolvente, sino que por el contrario aumentó ligeramente (del 56%, tabla 3.3.3, al 63,9%), lo que indica que, en este rango de volúmenes de disolvente, esta variable no es un factor limitante y quizás podría disminuirse aún más.

Por otro lado, el rendimiento de la segunda etapa fue considerable (15,7%), por lo que habrá que plantearse su incorporación al procedimiento de extracción a utilizar en adelante.

Los lavados de la torta resultan ahora menos eficaces (2,5 y 0,8%) que en el ensayo anterior (8,3 y 4,1%) debido a que la torta a lavar está más agotada en lípidos por habersele aplicado una extracción en dos etapas más severa. En condiciones similares se observa que el etanol extrae más lípidos que el hexano en el lavado.

3.3.2.3.- Extracción en tres etapas

Debido al incremento de los rendimientos que se obtuvo con dos etapas de extracción, se procedió a un ensayo con tres etapas extractivas. En la tabla 3.3.5 se muestran los rendimientos de extracción y las concentraciones de lípidos alcanzadas en el cuarto ensayo de extracción en el que se aplican tres etapas de extracción. En la tercera etapa se vuelven a ensayar dos disolventes diferentes: etanol 96% (v/v) y n-hexano.

Tabla 3.3.5.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum* con etanol (96% v/v): rendimientos y concentraciones de lípidos alcanzadas en las tres etapas de extracción siguientes: (i) 10 g de biomasa de *P. tricornutum*, **150 ml de etanol 96% (v/v)**, 120 min (igual que con dos etapas, tabla 3.3.4); (ii) extracción del residuo de biomasa con **100 ml de etanol 96% (v/v) durante 60 minutos** (igual que con dos etapas, tabla 3.3.2.3); (iii) tercera extracción con 50 ml de disolvente durante 30 minutos. En esta tercera etapa se ensayaron dos disolventes (etanol 96% v/v y n-hexano) dividiendo la torta residual de la 2ª etapa y los volúmenes de disolvente en dos partes iguales. Todos los extractos alcohólicos se unieron para formar el extracto final.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (g/l)	RENDIMIENTO (%)
Primer extracto	3,14	59,6
Segundo extracto	0,97	12,3
Tercer extracto con etanol	0,29	4,5
Tercer extracto con hexano	0,10	1,7
E4	2,62	78,1

Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

En esta tabla se observa que los rendimientos de las dos primeras etapas coinciden aproximadamente con los de las dos primeras etapas del ensayo anterior (tabla 3.3.4) realizadas en las mismas condiciones. Por otro lado se confirma que una tercera etapa de

extracción es más eficaz que un lavado. También se vuelve a confirmar que el etanol 96% (v/v) es algo más eficaz como disolvente (4,5%) que el n-hexano (1,7%).

3.3.2.4.- Influencia del volumen de disolvente y del tiempo de extracción

Una vez comprobado que resulta ventajoso llevar a cabo la extracción de lípidos mediante varias etapas, se pasó a estudiar con más detalle la influencia del volumen de disolvente y del tiempo de extracción sobre el rendimiento de la primera etapa de extracción. Para ello, se realizaron experimentos con distintas cantidades de hexano y a tiempos crecientes, hasta alcanzar un rendimiento en lípidos aproximadamente constante. Puesto que entre 150 y 200 ml de hexano esta variable no parece un factor limitante, en estos nuevos experimentos se ensayaron 150, 100 y 50 ml de etanol 96% (v/v). Los rendimientos y concentraciones obtenidas se muestran en la tabla 3.3.6.

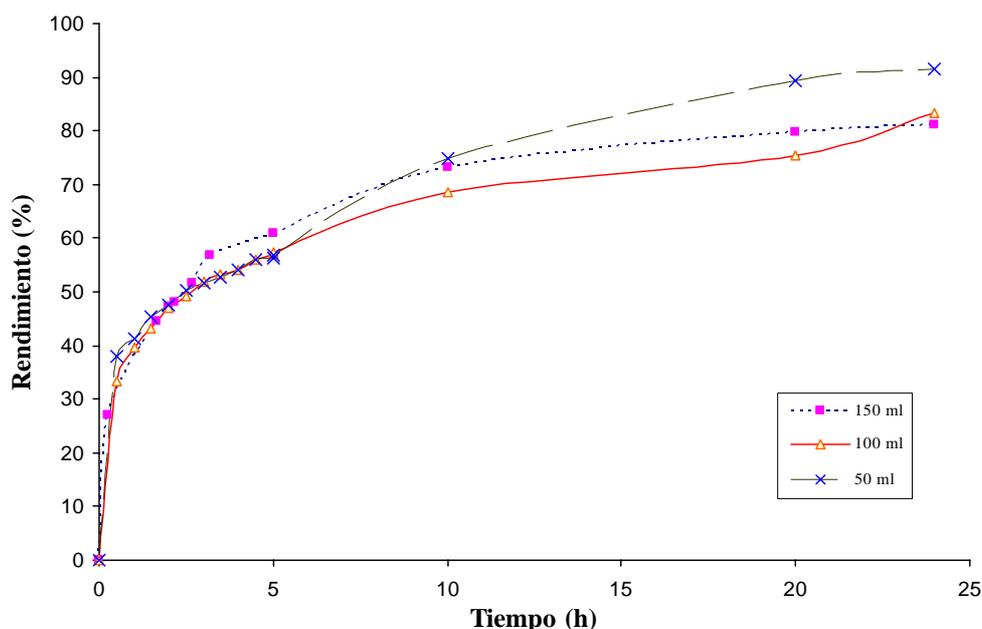
Tabla 3.3.6.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum* con distintas cantidades de etanol (96% v/v) y a tiempos crecientes: rendimientos y concentraciones de lípidos alcanzadas en la extracción de 10 g de biomasa en una sola etapa.

Volumen: 150 ml		Volumen: 100 ml		Volumen: 50 ml	
Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
0,3	27,0	0,5	33,3	0,5	37,9
-	-	1,0	39,6	1,0	41,3
1,7	44,6	1,5	43,1	1,5	45,5
2,0	47,2	2,0	47,1	2,0	47,6
2,2	48,1	2,5	49,3	2,5	50,2
2,7	51,6	3,0	51,9	3,0	51,8
3,2	56,9	3,5	53,3	3,5	52,8
-	-	4,0	54,2	4,0	54,2
-	-	4,5	56,0	4,5	56,1
-	-	5,0	57,2	5,0	56,4
5,0	60,9	5,0	57,3	5,0	56,8
10,0	73,1	10,0	68,5	10,0	75,0
20,0	79,8	20,0	75,3	-	-
24,0	81,1	24,0	83,4	-	-

Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

Estos resultados se han representado en la figura 3.3.1.

Figura 3.3.1.- Extracción de lípidos de *P. tricornutum*: influencia del volumen de etanol (96% v/v) y del tiempo de extracción sobre el rendimiento (R) de la extracción de lípidos a 10 g de biomasa en una sola etapa.



Se observa que los rendimientos aumentan con el tiempo de extracción y que las velocidades de extracción son similares para los tres volúmenes de disolvente empleados. También los rendimientos finales obtenidos con 100 y 150 ml son similares (en torno al 80%), mientras que el rendimiento final obtenido con 50 ml es algo mayor (en torno al 90%). Estos resultados ponen de manifiesto que también en este rango de relaciones volumen de disolvente/biomasa esta variable no influye significativamente en el rendimiento de la extracción, por lo que puede utilizarse la menor de las relaciones ensayadas (5 ml de etanol 96%/g de biomasa) de manera que el gasto de disolvente sea menor y los extractos queden más concentrados. El mayor rendimiento final obtenido con 50 ml de etanol 96% parece debido a que, mientras que el volumen de disolvente parece no influir significativamente, la intensidad de la agitación por unidad de volumen en este caso es mayor, por lo que la biomasa queda mejor lavada de lípidos. No se consideró

conveniente operar con relaciones disolvente/biomasa inferiores a 5 ml/g porque se tenían dificultades en el manejo, homogeneización y agitación de la mezcla extractante.

En cualquier caso, en la figura 3.3.1 también se observa que para alcanzar rendimientos próximos al 90% se necesitan tiempos de extracción por encima de las 20 horas. Por esta razón, y como ya antes se ha puesto de manifiesto, parece conveniente operar realizando varias etapas de extracción.

3.3.2.5.- Fin de la primera etapa de extracción y estudio de la segunda

Para determinar el momento en que se detiene la primera etapa de extracción se adoptó el criterio aproximado de parar la extracción cuando el incremento del rendimiento por hora de extracción fuera inferior al 1%. Para ello los rendimientos (R, %) en lípidos obtenidos con 50 ml de etanol 96% (figura 3.3.1) se adjuntaron a la ecuación:

$$R = 11,71\ln(t) + 5,8177 \quad r^2 = 0,9969 \quad [3.3.1]$$

donde t es el tiempo en minutos.

Utilizando el criterio indicado esta ecuación permitió predecir que la primera etapa de extracción debería finalizar a las 10 horas.

Aplicando este criterio se realizó la extracción cuyos resultados se muestran en la tabla 3.3.7. Se observa que en las condiciones indicadas se obtuvo un rendimiento en lípidos del 77,4%, próximo al 80,7% que predice la ecuación anterior.

También en esta tabla se muestran los rendimientos obtenidos en una segunda etapa de extracción realizada con distintos disolventes y con una relación disolvente/biomasa inicial de 4,8 ml/g. Para esta segunda extracción la biomasa procedente de la primera extracción se dividió en cuatro partes y cada una de ellas se trató con 12 ml de disolvente. Los disolventes ensayados fueron etanol, etanol-hexano 3:1 v/v, acetona y n-hexano. En estas extracciones se tomaron muestras a tiempos crecientes.

Tabla 3.3.7.- Extracción de lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*: rendimientos y concentraciones de lípidos obtenidos en las dos etapas de extracción siguientes: (i) 10 g de biomasa se trataron con una relación etanol (96% v/v)/biomasa de 5 ml/g; (ii) la biomasa resultante se dividió en cuatro fracciones iguales y cada una de ellas se trató con 12 ml de distintos disolventes durante 90 minutos tomando muestras a tiempos crecientes.

MUESTRA	TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (g/l)	RENDIMIENTO (%)
PRIMERA EXTRACCIÓN	600	11,90	77,4
ACETONA	60	18,0	23,8
	90	18,5	24,0
HEXANO	60	15,0	22,9
	90	15,1	22,8
ETANOL 96% V:V	15	2,17	13,7
	30	2,36	15,0
	45	2,52	16,0
	60	2,67	16,9
	75	2,96	18,7
	90	2,96	18,7
	15	1,62	15,4
	30	2,38	15,1
Etanol-hexano 3:1 v:v	45	2,69	17,0
	60	3,00	19,0
	75	2,95	18,7
	90	2,95	19,0

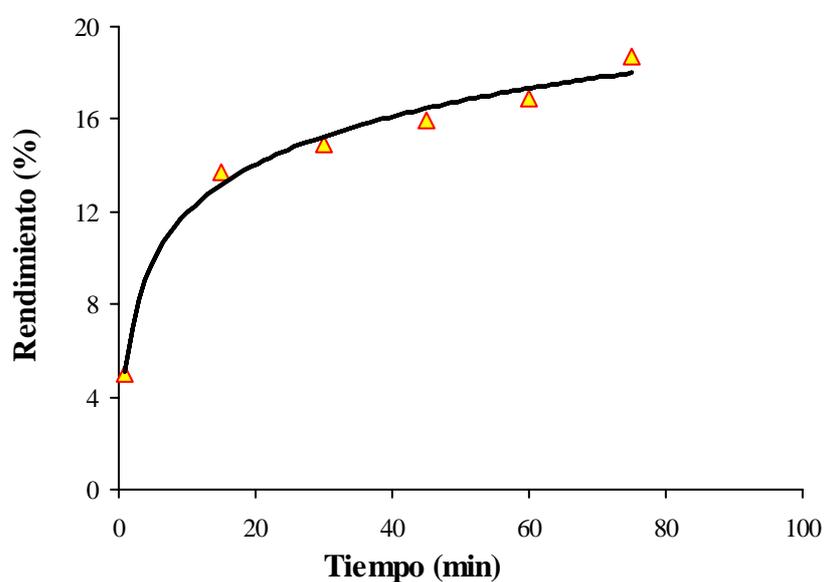
Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

En esta tabla se observa que con todos los disolventes se obtuvieron incrementos del rendimiento de la extracción en torno a un 20%, lo que permite que el rendimiento global de la extracción aumente hasta valores en torno al 90%. En este caso se observa que con acetona y hexano se obtuvieron rendimientos aproximadamente un 5% superiores a los obtenidos con etanol 96%; sin embargo estas diferencias pueden ser debidas en parte a errores experimentales y no justifican cambiar de disolvente extractante de unas etapas de extracción a otras.

3.3.2.6.- Fin de la segunda etapa de extracción

En la figura 3.3.2 se ha representado la variación con el tiempo del rendimiento de la segunda etapa de extracción (tabla 3.3.8) realizada con etanol (96% v/v).

Figura 3.3.2.- Extracción de lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*: influencia del tiempo de extracción sobre el rendimiento en lípidos obtenidos en la segunda etapa de extracción realizada con una relación etanol /biomasa 4,8 ml/g.



Estos datos se han ajustado a la ecuación:

$$R = 2,9946 \ln(t) + 5,068 \quad r^2 = 0,9883 \quad [3.3.2]$$

Esta ecuación permite obtener el tiempo final de extracción para esta segunda etapa, aplicando el mismo criterio que en la primera etapa (la extracción finaliza cuando el incremento del rendimiento de extracción de lípidos por hora es inferior al 1%). Aplicando este criterio se obtiene que esta segunda etapa de extracción debe finalizar tras aproximadamente 3,5 horas (210 minutos).

3.3.2.7.- Tercera etapa extractiva

Para agotar aun más el contenido de lípidos de la biomasa que procede de la segunda etapa de extracción y aumentar más el rendimiento se realizó una tercera etapa extractiva. En la tabla 3.3.8 se muestran los rendimientos de extracción alcanzados en una tercera etapa de extracción aplicada a la torta residual que procede de la segunda etapa (tabla 3.3.7).

Tabla 3.3.8.- Extracción de lípidos de la biomasa de *P. tricornutum*: rendimientos y concentraciones de lípidos obtenidos en la tercera etapa de extracción aplicada a la torta residual de la segunda etapa (tabla 3.3.7): la biomasa residual se mezcla con 50 ml de disolvente y se agita durante 80 minutos, tomando muestras cada 20 minutos.

TIEMPO (min)	CONCENTRACIÓN (g/l)	RENDIMIENTO (%)
20	0,10	1,6
40	0,13	2,0
60	0,15	2,4
80	0,16	2,5

Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.2.

Como se observa en esta tabla el rendimiento en lípidos que se obtuvo tras 80 min de extracción fue del 2,5% (referido a lípidos en la biomasa inicial). Sumando los rendimientos de las tres etapas de extracción, el rendimiento total de lípidos sería del 98,6%. De cualquier forma, esta tercera etapa extractiva puede no ser rentable si se tienen en cuenta los costes de operación derivados del cambio de etapa y que, para extractos procedentes de dos etapas extractivas apenas se consigue superar el 1,5% de aumento del rendimiento en una hora. Por lo tanto la extracción de los lípidos se realizaría mediante dos etapas de extracción, de 10 y 3,5 horas, respectivamente, ambas con una relación etanol (96% v/v)/biomasa de 5 ml/g.

3.3.3.- PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS LIPÍDICOS

Mediante etanol 96% v/v se obtiene un extracto de lípidos que contiene, además de lípidos saponificables (glicéridos, fosfolípidos y glucolípidos), lípidos insaponificables, como determinados pigmentos, y otros compuestos no lipídicos, como proteínas hidrofóbicas, aminoácidos libres, clorofilas, etc., que se arrastran con los lípidos al usar disolventes polares. La purificación de los lípidos presentes en la disolución etanólica puede realizarse añadiendo agua y hexano para formar un sistema ternario bifásico; de esta manera los lípidos purificados quedarán en la fase hexánica, mientras que los compuestos más polares quedarán en la fase hidroalcohólica (Molina Grima y cols., 1994; Robles Medina y cols., 1998).

La optimización de esta purificación se ha hecho en dos etapas. En primer lugar se ha optimizado el contenido de agua en la disolución hidroalcohólica y a continuación se ha procedido a la extracción de los lípidos con hexano.

3.3.3.1.- Optimización del contenido de agua en la mezcla hidroalcohólica

El contenido en agua de la disolución hidroalcohólica de lípidos influye en la polaridad de esta disolución y por tanto cuanto mayor sea el contenido de agua en esta disolución menor será su miscibilidad con el hexano y, además, el equilibrio de distribución de los lípidos entre ambas fases estará más desplazado hacia la fase hexánica (Molina Grima y cols., 1994).

Suponiendo que el contenido de agua inicial de los extractos lipídicos es del 4% en volumen (contenido del etanol 96%), se añade agua hasta alcanzar contenidos entre el 20% y el 80% en peso de la disolución hidroalcohólica (tabla 3.3.9). A continuación se toman alícuotas de los extractos lipídicos con distintos contenidos en agua y se mezclan con hexano, en una relación disolución hidroalcohólica/hexano 1:1 v/v. Por último se separa la fase hexánica y se evalúa el rendimiento de la extracción por cromatografía gaseosa. Este rendimiento se ha evaluado como la relación entre los ácidos grasos extraídos en la fase hexánica y los ácidos grasos presentes en el extracto lipídico bruto. En la tabla 3.3.9 se muestran los rendimientos obtenidos en la extracción de lípidos de la fase hidroalcohólica con hexano para contenidos de agua de la fase hidroalcohólica crecientes. Estos resultados también se han representado en la figura 3.3.3.

Tabla 3.3.9- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: influencia del contenido de agua de la disolución hidroalcohólica sobre el rendimiento en lípidos y en EPA (R_H y R_{EH} , respectivamente) y sobre el contenido de EPA en la fase hexánica (C_{EH}). Condiciones de operación: relación disolución hidroalcohólica/hexano 1:1, v/v; a la disolución hidroalcohólica se le añadió agua hasta completar los porcentajes de agua en peso que se indican en la tabla.

Agua (%)	C_{EH} (%)	R_H (%)	R_{EH} (%)
4	-----	No se decantan fases	-----
20	22,8	63,0	63,0
30	24,9	78,4	85,6
40	25,8	81,5	92,1
50	28,5	76,5	95,5
60	29,3	73,3	94,3
70	30,9	49,2	66,6
80	32,4	47,4	67,4

Agua: Porcentaje de agua en la fase hidroalcohólica

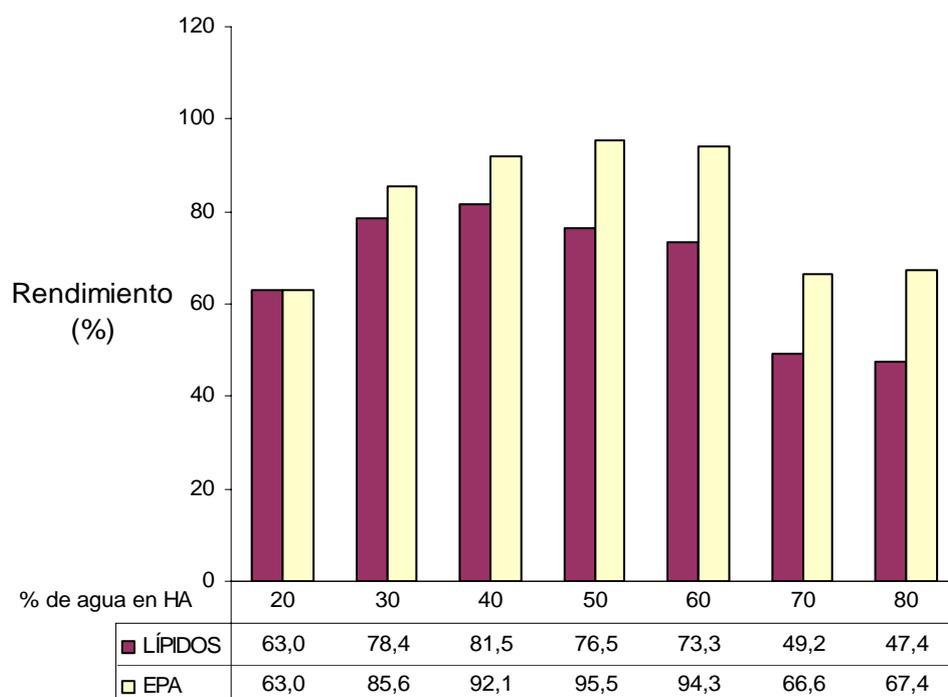
C_{EH} : Porcentaje en peso de EPA en el extracto de hexano con respecto a los ácidos grasos totales.

R_H : Porcentaje de ácidos grasos presentes en el extracto hexánico (lípidos) con respecto a los presentes en el extracto bruto.

R_{EH} : Porcentaje de EPA presente en el extracto hexánico (lípidos) con respecto al presente en el extracto bruto.

En la tabla 3.3.9 puede observarse como el contenido en EPA (con respecto a ácidos grasos totales) del extracto lipídico en la fase hexánica aumenta en aproximadamente un 10% cuando el contenido en agua lo hace en un 60%. Este resultado parece indicar que a medida que la fase hidroalcohólica se hace más polar el equilibrio de distribución de los lípidos ricos en EPA está más desplazado hacia la fase hexánica, con respecto al resto de los lípidos. Es difícil de justificar este resultado y para confirmarlo serían necesarios estudios más detallados sobre la distribución de lípidos saponificables ricos en distintos tipos de ácidos grasos entre ambas fases. De cualquier manera, si este resultado se confirmara, podría ser una forma de aumentar el contenido de EPA en extractos lipídicos.

Figura 3.3.3.- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: influencia del contenido de agua de la disolución hidroalcohólica sobre el rendimiento en lípidos y en EPA (R_H y R_{EH} , respectivamente) en la fase hexánica.



Condiciones de operación: relación disolución hidroalcohólica/hexano 1:1, v/v; a la disolución hidroalcohólica se le añadió agua hasta completar los porcentajes de agua en peso que se indican en la tabla.

En la tabla 3.3.9 y en la figura 3.3.3 también se observa que el rendimiento en la extracción de lípidos aumenta con el contenido de agua hasta alcanzar un máximo en torno al 40% de agua. Por encima de este porcentaje el rendimiento disminuye debido a la formación de emulsiones que dificultan la separación de las fases y la recuperación completa de la fase hexánica. En trabajos anteriores de extracción de lípidos de biomasa microalgal con etanol (96% v/v) (Ibáñez González y cols., 1998) se comprobó que estos extractos podían llegar a tener hasta 15 g/l de proteínas, que pueden actuar como agentes emulsionantes, favoreciendo y estabilizando las emulsiones. Esta disminución final del rendimiento en lípidos hace que la recuperación de EPA en la fase hexánica (productividad

de EPA) también disminuya, a pesar del mayor contenido de EPA de los lípidos en esta fase con los mayores contenidos de agua.

Así pues, a la vista de estos resultados, parece que un contenido de agua de la disolución hidroalcohólica en torno al 40% puede resultar adecuado.

De todas formas, para aumentar el rendimiento de la extracción de lípidos en la fase hexánica, se realizaron a continuación experimentos de extracción en dos etapas, con tres contenidos en agua (40, 50 y 60%). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.3.10.

Tabla 3.3.10.- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano en dos etapas: influencia del contenido de agua de la disolución hidroalcohólica sobre el rendimiento en lípidos y en EPA (R_H y R_{EH} , respectivamente). Relación disolución hidroalcohólica/hexano 1:1, v/v.

Agua (%)	ETAPA	C_{EH} (%)	R_H (%)	R_{EH} (%)
40	1 ^a	24,8	67,7	73,8
40	2 ^a	25,0	23,4	25,7
40	1 ^a + 2 ^a	24,9*	91,1	99,5
50	1 ^a	25,9	66,3	75,3
50	2 ^a	25,5	17,7	19,8
50	1 ^a + 2 ^a	25,8*	83,9	95,0
60	1 ^a	27,5	66,0	79,5
60	2 ^a	25,8	13,0	14,8
60	1 ^a + 2 ^a	27,2*	79,0	94,2

* Media ponderada de las dos extracciones
 Simbología idéntica a la de la tabla 3.3.9

Se observa que los mayores rendimientos en lípidos y productividades de EPA se obtuvieron con un contenido inicial de agua del 40% en la disolución hidroalcohólica. Con este porcentaje de agua se obtuvo un rendimiento en lípidos del 67,7% en la primera etapa y un 26,9% en la segunda, lo que permitió recuperar el 94,6% de los lípidos en las dos etapas. Por lo tanto, definitivamente se considera que el 40% es el valor más adecuado para el contenido en agua en la disolución hidroalcohólica inicial.

3.3.3.2.- Optimización de la extracción de los lípidos con hexano

Una vez optimizado el contenido de agua de la disolución hidroalcohólica se pasó a la optimización de la extracción con hexano. Para optimizar la relación hexano/disolución hidroalcohólica y el número de etapas de extracción se obtuvo la curva de equilibrio del reparto de los lípidos disueltos en el extracto hidroetanólico entre las dos fases puestas en contacto: disolución hidroetanólica (40% en agua) y hexano. Estos datos se obtuvieron a temperatura ambiente, es decir, en un intervalo estrecho de temperaturas entre 20 y 25°C, ya que el laboratorio está termostatzado y los experimentos se hicieron en un periodo corto de tiempo.

Para obtener estos datos 1 ml de extracto hidroalcohólico con un 40% en peso de agua se trató con volúmenes variables de hexano. En las tablas 3.3.11 y 3.3.12 se muestran los resultados obtenidos en experimentos realizados a dos extractos hidroalcohólicos de concentraciones en lípidos ligeramente diferentes.

Tabla 3.3.11- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: influencia de la relación disolución hidroetanólica (40% agua)/hexano (v/v) sobre el contenido de EPA en la fase hexánica (C_{EH}), la concentración de lípidos en la fase hexánica (C_H), el rendimiento en lípidos (R_H) y en EPA (R_{EH}) en la fase hexánica. Concentración en lípidos del extracto hidroalcohólico de partida: 11,5 g/l.

Hexano/disolución hidroalcohólica (v / v)	C_{EH} (%)	R_H (%)	C_H (mg/ml)	R_{EH}^{**} (%)
6	25,3	79,9	0,46	88,6
4	25,4	77,3	0,66	86,2
3	29,1	75,0	0,85	95,7
2	28,6	72,5	1,24	91,0
1	25,9	69,0	2,35	78,3
0,5	25,5	67,3	4,58	75,2
0,33	25,4	64,1	6,54	71,4
0,25	25,9	61,5	8,37	69,7
0,17	24,6	60,5	12,36	65,4

* $K_L = C_H/C_{HA}$

Resto de la simbología idéntica a la de la tabla 3.3.9

A partir de las concentraciones de lípidos en la fase hexánica que figuran en estas tablas se calcularon mediante balances de lípidos las concentraciones de lípidos en la fase hidroetanólica en equilibrio (tabla 3.3.12). Estas concentraciones se han representado en la figura 3.3.4, que muestra la curva de equilibrio de reparto de lípidos entre las dos fases. Esta curva y los coeficientes de reparto de los lípidos entre ambas fases, K_L (tabla 3.3.12) indican que el equilibrio de distribución de los lípidos entre ambas fases está muy desplazado hacia la fase hexánica.

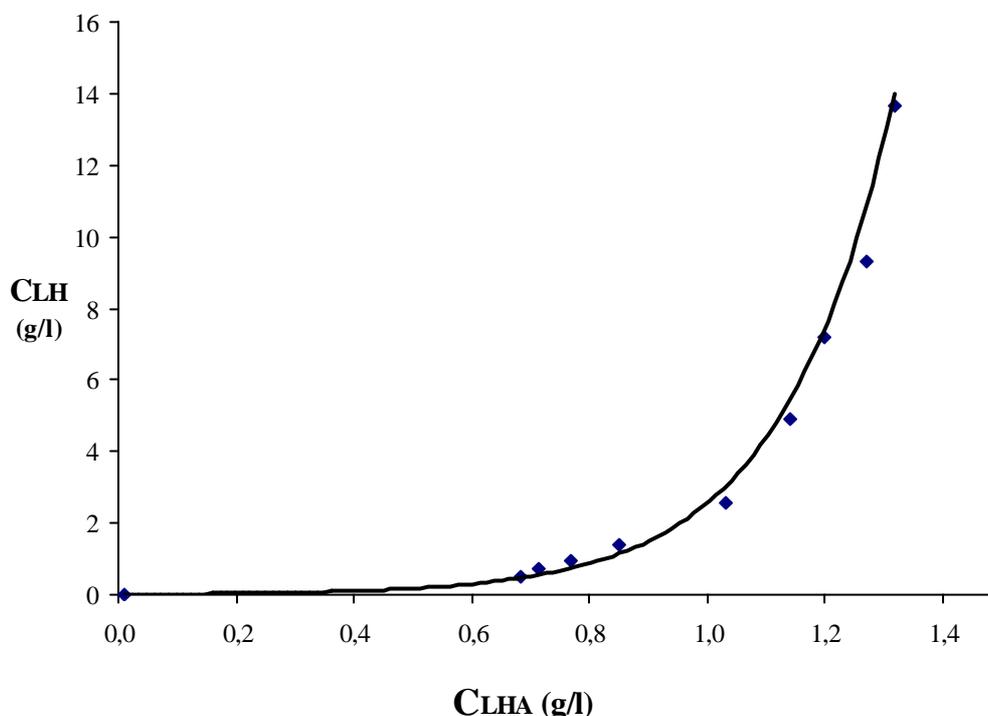
Tabla 3.3.12- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: influencia de la relación hexano/disolución hidroetanólica (40% agua) (v/v) sobre el contenido de EPA en la fase hexánica (C_{EH}), el rendimiento en lípidos (R_H) y en EPA (R_{EH}) en la fase hexánica, la concentración de lípidos en la fase hexánica (C_H) y en la fase hidroalcohólica (C_{HA}) y el coeficiente de reparto de los lípidos entre ambas fases (K_L)*. Concentración en lípidos del extracto hidroalcohólico de partida: 10,9 mg/l.

Hexano/disolución hidroalcohólica (v / v)	C_{EH} %	R_H %	C_H (mg/ml)	C_{HA} (mg/ml)	K_L^*	R_{EH} (%)
6	24,1	81,0	0,49	0,68	0,71	85,4
4	23,7	80,2	0,72	0,71	1,01	83,2
3	24,0	78,6	0,94	0,77	1,23	82,7
2	24,7	76,4	1,37	0,85	1,62	82,6
1	24,6	71,3	2,57	1,03	2,49	76,8
0,5	24,4	68,3	4,91	1,14	4,30	72,9
0,33	24,0	66,6	7,19	1,20	5,99	70,1
0,25	23,9	64,7	9,30	1,27	7,32	67,7
0,17	23,3	63,4	13,67	1,32	10,37	64,6

* $K_L = C_H/C_{HA}$

Resto de la simbología idéntica a la de la tabla 3.3.9

Figura 3.3.4.- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: concentraciones de equilibrio de los lípidos en la fases hexánica (C_H) e hidroalcohólica (40% en agua) (C_{HA}).



En la tabla 3.3.12 también se observa que, lógicamente, el rendimiento de lípidos en la fase hexánica aumenta con la relación hexano/disolución hidroalcohólica.

Para poder estimar los rendimientos en la extracción de lípidos que se obtendrían con distintas relaciones hexano/disolución hidroalcohólica en una o varias etapas es necesario conocer el grado de miscibilidad de ambas fases y también es conveniente ajustar las concentraciones de equilibrio a alguna ecuación matemática. Entre las ensayadas, la que mejor ajusta los resultados experimentales es

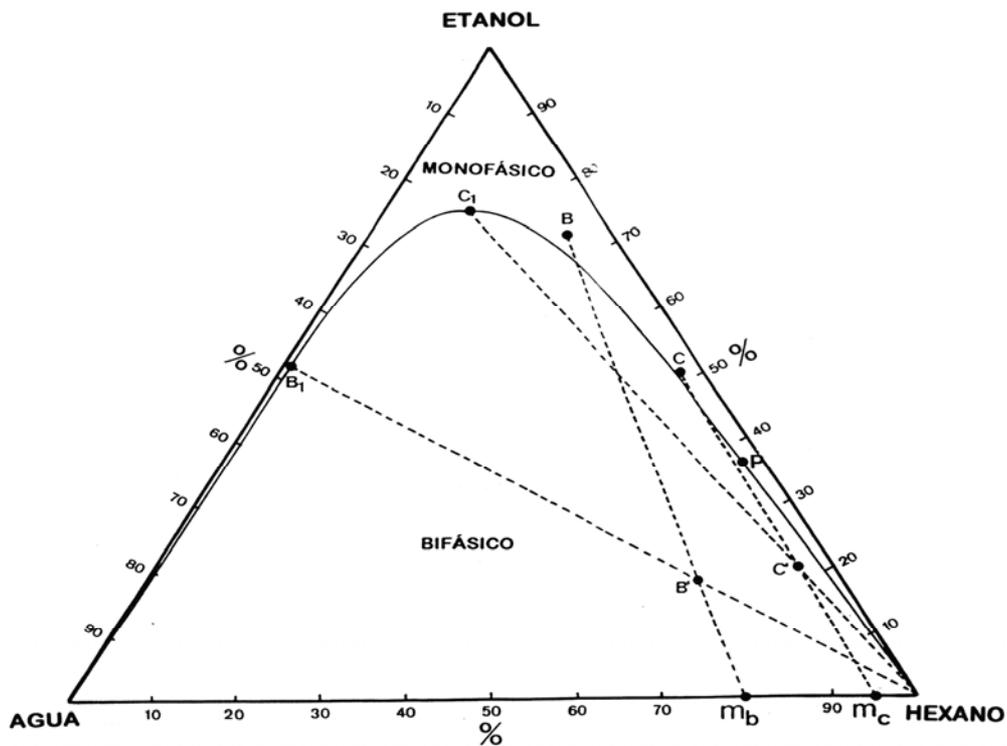
$$C_H = 0,0112e^{5,19C_{HA}} \quad r^2 = 0,9941 \quad [3.3.3]$$

La línea continua de la figura 3.3.4 corresponde a esta ecuación.

En la figura 3.3.5 se muestra el diagrama de equilibrio del sistema agua-etanol-hexano (Bonner, 1910). En este diagrama se observa que el punto crítico P contiene

un porcentaje de agua muy bajo (1,9% de agua, 37,1% de etanol y 61,0% de hexano); además, dado que prácticamente todas las rectas de reparto parten del vértice correspondiente al hexano puro, las distintas mezclas hexano-disolución hidroalcohólica (40% p/p) estarán situadas en la recta de reparto representada en el diagrama de la figura 3.3.5. Por tanto se observa que estas dos fases pueden considerarse totalmente inmiscibles.

Figura 3.3.5.- Diagrama de equilibrio del sistema ternario hexano/etanol/agua (Bonner, 1910). Composiciones se expresadas en porcentajes en peso.



Si la extracción de lípidos se realiza en una o varias etapas de equilibrio en serie, los rendimientos en la extracción de los lípidos podrán predecirse a partir de los datos de equilibrio (figura 3.3.4 y ecuación 3.3.3) y de balances de lípidos en cada una de las etapas. Así, para una etapa cualquiera i , las concentraciones de las fases hexánica e hidroalcohólica a la salida (en g/l, C_{Hi} y C_{HAi} , respectivamente) se determinarán resolviendo el sistema de ecuaciones:

$$C_{HAi} = \frac{1}{r}(C_{HAi-1} - C_{HAi}) \quad [3.3.4]$$

$$C_{Hi} = 0,0112e^{5,19C_{HAi}} \quad [3.3.5]$$

donde r es la relación en volumen hexano/disolución hidroetanólica. Estas ecuaciones corresponden al balance de lípidos (teniendo en cuenta que en cada etapa se suministra hexano exento de lípidos) y a la relación de equilibrio, respectivamente. Conocida la concentración de lípidos de la disolución hidroetanólica que se alimenta a la primera etapa (C_{HA0} , C_{HAi-1} para $i = 1$) y la relación hexano/disolución hidroetanólica, r , podrán determinarse, etapa a etapa, todas las concentraciones intermedias y las concentraciones finales de ambas fases. A partir de estas concentraciones se pueden determinar los rendimientos de extracción de los lípidos mediante la ecuación:

$$R_H = \frac{\sum_{i=1}^n C_{Hi} V_H}{C_{HA0} V_{HA0}} 100 \quad [3.3.6]$$

donde V_H y V_{HA0} son el volumen de la fase hexánica en cada etapa de extracción y el volumen inicial de la fase hidroalcohólica, respectivamente, C_{HA0} es la concentración inicial de lípidos en la disolución hidroetanólica y n es el número de extracciones.

En un trabajo anterior de nuestro grupo (Ibáñez González y cols., 1998) la purificación de ácidos grasos de *P. tricorutum*, contenidos en una disolución hidroetanólica (40% en agua, p/p), fue bien cuando se realizaron cuatro etapas de extracción con hexano, empleando en cada etapa una relación hexano/disolución hidroetanólica igual a 0,2 (v/v). Dada la similitud del problema (la única diferencia es que ahora se trata de lípidos y en ese trabajo se purificaban ácidos grasos libres), en el presente trabajo se optó por emplear la misma relación hexano/disolución hidroalcohólica (0,2 v/v) y 5 etapas de extracción ($n = 5$).

En la tabla 3.1.13 se muestran los rendimientos obtenidos por este método en la extracción de los lípidos contenidos en dos extractos hidroetanólicos de concentraciones 1,44 y 3,83 g/l.

Tabla 3.1.13- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: cálculo de los rendimientos en lípidos que se obtendrían mediante 5 etapas teóricas de extracción en serie con una relación hexano/disolución hidroalcohólica (40% agua) de 0,2 v/v partiendo de dos extractos hidroetanólicos de concentraciones 1,44 y 3,83 g de lípidos/l. Se muestran las concentraciones de lípidos en las fases hidroalcohólica (C_{HA}) y hexánica (C_H) y el porcentaje de lípidos recuperados en la fase hexánica (R_H).

C_{HAi} (g/l)*	C_{Hi} (g/l)*	R_{Hi} ** (%)
$C_{HA0} = 1,44$		
1,01	2,14	29,72
0,84	0,87	12,06
0,74	0,51	7,10
0,67	0,35	4,91
0,61	0,27	3,72
		$R_H = 57,51$
$C_{HA0} = 3,83$		
1,35	12,40	64,74
0,98	1,84	9,60
0,82	0,80	4,18
0,73	0,48	2,53
0,66	0,34	1,78
		$R_H = 82,83$

*Cálculos realizados mediante las ecuaciones [3.3.4] y [3.3.5]

**Rendimientos calculados mediante la ecuación $R_{Hi} = \frac{C_{Hi} V_H}{C_{HA0} V_{HA0}} 100$, siendo $\frac{V_H}{V_{HA0}} = 0,2$

En esta tabla se observa que el rendimiento obtenido cuando se parte de la disolución hidroetanólica más concentrada es mayor que cuando se parte de la disolución más diluida. Esto es consecuencia de la forma de la curva de equilibrio, ya que a medida que disminuyen las concentraciones disminuye el coeficiente de reparto K_L (tabla 3.1.13).

Por tanto, si se partiera de disoluciones con concentraciones del orden de las obtenidas cuando se trata la biomasa con relaciones etanol (96% v/v)/biomasa de 10 ml/g podrían aumentarse bastante los rendimientos. Así, en la tabla 3.1.14 se

muestran los rendimientos que podrían obtenerse para la concentración de lípidos en la disolución hidroetanólica de partida de 11,5 g/l, si la ecuación de equilibrio se cumpliera hasta estas concentraciones y no se presentaran dificultades experimentales. Se observa que en este caso el rendimiento de extracción de lípidos podría llegar casi al 95%. Con sólo dos etapas el rendimiento ya superaría el 90%.

Tabla 3.1.14- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: cálculo de los rendimientos en lípidos que se obtendrían mediante 5 etapas teóricas de extracción en serie con una relación hexano/disolución hidroalcohólica (40% agua) de 0,2 v/v partiendo de dos extractos hidroetanólicos de concentración 11,5 g de lípidos/l. Se muestran las concentraciones de lípidos en las fases hidroalcohólica (C_{HA}) y hexánica (C_H) y el porcentaje de lípidos recuperados en la fase hexánica (R_H).

C_{HAi} (g/l)*	C_{Hi} (g/l)*	R_{Hi} ** (%)
$C_{HA0} = 11,5$		
1,62	49,42	85,94
1,06	2,77	4,83
0,86	0,99	1,72
0,75	0,56	0,97
0,68	0,38	0,65
		$R_H = 94,12$

*Cálculos realizados mediante las ecuaciones [3.3.4] y [3.3.5]

**Rendimientos calculados mediante la ecuación $R_{Hi} = \frac{C_{Hi}V_H}{C_{HA0}V_{HA0}} \cdot 100$, siendo $\frac{V_H}{V_{HA0}} = 0,2$

Para comprobar algunos de estos resultados se realizaron experimentalmente las extracciones de concentraciones diluidas cuyos resultados se predicen en la tabla 3.1.15. Los resultados obtenidos se muestran en dicha tabla.

Tabla 3.1.15.- Purificación de los lípidos contenidos en la disolución hidroalcohólica mediante extracción con hexano: rendimientos en lípidos obtenidos mediante 5 etapas de extracción en serie con una relación hexano/disolución hidroalcohólica (40% agua) de 0,2 v/v partiendo de dos extractos hidroetanólicos de concentraciones 1,44 y 3,83 g de lípidos/l. Se muestran los contenidos de EPA en la fase hexánica (C_{EH}), la concentración de lípidos en la fase hidroalcohólica (C_{HA}) y el porcentaje de lípidos recuperados en la fase hexánica (R_H).

$C_{HA0} = 1,44 \text{ g/l}$			
ETAPA	C_{EH}	C_{HA}	R_{Hi}
(v / v)	(%)	(mg/ml)	(%)
1 ^a	27,8	1,51	28,3
2 ^a	31,1	0,77	14,4
3 ^a	34,9	0,42	7,9
4 ^a	38,1	0,15	2,8
5 ^a	38,5	0,14	2,6
$R_H = 56,0$			
$C_{HA0} = 3,83 \text{ g/l}$			
ETAPA	C_{EH}	C_{HA}	R_{Hi}
(v / v)	(%)	(mg/ml)	(%)
1 ^a	25,5	9,91	58,9
2 ^a	29,9	2,52	15,0
3 ^a	37,5	1,09	6,5
4 ^a	63,3	0,23	1,4
$R_H = 81,8$			

Se observa que estos resultados son prácticamente iguales a los que se muestran en la tabla 3.1.13. Así pues la obtención de la curva de equilibrio permite predecir con bastante exactitud el rendimiento en lípidos que se obtendrá utilizando distinto número de etapas y distintas relaciones hexano/disolución hidroalcohólica.

4.-Conclusiones

Como resultado de la investigación que se expone en esta Memoria se ha llegado a las siguientes conclusiones:

4.1.- Hidrólisis enzimática

1. Las lipasas de *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Alcaliginese*, *Alcaligines spp.*, *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas stutzeri* hidrolizan al EPA a menor velocidad que al resto de los ácidos grasos y, a bajas intensidades de tratamiento (hasta un grado de hidrólisis de aproximadamente el 15%), concentran el EPA en la fracción de glicéridos sin hidrolizar. Sin embargo, todas estas lipasas hidrolizan apreciablemente el EPA a medida que aumenta la intensidad de tratamiento, por lo que desde un punto de vista práctico, la hidrólisis de los glicéridos no puede considerarse como un método apropiado para concentrar el EPA.

2. La hidrólisis enzimática de triglicéridos ricos en EPA con las lipasas D de *Rhizopus oryzae*, QLM *Alcaligines spp.*, EU-088 de *Pseudomonas cepacia* y, sobre todo, con la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* puede considerarse como un método de obtención de ácidos grasos libres ricos en EPA que conduce a resultados similares a la saponificación alcalina, ya que con estas lipasas se obtuvieron grados de hidrólisis de hasta el 80%, con rendimientos de recuperación de EPA del 77%. Además, permite mantener unas condiciones más suaves (37°C y pH neutro) y produce aguas residuales menos contaminadas.

3. Las condiciones experimentales que conducen a mayores grados de hidrólisis con la lipasa AK de *P. fluorescens* fueron: temperatura 37°C, relación agua/aceite 1:1 p/p, intensidad de tratamiento 4500 mg de lipasa × hora.

4. Las velocidades de hidrólisis de los triglicéridos del EPAX4510TG se han ajustado a un modelo cinético empírico que permite obtener valores representativos de las constantes cinéticas para cada ácido graso. Este modelo se basa en admitir que la velocidad de hidrólisis de un ácido graso por unidad de masa de enzima es proporcional al alejamiento del equilibrio. Las constantes cinéticas obtenidas mediante este modelo son muy parecidas para las lipasas AK, D y 088, estando en torno a 9 mmoles de ácidos grasos liberados/g lipasa × hora de reacción y 3 mmoles de EPA liberado/g de lipasa × hora de

reacción, lo que confirma que el EPA se libera a una velocidad menor que la velocidad media de hidrólisis de todos los ácidos grasos. Este modelo permite estimar los grados de hidrólisis y las fracciones molares de EPA hidrolizado que se pueden obtener con distintas intensidades de tratamiento y puede utilizarse para adoptar criterios para el escalamiento de los reactores discontinuos mezcla perfecta en que se ha llevado a cabo la hidrólisis.

4.2.- Esterificación enzimática

5. Las lipasas QLM de *Alcaligenes spp* y EU-093 de *Rhizopus delemar* son adecuadas para concentrar el EPA en la fracción de ácidos grasos libres cuando se ha esterificado un extracto de ácidos grasos del aceite EPAX4510TG (43,1% en EPA), ya que proporcionaron concentraciones de EPA en los ácidos grasos libres que quedan tras la esterificación del 69% (a 40 °C) y el 63,3% (a 55 °C), respectivamente. Sin embargo, con estas lipasas los rendimientos de recuperación de EPA en los AGLs fueron bajos (en torno al 38 y al 16%, respectivamente).

6. También las lipasas AK de *Pseudomonas fluorescens* y D de *Rhizopus oryzae* fueron adecuadas para concentrar el EPA en la fracción de AGLs, ya que, a pesar de no presentar grados de concentración excesivamente elevados (1,32 y 1,27 respectivamente, que equivale a una concentración de EPA del 57 y 55%), presentan rendimientos de recuperación de EPA superiores (84% para la AK, a 55 °C, y 66,7% para la lipasa D, a 40 °C).

7. La máxima concentración (74%) y rendimiento en EPA (80%) en la fracción de AGLs se consiguió esterificando un extracto de AGLs de EPAX4510TG, con la lipasa AK de *P. fluorescens* en las siguientes condiciones: 34 mg de lipasa, 178 mg de extracto de ácidos grasos de EPAX4510TG (relación AGLs/lipasa = 5,2 p/p), 222 mg de alcohol láurico (relación molar alcohol/AGLs = 2), 4 ml de n-hexano (relación AGLs/hexano = 44,5 mg/ml), sin adición de agua, 40 °C, 400 rpm, atmósfera inerte y 24 horas (intensidad de tratamiento = 1362 g de lipasa × hora/mol de AGLs).

8. Esterificando un extracto de AGLs de la biomasa de *P. tricornutum* (23% en EPA), catalizada mediante la lipasa AK de *P. fluorescens* sin inmovilizar se ha obtenido una

concentración de EPA del 71% y un rendimiento de recuperación de EPA del 76%. Este resultado se ha obtenido en las mismas condiciones descritas en la conclusión anterior pero empleando 92 mg de lipasa (intensidad de tratamiento = 3374 g de lipasa × hora/mol de AGLs).

9. Las lipasas D de *R. oryzae* y de EU-093 de *R. delemar* se inmovilizan eficazmente sobre Celite mediante los procedimientos ensayados. Inmovilizando respectivamente 8 y 16 mg de cada lipasa sobre 32 y 64 mg de Celite, se obtiene una actividad equivalente a la obtenida con 40 mg de lipasa sin inmovilizar al aplicar las mismas condiciones (salvo la adición de agua), obteniéndose grados de esterificación del orden de 53 y 77%, respectivamente. Ambas lipasas inmovilizadas operan mejor a 40 °C y sin adición de agua, de forma más acusada para la lipasa EU-093 de *R. delemar*.

10. De la misma manera que para la hidrólisis, la velocidad de esterificación de los extractos de AGLs procedentes del EPAX4510TG y de biomasa de *P. tricornutum* se han ajustado a un modelo cinético empírico que permite obtener valores representativos de las constantes cinéticas para cada ácido graso. Las constantes cinéticas obtenidas mediante este modelo prácticamente no cambian cuando se aumenta la concentración de 0,06 a 0,15 mol/l (en torno a 1,2 mmoles de ácidos grasos esterificados/g lipasa × hora de reacción y 0,35 mmoles de EPA esterificado/g de lipasa × hora de reacción) y también su disminución es relativamente pequeña cuando se retira el disolvente. Las constantes cinéticas sí disminuyen algo más apreciablemente cuando se aumenta la relación molar alcohol/AGLs (en torno a 0,62 y 0,19 respectivamente) y con los ácidos grasos de *P. tricornutum* (0,45 y 0,04 respectivamente). Este modelo permite estimar los grados de esterificación y las fracciones molares de EPA como éster que se pueden obtener con distintas intensidades de tratamiento y puede utilizarse como criterio para el escalamiento de los reactores discontinuos mezcla perfecta en que se ha llevado a cabo la esterificación.

11. La lipasa D de *Rhizopus oryzae* es adecuada para concentrar el EPA y el DHA mediante la esterificación de un extracto de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao (10% en EPA y 10% DHA) con alcohol láurico, sin disolvente y empleando una relación agua/extracto de AGLs del 5,6%. En estas condiciones se consiguen unas concentraciones

de EPA y DHA del 27 y 42% respectivamente, con una recuperación del 34 y 66,7% en la fracción de ácidos grasos no esterificados, utilizando una relación lipasa/AGLs del 5,6% durante 24 horas.

12. Los AGLs ricos en EPA (y/o DHA) se han separado aceptablemente de los ésteres láuricos. En primer lugar, se neutralizan los AGLs sin que se saponifiquen los ésteres mediante la adición de una disolución hidroalcohólica (30% en etanol) de KOH (0,5 N). Seguidamente se consiguen extraer más del 95% de los ésteres en tres etapas con hexano. Finalmente, tras volver a acidificar con HCl (0,5 N), el 99% de los AGLs (limpios de ésteres) se extraen en otras tres etapas con hexano.

4.3.- Extracción de lípidos

13. Se ha optimizado un procedimiento de extracción de lípidos saponificables de la biomasa de *P. tricornutum* mediante un método de dos etapas: (i) extracción con etanol (96% v/v) en dos etapas y (ii) purificación de los lípidos mediante extracción de los mismos con hexano. Entre ambas etapas se ajusta el contenido de agua de la fase hidroalcohólica (40%) para hacer máximo el rendimiento de extracción de lípidos con hexano.

14. Con este procedimiento se han reducido las cantidades de disolventes a emplear con respecto al procedimiento de Kates (1988). Así, mientras que con el método de Kates se emplean 250 ml de cloroformo/metanol por gramo de biomasa, en este caso se emplean sólo 10 ml de etanol por gramo. Los rendimientos alcanzados (cercaos al 90%) son similares en ambos casos.

15. Para la purificación de los lípidos mediante su extracción con hexano, en este trabajo se han obtenido las concentraciones correspondientes al equilibrio de distribución de los lípidos saponificables entre las fases hidroalcohólica (40% de agua) y hexánica. Estos datos permiten predecir los rendimientos en lípidos que pueden obtenerse con distintas relaciones hexano/disolución hidroalcohólica y con una o varias etapas de extracción. Así, mediante cinco etapas de extracción y una relación hexano/disolución hidroalcohólica (40% de agua) 1:5 v/v se han obtenido rendimientos en lípidos cercanos al 95%.

5.-Futuro

Los aspectos a estudiar en un futuro inmediato para completar esta investigación serían:

1. Escalar las esterificaciones en los reactores discontinuos mezcla perfecta, manteniendo constante la intensidad de tratamiento por mol de triglicérido inicial.
2. Estudiar la inmovilización de la lipasa AK en nuevos soportes, para mejorar la eficacia de la inmovilización en cuanto a actividad inicial, conservación de esta actividad a lo largo del tiempo y tras sucesivas reutilizaciones.
3. Tratar de mejorar las concentraciones y el rendimiento de EPA realizando esterificaciones sucesivas respectivamente a la fracción de ácidos grasos no esterificados y al extracto de los ésteres formados previamente hidrolizado.
4. Escalar el proceso completo de extracción y purificación de los lípidos de *P. tricornutum* y poner a punto una metodología analítica que permita medir la pureza de los lípidos extraídos y purificados teniendo en cuenta todas las especies presentes.
5. Obtener EPA con una alta concentración y un alto rendimiento mediante el siguiente proceso derivado de este trabajo:
 - Extracción y purificación de lípidos saponificables de biomasa microalgal rica en EPA mediante el sistema etanol-agua-hexano.
 - Hidrólisis enzimática de este extracto con la lipasa AK de *P. fluorescens* en las condiciones puestas a punto para obtener mezclas de ácidos grasos libres ricos en EPA.
 - Esterificación de estas mezclas de AGLs con las lipasa AK de *P. fluorescens* en las condiciones puestas a punto para obtener fracciones de AGLs de alta concentración y rendimiento en EPA.

Simbología

EPA (20:5n3)	Ácido eicosapentaenoico
EtOH	Alcohol etílico o etanol
F_{AE}	Factor adimensional de eficacia
F_C	Factor de concentración
F_{C1}	Factor de concentración de EPA en los AGLs basado en C_{EA}
$F_{C1'}$	Factor de concentración de EPA en los AGLs basado en C_{EL}
F_{C2}	Factor de concentración de EPA en los PGs
F_R	Factor de recuperación
GE	Grado de esterificación
GH	Grado de hidrólisis
GL	Glucolípidos
GLA (18:3n6)	Ácido γ -linolénico
K_L	Coefficiente de reparto de los lípidos entre las fases hexánica e hidroalcohólica
k_{HA}	Constante cinética global de hidrólisis
k_{HE}	Constante cinética de hidrólisis de EPA
k_L	Constante cinética global de esterificación
k_{LE}	Constante cinética de esterificación de EPA
L	Ácido graso de cadena larga
LA (18:2n6)	Ácido linoleico
LaOH	Alcohol láurico
LN	Lípidos neutros
LP	Lípidos polares
M	Ácido graso de cadena media
MG	Monoglicérido o monoacil-glicerol (o concentración adimensional de monoglicéridos)
m_A	Masa de ácidos grasos
m_z	Masa de enzima
m_{H_2O}	Masa de agua a añadir al alcohol

A	Ácido graso, grupo acilo
[A]	Concentración de A en moles/l
[A] ₀	Concentración de A inicial en moles/l
AA (20:4n6)	Ácido araquidónico
AGL	Ácido graso libre (o la concentración adimensional de ácidos grasos libres)
AHB	Aceite de hígado de bacalao
ALA (18:3n3)	Ácido α -linolénico
C	Ácido graso de cadena corta
CCF	Cromatografía en capa fina
C _{EPA}	Contenido en EPA con respecto a AG totales en los AGLs
C _{EPA0}	Contenido en EPA con respecto a AG totales en los AGLs al inicio de la esterificación
C _{EH}	Contenido en EPA con respecto a AG totales en la fase hexánica
C _{EP}	Contenido en EPA con respecto a AG totales en los PGs
C _{EL}	Contenido en EPA con respecto a AG totales en los ésteres láuricos
CG	Cromatografía de gases
C _H	Concentración de lípidos en el hexano
C _{Hi}	Concentración de lípidos en el hexano a la salida de una etapa, i
C _{HA}	Concentración de lípidos en el hidroalcohol
C _{HAi}	Concentración de lípidos en el hidroalcohol a la salida de una etapa, i
C _{HA0}	Concentración de lípidos en el hidroalcohol inicial
DG 1,2	1(3),2-diglicérido (o concentración adimensional de diglicéridos)
DG 1,3	1,3-diglicérido o diacil-glicerol (o concentración adimensional de diglicéridos)
DHA (22:6n3)	Ácido docosahexaenoico
E	Extracto bruto total de lípidos
[E]	Concentración de EPA en la mezcla
EE	Éster etílico de un ácido graso
EL	Éster láurico de un ácido graso

n	Número de etapas de extracción
PG	Glicérido acil-glicerol parcialmente hidrolizado (o concentración adimensional de glicéridos parciales: mono- y di-glicéridos)
PL	Fosfolípidos
PM _A	Peso molecular medio de los AGLs
PM _L	Peso molecular medio de los ELs
PM _{PG}	Peso molecular medio de los PGs
PM _{TG}	Peso molecular medio de los TGs
PS	Tanto por ciento en peso seco con respecto al peso total de biomasa
PSI	Índice de especificidad posicional
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
R	Rendimiento
R _{EH}	Rendimiento de EPA recuperado en la fase hexánica
R _F	Factor de retraso en CCF
R _H	Rendimiento de lípidos recuperados en la fase hexánica
r _{HA}	Velocidad de formación de ácidos grasos libres (velocidad de hidrólisis)
r _{HE}	Velocidad de formación de EPA libre (velocidad de hidrólisis de EPA)
r _L	Velocidad de formación de ésteres láuricos (velocidad de esterificación)
r _{LE}	Velocidad de esterificación de EPA con alcohol láurico
SA (18:4n3)	Ácido estearidónico
T	Temperatura
t	tiempo de reacción
TG	Triglicéridos o triacil-glicerol (o concentración adimensional de triglicéridos)
[TG] ₀	Concentración de triglicéridos inicial en moles/l
V	Volumen de mezcla de reacción
V _A	Volumen de disolución alcohólica

V_{AB}	Grado de hidrólisis determinado por volumetría ácido-base
V_{AB}'	Grado de esterificación determinado por volumetría ácido-base
V_b	Volumen gastado en valorar volumétricamente la mezcla de reacción inicial
V_g	Volumen gastado en valorar volumétricamente los productos de reacción
V_{Hi}	Volumen de hexano empleado en cada etapa extractiva
V_{HA0}	Volumen de disolución hidroalcohólica a tratar
V_o	Volumen gastado en valorar volumétricamente el medio de valoración
V_t	Volumen teórico que se gastaría en valorar todos los AGLs producidos en la hidrólisis completa de las especies lipídicas de la mezcla
X	Fracción másica de la especie lipídica concreta respecto al total
X_A	Fracción másica de AGLs respecto al total
X_L	Fracción másica de ELs respecto al total
X_{EA}	Fracción másica de EPA contenido en los AGLs con respecto al EPA total
X_{EL}	Fracción másica de EPA contenido en los ELs con respecto al EPA total
X_{PG}	Fracción másica de PGs respecto al total
X_{TG}	Fracción másica de TGs respecto al total
Y_A	Fracción molar de ácidos grasos libres respecto al total
Y_{Ae}	Fracción molar de ácidos grasos libres respecto al total (en el equilibrio)
Y_{A0}	Fracción molar inicial de ácidos grasos libres respecto al total
Y_{EA}	Fracción molar de EPA en los ácidos grasos libres respecto al total
Y_{EAe}	Fracción molar de EPA en los ácidos grasos libres respecto al total (en el equilibrio)
Y_{EA0}	Fracción molar de EPA en los AGLs iniciales con respecto a los AGs totales
Y_L	Fracción molar de ésteres láuricos respecto al total

Y_{Le}	Fracción molar de ésteres láuricos respecto al total (en el equilibrio)
Y_{L0}	Fracción molar inicial de ésteres láuricos respecto al total
Y_{EL}	Fracción molar de EPA en los ésteres láuricos respecto al total
Y_{ELe}	Fracción molar de EPA en los ésteres láuricos respecto al total (en el equilibrio)
Y_{EL0}	Fracción molar de EPA en los ésteres láuricos iniciales respecto al total
$[W]$	Concentración de agua
ρ_A	Densidad del alcohol

Bibliografía

- Abu-Nasr, A.M. y Holman, R.T. (1954). Isolation of methyl eicosapentaenoate, ethyl docosapentaenoate, and ethyl docosahexaenoate from col liver oil esters by chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 31: 41-45.
- Acién Fernández, F.G.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Fernández Sevilla, J.M. y Molina Grima, E. (1998). Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.*, 58: 605-614.
- Ackman, R.G. (1981). Algae as sources of edible lipids. New sources of fats and oils. Eds. Pryde, E.H., Princen, L.H. y Murkherjee, K.D. *Champaign: American Oil Chemist's Society*: 189-220.
- Ackman, R.G. (1992). The absorption of fish oils and concentrates. *Lipids*, 27: 858-862.
- Ackman, R.G. (1994). Technological advances in improved and alternative sources of lipids. Eds. B.S. Kamel y Y. Kakuda, *Blackie Academic & Professional*, Glasgow: 292-328.
- Adachi, S.; Okumura, K.; Ota, Y. y Mankura, M. (1993). Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate EPA and DHA in glycerides. *J. Ferment. Bioeng.*, 75: 259-264.
- Ainsworth, S.; Versteeg, C.; Plamer, M. y Millikan, M.B. (1996). Enzymatic interesterification of fats. Conferencia en Milkfat Update Conference, 27-28 Febrero 1996, Werribee, Victoria (Australia). *Australian J. Dairy Technol.*, 51: 105-107.
- Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S.; Willson, R.C.; Hamel, J.-F.P. y Cooney, C.L. (1988). Esterification-coupled extraction of organic acids: partition enhancement and underlying reaction and distribution equilibria. *Biotechnol. Bioeng.*, 34: 909-915.
- Akoh, C.C. y Hearnberger, J.O. (1991). Effect of catfish and salmon diet on platelet phospholipid and blood clotting in healthy men. *J. Nutr. Biochem.*, 2: 329-333.

- Akoh, C.C.; Cooper, C. y Nwosu, C.V. (1992). Lipase G-catalyzed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 257-260.
- Akoh, C.C. (1993). Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. *Biotechnol. Lett.*, 15: 949-954.
- Akoh, C.C. y Huang, K.H. (1995). Enzymatic synthesis of structured lipids: Transesterification of triolein and caprylic acid, *J. Food Lipids*, 2, 219-230.
- Akoh, C.C. y Yee, L.N. (1997). Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1409-1413.
- Albertazzi, P. y Coupland, K. (2002). Polyunsaturated fatty acids. Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention. *Maturitas*, 42 (1): 13-22.
- Alcántara, A.R.; Isidoro E. y de Fuentes Sinisterra, J.V. (1998). *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1-2): 169-184.
- Al-Duri, B. y Yong, Y.P. (2000). Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*, 4 (3): 207-215.
- Álvarez Cobelas, M. (1989) Lipids in microalgae. A review II. Environment. *Grasas y aceites*, 40: 213-223.
- Arroyo, M. (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39 (2): 23-39.
- Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J.M. y Sinisterra, J.V. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technol.*, 24 (1-2): 3-12.
- Bajpai, P.; Bajpai, P.K. y Ward, O.P. (1991) Eicosapentaenoic acid (EPA) formation: comparative studies with *Mortierella* strains and production by *Mortierella elongata*. *Mycol. Res.*, 95: 1294-1298.
- Bajpai, P. y Bajpai, P.K. (1992) Arachidonic acid production by microorganisms. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15: 1-10.

- Bajpai, P. y Bajpai, P.K. (1993). Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnol.*, 30: 161-183.
- Balcão, V.M.; Paiva, A.L. y Malcata, F.X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technol.*, 18 (6): 392-416.
- Balcão, V.M. y Malcata, F.X. (1998). Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnology Advances*, 16 (2): 309-341.
- Bartsch, H.; Nair, J. y Owen, R.W. (1999). Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20 (12): 2209-2218.
- Battistel, E.; Bianchi, D.; Cesti, P. y Pina, C. (1991). Enzymatic resolution of (S)-(+)-Naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 659-664.
- Belarbi, H.; Molina, E. y Chisti, Y. (2000). A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Process Biochemistry*, 35 (9): 951-969.
- Berger, M.; Laumen, K. y Schneider, M.P. (1992a). Lipase-catalyzed esterification of hydrophilic diols in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 14: 553-558.
- Berger, M.; Laumen, K. y Schneider, M.P. (1992b). Enzymatic esterification of glycerol I. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-*sn*-diacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 955-960.
- Best, D. (1997). All natural and nutraceutical. *Prepared Foods*, 166 (6): 32-38.
- Bligh, E.G y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Bloomer, S. (1992). Lipase-catalyzed lipid modifications in non-aqueous media. *Tesis doctoral*. Departamento de Biotecnología, Universidad de Lund, Suecia.
- Bloomer, S.; Adlercreutz, P.; Mattiason, B. (1991). Triglyceride interesterification by lipases. 2. Reaction parameters for the reduction of trisaturated impurities and diglycerides in batch reactions. *Biocatalysis*, 5: 145-162.
- Bondía-Martínez, E.; López-Sabater, M.C. y Castellote-Bargalló, A.I. (1998). Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulae with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin. *Early Human Develop.*, 53 (S): 109-119.

- Borowitzka, M. (1988). Fats, oils and hydrocarbons. En *Micro-algal Biotechnology*. Eds. Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. *Cambridge University Press*: 257-287.
- Braden, L.M. y Carroll, K.K. (1986). Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. *Lipids*, 21: 285-288.
- Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Tolley, S.; Turkenburg, J.P.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L.; Thim, L. y Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343: 767-770.
- Breivik, H.; Haraldsson, G.G. y Kristinsson, B. (1997). Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1425-1429.
- Brockman, H.L.; Law, J.H. y Kézdy, F.J. (1973). Catalysis by adsorbed enzymes: the hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads. *J. Biol. Chem.*, 248: 4965-1970.
- Calder, P.C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity, *Lipids*, 36 (9): 1007-1024.
- Camacho Páez, B. (2000). Obtención de lípidos estructurados por acidólisis con lipasas inmovilizadas. *Tesis doctoral*, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería.
- Camacho Páez, B.; Robles Medina, A.; Camacho Rubio, F.; González Moreno, P. y Molina Grima, E. (2002). Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. *Chemical Engineering Science*, 57 (8): 1237-1249.
- Camacho Páez, B.; Robles Medina, A.; Camacho Rubio, F.; González Moreno, P. y Molina Grima, E. (2003). Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technol.*, 33: 845-853.
- Camacho Rubio, F.; Acién Fernández, F.G.; Sánchez Pérez, J.A.; García Camacho, F. y Molina Grima, E. (1998). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 62: 71-86.

- Cambou, B. y Klivanov, A.M. (1984a). Comparison of different strategies for the lipase-catalyzed preparative resolution of racemic acids and alcohols: asymmetric hydrolysis, esterification, and transesterification. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 1449-1454.
- Cambou, B. y Klivanov, A.M. (1984b). Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 2687-2692.
- Carmena R.; Ros E.; Gómez-Gerique J.A.; Masana L. y Ascano J.F. (1989). Recomendaciones para la prevención de la arteriosclerosis en España. *Documento oficial de la Sociedad Española de Arteriosclerosis*, 1: 1-9.
- Carsten, M.; Molina Grima, E.; Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A. e Ibáñez González, M.J. (1996). Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 1025-1031.
- Catoni, E.; Cernia, E. y Palocci, C. (1996). Different aspects of 'solvent engineering' in lipase biocatalysed esterifications. *J. Molecular Catal. A: Chem.*, 105: 79-86.
- Cave, W.T. (1996). Dietary omega-3 polyunsaturated fats and breast cancer, *Nutrition*, 12 (1): S39-S42.
- Cellini, M.; Caramazza, N.; Mangiafico, P.; Possati, G.L. y Caramazza, R. (1998). Fatty acid use in glaucomatous optic neuropathy treatment. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 227: 41-42.
- Chao, S.W. y Rhee, J.S. (1993). Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. *Biotechnol. and Bioeng.*, 41: 204-210.
- Cheetham, P.S.J. (1992). Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. *Handbook of enzyme biotechnology*, IV, (3ª edición). *Ellis Horwood series in Biochemistry and Biotechnology*. (Londres).
- Choi, K.J.; Nakhost, Z.; Krukonis, V.J. y Karel, M. (1987). Supercritical fluid extraction and characterization of lipids from algae *Scenedesmus obliquus*. *Food Biotechnology.*, 1: 236-281.
- Christensen, M.M.; Lund, S.P.; Simonsen, L.; Hass, U.; Simonsen, S.E. y Hoy, C.E. (1998). Dietary structured triacylglycerols containing docosahexaenoic acid
-

- given from birth affect visual and auditory performance and tissue fatty acid profiles of rats. *The Journal of Nutrition*, 128 (6): 1011-1017.
- Chulalaksananukul, W.; Condoret, J.S.; Delorme, P. y Willemot, R.M. (1990). Kinetic study of esterification by immobilized lipase in *n*-hexane. *FEBS Lett.*, 276: 181-184.
- Clandinin, M.T.; Van Aerde, J.E.; Parrott, A.; Field, C.J.; Euler, A.R. y Lien, E.L. (1997). Assessment of the efficacious dose of arachidonic and docosahexaenoic acids in preterm infant formulas: fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids. *Pediatric Research*, 42 (6): 819-825.
- Clealand, L.G. y James, M.J. (2000). Fish oil and reumatoid arthritis: antiinflammatory and colateral health benefit. *J. Rheumatol.*, 27: 10-27.
- Cohen, Z. (1994). Production potential of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 941-945.
- Cohen, Z. y Cohen, S. (1991). Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68: 16-19.
- Cohen, Z. y Heimer, Y.M. (1992). Production of polyunsaturated fatty acids (EPA, ARA and GLA) by the microalgae *Porphyridium* and *Spirulina*. Industrial applications of single cell oils. Eds. Kyle, D.J. and Ratledge, C. *American Oils Chemist's Society*, Champain, Illinois: 243-273.
- Cohen, Z.; Norman, H.A. y Heimer, Y.M. (1995). Microalgae as a source of ω 3 fatty acids. *World Review of nutrition and dietetics*. Ed. Simopoulos, A.P. Basel, Karger, 77: 1-31.
- Cohen, Z.; Vonshak, A.; Boussiba, S. y Richmond, A. (1988b). The effect of temperature and cell concentration on the fatty acid composition of outdoor culture of *Porphyridium cruentum*. *Algal Biotechnology*. Stadler, T., Mollin, J. y Verdus, M.C. *Elsevier Appl. Sci.* Londres : 421-428.
- Cohen, Z.; Vonshak, A., y Richmond, A. (1988a). Effect of environmental conditions on fatty acids composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. Phycol.*, 24: 328-332.
- Connor, W.E. y Bendich, A. (2000). Highly unsaturated fatty acids in nutrition and disease prevention. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71 (Supl.): 169-398.
- Corden, C. (1998). *Scotia Pharmaceuticals Ltd, U.K., Comunicación personal*.
-

- Cvengros, J.; Micov, M. y Lutisan, J. (2000). Modelling of fractionation in a molecular evaporator with divided condenser. *Chem. Engineering and Processing*, 39: 191-199.
- Cvengros, J.; Pollak, S.; Micov, M. y Lutisan, J. (2001). Film wiping in the molecular evaporator. *Chem. Engineering and Processing*, 81: 9-14.
- Deetz, J. S. y Rozzell, J. D. (1988). Enzyme-catalysed reactions in non-aqueous media. (Review). *TIBTECH*, 6: 15-19.
- Deleuze, H.; Langrand, G. ; Millet, H. ; Baratti, J. ; Buono, G. y Triantaphylides, C. (1987). Lipase-catalyzed reactions in organic media: competition and applications. *Biochim. Biophys. Acta*, 911: 117-120.
- Dommels, Y.E.M.; Alink, G.M.; van Bladeren, P.J. y van Ommen, B. (2002). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and colorectal carcinogenesis: results from cultured colon cells, animal models and human studies. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12 (4): 233-244.
- Dordick, J.S. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 194-211.
- Dordick, J.S. (1992). Designing enzymes for use in organic solvents. (Reviews). *Biotechnol. Prog.*, 8: 259-267.
- Dyerberg, J. (1986). Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.*, 44: 125-134.
- Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. y Vesnaver, R. (1996). Influence of organic solvents on enzyme chemoselectivity and their role in enzyme-substrate interaction. *Tetrahedron*, 52: 4867-4876.
- Eisenbach, W. (1984). Supercritical fluid extraction: A film demonstration. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 88: 882-887.
- Endo, Y.; Hoshizaki, S. y Fujimoto, K. (1997a). Autoxidation of synthetic isomers of triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 543-548.
- Endo, Y.; Hoshizaki, S. y Fujimoto, K. (1997b). Oxidation of synthetic triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids: effect

- of oxidation system and triacylglycerol structure. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1041-1045.
- Ergan, F. y André, G. (1989). Simple high performance liquid chromatography methods for monitoring lipase reactions. *Lipids*, 24: 76-78.
- Ergan, F.; Trani, M. y André, G. (1988). Solvent free triglyceride synthesis using LipozymeTM IM-20. *Biotechnol. Lett.*, 10: 629-634.
- Ergan, F.; Trani, M. y André, G. (1990). Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipases in non-aqueous media. *Biotechnol. Bioeng.*, 35: 195-200.
- Ergan, F. y Trani, M. (1991). Effect of lipase specificity on triglyceride synthesis. *Biotechnol. Lett.*, 13: 19-24.
- Ergas, D.; Eilat, E.; Mendlovic, S. y Stoecker, Z. (2002). n-3 fatty acids and the immune system in autoimmunity. *The Israel Medical Association Journal*, 4 (1): 34-38.
- Esteban Cerdán, L.; Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A.; Ibáñez González, M.J. y Molina Grima, E. (1997). Enriched PUFA-triglycerides from PUFA concentrates of cod liver oil and *Phaeodactylum tricornutum* by enzymatic catalysis. *3rd European Workshop Biotechnology of Microalgae European Society of Microalgal Biotechnology*. Berlín. Junio: 16-17.
- Esteban Cerdán, L.; Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A.; Ibáñez González, M.J. y Molina Grima, E. (1998). Síntesis of Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Triglycerides by Lipase-Catalyzed Esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1329-1337.
- Fevrier, P.; Guégan, P.; Yvergnaux, F.; Callegari, J.P.; Dufossé, L. y Binet, A. (2001). Evaluation of regioselectivity of lipases based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (4-6): 445-453.
- Flamand L.; Borgeat P.; Lalonde R. y Gosselin J. (2004). Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. *J. Infect. Dis.*, 189: 2001-9.
- Foglia, T.A. y Sonnet, P. (1995). Fatty acid selectivity of lipases: γ -linolenic acid from borage oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72: 417-420.

- Foglia, T.A. y Villeneuve, P. (1997). *Carica papaya* latex-catalyzed síntesis of structured triacylglycerols, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1447-1450.
- Folch, J.; Lees, M. y Stanley, G. M. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Fomuso, L.B. y Akoh, C.C. (1998). Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 405-410.
- Formo, M.W. (1954). Ester reactions of fatty materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 31: 548-559.
- Gámez-Meza N.; Noriega-Rodríguez J.A.; Medina-Juárez L.A.; Ortega-García J.; Monroy-Rivera J; Toro-Vázquez F.J.; García H.S. y Angulo-Guerrero O. (2003). Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Research International*, 36: 721-727.
- Gan, Q.; Baykara, F.; Rahmat, H.; Weatherley, L.R. (2000). Analysis of a Direct Contact Membrane Reactor for Lipase-Catalyzed Oil Hydrolysis in a Dynamic Emulsion System. *Catalysis Today*, 56: 179-190.
- Gandhi, N.N. (1997). Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 621-633.
- García Sánchez, J.L.; Molina Grima, E.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A. y Giménez Giménez, A. (1993). Cuantificación de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal. *Grasas y aceites*, 44: 348-353.
- Giménez Giménez, A.; Ibáñez González, M.J.; Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; García Salas, S. y Esteban Cerdán, L. (1998). Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n3) and arachidonic acids (20:4n6) from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Bioseparation*, 7: 89-99.
- Glen, I. (2002). The potencial for new fatty acids and antioxidants in the treatment of psychiatric and neurological diseases. *Symposium "Microalgal Products and Health"*. Roquetas de Mar (Almería, España).
- Goma-Doncescu, N. y Legoy, M.D. (1997). An original transesterification route for fatty acid ester production from vegetable oils in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1137-1143.

- González Moreno, P.A.; Robles Medina, A.; Camacho Rubio, F.; Camacho Páez, B. y Molina Grima, E. (2004). Production of structured lipids by acidolysis of an EPA enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes. *Biotechnol. Prog.*, 20: 1044-1052.
- Greenwald, P.; Clifford, C.K. y Milner, J.A. (2001). Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, 37 (8): 948-965.
- Guil-Guerrero, J.L.; Gómez-Mercado, F.; García-Maroto, F. y Campra-Madrid, P. (2000a). Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid. Part I: *Echium* seeds from *Macaronesia*. *Phytochemistry*, 53 (4): 451-456.
- Guil-Guerrero, J.L.; Gómez-Mercado, F.; García-Maroto, F. y Campra-Madrid, P. (2000b). Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid. Part II: fatty acids and squalene from *Macaronesian Echium* leaves. *Phytochemistry*, 54 (5): 525-529.
- Guit, R.P.M.; Kloosterman, M.; Meindersma, G.W.; Mayer, M. y Meijer, E.M. (1991). Lipase kinetics: hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber membrane reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 727-732.
- Halldorsson, A.; Kristinsson, B.; Glynn, C. y Haraldsson, G.G. (2003). Separation of EPA and DHA in Fish Oil by Lipase-Catalyzed Esterification with Glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80 (9): 915-921.
- Halldorsson, A.; Kristinsson, B. y Haraldsson, G.G. (2004). Lipase selectivity toward fatty acids commonly found in fish oil. *Eur. J. Lipid SCI. Technol*, 106: 79-87.
- Hardardottir, I. y Kinsella, E. (1988). Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. *J. Food Sci.*, 53: 1659-1659.
- Hamilton, R.J. y Hamilton, S. (1992). Lipid analysis. A Practical Approach. *Eds. Rickwood, D., Hames, B.D., Oxford University press, New York*: 90-94.
- Hara, A. y Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, 90: 420-426.
- Haraldsson, G.G.; Höskuldsson, P.A.; Sigurdsson, S. Th.; Thorsteinsson, F. y Gudbjarnason, S. (1989). The preparation of triglycerides highly enriched with
-

- ω-3 polyunsaturated fatty acids via lipase catalyzed interesterification. *Tetrahedron Lett.*, 30: 1671-1674.
- Haraldsson, G.G.; Kristinsson, B.; Sigurdardottir, R.; Gudmundsson, G.G. y Breivik, H. (1997). The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1419-1424.
- Harbige L.S. (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids*, 38: 323-41.
- Harper, C.R. y Jacobson, T.A. (2001). The fats of life - The role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Archives of Internal Medicine*, 161 (18): 2185-2192.
- Harris, W.S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1645-1654.
- Hayashi, K. y Kishimura, H. (1993). Separation of eicosapentaenoic acid-enriched triglycerides by column chromatography on silicic acid. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 44 (1): 24-31.
- Herold, P.M. y Kinsella, J.E. (1986). Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566-598.
- Hills, M.J.; Kiewitt, I. y Mukherjee, K.D. (1990). Enzymatic fractionation of fatty acids: enrichment of γ-linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 561-564.
- Hollingworth, P. (1997). Mainstreaming healthy foods. *Food Technol*, 51(3): 55-58.
- Holman, R.T. (1954a). Autoxidation of fats related substances. Progress in the fats and other lipids, (2). Eds. Holman, R.T., Lundberg, W.O. y Malkin, T. London: Pergamon Press: 51-98.
- Holman, R.T. (1954b). General introduction to polyunsaturated acids. Progress in the fats and other lipids, (9). Eds. Holman, R.T., Lundberg, W.O. y Malkin, T. London: Pergamon Press: 1-11.

- Horrocks, L.A. y Yeo, Y.K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research: the Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 40 (3): 211-225.
- Horwood, L.J. y Fergusson, D.M. (1998). Breastfeeding and later cognitive and academic outcomes. *Pediatrics*, 101 (1), E9.
- Hoshino, T.; Yamane, T. y Shimizu, S. (1990). Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids. *Agric. Biol. Chem.*, 54: 1459-1467.
- Howell, W.H.; McNamarra D.J.; Tosca M.A.; Smith B.T. y Gaines J.A. (1997). Plasma lipid and lipoprotein responses to dietary fat and cholesterol: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65: 1747-1764.
- Huang, K-H. y Akoh, C.C. (1994). Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 1277-1280.
- Huang, F.C.; Ju, Y.H. y Huang, C.W. (1997). Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil via lipase-catalyzed reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 977-981.
- Huang, F.C.; Ju, Y.H. y Chiang, J-C. (1999). G-Linolenic Acid-Rich Triacylglycerols Derived from Borage Oil Via Lipase-Catalyzed Reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (7): 833-837.
- Ibáñez González, M.J.; Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; Giménez Giménez, A.; Cartens, M. y Esteban Cerdán, L. (1998). Optimization of Fatty Acid Extraction from *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 Biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1735-1740.
- Innis, S.M. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.*, 30: 39-103.
- Innis, S.M. (1993). Essential fatty acid requirements in human nutrition. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 71 (9): 699-706.
- Innis, S.M.; Sprecher, H.; Hachey, D.; Edmond, J. y Anderson, R.E. (1999). Neonatal polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*, 34 (2): 139-149.
- Ip, C. (1997). Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary
-

- carcinogenesis in animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66 (6) Supplement: 1523-1529.
- Ison, A.P.; Macrae, A.R.; Smith, C.G. y Bosley, J. (1994). Mass transfer effects in solvent-free fat interesterification reactions: influences on catalyst design. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 122-130.
- Iverson, J.L. y Weik, R. W. (1967). Correlation of fatty acid structure with preferential order of urea complex formation. *J. A. O. A. C.*, 50(5): 1111-1118.
- Iwai, M. y Tsujisaka, Y. (1984). Fungal lipase. *Lipases. Eds. Borgstrom, B. y Brockman, H. L. Elsevier, Ámsterdam*: 443-470.
- Iwasaki, Y.; Yasui, M.; Ishikawa, T.; Irimescu, R.; Hata, K. y Yamane, T. (2001). Optical resolution of asymmetric triacylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 905 (1-2): 111-118.
- Jandacek, R.J.; Whiteside, J.A.; Holcombe, B.N.; Volpenheim, R.A. y Taulbee, J.D. (1987). The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. *Am. J. Clin. Nutr.*, 45: 940-945.
- Janssen, A.E.M.; Hadini, M.; Wessels Boer, N.; Walinga, R.; van der Padt, A.; van Sonsbeck, H.M. y van't Riet, K. (1992). The effect of organic solvents on enzymatic esterification of polyols. *Biocatalysis in non-conventional media. Eds. Tramper, J. y cols. Elsevier Science Publishers B. V.*: 155-161.
- Janssen, A.E.M.; van der Padt, A.; van Sonsbeck, H.M. y van't Riet, K. (1993). The effect of organic solvents on the equilibrium position of enzymatic acylglycerol synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 95-103
- Jensen, R.G.; Dejong, F.A. y Clark, R.M. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids (Methods)*, 18: 239-252.
- Jensen, R.G.; Galluzo, D.R. y Bush, V.J. (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). *Biocatalysis*, 3: 307-316.
- Jonzo, M.D.; Hiol, A.; Zagol, I.; Druet, D. y Comeau, L-C. (2000). Concentrates of DHA from Fish Oil by Selective Esterification of Cholesterol by Immobilized Isoforms of Lipase from *C. rugosa*. *Enzyme and Microbial Technol.*, 27: 443-450.

- Kamal-Eldin, A. y Appelqvist, L-Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31: 671-701.
- Kates, M. (1988). Isolation, analysis and identification of lipids. “*Techniques of lipidology*”. 2nd edition. Edited by Burdon, R. H. y Van Knippenberg, P. H. Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science Publishers B. V.: 168-170.
- Kawano, Y.; Kawasaki, M.; Shiomori, K.; Baba, Y. y Hano, T. (1994). Hydrolysis kinetics of olive oil with lipase in a transfer cell. *J. of Ferment. and Bioeng.*, 77: 283-287.
- Kennedy, J.F. y Cabral, J.M.S. (1983). Solid Phase Biochemistry. Schouten, W.H. (ed.), Wiley Pub., New York.
- Kim, H.Y. y Edsall, L. (1999). The role of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in neuronal signalling. *Lipids*, 34 (S): 249-250.
- Kim, M.G. y Lee, S.B. (1996). Enhanced catalytic efficiency of enzymes in organic media with addition of the solid support: effect of silica gel on reaction rates and enzyme agglomeration. *J. Molecular Catal. B: Enzymatic*, 2: 127-140.
- Kinsella, J.E. y Lokesh, B. (1990). Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. *Critical Care Medicine*, 18 (2): 94-113.
- Kirchner, G.; Scollar, M.P. y Klibanov, A.M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 107: 7072-7076.
- Klei, H.E.; Sundstrom, D.W. y Shim, D. (1985). Immobilization of enzymes by microencapsulation en Immobilized cells and enzymes: a practical approach. J. Woodward, ed. IRL Press: 49-54.
- Knapp, H.R. (1989). Omega-3 fatty acids, endogenous prostaglandins and blood pressure regulation in humans. *Nutr. Rev.*, 47: 301-313.
- Koletzko, S. y Reinhardt, D. (2001). Nutritional challenges of infants with cystic fibrosis. *Early Human Development*, 65 (S2): 53-61.
- Kolossvary G.J. (1996). Optimization of Lipase Activity from *Rhizopus sp* in TG Hydrolysis Using a Modified Simplex Method. *Process Biochem.*, 31 (6): 595-600.

- Kosugi, Y.; Chang, Q.L.; Kanazawa, K. y Nakanishi, H. (1997). Changes in hydrolysis specificities of lipase from *Rhizomucor miehei* to polyunsaturated fatty acyl ethyl esters in different aggregation states. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1395-1399.
- Kosugi, Y.; Roy, P.K.; Chang, Q.; Shu-Gui, C.; Fukatsu, M.; Kanazawa, K. y Nakanishi, H. (2000). Esterification of polyunsaturated fatty acids by various forms of immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Lipids*, 35 (4): 461-466.
- Kwon, S.J.; Han J.J. y Rhee, J.S. (1995). Production and *in situ* separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. *Enzym. Microb. Technol.*, 17: 700-704.
- Kyle, D. (1989). Market application from microalgae. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66: 648-653.
- Langrand, G.; Secchi, M.; Buono, G.; Baratti, J. y Triantaphylides, C. (1985). Lipase-catalyzed ester formation in organic solvents: an easy preparative resolution of α -substitued cyclohexanols. *Tetrahedron Lett.*, 26: 1857-1860.
- Langrand, G.; Baratti, J.; Buono, G. y Triantaphylides, C. (1986). Lipase catalyzed reactions and strategy for alcohol resolution. *Tetrahedron Lett.*, 27: 29-32.
- Lauritzen, L.; Hansen, H.S.; Jørgensen, M.H. y Michaelsen, K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research*, 40 (1-2): 1-94.
- Lahoz, C.; Alonso, R.; Ordovas, J.M.; López-Farré, A.; De Oya, M. y Mata P. (1997). Effect of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur. J. Clin. Inv.*, 27: 780-787.
- Lee, K.T. y Akoh, C.C. (1996). Immobilization lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid a specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 611-615.
- Lee, K.T. y Akoh, C.C. (1997). Effects of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 579-584.
- Lee, K.T. y Akoh, C.C. (1998). Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from Peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1533-1537.

- Lee, C. y Parkin, K. (2001). Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. *Biotechnol. Bioeng.*, 75: 219-227.
- Lepage, G. y Roy, C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J. Lipid Res.*, 25: 1391-1396.
- Li, Z.Y. y Ward, O.P. (1993a). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 745-748.
- Li, Z.Y. y Ward, O.P. (1993b). Enzyme catalyzed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Lett.*, 15: 185-188.
- Li, Z.Y. y Ward, O.P. (1994). Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acids by microbial lipase in organic solvent. *J. Industrial Microbiol.*, 13: 49-52.
- Linder, M.; Matouba, E.; Fanni, J. y Parmentier, M. (2002). Enrichment of salmon oil with n-3 PUFA by lipolysis, filtration and enzymatic re-esterification. *Eur. J. Lipid SCI. Technol.*, 104: 455-462.
- Linko, Y-Y. y Hayakawa, K. (1996). Docosahexaenoic acid: a valuable nutraceutical? *Trends Food Sc. Technol.*, 7: 59-63.
- Long, K.; Ghazali, H. M.; Ariff, A. y Bucke, C. (1997). Acidolysis of several vegetable oils by micelium-bound lipase of *Aspergillus flavus* link. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1121-1128.
- López Alonso, D.; Segura del Castillo, C.I.; Molina Grima, E. y Cohen, Z. (1996). First insights into improvement of eicosapentaenoic acid content in *Phaeodactylum tricorutum* (*Bacillariophyceae*) by induced mutagenesis. *J. Phycol.*, 32: 339-345.
- López Alonso, D.; Belarbi, E.H.; Fernández-Sevilla, J.M.; Rodríguez-Ruiz, J.; Segura C.I. y Giménez, A. (1998). Acyl lipids of three microalgae. *Phytochemistry*, 47 (8): 1473-1481.
- López Alonso, D. y García Maroto, F. (2000). Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 18 (6): 481-497.

- Lortie, R.; Trani, M. y Ergan, F. (1993). Kinetic study of the lipase-catalyzed synthesis of triolein. *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 1021-1026.
- Lortie, R. (1997). Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol. Adv.*, 15: 1-15.
- Lundberg, W.O. y Järvi, P. (1966). Peroxidation of polyunsaturated fatty compounds. *Progress in the fats and other lipids, Vol. 9. Eds. Holman, R.T., Lundberg, W.O. y Malkin, T. London: Pergamon Press*, 9 (10): 377-406.
- Lynch, D.V. y Thompson, G.A. (1984). Microsomal phospholipid molecular species alterations during low temperature acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiology*, 74: 193-197.
- Maehr, H.; Zenchoff, G. y Coffen, D.L. (1994). Enzymic enhancement of n-3 fatty acid content in fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 463-467.
- Makasçi, A.; Arisoy, K. y Telefoncu, A. (1996). Deacidification of high acid olive oil by immobilized lipase. *Tr. J. Chem.*, 20: 258-264.
- Malcata, F.X.; Reyes, H.R.; García, H.S.; Hill, C.G. Jr., y Amundson, C.H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 14: 426-446.
- Manjón, A; Iborra, J.L. y Arocas, A. (1991). Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. *Biotechnol. Letters*, 13: 339-344.
- Mann, J.E. y Myers, J. (1968). On pigments, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.*, 4: 349-355.
- Marison, I.W. (1996). Cinética enzimática. *Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Compilado por Alan Scragg. Ed. Limusa, Noriega, México*: 101-124.
- Martínez, M. (1991). Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J. Pediatr.*, 120(S): 129-138.
- Mataix Verdú, F.J. y Martínez de Victoria Muñoz, E. (1988). El aceite de oliva: bases para el futuro. *Ed. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias, Centro de Información y Documentación Agraria*. Sevilla.
- Matori, M.; Asahara, T. y Ota, Y. (1991). Positional specificity of microbial lipases. *J. Ferment. Bioeng.*, 72: 397-398.
-

- Miller, C.; Austin, H.; Posorske, L. y Gonzalez, J. (1988). Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 927-931.
- Millqvist Fureby, A.; Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1994). Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for the preparation of 2-monoglycerides. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 1042-1047.
- Miyashita, K.; Frankel, E.N.; Neff, W.E. y Awl, R.A. (1990). Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols, III. Synthetic triacylglycerols containing linoleate and linolenate. *Lipids*, 25: 48-53.
- Miyashita, K.; Nara, E. y Ota, T. (1993). Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 1638-1640.
- Moffat, C.F.; McGill, A.S.; Hardy, R. y Anderson, R.S. (1993). The production of fish oils enriched in polyunsaturated fatty acid-containing triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 133-138.
- Molina Grima, E.; Sánchez Pérez, J.A.; García Camacho, F.; García Sánchez, J.L.; Acién Fernández, F.G. y López Alonso, D. (1994a). Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 in a closed tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.*, 37: 159-166.
- Molina Grima, E.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Urda Carmona, J.; Acién Fernández, F.G. y Fernández Sevilla, J.M. (1994b). Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a tubular photobioreactor for the production of eicosapentaenoic acid. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 20: 279-290.
- Molina Grima, E.; Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A.; Sánchez Pérez, J.A.; García Camacho, F. y García Sánchez, J.L. (1994c). Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 955-959.
- Molina Grima, E.; Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A. e Ibáñez González, M.J. (1996). Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n3) from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass. *J. Appl. Phycol.*, 8: 359-367.

- Moore, N.G.; Wang-Johanning, F.; Chang, P.L. y Johanning, G.L. (2001). Omega-3 fatty acids decrease protein kinase expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 67 (3): 279-283.
- Mu, H.; Xu, X. y Høy, C.E. (1998). Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalized Interesterification in a Laboratory-Scale Continuous Reactor. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75: 1187-1193.
- Mühling, M.; Whitton, B.A.; Harris, N.; Wilmotte A.; Belay, A. y Ota, Y. (1999). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* ("Spirulina") strains. *8TH International Conference on Applied Algology "Algae and Human Affairs in the 21st Century"*.
- Mukherjee, K.D. (1990). Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis*, 3: 277-293.
- Nilsson, W.B.; Gauglitz, E.J.; Hudson, J.K.; Stout, V.F. y Spinelli, J. (1988). Fraction of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO₂. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 109-117.
- Nagle, N. y Lemke, P. (1990). Production of methyl ester fuel from microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24/25: 355-366.
- Nair, S.S.; Leitch, J.W.; Falconer, J. y Garg, M.L. (1997). Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 127 (3): 383-393.
- Nakamura, K. y Hoshino, T. (1992). Novel utilization of supercritical carbon dioxide for enzymatic reaction in food processing. *Advances in food engineering*. Eds. Singh, R. P. y Wirakartakusumah, M. A., 20: 257-262.
- Nettleton, J.A. (1991). Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition. *Journal of the American Dietetic Association*, 91 (3): 331-337.
- Nettleton, J.A. (1993). Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J. Am. Dietetic Assoc.*, 93: 58-64.
- Nouredini, H.; Gao, X.; Joshi, S. y Wagner, P.R. (2002). Immobilization of *Pseudomonas cepacia* Lipase by Sol-Gel Entrapment and Its Application in the Hydrolysis of Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79 (1): 33-40.

- Oh, S-G.; Holmberg, K. y Ninham, B.W. (1996). Effect of hydrocarbon chain length on yield of lipase catalyzed triglyceride synthesis in microemulsion. *J. Colloid Interface Sci.*, 181: 341-343.
- Okumura, S.; Iwai, M. y Tsujisaka, Y. (1976). Positional specificities of four kinds of microbial lipases. *Agr. Biol. Chem.*, 40: 655-660.
- Ono, M.; Hosokawa, M.; Inoue, Y. y Takahashi, K. (1997). Water activity-adjusted enzymatic partial hydrolysis of phospholipids to concentrate polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1415-1417.
- Osada, K.; Takahashi, K. y Hatano, M. (1990a). Hydrolysis and synthesis of icosapentaenoic acid-docosahexaenoic acid rich oil by lipase TOYO. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 39: 50-51.
- Osada, K.; Takahashi, K. y Hatano, M. (1990b). Polyunsaturated fatty glyceride synthesis by microbial lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 921-922.
- Ota, Y.; Itabashi, Y. y Hasuo, M. (1996). Measurement of positional specificity index of microbial lipases by chiral phase high-pressure liquid chromatography. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60: 145-146.
- Otha, S.; Chang, T.; Aozasa, O.; Kondo, M. y Miyata, H. (1992). Sustained production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the red alga *Porphyridium cruentum* cultured in a light/dark cycle. *J. Ferment. Bioeng.*, 74: 398-402.
- Pencreac'h, G. y Baratti, J.C. (2001). Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. *Enzyme and Microbial Technol.*, 28 (4-5): 473-479.
- Persson, M.; Wehtje, E. y Adlercreutz, P. (2000). Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. *Biotechnology letters*, 22: 1571-1575.
- Philip, F.C. y Privett, O.S. (1979). Extraction and analysis of lipid from immature soybeans. *Lipids*, 14 (11): 949-952.
- Plakas, S.M. y Guarino, A.M. (1986). Omega-3 fatty acids and fish oils: Is the news all good? *Proceedings of eleventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas. Texas Agricultural Extension Service. Marine Service Program.*
-

- Polak, J.T.; Balaban, M.; Peplow, A. y Philips, A.J. (1989). Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from algae. "*Supercritical fluid science and technology*". Eds. Johnston, K.P. y Penninger, J.M.L. Penninger. ACS Symposium Series, 406: 449-467.
- Porter, N.A.; Caldwell, S.E. y Mills, K.A. (1995). Mecanismos of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30: 277-290.
- Pohl, P. y Zurheide, F. (1982). Fat production in freshwater and marine algae. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Eds Hoop, H.A., Levring, T. Y TANAKA, y., New York: Walter de gruyter and Co., 2: 65-80.
- Privett, O.S. (1968). Preparation of polyunsaturated fatty acids from natural sources. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*. Ed. Holman, R.T. Pergamon Press, IX, 11(3): 409-452.
- Quinlan, P. y Moore, S. (1993). Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *INFORM (Biotechnology)*, 4: 580-585.
- Rakshit, S.K.; Vasuhi, R. y Kosugi, Y. (2000). Enrichment of PUFAs from Tuna Oil Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens* Lipase. *Bioprocess Engineering*, 23: 251-255.
- Ramírez Fajardo, A.; Akoh, C.C. y Lai, O.M. (2003). Lipase-Catalyzed Incorporation of n-3 PUFAs into Palm Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80 (12): 1197-1200.
- Rangheard, M.-S.; Langrand, G.; Triantaphylides, C. y Baratti, J. (1989). Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1004: 20-28.
- Ratnayake, W.M.N.; Olsson, B.; Matthews, D. y Ackman, R.G. (1988). Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation. *Fat Sci. Technol.*, 10: 381-386.
- Riaublanc, A.; Ratomahenina, R.; Galzy, P. y Nicolas, M. (1993). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 497-500.
- Richmond, A. (1986). CRC Handbook of microalgal mass culture. Ed. A. Richmond, CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida: 199-243.

- Rizvi, S. S. H.; Chao, R. R. y Liew, Y. L. (1988). Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications. Eds. B. A. Charpentier y M. R. Sevenants. ACS Sym. Series No. 366. American Chemical Society Pub., Chicago: 88-108.
- Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A.; García Camacho, F.; Sánchez Pérez, J.A.; Molina Grima, E. y Contreras Gómez, A. (1995a). Concentration and purification of stearidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from cod liver oil and the marine microalga *Isochrysis galbana*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72: 575-583.
- Robles Medina, A.; Giménez Giménez, A.; Molina Grima, E. y García Sánchez, J.L. (1995b). Obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por el método de los compuestos de inclusión de urea. *Grasas y aceites*, 42: 174-182.
- Robles Medina, A.; Molina Grima, E.; Giménez Giménez, A. e Ibáñez González, M.J. (1998). Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.*, 16: 517-580.
- Robles Medina, A.; Esteban Cerdán, L.; Giménez Giménez, A.; Camacho Páez, B.; Ibáñez González, M.J. y Molina Grima, E. (1999). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae Oils. *Journal of Biotechnol.*, 70: 379-391.
- Rodriguez Ruiz, J.; Belarbi, E.; García Sanchez, J.L. y Lopez Alonso, D. (1998). Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnology Techniques*, 12: 689-691.
- Rogalska, E.; Ransac, S. y Verger, R. (1990). Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.*, 265: 20271-20276.
- Rogalska, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F. y Verger, R. (1993). Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality*, 5: 24-30.
- Rooney, D. y Weatherley, L.R. (2001). The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid reactor. *Process Biochemistry*, 36 (10): 947-953.
- Rose, D.P. (1997). Dietary fatty acids and cancer. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66: 998-1003.

- Rose, D.P. y Connolly, J.M. (1999). Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 83 (3): 217-244.
- Rudman, D. y Cohan, M.E. (1991). Polyunsaturated fatty acids and the health of the elderly. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 66: 143-160.
- Sargent, J.; McEvoy, L.; Estevez, A.; Bell, G.; Bell, M.; Henderson, J. y Tocher, D. (1999a). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 (1-4), 217-229.
- Sargent, J.R. y Tacon, A.G. (1999b). Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58 (2): 377-383.
- Schlenk, H. (1961). Crystallization of fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 38: 728-736.
- Schmidt, E.B. (1997). N-3 fatty acids and the risk of coronary heart disease. *Danish Medical Bulletin*, 44 (1): 1-22.
- Schmidt, E.B.; Christensen, J.H.; Aardestrup, I.; Madsen, T.; Riahi, S.; Hansen, V.E. y Skou, H.A. (2001). Marine n-3 fatty acids: basic features and background. *Lipids*, 36 (S): 65-68.
- Schmitt-Rozieres, M.; Vanot, G.; Deyris, V.; Comeau, L. (1999). *Borago officinalis* Oil: Fatty Acid Fractionation by Immobilized *Candida rugosa* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (5): 557-562.
- Schuch, R. y Mukherjee, K.D. (1989). Lipase-catalyzed reactions of fatty acids with glycerol and acylglycerols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 332-336.
- Seriburi, V. y Akoh, C.C. (1998). Enzymatic transesterification of triolein and stearic acid and solid fat content of their products. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 511-516.
- Seto, A.H.; Wang, H.L. y Hesseltine, C.W. (1984). Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61: 892-894.
- Sharma, R.; Chisti, Y. y Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19 (8): 627-662.

- Shimada, Y.; Maruyama, K.; Okazaki, S.; Nakamura, M. y Sugihara, A. (1994). Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 951-954.
- Shimada, Y.; Maruyama, K.; Nakamura, M.; Nakayama, S.; Sugihara, A. y Tominaga, S. (1995). Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72: 1577-1581.
- Shimada, Y.; Sugihara, A.; Nakano, H.; Yokota, T.; Nagao, T.; Komemushi, S. y Tominaga, Y. (1996a). Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73: 1415-1420.
- Shimada, Y.; Sugihara, A.; Maruyama, K.; Nagao, T.; Nakayama, S.; Nakano, H. y Tominaga, Y. (1996b). Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.*, 81: 299-303.
- Shimada, Y.; Sugihara, A.; Nakano, H.; Kuramoto, T.; Nagao, T.; Gemba, M. y Tominaga, Y. (1997a). Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 97-101.
- Shimada, Y.; Maruyama, K.; Sugihara, A.; Moriyama, S. y Tominaga, Y. (1997b). Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method: hydrolysis and selective esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1441-1446.
- Shimada, Y.; Sugihara, A.; Shibahiraki, M.; Fujita, H.; Nakano, H.; Nagao, T.; Terai, T. y Tominaga, Y. (1997c). Purification of γ -linolenic acid from borage oil by a two-step enzymatic method. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 1465-1470.
- Shimada, Y.; Sugihara, A.; Nakano, H.; Nagao, T.; Suenaga, M.; Nakai, S. y Tominaga, Y. (1997d). Fatty acid specificity of *Rhizopus delemar* lipase in acidolysis. *J. Ferment. Bioeng.*, 83: 321-327.
- Shimada, Y.; Fukushima, N.; Fujita, H.; Honda, Y.; Sugihara, A. y Tominaga, Y. (1998a). Selective Hydrolysis of Borage oil with *Candida rugosa* Lipase: Two Factors Affecting the Reaction. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1581-1586.

- Shimada, Y.; Sakai, N.; Sugihara, A.; Fujita, H.; Honda, Y. y Tominaga Y. (1998b). Large-scale purification of g-linolenic acid by selective esterification using *Rhizopus delemar*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1539-1543.
- Shimada, Y.; Sugihara, A. y Tominaga, Y. (2001a). Enzymatic purification of PUFAs (review). *J. Biosci. Bioeng.*, 91: 529-538.
- Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A.; Baba, T.; Ooguri, T.; Moriyama, S.; Terai, T. y Tominaga, Y. (2001 b). Ethyl esterification of docosahexaenoic acid in an organic solvent-free system with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (1): 19-23.
- Simonsen, N.; van't Veer, P.; Strain, J.J.; Martin-Moreno, J.M.; Huttunen, J.K.; Navajas, J.F.; Martin, B.C.; Thamm, M.; Kardinaal, A.F. y Kok C. (1998). Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction and Breast Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 147 (4): 342-352.
- Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3): 560S-569S.
- Simopoulos, A.P. (2000). Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, 79 (7): 961-970.
- Simopoulos, A.P. (2001). Evolutionary aspects of diet and essential fatty acids. *World Review of Nutrition & Dietetics*, 88: 18-27.
- Singh, G. y Chandra, R.K. (1988). Biochemical and cellular effects of fish and fish oils. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 12: 371-419.
- Sonnet, P.E.; Foglia, T.A. y Fearheller, S.H. (1993). Fatty acid selectivity of lipases: erucic acid from rapeseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 387-391.
- Soon-yeong, C.; Miyashita, K.; Miyazawa, T.; Fujimoto, K. y Kaneda, T. (1987). Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64: 876-879.
- Soumanou, M.M.; Bornscheuer, U.T.; Menge, U. y Schmid, R.D. (1997). Synthesis of structured triglycerides from Peanut oil with immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 427-433.

- Soumanou, M.M.; Bornscheuer, U.T. y Schmid, R.D. (1998a). Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 703-710.
- Soumanou, M.M.; Bornscheuer, U.T.; Schmid, U. y Schmid, R.D. (1998b). Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. *Fett/Lipid*, 100 (4-5): 156-160.
- Sprecher, H.; Luthria, D.L.; Mohammed, B.S. y Baykousheva, S.P. (1995). Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*, 36: 2471-2477.
- Sridhar, R. y Lakshminarayana, G. (1992). Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into groundnut oil by lipase-catalyzed ester interchange. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 1041-1042.
- Stark, M.B. y Holmberg, K. (1989). Covalent immobilization of lipase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 13: 339.
- Stevenson, D.E.; Stanley, R.A. y Furneaux, R.H. (1994). Near-quantitative production of fatty acid alkyl esters by lipase-catalyzed alcoholysis of fats and oils with adsorption of glycerol by silica gel. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 478-484.
- Su, K.; Shen, W.W. y Huang, S. (2001). Omega-3 fatty acids as a psychotherapeutic agent for a pregnant schizophrenic patient. *European Neuropsychopharmacology*, 11 (4): 295-299.
- Sugiura, M. (1984). Bacterial lipases. *Lipases. Eds. Borgstrom, B. y Brockman, H. L. Elsevier, Amsterdam*: 504-523.
- Swern, D. (1964). Technique of separation. Urea complexes. "Fatty acids. Their Chemistry, Properties, Production and Uses". *Second edition, Ed. K. S. Markley, Part 3, Interscience Publishers, New York, XX*: 2309-2358.
- Tanaka, Y.; Funada, T.; Hirano, J. y Hashizume, R. (1993). Triglyceride specificity of *Candida cylindracea* lipase: effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 1031-1034.
- Tanaka, Y.; Hirano, J. y Funada, T. (1992). Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 1210-1214.
-

- Tanaka, Y.; Hirano, J. y Funada, T. (1994). Synthesis of docosahexaenoic acid-rich triglyceride with immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 331-334.
- Tanigaki, M.; Sakata, M. y Wada, H. (1993). Hydrolysis of Soybean oil by lipase with a bioreactor having two different membranes. *J. of Fermentation and Bioengineering*, 75: 53-57.
- Teitelbaum, J.E. y Walker, W.A. (2001). Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 12 (1): 21-32.
- Teramoto, M.; Matsuyama, H.; Ohnishi, N.; Uwagawa, S. y Nakai, K. (1994). Extraction of ethyl and methyl esters of polyunsaturated fatty acids with aqueous silver nitrate solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33: 341-345.
- Torres, C.F.; Barrios, E. y Hill C.G. (2002a). Lipase-Catalyzed Acidolysis of Menhaden Oil with CLA: Optimization by Factorial Design. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79(5): 457-466.
- Torres, C.F.; Munir, F.; Lessard, L.P. y Hill C.G. (2002b). Lipase-Mediated Acidolysis of Tristearin with CLA in Packed-Bed Reactor: A Kinetic Study. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79(7): 655-661.
- Torres, C.F.; Moeljadi, M. y Hill C.G. (2003). Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Fish Oils: Multi-response Kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(3): 275-281.
- Traitler, H.; Wille, H. J. y Studer, A. (1988). Fractionation of blackcurrant seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65 (5): 755-760.
- Tsai, S-W.; Wei, H-J. y Chiang, Ch-L. (1993). Action of lipolytical enzymes in biphasic organic-aqueous systems: dynamics of the irreversible Michaelis-Menten reaction. *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 603-611.
- Tsujisaka, Y.; Okumura, S. y Iwai, M. (1977). Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, 489: 415-422.
- Vacek, M.; Zarevúcka, M.; Wimmer, Z.; Stransky, K.; Koutek, B.; Mackova, M. y Demnerova, K. (2000). Lipase-Mediated Hydrolysis of Blackcurrant Oil. *Enzyme and Microbial Technol.*, 27: 531-536.

- Valivety, R.H.; Johnston, G.A.; Suckling, C.J. y Halling, P.J. (1991). Solvent effects on biocatalysis in organic systems: equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 1137-1143.
- Veloso, V.; Reis, A.; Gouveia, L.; Fernandes, H.L.; Empis, J.A. y Novais, J.M. (1991). Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technol.*, 38: 115-119.
- Verger, R. (1984). Pancreatic lipase. *Lipases*. Eds. Borgstrom, B. y Brockman, H. L. Elsevier, Amsterdam: 83-150.
- Villeneuve, P.; Pina, M.; Montet, D. y Graille, J. (1995). Determination of lipase specificities through the use of chiral triglycerides and their racemics. *Chem. Phys. Lipids*, 76: 109-113.
- Villeneuve, P. y Foglia, T.A. (1997). Lipase specificities: potential application in lipid bioconversions. *INFORM (Biotechnology)*, 8: 640-650.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J. y Haas, M.J. (2000). Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9 (4-6): 113-148.
- Voet, D. y Voet, J.G. (1990). "Bioquímica". Ediciones Omega (1992). Traducción de Bozal Fess, J.; Cuchillo Foix, C.M. y Farrés I Vicent, J.; *Metabolismo de los Lípidos*, 23: 662-724.
- Wainwright, P. (2000). Nutrition and behaviour: the role of n-3 fatty acids in cognitive function. *Br. J. Nutr.*, 83: 337-339.
- Wanasundara U.N. y Shahidi F. (1998a) Lipase-Assisted Concentration of n-3 PUFAs in Acylglycerols from Marine Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 75 (8): 945-951.
- Wanasundara U.N. y Shahidi F. (1998b) Concentration of w-3 PUFAs of Marine Oils Using *Candida cylindracea* Lipase: Optimization of Reactions Conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 75 (12): 1767-1774.
- Watkins, B.A.; Li, Y. y Seifert, M.F. (2000). Dietary omega-3 fatty acids and bone health. *Current Organic Chemistry*, 4 (11): 1125-1144.
- Weber, P. y Raederstorff, D. (2000). Triglyceride-lowering effect of omega-3 LC-polyunsaturated fatty acids: a review. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 10 (1): 28-37.
-

- Wigmore, S.J.; Barber, M.D.; Ross, J.A.; Tisdale, M.J. y Fearon, K.C. (2000). Effect of oral eicosapentaenoic acid on weight loss in patients with pancreatic cancer. *Nutrition and Cancer*, 36 (2): 177-184.
- Willis, W.M.; Lencki, R.W. y Marangoni A.G. (1998). Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8): 639-674.
- Wu, X.Y.; Jääskeläinen, S. y Linko, Y.Y. (1996) An Investigation of Crude Lipases for Hydrolysis, Esterification and Transesterification. *Enzyme and Microbial Technol.*, 19: 226-231
- Yamagouchi, K.; Murakami, M.; Nakano, H.; Konusu, S.; Kokura, K. Yamamoto, H.; Kosaka, M. y Hata, K. (1986). Supercritical carbon dioxide extraction of oils from antarctic krill. *J. Org. Chem.*, 34: 904-907.
- Yamane, T.; Tomomasa, S.; Sahashi, Y.; Vikersveen, L. y Hoshino, T. (1992). Production of n-3 PUFA-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis without solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69: 1104-1107.
- Yamane, T.; Suzuki, T. y Hoshino, T. (1993). Increasing n-3 polyunsaturated fatty acid content of fish oil by temperature control of lipase-catalyzed acidolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70: 1285-1287.
- Yan, Y.; Bornscheuer, U.T. y Schmid, R.D. (2002). Efficient water removal in lipase-catalyzed esterifications using a low-boiling-point azeotrope. *Biotechnol. Bioeng.*, 78: 31-34.
- Yokozeiki, K.; Yamanaka, S.; Takinami, K.; Hirose, Y.; Tanaka, A.; Sonomoto, K. y Fukui, S. (1981). Application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. European. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 1-5.
- Yong, Y.P. y Al-Duri, B. (1996). Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 65: 239-248.
- Yongmanitchai, W. y Ward, O.P. (1989). Omega-3 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.*, 8: 117-125.
- Yongmanitchai, W. y Ward, O.P. (1991a). Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry*, 30: 2963-2967.
-

- Yongmanitchai, W. y Ward, O.P. (1993). Molecular species of triacylglycerols from the freshwater diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 32: 1137-1139.
- Yoshida, H. y Alexander, J.C. (1982). Fatty acid distribution in the triacylglycerols isolated from thermally oxidized oils. *Nutr. Rep. International*, 26: 655-665.
- Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1984). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 3192-3196.
- Zaks, A. y Klibanov, A. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Biochemistry*, 82: 3192-3196.
- Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988a). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *The J. of Biol. Chem.*, 263: 3194-3201.
- Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988b). The effect of water on enzyme action in organic media. *The J. of Biol. Chem.*, 263: 8017-8021.
- Zhukov, A. V. y Vereshchagin, A. G. (1981). Current techniques of extraction, purification and preliminary fractionation of polar lipids of natural origin. *Advances in Lipids Research*, 18: 247-282.