

**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**

**Facultad de Ciencias Experimentales**

**Departamento de Ingeniería Química**



**UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA**



# **Obtención de lípidos estructurados a partir de microalgas**

**Grado en Biotecnología**

**Curso 2020-2021**

**Autor:**

Héctor Salvador Cairós Regalado

**Directores:**

Alfonso Robles Medina

María José Jiménez Callejón

## ÍNDICE

Resumen .....	A
Abstract.....	B
1. Objetivo.....	1
2. Introducción.....	1
3. Justificación.....	2
3.1. Lípidos estructurados como productos nutracéuticos .....	2
3.2. Lípidos estructurados como materia prima en formulaciones de alimentos infantiles .....	5
3.3. Lípidos estructurados como sustitutos de grasas convencionales .....	6
4. Fuentes de obtención de aceites útiles en la producción de lípidos estructurados .....	8
4.1. Fuentes tradicionales.....	8
4.2. Las microalgas como fuente prometedora de lípidos .....	9
4.2.1. Perfil lipídico de las microalgas .....	11
5. Pretratamiento de la biomasa microalgal .....	15
6. Extracción de los lípidos de las microalgas .....	19
6.1. Extracción con disolventes orgánicos .....	19
6.2. Extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	21
6.3. Método de extracción con láser y adsorbente .....	22
7. Purificación de compuestos lipídicos útiles en la síntesis de lípidos estructurados .....	23
7.1. Purificación mediante sistemas bifásicos de etanol-hexano .....	24
7.2. Purificación mediante destilación molecular .....	25
7.3. Purificación mediante cristalización a baja temperatura .....	26
8. Síntesis de lípidos estructurados.....	27
8.1. Lipasas utilizadas en la síntesis de lípidos estructurados.....	28
8.2. Síntesis enzimática de lípidos estructurados en una única etapa .....	30
8.2.1. Síntesis de lípidos estructurados mediante acidólisis .....	31
8.2.2. Síntesis de lípidos estructurados mediante alcoholisis.....	33
8.2.3. Síntesis de lípidos estructurados por interesterificación .....	35
8.3. Síntesis enzimática de lípidos estructurados en dos etapas .....	36
9. Bibliografía .....	40

## Resumen

Los lípidos estructurados se definen generalmente como triglicéridos que han sido modificados mediante reacciones químicas o enzimáticas para cambiar su composición en ácidos grasos y la distribución posicional de éstos en la molécula de glicerol. Son triglicéridos diseñados para tener propiedades funcionales específicas, con aplicaciones alimentarias, médicas y nutricionales. Ejemplos de lípidos estructurados son los diseñados como sustitutos de la manteca de cacao, aceites y grasas bajas en calorías, triglicéridos sustitutos de la fracción lipídica de la leche humana o aceites enriquecidos con ácidos grasos específicos.

Las microalgas son una fuente valiosa y rica de aceites que pueden modificarse para sintetizar triglicéridos estructurados para las industrias alimentaria y nutracéutica. Además, los aceites de microalgas son una fuente emergente de lípidos que presentan múltiples ventajas sobre otras, entre ellas una mayor productividad de lípidos en términos de g/L/día, que no se ve afectada por cambios estacionales, la necesidad de poca mano de obra, su fácil escalado y la presencia de determinados ácidos grasos esenciales, como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3. La conversión del aceite de microalgas en triglicéridos estructurados implica procesos como la rotura celular, la extracción y purificación de los lípidos y la síntesis enzimática de los lípidos estructurados. Los métodos de rotura celular se basan en pretratamientos físicos, biológicos y químicos, como la extrusión, la homogeneización de alta presión, la hidrólisis enzimática, el pretratamiento en campo eléctrico pulsado o los pretratamientos ácidos y alcalinos. Uno de los métodos más comunes y efectivos para la extracción de lípidos de la biomasa microalgal es mediante disolventes orgánicos, aunque hay otros métodos más respetuosos con el medio ambiente, como la extracción mediante biodisolventes, con CO<sub>2</sub> supercrítico o la extracción con láser y adsorbentes. Posteriormente, es necesario purificar las especies lipídicas útiles para la síntesis de lípidos estructurados. Algunas de las técnicas más utilizadas son la purificación por cristalización con disolventes a baja temperatura, extracción en sistemas bifásicos etanol-hexano y la destilación molecular.

En los últimos años, la utilización de lipasas en la producción de triglicéridos estructurados ha aumentado considerablemente, principalmente porque las reacciones catalizadas por lipasas tienen importantes ventajas en comparación con los métodos químicos, como son la especificidad de las lipasas hacia las distintas posiciones de los ácidos grasos en la molécula del triglicérido, las suaves condiciones de reacción, la fácil separación de los productos y el carácter "verde" (poco contaminante) del proceso. Este tipo de lípidos puede sintetizarse por diferentes vías, según el tipo de triglicérido y la naturaleza del sustrato. En la síntesis de triglicéridos estructurados a partir de aceites y grasas naturales normalmente se utilizan las reacciones de interesterificación, acidólisis, esterificación y alcoholisis enzimáticas, así como combinaciones de estas reacciones en un proceso enzimático de dos etapas.

## Abstract

Structured lipids are generally defined as triacylglycerols that have been modified to change their fatty acid composition and their positional distribution in glycerol molecules by chemical or enzymatic reactions. They are specifically designed for obtaining triacylglycerols with functional properties for food, medical and nutritional applications, like cocoa butter substitutes, low calorie fats and oils, human milk fat substitutes or oils enriched with specific fatty acids.

Microalgae are a valuable and rich source of oil that can be upgraded to synthesize structured triacylglycerols for the food and nutraceutical industries. Moreover, microalgae oils are an emerging source of lipids that present many advantages over others, including higher lipid productivity in terms of g/L/day, being unaffected by any seasonal climate changes, low labour intensiveness, and easily scale-up. The conversion of microalgal oil into structured lipids involves processes like cell disruption, lipid extraction and purification, and enzymatic synthesis of structured lipids. Cell fragmentation methods are based on physical, biological, and chemical pre-treatments such as extrusion, high-pressure homogenization, enzymatic hydrolysis, pulsed electric field pre-treatment or acid and alkaline pre-treatments. One of the most common and effective method for lipid extraction from microalgal biomass is through organic solvents, although there are also more eco-friendly methods such as extraction using bio-based solvents, supercritical CO<sub>2</sub> or extraction using laser and adsorbents. Subsequently, it is necessary to purify useful lipidic species for structured lipids synthesis. Some of the most applied techniques are purification by low-temperature solvent crystallization, ethanol-hexane biphasic systems and molecular distillation.

In recent years, the use of lipases in the production of structured triglycerides has grown significantly mainly because lipase-catalyzed reactions have some advantages compared to chemical methods, such as position specific reactions, mild reaction conditions, easy product separation and “green” character of the process. This type of lipids can be synthesized by different routes, depending on the kind of triacylglycerol and the nature of the substrate. In the synthesis of structured triacylglycerol from natural oils and fats, typically, enzymatic interesterification, acidolysis, esterification and alcoholysis are used, as well as combinations of these reactions in two-step enzymatic process.

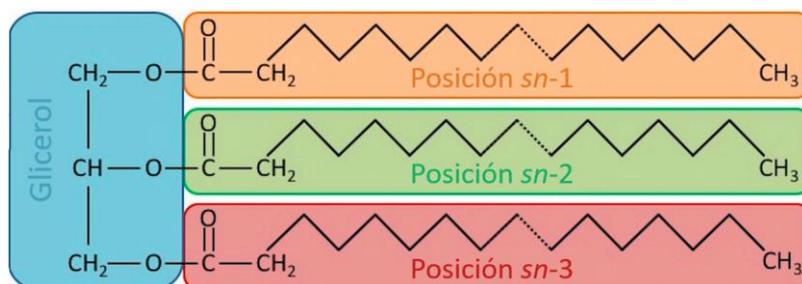
## 1. Objetivo

Este trabajo muestra la información recogida mediante una búsqueda bibliográfica de las distintas metodologías biotecnológicas que se han llevado a cabo en las últimas décadas para producir lípidos estructurados a partir de la fracción lipídica de las microalgas. Además, se han procurado recoger las últimas novedades en las técnicas de pretratamiento de la biomasa microalgal, así como de la extracción y purificación de los lípidos microalgales utilizadas en la síntesis de lípidos estructurados.

## 2. Introducción

La denominación "lípidos estructurados" hace referencia a acilglicéridos (generalmente triglicéridos) con una composición y una distribución de ácidos grasos definidas (Pande y Akoh, 2013). Son "grasas hechas a medida", formuladas para que realicen alguna función nutricional, organoléptica o tecnológica específica (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Estos lípidos estructurados no se encuentran en la naturaleza, por lo que hay que producirlos sintéticamente mediante métodos enzimáticos o químicos (Liu *et al.*, 2015).

La mayor parte de los lípidos que componen nuestra alimentación son triglicéridos, ya que suponen más del 90% del total de lípidos que ingerimos en la dieta (Ferreira y Tonetto, 2017). Por esta razón, los esfuerzos tecnológicos orientados al desarrollo de nuevos tipos de lípidos están centrados, principalmente, en la elaboración de nuevos tipos de triglicéridos (Hita, 2007), que son el producto de la esterificación de una molécula de glicerina con tres ácidos grasos (Valenzuela *et al.*, 2002; Figura 1). Según su composición en ácidos grasos y su distribución en la molécula de glicerol, los triglicéridos estructurados se clasifican en varios tipos: AAA, ABA, AAB y ABC; siendo A, B y C ácidos grasos diferentes (Liu *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura molecular de un triglicérido. Numeración estereoespecífica (*sn*) (tomada de Alfieri *et al.*, 2018).

El mejor conocimiento del funcionamiento de las lipasas digestivas, de la estereoquímica de los triglicéridos de la dieta y de los mecanismos de absorción y transporte de los ácidos grasos en el organismo, han permitido conocer que la posición y las características bioquímicas de los ácidos grasos que forman los acilglicéridos van a condicionar su absorción en el organismo (Hita, 2007). Esto ha incentivado el desarrollo de nuevas tecnologías encaminadas a la estructuración de lípidos para su utilización en nutrición humana. La estructuración de estos triglicéridos implica decidir los ácidos

grasos que se incorporan a la molécula y la posición de estos en los triglicéridos que se deseen estructurar (Pande y Akoh, 2013). Las materias primas usadas en la síntesis de este tipo de lípidos suelen ser aceites naturales de origen animal y vegetal (Speranza y Macedo, 2012), aunque este trabajo se centrará en su obtención a partir de aceites de microalgas. Para diseñar los lípidos o triglicéridos estructurados se aprovecha la alta especificidad que presentan determinadas lipasas y su capacidad para catalizar las reacciones de acidólisis, esterificación, alcoholisis e interesterificación que permiten la estructuración de estos lípidos (Ferreira y Tonetto, 2017).

### **3. Justificación**

Los lípidos son de gran importancia en la dieta porque son los nutrientes que tienen mayor contenido energético por unidad de masa (Ramírez, 2005). Por otro lado, constituyen el vehículo de transporte de vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K) y organolépticamente contribuyen a la palatabilidad y sabor de los alimentos, además de ser los componentes más importantes que contribuyen a la saciedad que producen los alimentos tras su ingestión (Valenzuela *et al.*, 2002). Desde un punto de vista cuantitativo, los principales componentes de los lípidos que obtenemos a través de la dieta son los triglicéridos, que suponen entre un 93% y un 95% de los lípidos que ingerimos (Ferreira y Tonetto, 2017). Además, este tipo de lípidos son de gran importancia porque son nuestra principal fuente de ácidos grasos (Wu *et al.*, 2017).

Los ácidos grasos pueden suministrarse con fines médicos y dietéticos en forma de ácidos grasos libres, como ésteres etílicos o como triglicéridos (Ikeda *et al.*, 1995). La industria farmacéutica y alimentaria priorizan el suministro de los ácidos grasos en forma de triglicéridos, ya que éstos constituyen la forma más habitual en la que se ingieren los ácidos grasos a través de la dieta (Hita, 2007; Ferreira y Tonetto, 2017). Además, se ha demostrado que la eficiencia de su absorción es mayor cuando se suministran formando parte de un triglicérido; por esta razón, la industria biotecnológica sintetiza triglicéridos con unos ácidos grasos determinados según las necesidades médicas o dietéticas de los consumidores finales (Hita, 2007).

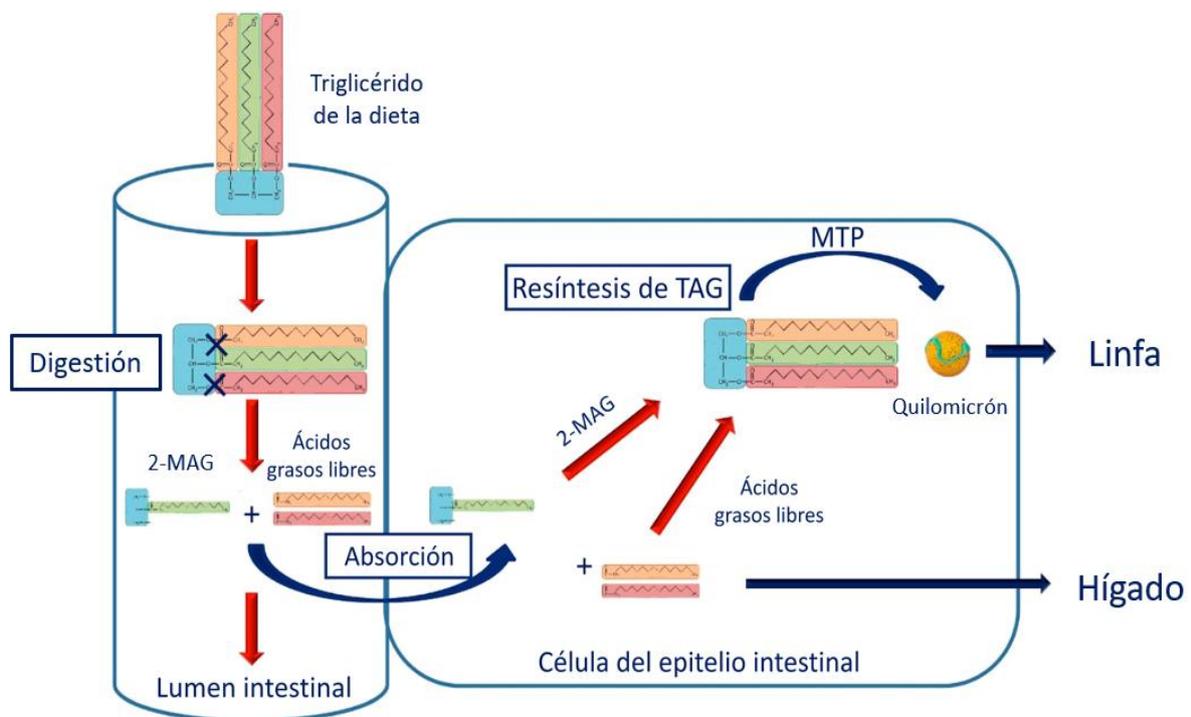
La modificación de la composición, estructura y propiedades de los triglicéridos tiene como principales objetivos: reducir el consumo de grasas trans y ácidos grasos saturados en la población; aumentar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta; reducir el valor calórico de aceites y grasas y producir aceites y grasas que promuevan la salud y el bienestar, más allá de sus propiedades nutritivas (Adamczak, 2004; Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Además de su uso para mejorar la calidad nutricional de aceites y grasas y su utilización como productos nutracéuticos, estos lípidos también tienen como objetivo la producción de sustitutos de grasas y aceites con propiedades fisicoquímicas y nutricionales útiles en la industria alimentaria (Adamczak, 2004).

#### **3.1. Lípidos estructurados como productos nutracéuticos**

Algunos lípidos estructurados se consideran sustancias bioactivas, ya que son compuestos que tienen un impacto favorable en la salud, afectando de manera positiva al bienestar del consumidor,

reduciendo el riesgo de enfermedad o incluso como tratamiento para determinadas enfermedades (Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Bernhoft, 2010).

Entre los lípidos estructurados con propiedades nutracéuticas, los de mayor interés son los triglicéridos estructurados con una distribución MLM (Korma *et al.*, 2018; Tabla 1). Este tipo de lípido estructurado es un triglicérido que contiene ácidos grasos de cadena media (6-12 carbonos) situados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula y un ácido graso bioactivo o esencial de cadena larga en posición *sn*-2 (He *et al.*, 2018). Los ácidos grasos esenciales o funcionales se absorben mejor cuando ocupan la posición *sn*-2 del triglicérido porque la lipasa pancreática es *sn*-1,3 específica, por lo que, al hidrolizar los triglicéridos, libera los ácidos grasos que se encuentran en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula y el ácido graso en posición *sn*-2 se queda formando un 2-monoacilglicerol (2-MAG) (Mu y Porsgaard, 2005). De esta forma, los ácidos grasos de cadena media liberados (que ocupaban las posiciones *sn*-1 y *sn*-3) son absorbidos en el intestino y transportados directamente al hígado a través de la vena porta, donde son metabolizados rápidamente por los hepatocitos para generar energía (He *et al.*, 2018; Korma *et al.*, 2018; Figura 2). Sin embargo, los ácidos grasos funcionales de cadena larga que ocupaban la posición 2 del triglicérido, son absorbidos como 2-MAG, lo que permite su mejor absorción a través de la pared intestinal (Hita, 2007). Estos monoglicéridos emulsionan y forman micelas que son absorbidas por los enterocitos de la pared intestinal, para posteriormente ser esterificados con otros ácidos grasos, formando nuevos triglicéridos que pasarán al sistema linfático como quilomicrones, para acabar en el sistema circulatorio (Ferreira y Tonetto, 2017; Figura 2).



**Figura 2.** Absorción de los ácidos grasos de los triglicéridos según su posición en la molécula. Triglicérido (TAG); 2-monoacilglicerol (2-MAG); proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (MTP) (tomada de Alfieri *et al.*, 2018).

Entre los múltiples usos de los triglicéridos MLM, destaca su utilización en la fabricación de emulsiones lipídicas usadas en pacientes alimentados por vía intravenosa y a través de sondas (Wu *et al.*, 2017). Por otro lado, estos triglicéridos estructurados permiten aportar ácidos grasos esenciales y energía a pacientes con insuficiencia pancreática y otros problemas de absorción de lípidos, ya que estos lípidos son absorbidos fácilmente y proporcionan energía metabólica de forma rápida (Gupta *et al.*, 2013). Además, este tipo de lípidos se absorben rápidamente, por lo que es menos probable que se acumulen en el tejido adiposo que los triglicéridos que se encuentran habitualmente en la dieta (ricos en ácidos grasos de cadena larga), siendo útiles en el tratamiento de la malabsorción de lípidos (Lindgreen *et al.*, 2001).

Entre este tipo de lípidos, tienen gran interés los triglicéridos estructurados que contienen PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados), ácidos grasos omega-3 u omega-6 en la posición intermedia de la molécula (Ferreira y Tonetto, 2017). Varias investigaciones médicas y dietéticas recientes con este tipo de lípidos estructurados demuestran el gran potencial y el futuro prometedor de estos productos (Druschky y Pscheidl, 2000). Prueba de ello, es que se ha demostrado que estos triglicéridos estructurados fortalecen el sistema inmune, promueven la eliminación de lípidos del torrente sanguíneo y ayudan a controlar la hipertensión y al correcto funcionamiento y desarrollo del cerebro, la retina, los riñones y el hígado (Rodríguez *et al.*, 2012; Adamczak, 2004). También se ha demostrado que los PUFAs suministrados de forma estructurada son útiles para tratar pacientes con pancreatitis, pacientes posquirúrgicos y enfermos críticos, ya que estos PUFAs se absorben mejor y dan lugar a menos complicaciones gastrointestinales e infecciones (Hita, 2007; Adamczak, 2004; Ferreira y Tonetto, 2017).

La finalidad de estos lípidos estructurados es mejorar la absorción de ácidos grasos omega-3, omega-6 y otros ácidos grasos poliinsaturados de importancia nutricional, como triglicéridos que contienen DHA (ácido docosahexaenoico), ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido oleico, EPA (ácido eicosapentaenoico) y ácido araquidónico (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). El suministro de estos lípidos estructurados permite solventar la deficiencia de este tipo de ácidos grasos en la dieta actual a través de suplementos alimenticios y aceites sintetizados a partir de estos triglicéridos (Speranza y Macedo, 2012). La importancia de estos lípidos radica en que algunos ácidos grasos poliinsaturados no pueden ser sintetizados por nuestro organismo, por lo que estos ácidos grasos se consideran esenciales y deben incluirse en la dieta (Abed *et al.*, 2016). Estos ácidos se suelen dividir en familias, aunque los más importantes pertenecen a las familias de los omega-3 y omega-6 (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).

Los ácidos grasos omega-3 y omega-6 tienen dos funciones principales: una como componentes estructurales y otra como sustrato de las vías metabólicas en las que estos ácidos grasos se transforman en eicosanoides (Hita, 2007). Dentro de la familia omega-6 los más importantes son el ácido linoleico, el ácido  $\gamma$ -linolénico y el ácido araquidónico (Ramírez, 2005). Estos ácidos grasos son los precursores de los eicosanoides, unas biomoléculas que regulan muchas reacciones inflamatorias e hipersensibles. Además, la deficiencia de ácidos grasos omega-6 produce retraso en el crecimiento, engrosamiento de la piel, disminución de la pigmentación de la piel, trastornos de la contracción muscular y una mayor susceptibilidad a infecciones (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017). Dentro de la

familia de los omega-3 podemos citar como los más importantes el ácido  $\alpha$ -linolénico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Ramírez, 2005). Estos ácidos grasos han recibido gran atención debido a sus efectos fisiológicos, como su actividad antioxidante y su capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas y de prevenir enfermedades neurológicas y cardiovasculares (He *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2020).

### 3.2. Lípidos estructurados como materia prima en formulaciones de alimentos infantiles

Los triglicéridos representan el 98% de la grasa en la leche humana y suministran aproximadamente el 50% de la energía necesaria para el desarrollo y el crecimiento del recién nacido (He *et al.*, 2019; Ferreira y Tonetto, 2017). Más del 68% (en peso) de estos triglicéridos contienen ácido palmítico en la posición *sn*-2 de la molécula y cerca del 62% de los ácidos grasos esterificados en posiciones extremas del acilglucérido son ácidos grasos insaturados, mientras que más del 30% son ácidos grasos saturados (Liu *et al.*, 2015). Entre ellos, los triglicéridos con estructura OPO (oleico-palmítico-oleico) son los mayoritarios en la leche materna humana, por lo que los lípidos con esta estructura son los de mayor interés para su uso en la fabricación de fórmulas infantiles (Koletzko *et al.*, 2001; Tabla 1). Este tipo de estructuración tiene un efecto crucial en la digestibilidad y la absorción intestinal de la leche en los bebés (Ferreira-Dias *et al.*, 2013).

Los aceites vegetales y la grasa de la leche del ganado usados tradicionalmente como sustitutos de la grasa de la leche materna humana no poseen triglicéridos con esta estructura en cantidades suficientes, por lo que el uso de estos lípidos como sustituto de las grasas de la leche materna humana puede causar una absorción intestinal deficiente de grasas y calcio (Ferreira y Tonetto, 2017). Esto es debido a que se forman jabones de calcio insolubles en los intestinos a partir de los ácidos grasos saturados de cadena larga liberados por acción de la lipasa pancreática *sn*-1,3 específica (Sahin *et al.*, 2005). Por ello, los triglicéridos con este tipo de estructuración (OPO) resultan de interés para la fabricación de alimentos infantiles, ya que se podrían formular mezclas de grasas más cercanas a la de la leche humana natural (Liu *et al.*, 2015). Estos triglicéridos son más digeribles que los que presentan otros tipos de estructuras, facilitan la absorción de calcio, mejoran la absorción de las grasas y parecen tener influencia en el metabolismo de las lipoproteínas de los niños recién nacidos (Da Silva *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2013).

Es muy importante suministrar las grasas que necesitan los bebés durante su crecimiento a través de estos formulados, ya que, por diversas razones, son el único o el más importante alimento que tienen muchos bebés en sus primeros meses de vida (He *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015). Además, su importancia también radica en que la calidad y cantidad de la grasa ingerida durante la infancia está relacionada con el desarrollo de enfermedades prevalentes en la etapa adulta, puesto que el contenido de los lípidos ingeridos durante esta etapa determinará la composición de los lípidos corporales durante su desarrollo (Lama y Moráis, 2005). Por otro lado, estas formulaciones con lípidos estructurados tienen efectos más beneficiosos para la salud infantil que las fórmulas infantiles tradicionales, dado que permiten una mayor absorción del ácido palmítico (fuente importante de energía) y una dureza de las heces y una excreción fecal del calcio significativamente menores.

Además, permiten un desarrollo de la matriz ósea similar a la de los lactantes alimentados con leche materna, tienen un efecto positivo sobre el microbioma intestinal comparable al de los lactantes alimentados con leche humana y mejoran la comodidad del bebé en términos de menor tiempo de llanto y mayor tiempo de sueño (Ferreira y Tonetto, 2017).

### **3.3. Lípidos estructurados como sustitutos de grasas convencionales**

Muchos lípidos estructurados pueden aportar características nutricionales importantes y propiedades fisicoquímicas a los alimentos, por lo que también tienen un gran potencial para su utilización en la industria alimentaria (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Algunos de estos acilglicéridos estructurados se adicionan a productos alimenticios como sustitutos de las grasas que se suelen usar habitualmente en la industria (Abed *et al.*, 2016). De esta manera se pueden producir alimentos más saludables y de mayor calidad, ajustándose mejor a las necesidades actuales de los consumidores (Speranza y Macedo, 2012). Entre las múltiples utilidades de estos lípidos en la industria alimentaria, destacan los utilizados en la producción de alimentos libres de grasas trans (Ferreira y Tonetto, 2017). Para esta finalidad se han sintetizado margarinas libres de grasas trans a partir de triglicéridos estructurados ricos en ácido esteárico, palmítico y ácidos grasos de cadena media, como los ácidos láurico o caprílico (Abed *et al.*, 2016). Estas margarinas fabricadas con lípidos estructurados se pueden usar para cocinar u hornear y también como grasa sólida para fabricar productos para untar. De esta manera podrían usarse como una alternativa a las grasas parcialmente hidrogenadas para formular alimentos libres de grasas trans en la industria alimentaria (Pande y Akoh, 2013).

Otros lípidos estructurados de interés en la industria alimentaria son los lípidos estructurados con bajo contenido calórico, que permiten satisfacer la creciente necesidad de consumir alimentos más saludables (Cao *et al.*, 2013). De esta forma, este tipo de lípidos se ajustarían a las exigencias de unos consumidores cada vez más preocupados por el exceso de peso y sus consecuencias para la salud, y que han llevado a la industria alimentaria a reducir el contenido graso y calórico de los alimentos (Auerbach *et al.*, 2001). Este tipo de lípidos también ayudan a prevenir el sobrepeso, un problema de salud que actualmente afecta a más de 1.900 millones de adultos, mayores de 18 años, en todo el mundo (Ferreira y Tonetto, 2017). En este aspecto, la biotecnología supone una opción prometedora para reducir este grave problema a partir de la reducción del valor calórico de las grasas y aceites comerciales a través de la síntesis de lípidos estructurados (Speranza y Macedo, 2012).

Los acilglicéridos más comunes de este tipo de lípidos estructurados son triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta o media en las posiciones externas de la molécula y un ácido graso de cadena larga en la posición *sn*-2 (tipo CLC y MLM) y los formados por ácidos grasos de cadena media en las tres posiciones de la molécula (tipo MMM) (Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Tabla 1). Este tipo de lípidos presentan un valor calórico aproximado de 5 kcal/g, mientras que grasas y aceites convencionales tienen un contenido calórico mayor a 9 kcal/g (Ferreira y Tonetto, 2017). El hecho de que presenten este contenido energético tan reducido se debe a las pocas calorías que presentan los ácidos grasos de cadena corta y media en comparación con los de cadena larga (Auerbach *et al.*, 2001). Además, los ácidos grasos de cadena media y corta se metabolizan tan rápido como la glucosa, por lo que

tienen poca tendencia a acumularse en el cuerpo como grasa de almacenamiento (Osborn y Akoh, 2002). Otro tipo de lípidos estructurados con bajo contenido calórico son los triglicéridos con ácidos grasos saturados de cadena muy larga, como el ácido behénico (22: 0), en las posiciones *sn*-1,3 de la molécula (Speranza y Macedo, 2012). El bajo contenido calórico de estos lípidos se debe a la absorción gástrica reducida de este tipo de ácidos grasos, debido a que presentan una temperatura de fusión más alta que la temperatura corporal (Ferreira y Tonetto, 2017; Speranza y Macedo, 2012). Además, estos triglicéridos estructurados tienen una baja tendencia a la formación de emulsiones y a la solubilización micelar en el aparato digestivo, por lo que son resistentes a la hidrólisis que lleva a cabo la lipasa pancreática (Hashim y Babayan, 1978).

Otra utilización de determinados lípidos estructurados en la industria alimentaria es su empleo como sustituto de la manteca de cacao, un componente esencial en las formulaciones de chocolates y productos de confitería (Gupta *et al.*, 2013). Su función es la de aportar la textura y apariencia adecuada a multitud de cubiertas y rellenos de postres y dulces, helados, caramelos, chocolatinas y otros productos de confitería (Zam, 2015). Los sustitutos de esta grasa son de gran interés porque aportan las propiedades reológicas y sensoriales únicas de la manteca de cacao sin los altos costos que presenta la utilización de esta materia prima, ni las enormes fluctuaciones que experimenta la oferta de manteca de cacao natural (Abed *et al.*, 2016). Además, los lípidos estructurados usados para este fin mejoran los límites funcionales de la manteca de cacao, convirtiéndose en una alternativa mucho más práctica para su uso en la industria alimentaria. Esta mayor versatilidad se debe a que se obtienen productos más maleables y resistentes a las altas temperaturas, así como productos que presentan mayor estabilidad durante el almacenamiento, dotándolos de una vida útil más larga (Ferreira y Tonetto, 2017). Estos triglicéridos estructurados suelen estar formados por ácidos grasos saturados, como el ácido palmítico o el ácido esteárico, en las posiciones externas y un ácido graso monoinsaturado (normalmente ácido oleico) en la posición *sn*-2, ya que este tipo de triglicéridos suponen más del 75% de los lípidos que componen la manteca de cacao natural (Ferreira y Tonetto, 2017; Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Tabla 1).

**Tabla 1.** Usos potenciales de algunos lípidos estructurados, algunas marcas bajo las que se comercializan estos lípidos, tipos de lípidos estructurados que suelen componer los productos vendidos por estas marcas y método potencial de síntesis de estos lípidos estructurados. Ácido graso de cadena media (M); ácido graso de cadena larga (L); ácido graso de cadena corta (C); ácido oleico (O); ácido palmítico (P); ácido esteárico (S) (adaptada de Sproston *et al.*, 2017; Abed *et al.*, 2016; Zam, 2015).

Uso del lípido estructurado	Marcas comerciales	Tipo de lípido estructurado	Método potencial de síntesis
Fabricación de alimentos bajos en calorías	Benefat, Neobee, Olestra, Salatrim y Captex	Triglicéridos con estructura CLC, MMM y MLM	Interesterificación de triglicéridos de cadena larga con triglicéridos de cadena corta o media usando lipasas <i>sn</i> -1,3 específicas

Sustitutos de grasa de la leche materna humana	Betapol e InFat	Triglicéridos con estructura OPO y con ácidos grasos esenciales en posición <i>sn</i> -2	Interesterificación y acidólisis de triglicéridos ricos en ácidos oleico o ácidos grasos libres ricos en ácidos oleico con triglicéridos con ácido palmítico en posición <i>sn</i> -2 usando lipasas <i>sn</i> -1,3 específicas
Sustitutos de grasa de la manteca de cacao	Caprenin y Laurical	Triglicéridos con estructura POP, SOS y POS	Acidólisis de triglicéridos con ácido oleico en posición <i>sn</i> -2 y ácidos grasos libres ricos en ácido palmítico y esteárico usando lipasas <i>sn</i> -1,3 específicas
Uso como nutracéuticos	Structolipid e Impact	Triglicéridos con estructura MLM	Acidólisis de triglicéridos de cadena larga con ácidos grasos libres de cadena corta usando lipasas <i>sn</i> -1,3 específicas

#### 4. Fuentes de obtención de aceites útiles en la producción de lípidos estructurados

La síntesis de lípidos estructurados se realiza a partir de aceites y grasas de origen natural, los cuales proporcionan los acilglicéridos y ácidos grasos utilizados en las reacciones de síntesis (Ferreira y Tonetto, 2017). Estas fuentes tienen una composición específica de lípidos que permite seleccionarlas según el tipo de lípidos estructurados a sintetizar (Guo *et al.*, 2020; Ferreira y Tonetto, 2017). Entre las fuentes de aceite con interés para su uso en estos procesos destacan los cultivos oleaginosos convencionales y algunos peces marinos, aunque algunos microorganismos, como las microalgas, han generado gran interés en su utilización como una fuente alternativa (Guo *et al.*, 2020; Rodolfi *et al.*, 2009). El enorme interés que han ganado las microalgas en la actualidad se debe a que sus aceites tienen propiedades similares a las de los aceites de semillas de plantas y grasas animales, pero estos microorganismos los producen de una manera más eficiente, lo que los convierte en una fuente con un gran potencial (Chen *et al.*, 2018).

##### 4.1. Fuentes tradicionales

Las fuentes de lípidos usadas en la síntesis de triglicéridos estructurados han sido, tradicionalmente, aceites producidos a partir de cultivos oleaginosos, vísceras animales y aceites de pescado (Ramírez, 2005; Tabla 2).

**Tabla 2.** Algunas fuentes tradicionales de aceites ricos en determinados ácidos grasos (adaptada de Bart *et al.*, 2010; Ramírez, 2005; Xue *et al.*, 2020).

Ácido graso	Fuente tradicional
Ácido araquidónico	Aceite de arenque, testículos de bovino e hígados de vaca y cerdo
Ácido docosahexaenoico	Aceites de atún, salmonete y arenque, y sesos de cerdo y de buey
Ácido eicosapentaenoico	Hígados de buey, vaca y bacalao, y aceites de atún y sardina
Ácido esteárico	Aceite de mahua, sebo de vaca y manteca de cerdo
Ácido láurico	Aceite de coco y aceite de palma

Ácido linoleico	Aceites de maíz, algodón, soja, girasol y cártamo
Ácido oleico	Aceites de colza, oliva, cacahuete y palma
Ácido palmítico	Oleína y estearina de palma
Ácido $\alpha$ -linolénico	Aceite de linaza y aceite de tung

Sin embargo, estas fuentes tradicionales son insuficientes para satisfacer la producción de lípidos estructurados debido al aumento de la demanda de estos productos en el mercado (He *et al.*, 2019). Además, estas fuentes de aceite se están enfrentando al gran desafío que supone el crecimiento de la población y el desarrollo de la industria del biodiesel (Xue *et al.*, 2020). Por otra parte, estas fuentes pueden presentar otros problemas adicionales como la variación estacional y climática de la composición del aceite, lo que puede causar inconsistencias en la calidad y el suministro; la baja productividad de las fuentes tradicionales y que los procesos de obtención suelen ser complejos y caros (Hita, 2007). Debido a estos inconvenientes son necesarias fuentes alternativas de lípidos que puedan competir en costes con las fuentes tradicionales (Kaur *et al.*, 2012).

#### 4.2. Las microalgas como fuente prometedora de lípidos

Entre las fuentes de lípidos alternativas para la producción de lípidos estructurados destacan los aceites obtenidos a partir de microalgas (Huerlimann *et al.*, 2010). Estas son de gran interés por su potencial para sintetizar y acumular aceites naturales en grandes cantidades, por lo que actualmente son la fuente lipídica más prometedora para la producción de lípidos estructurados (Gao *et al.*, 2013). Asimismo, las microalgas suponen una fuente viable y sostenible de aceite para satisfacer la creciente demanda de lípidos estructurados (Castejón y Señoráns, 2020). Esto es debido a su alta velocidad de crecimiento, lo que supone un factor importante para la obtención de productos a nivel industrial (Kaur *et al.*, 2012).

Entre las ventajas de utilizar las microalgas como fuentes de lípidos destaca que se pueden cultivar en agua de mar o salobre en tierras no cultivables, de forma que no compiten con la agricultura, y que la biomasa residual producida en la extracción de sus aceites puede usarse como alimento, fertilizante, o fermentarse para producir etanol o metano (Xue *et al.*, 2020; Rodolfi *et al.*, 2009). Además, se pueden cultivar en fotorreactores a gran escala y tienen una tasa de producción de biomasa mucho mayor que la de la biomasa terrestre, por lo que estos microorganismos tienen un gran potencial para su uso como materia prima (Chen *et al.*, 2018). Por otra parte, las microalgas cultivadas en condiciones controladas dan lugar a una biomasa de composición más homogénea, que unido a que tienen una composición en ácidos grasos más sencilla, permiten simplificar los procesos de extracción y purificación de lípidos que se tienen que llevar a cabo durante el proceso de producción de lípidos estructurados (Ramírez, 2005). Asimismo, a través del cultivo controlado de microalgas se puede tener una producción estable durante todo el año (Huerlimann *et al.*, 2010).

Actualmente, el uso de microalgas para la producción de alimentos se limita a unas pocas especies debido a la existencia de estrictos controles de seguridad alimentaria en los países desarrollados

(Castejón y Señoráns, 2020). Entre ellas se encuentran las microalgas *Cryptocodinium cohnii*, *Chlorella sp.*, *Diacronema lutheri*, *Haematococcus sp.*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis sp.*, *Odontella aurita*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium cruentum* y *Schizochytrium sp.* (He *et al.*, 2019). Estas especies de microalgas son algunas de las pocas que han sido admitidas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos y el Reglamento Europeo (EU) 2015/2283 relativo a nuevos alimentos y sus usos en la industria alimentaria (Bernaerts *et al.*, 2018).

La obtención de lípidos estructurados a partir de microalgas supone una serie de ventajas con respecto al uso convencional de aceites de pescado (Ryckebosch *et al.*, 2014). Una de las principales ventajas es que los lípidos de las microalgas se encuentran libres del olor característico del pescado y presentan un menor contenido en sodio, colesterol y productos tóxicos, como metales pesados o pesticidas, que tienden a acumularse en las grasas de pescado (Ramírez, 2005). Además, las microalgas tienen una tasa de síntesis de triglicéridos mucho mayor que los animales, lo que las convierte en una mejor alternativa para su uso en producción de triglicéridos estructurados (He *et al.*, 2019). Los aceites de pescado se utilizan en la síntesis de lípidos estructurados como fuentes naturales de ácidos grasos omega-3, aunque éstos los obtienen a través del consumo de microalgas marinas (Castejón y Señoráns, 2020). Esto indica que las microalgas son los principales productores de ácidos grasos omega-3, pudiéndose usar estos microorganismos como fuente alternativa de este tipo de lípidos (Sahu *et al.*, 2013). Además, de esta manera también se podría contribuir a reducir el riesgo de que disminuyan las poblaciones de peces salvajes, evitando su escasez en los océanos y reduciendo el peligro de extinción de algunas especies (Ryckebosch *et al.*, 2014).

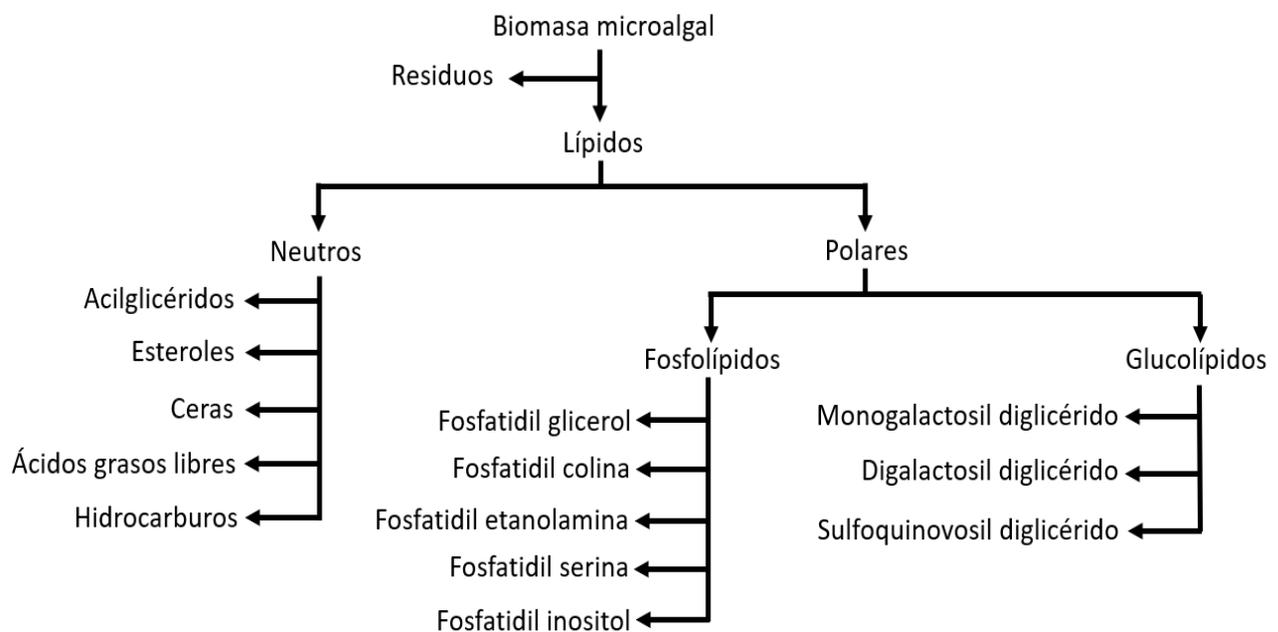
Por otro lado, la obtención de aceites a partir de microalgas también supone una gran ventaja con respecto a su obtención a partir de plantas oleaginosas (Xue *et al.*, 2020). Una de las principales ventajas es que las microalgas tienen un mayor contenido lipídico que las semillas y frutos obtenidos a partir de cultivos de plantas oleaginosas (Rodolfi *et al.*, 2009). Estos productos suelen tener un contenido de aceite de entre el 20% y el 60% de su peso, mientras que las células de microalgas suelen contener entre un 30% y un 80% (Deshmukh *et al.*, 2019). Además, se logran mayores rendimientos en la obtención de aceite a partir de las microalgas que de las plantas oleaginosas, puesto que a partir de los cultivos agrícolas se suelen obtener menos de 2.800 litros de aceite por hectárea de cultivo, mientras que a partir de las microalgas se puede alcanzar rendimientos que varían de entre los 56.000 y los 140.000 litros de aceite por hectárea (Sajjadi *et al.*, 2018). Esto es debido a que las microalgas poseen una mayor tasa de crecimiento y de producción de lípidos y al menor uso de terreno en comparación con los cultivos terrestres (Castejón y Señoráns, 2020). La utilización de microalgas como fuente de lípidos también tiene otras ventajas sobre la obtención a partir de cultivos de plantas superiores, porque los cultivos de microalgas necesitan menos agua que los cultivos terrestres y su cultivo no necesita herbicidas ni pesticidas (Rodolfi *et al.*, 2009).

Otra de las ventajas del uso de microalgas como fuente de lípidos es que debido a la gran biodiversidad que presentan, existen especies ricas en la mayoría de los ácidos grasos utilizados en la síntesis de lípidos estructurados (Ohse *et al.*, 2015). De esta forma, dependiendo de la especie a la que pertenezca una microalga, esta puede producir y almacenar triglicéridos con una composición

distinta de ácidos grasos (He *et al.*, 2019). Además, existen distintas especies ricas en determinados tipos de ácidos grasos saturados o insaturados que tradicionalmente se han obtenido a partir de las plantas superiores (Huerlimann *et al.*, 2010). También existen especies que contienen altas concentraciones de ácidos grasos omega-3 y omega-6, que se encuentran en pequeñas proporciones en las plantas oleaginosas cultivadas (Xue *et al.*, 2020). Por tanto, se pueden sintetizar la mayoría de los lípidos estructurados con interés comercial utilizando únicamente aceites provenientes de microalgas, al contrario de lo que ocurre con las fuentes de aceites tradicionales (He *et al.*, 2019).

#### 4.2.1. Perfil lipídico de las microalgas

Los principales componentes bioquímicos de las microalgas son los lípidos, las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos (Sajjadi *et al.*, 2018). Los lípidos de las microalgas constituyen un grupo de compuestos químicamente muy diverso cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua, pero que, en cambio, se disuelven fácilmente en los disolventes apolares orgánicos (Ramírez, 2005). Estos lípidos provienen principalmente de la membrana plasmática, endomembranas, cloroplastos y cuerpos lipídicos en los que se almacenan principalmente triacilglicéridos y ácidos grasos libres (Wang *et al.*, 2009). Estos lípidos se pueden clasificar en lípidos neutros y lípidos polares, donde los lípidos neutros (como triglicéridos y esteroides) constituyen la reserva energética de la célula y los lípidos polares (como fosfolípidos y glicolípidos) tienen funciones estructurales (D'Alessandro y Antoniosi, 2016). Otras clases lipídicas contenidas en las microalgas son las ceras, los hidrocarburos y los ácidos grasos libres (Yu *et al.*, 2011), tal y como muestra la figura 3.



**Figura 3.** Clasificación de los principales componentes de la fracción lipídica de las microalgas. (Tomada de Ramírez, 2005).

A pesar de la gran variedad de grasas que sintetizan las microalgas, éstas sintetizan principalmente lípidos en forma de triglicéridos; por lo que los triacilgliceroles son los lípidos que se encuentran en mayor proporción en estos organismos (He *et al.*, 2019).

El contenido lipídico de las microalgas varía según la especie y las condiciones de crecimiento, aunque suele encontrarse entre el 30% y el 50% de la biomasa en microalgas que habitan con condiciones óptimas (Xue *et al.*, 2020; Rodolfi *et al.*, 2009; Tabla 3). Incluso puede llegar a suponer el 80% del contenido celular en microalgas cultivadas bajo determinadas condiciones (Xue *et al.*, 2020).

**Tabla 3.** Contenido lipídico como porcentaje de peso seco de biomasa y productividad de lípidos de algunas especies de microalgas; sin determinar (nd); (adaptada de Abou-Shanab *et al.*, 2011; Rodolfi *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2020).

Especie	Contenido lipídico (% de biomasa seca)	Productividad lipídica (mg/L/día)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	31	nd
<i>Botryococcus terribilis</i>	49	nd
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	40	27,6
<i>Chaetoceros muelleri</i>	34	31,8
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	29	45,5
<i>Chlamydomonas pitschmannii</i>	51	54,1
<i>Chlorella emersonii</i>	63	50,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	60	42,1
<i>Chlorella vulgaris</i>	58	44,5
<i>Dunaliella salina</i>	25	116,0
<i>Ellipsoidion anulatum</i>	27	47,3
<i>Isochrysis galbana</i>	28	37,8
<i>Nannochloris sp.</i>	68	54,8
<i>Pavlova lutheri</i>	36	50,2
<i>Pavlova salina</i>	31	49,4
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	57	44,8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	29	53,0
<i>Schizochytrium sp.</i>	77	nd
<i>Skeletonema sp.</i>	32	27,3

Por otra parte, el grado de acumulación de lípidos en las microalgas también puede variar según el microambiente al que estén expuestas (Gao *et al.*, 2013). Esta variabilidad en el contenido lipídico que presentan las microalgas se observó mientras se estudiaba la biodiversidad microalgal que alberga el bosque de Sunderbans (el bosque de manglar más grande del mundo), en la India, donde

se encontraron microalgas con contenidos variables de lípidos y composiciones de ácidos grasos (Barman *et al.*, 2012). Esto es debido a que las microalgas reaccionan de forma diferente a los cambios ambientales, como cambios en los componentes del medio o la exposición a diferentes niveles de estrés ambiental (Sajjadi *et al.*, 2018). De esta forma, las microalgas que son expuestas a una determinada condición que no es óptima para su crecimiento, activan mecanismos celulares que desvían sus flujos metabólicos hacia procesos que incrementan la síntesis y el almacenamiento de compuestos ricos en energía (De Bhowmick *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2020). Esta característica de las microalgas se utiliza para obtener biomasa con alto contenido lipídico en cultivos controlados mediante la optimización de los parámetros físicos, como la temperatura, el pH o la intensidad de la luz y parámetros químicos, como la privación de nutrientes y la salinidad (Karemore *et al.*, 2013). Entre los diferentes factores de estrés que inducen la acumulación de lípidos en las microalgas, uno de los más efectivos es el estrés nutricional, especialmente el estrés por deficiencia de nitratos y fosfatos (Xue *et al.*, 2020). Esta condición de estrés provoca en las microalgas una canalización de los flujos metabólicos hacia la biosíntesis de los ácidos grasos, lo que resulta en una mayor acumulación de lípidos de almacenamiento en forma de triacilgliceroles en sus células (Dorval *et al.*, 2009).

Actualmente solo se ha estudiado el contenido lipídico de unos pocos cientos de especies de entre la gran diversidad de especímenes que existen (Kaur *et al.*, 2012). Además, solo se ha logrado mantener en cultivos a unos pocos miles de especies en todo el mundo (Olaizola, 2003). Por ello, uno de los mayores desafíos asociados a la biotecnología de las microalgas es la identificación de especies adecuadas para el cultivo en masa, con un alto contenido lipídico y con perfiles adecuados de ácidos grasos (Gao *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2012). Entre los diversos tipos de microalgas estudiados, las pertenecientes al grupo taxonómico Chlorophyceae, son las que tienen una mayor aplicación biotecnológica (Rosenberg *et al.*, 2008).

La composición en ácidos grasos de los acilglicéridos que sintetizan las microalgas depende de la especie a la que pertenezca el organismo, hasta el punto de que el perfil de ácidos grasos se puede utilizar como criterio taxonómico (Mühling *et al.*, 2005). Esto es posible debido a que los perfiles de ácidos grasos suelen ser similares entre especies del mismo filo o clase, mientras que difiere mucho entre especies pertenecientes a clases o filos distintos (Huerlimann *et al.*, 2010). Los ácidos grasos encontrados en el aceite de microalgas suelen ser los mismos que se encuentran en los aceites derivados de plantas superiores, principalmente ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, como el ácido palmítico y el ácido oleico (Xue *et al.*, 2020; Tabla 4). Estos tipos de ácidos grasos predominan entre los miembros del grupo Cyanophyceae, que suelen ser microalgas ricas en ácido palmítico y ácido oleico, mientras que las microalgas que forman el grupo Chlorophyceae suelen ser ricas en ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico (Sahu *et al.*, 2013). También existen algunas especies de microalgas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), las cuales tienen un contenido en PUFAs que puede variar entre el 20% y el 60% en términos de composición de ácidos grasos (Xue *et al.*, 2020; Tabla 4). Entre este tipo de lípidos destacan los ácidos grasos omega-3, siendo las microalgas una de las fuentes alternativas más prometedora de este tipo de ácidos grasos (Castejón y Señoráns, 2020). Esto se debe a que estos microorganismos son los principales productores de EPA y DHA, aunque se ha observado que las microalgas con alto contenido en EPA no contienen prácticamente

DHA y viceversa (Ryckebosch *et al.*, 2014). Las principales productoras de ácidos grasos omega-3 son especies planctónicas marinas, entre las que destacan microalgas pertenecientes a los géneros *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum* (como la especie *Phaeodactylum tricornutum*), *Pavlova*, *Thalassiosira*, *Botryococcus*, *Dunaliella* (como la especie *Dunaliella salina*), *Stramenopiles* y *Haptista*. (Xue *et al.*, 2020; Ryckebosch *et al.*, 2014; Castejón y Señoráns, 2020).

Otras especies con altos contenidos en ácidos grasos útiles para la síntesis de determinados lípidos estructurados son las microalgas pertenecientes al género *Picochloruim*, que suelen ser ricas en ácido caprílico; las microalgas de la especie *Tetraselmis chuii*, que son ricas en ácido behénico y ácido araquidínico; *Isochrysis galbana*, que tienen un contenido importante de ácido oleico, ácido palmítico y ácido behénico; *Thalassiosira fluviatilis*, con una alta concentración en ácido esteárico; *Chlorella vulgaris*, rica en ácido  $\alpha$ -linolénico, ácido cáprico y ácido láurico; *Nannochloropsis sp.* que suele presentar altos contenidos en ácido esteárico; *Chlamydomonas mexicana*, rica en ácido láurico y ácido palmítico; *Chlamydomonas pitschmannii* y *Scenedesmus obliquus*, que son especies con un alto contenido en ácido esteárico y linolénico; y *Senedesmis sp.*, con una alta concentración en ácido propanoico, ácido butírico y ácido cáprico (Ohse *et al.*, 2015; Elumalai *et al.*, 2011; Cheirsilp y Torpee, 2012; Abou-Shanab *et al.*, 2011; El-Kassas, 2013).

**Tabla 4.** Composición en ácidos grasos de algunas especies de microalgas. Ácido araquidónico (AA); ácido cáprico (AC); ácido caprílico (ACL); ácido esteárico (AE); ácido linoleico (AL); ácido linolénico (ALN); ácido láurico (ALU); ácido oleico (AO); ácido palmítico (AP); ácido eicosapentaenoico (EPA); ácido docosahexaenoico (DHA); sin determinar (nd) (adaptada de Xue *et al.*, 2020; Ohse *et al.*, 2015; Abou-Shanab *et al.*, 2011; Sahu *et al.*, 2013; Ramírez, 2005).

Especie	Porcentaje en peso del total de ácidos grasos										
	AA	AC	ACL	AE	AL	ALN	ALU	AO	AP	EPA	DHA
<i>Botryococcus terribilis</i>	-	-	-	1,28	3,09	5,2	-	75,19	6,27	1,24	2,26
<i>Calothrix sp.</i>	-	-	-	3,99	6,94	-	-	55,52	26,95	-	-
<i>Chaetoceros muelleri</i>	-	-	0,11	14,38	1,22	2,84	-	-	0,96	0,12	2,12
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	-	-	-	6,0	-	-	34,0	-	50,0	-	-
<i>Chlamydomonas pitschmannii</i>	-	-	-	23,0	-	23,0	10,0	13,0	26,0	-	-
<i>Chlorella minutissima</i>	5,0	nd	nd	nd	2,0	.	nd	nd	nd	45,0	-
<i>Chlorella protothecoides</i>	-	-	-	3,4	19,86	-	-	58,94	13,42	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	-	-	15,47	7,44	22,17	-	13,46	21,17	0,43	0,86

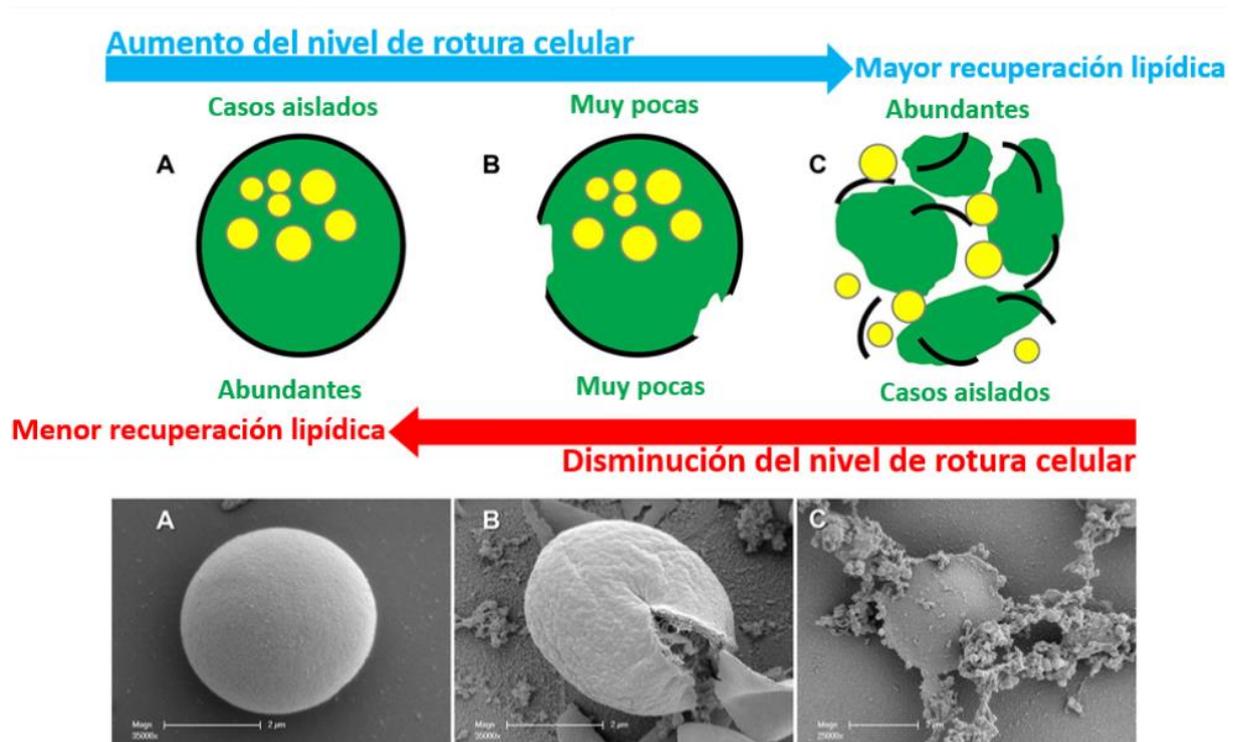
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	-	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	nd	-	30,0
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	-	-	-	7,05	14,62	20,24	-	15,49	26,19	-	-
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	-	-	-	4,05	22,9	41,4	-	8,6	26,1	0,4	-
<i>Gonyaulax digensis</i>	-	nd	nd	nd	-	2,0	nd	nd	nd	8,0	25,0
<i>Isochrysis galbana</i>	-	0,97	0,88	4,72	0,87	5,54	-	21,12	20,84	-	3,92
<i>Leptolyngbya sp.</i>	-	-	-	4,73	5,36	1,56	-	69,52	13,74	-	-
<i>Lyngbya sp.</i>	-	-	-	3,24	4,00	5,15	-	54,53	26,49	-	-
<i>Nannochloropsis oculata</i>	-	-	-	1,8	2,2	0,9	-	4,1	20,5	29,7	-
<i>Nostoc muscorum</i>	-	-	-	-	7,85	11,24	-	54,01	26,89	-	-
<i>Oscillatoria acuta</i>	-	-	-	8,53	9,17	-	-	68,68	13,71	-	-
<i>Oscillatoria marina</i>	-	-	-	4,74	8,9	-	-	63,15	18,74	-	-
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	-	-	0,63	0,4	3,38	1,71	-	2,8	11,3	28,4	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	36,0	nd	nd	nd	16,0	-	nd	nd	nd	17,0	-
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	-	-	17,0	-	23,0	11,0	20,0	29,0	-	-
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	5,21	7,74	-	-	56,54	22,53	-	-
<i>Synechococcus sp.</i>	-	-	-	-	5,45	1,94	-	1,73	8,74	-	-
<i>Tetraselmis chuii</i>	-	-	-	2,78	6,19	17,57	-	17,55	23,43	-	-
<i>Tetraselmis suecica</i>	0,12	-	-	12,68	2,23	14,57	-	25,11	27,32	5,24	-
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	-	-	-	37,95	3,57	6,69	-	7,07	3,35	-	-
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	-	-	-	3,11	3,54	3,99	-	4,51	2,69	2,15	-

## 5. Pretratamiento de la biomasa microalgal

El uso de las microalgas como fuente de lípidos en los procesos a gran escala suele estar limitado por los costos y la sostenibilidad del proceso de extracción de sus aceites (Onumaegbu *et al.*, 2018). Uno de los gastos energéticos más altos que tiene el proceso de extracción es el asociado al secado de la

biomasa, que puede representar hasta el 84,9% del aporte total de la energía necesaria para llevar a cabo la extracción de los aceites de las microalgas (Yang *et al.*, 2015). Por ello, la utilización de biomasa húmeda en la extracción supone una mejor opción, ya que permite reducir los costos de operación, haciendo que el proceso sea más factible a escala industrial (Patel *et al.*, 2020). No obstante, el uso de biomasa húmeda suele dificultar la recuperación de los disolventes, lo que resulta en una disminución en la eficiencia de extracción (Jiménez *et al.*, 2020b). Aunque dependiendo de la técnica de pretratamiento y extracción que se utilizará en el proceso, convendrá utilizar la biomasa en forma concentrada, semiconcentrada o seca (Halim *et al.*, 2012).

Por otro lado, las microalgas suelen presentar paredes celulares gruesas y robustas, lo cual es un inconveniente que dificulta la recuperación de los lípidos (Patel *et al.*, 2020; Figura 5). Por ello, normalmente se pretrata la biomasa para obtener una eficiencia mayor en la extracción de los lípidos microalgales, de manera que se reduce el consumo energético del proceso y el uso de compuestos extractivos contaminantes (Alhattab *et al.*, 2019). Estas técnicas de pretratamiento se utilizan para la desintegración de la estructura de sus células a partir de la rotura de la pared celular que poseen estos microorganismos, lo que permite la liberación de los lípidos almacenados intracelularmente (Patel *et al.*, 2018; Figura 4).



**Figura 4.** En la parte superior de la figura se muestra una representación esquemática de la extensión de la ruptura celular en un cultivo de microalgas pretratado, y el efecto sobre la tasa de recuperación de sus aceites según el grado de rotura celular alcanzado en el cultivo. En la parte inferior de la figura, se representan los diferentes niveles de ruptura celular mostrados en el esquema de la parte superior, a través de imágenes tomadas por microscopía electrónica. Células intactas (A); levemente fracturadas (B); completamente desintegradas (C) (adaptada de Yap, B. *et al.*, 2014).

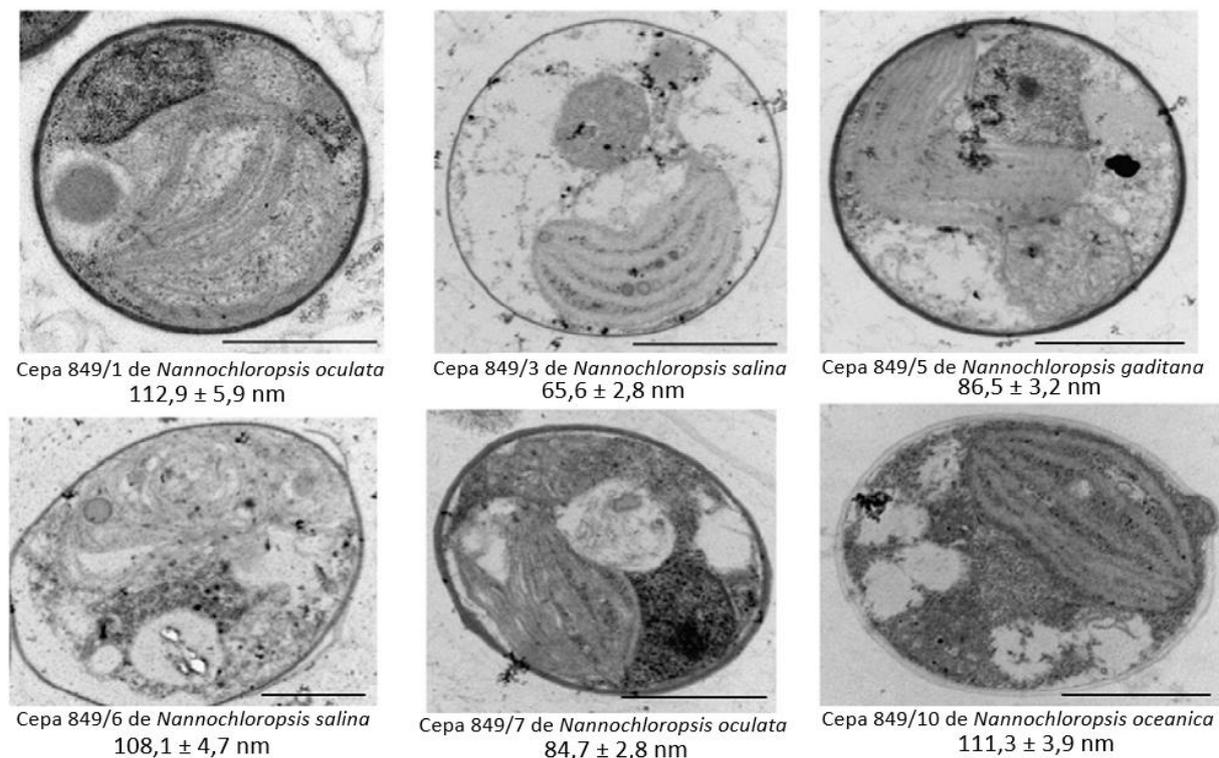
Actualmente, se emplean métodos químicos, biológicos, físicos y mecánicos para romper las paredes celulares de las microalgas, entre las que se incluyen pretratamientos con irradiación de microondas, tratamientos con ultrasonidos, hidrólisis enzimática, homogeneización a alta presión, autoclavado, molienda en molino de bolas y choque osmótico, entre otros (D'hondt, *et al.*, 2017; Tabla 5). Las metodologías que utilizan fuerzas mecánicas para llevar a cabo la disrupción celular se pueden dividir en dos clases: las que aplican fuerzas de cizallamiento sólido (por ejemplo, el molino de bolas y la homogeneización de alta velocidad) y las que aplican fuerzas de cizallamiento líquido (por ejemplo, la homogeneización de alta presión) (Patel *et al.*, 2018). Por otro lado, los métodos físicos provocan la rotura de las células transfiriéndoles energía en forma de calor (autoclave), de ondas (ultrasonidos y tratamiento con microondas) o de corrientes eléctricas de forma directa (Ma *et al.*, 2018). El pretratamiento químico consiste en la utilización de reactivos alcalinos y ácidos que solubilizan los polímeros que forman las paredes celulares de las microalgas (Harmsen *et al.*, 2010). Mientras que los métodos biológicos se basan en solubilizar estos polímeros a través de la acción enzimática (Onumaegbu *et al.*, 2018).

**Tabla 5.** Ventajas e inconvenientes de algunos métodos utilizados para el pretratamiento de la biomasa microalgal. (Adaptado de Onumaegbu *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2018).

Pretratamiento	Ventajas	Desventajas
Choque osmótico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> <li>- Económico</li> <li>- Respetuoso con el medio ambiente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Su eficiencia depende de la especie de microalga</li> </ul>
Hidrólisis enzimática	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo consumo energético</li> <li>- Tiempos de extracción cortos</li> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proceso lento</li> <li>- Alto costo de las enzimas</li> </ul>
Homogeneización de alta presión	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil de realizar</li> <li>- Proceso rápido</li> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto costo de mantenimiento</li> </ul>
Homogeneización de alta velocidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil de realizar</li> <li>- Proceso rápido</li> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto consumo energético</li> <li>- Se producen altas temperaturas durante del proceso</li> </ul>
Molino de bolas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil de realizar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baja eficiencia con microalgas que presenten paredes muy resistentes</li> </ul>
Prensa de extrusión	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil de realizar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requiere grandes cantidades de biomasa</li> <li>- Proceso lento</li> </ul>
Tratamiento con ácidos y bases	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo consumo energético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto coste de los productos químicos</li> <li>- Contaminación química de los aceites</li> </ul>
Tratamiento con autoclave	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> <li>- Reduce la degradación de los lípidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difícil de escalar a nivel industrial</li> <li>- Proceso lento</li> <li>- Alto consumo energético</li> </ul>
Tratamiento con campos eléctricos pulsados	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fácil de realizar</li> <li>- Alta eficiencia energética</li> <li>- Proceso rápido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altos costos de mantenimiento</li> <li>- Se producen altas temperaturas durante el proceso</li> <li>- Dependencia de la composición del medio de cultivo</li> </ul>

Tratamiento con microondas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo consumo energético</li> <li>- Respetuosa con el medio ambiente</li> <li>- Tiempos de extracción cortos</li> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> </ul>	- Difícil de escalar a nivel industrial
Tratamiento con ultrasonidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempos de extracción cortos</li> <li>- Altos rendimientos de extracción</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto consumo energético</li> <li>- Difícil de escalar a nivel industrial</li> </ul>

Entre las diversas metodologías utilizadas, el tratamiento con ultrasonidos y el tratamiento con microondas son los métodos más usados para alterar la integridad celular de los microorganismos oleaginosos (Patel *et al.*, 2018). Sin embargo, las paredes celulares de las microalgas suelen ser muy diversas tanto estructuralmente como químicamente, por lo que dependiendo del tipo de pared celular que posea la microalga, se deberá elegir un método de pretratamiento adecuado (Alhattab *et al.*, 2019; Figura 5). La selección del método adecuado dependerá de la resistencia de la pared celular de la microalga, el riesgo de degradación de productos importantes y de pérdida de la calidad del aceite, el tamaño del flujo del proceso, la seguridad del método y los costos del proceso de pretratamiento (Onumaegbu *et al.*, 2018). Aunque algunas veces, el uso de un único método de pretratamiento puede que no sea suficiente para alcanzar el rendimiento máximo de extracción, por lo que puede resultar ventajoso combinar varios métodos diferentes de tratamiento (Patel *et al.*, 2018).



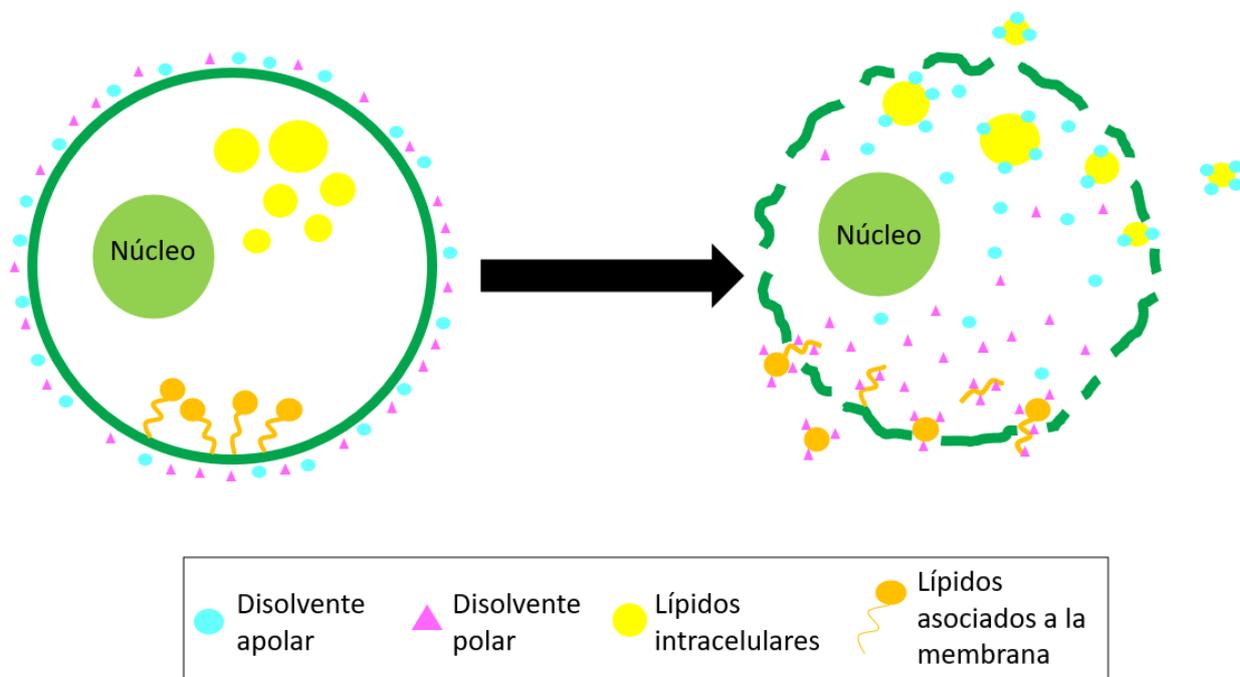
**Figura 5.** Imágenes representativas de varias especies y cepas de *Nannochloropsis* tomadas por microscopía electrónica, con una barra de escala que indica 1  $\mu$ m. Debajo de cada imagen se describe la especie y la cepa de la microalga que muestran, así como la media del grosor de la pared celular en cada una de ellas. (Adaptada de Beacham *et al.*, 2014).

## 6. Extracción de los lípidos de las microalgas

Para sintetizar lípidos estructurados a partir de microalgas, se deben extraer los lípidos contenidos en la biomasa de la microalga para obtener un extracto de lípidos que sirva como sustrato para las reacciones enzimáticas (Ramírez, 2005). El proceso de extracción de los aceites microalgales debería cumplir con unos requisitos esenciales para poder ser utilizado a escala industrial: debería ser rápido, eficaz, energéticamente eficiente, no reactivo con los lípidos, respetuoso con el medio ambiente, relativamente barato (tanto en términos de costo de capital como de costo operativo) y seguro (Halim *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2020). No existe un método universal de extracción de lípidos válido para todas las microalgas, ya que cada especie presentará unas particularidades que harán que un método de extracción sea más eficaz que otro (Ramírez, 2005).

### 6.1. Extracción con disolventes orgánicos

El método más común y simple para extraer el aceite de microalgas es la extracción con disolventes orgánicos (Xue *et al.*, 2020). Tradicionalmente, la extracción de lípidos de microalgas se ha realizado mediante los métodos de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959) y Folch (Folch *et al.*, 1957), que utilizan cloroformo y metanol como disolventes extractores (Patel *et al.*, 2020). Sin embargo, a pesar de las altas eficiencias de extracción que presentan disolventes como el cloroformo o el benceno, se trata de compuestos tóxicos, perjudiciales para el medio ambiente, que no están permitidos en la fabricación de alimentos y que dificultan el tratamiento enzimático posterior de los triglicéridos extraídos (Yang *et al.*, 2015; Sati *et al.*, 2019). Por ello, se han buscado métodos alternativos que utilicen disolventes menos tóxicos y que estén permitidos en la fabricación de productos alimenticios (Jiménez *et al.*, 2020a). En la actualidad, el hexano y el etanol son utilizados en la extracción de aceites comestibles, ya que el etanol es un disolvente barato, eficaz, ecológico y seguro; y el hexano es uno de los disolventes más eficientes en la extracción de lípidos y presenta baja toxicidad (Jiménez *et al.*, 2020b; Sati *et al.*, 2019). Con estos disolventes se realizan extracciones sólido-líquido en sistemas líquidos monofásicos, en los que el disolvente extrae los lípidos contenidos en las células de las microalgas (Ramírez, 2005). Este proceso se basa en la capacidad de los disolventes orgánicos de penetrar en el interior de las células e interactuar con los componentes que almacenan en su interior, formando complejos disolvente-compuesto celular (Figura 6). Estos complejos se difunden a través de la membrana de la célula, impulsados por un gradiente de concentración que se crea durante el procedimiento (Halim *et al.*, 2012; Figura 6). La utilización de disolventes no polares (como el hexano), permite extraer los lípidos neutros almacenados en el interior celular, debido a que forman enlaces de Van der Waals similares a los que permiten a estos lípidos formar glóbulos lipídicos en el citoplasma (Jiménez *et al.*, 2020a; Figura 6). Sin embargo, algunos de los lípidos neutros que contiene la célula están formando complejos con lípidos polares, que, a su vez, están unidos a proteínas de la membrana celular mediante enlaces de hidrógeno (Sati *et al.*, 2019). Para extraer estos complejos lipídicos y los lípidos polares contenidos en el interior celular se utilizan disolventes polares (como el etanol), que son capaces de romper los enlaces de hidrógeno que unen los lípidos polares con las proteínas y liberar los lípidos neutros de estos complejos mediante la formación de enlaces de hidrógeno con los lípidos polares (Sati *et al.*, 2019; Jiménez *et al.*, 2020a).



**Figura 6.** Representación esquemática del mecanismo de acción de los disolventes orgánicos en la extracción de los lípidos de las microalgas. (Adaptado de Yang *et al.*, 2015)

Este tipo de extracción ha sido utilizada para extraer los lípidos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, utilizando etanol como disolvente para extraer los aceites de la biomasa microalgal seca (Ramírez, 2005). En este proceso se obtuvo un rendimiento de extracción de aproximadamente el 90% del peso de los lípidos contenidos en la biomasa seca. También se ha usado etanol en la extracción de los aceites de la microalga *Chlorella sp.* a partir de biomasa húmeda, en la que se obtuvo un rendimiento de extracción del 33% del peso seco de la biomasa (Yang *et al.*, 2015). En otro estudio se utilizó 2-propanol para extraer los aceites de biomasa húmeda de *Nannochloropsis sp.* En este caso se obtuvo un rendimiento de extracción del 40,8%, aunque este porcentaje aumentó hasta más del 73% cuando se pretrató la biomasa con celulasas y  $\beta$ -mananasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de hemicelulosas de tipo manano, el principal componente hemicelulósico de la pared celular de *Nannochloropsis sp.*) (Maffei *et al.*, 2018). Por otro lado, también se ha utilizado hexano para extraer los aceites de la microalga *Nannochloropsis sp.* a partir de pasta húmeda de biomasa concentrada. En este proceso se obtuvo un rendimiento de hasta el 70% (p/p) tras un tratamiento previo de homogeneización a alta presión de la biomasa (Olmstead *et al.*, 2013). El hexano también ha sido utilizado como disolvente para la extracción de los aceites de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*, en el que se obtuvo un rendimiento del 54,2% tras un pretratamiento de hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (Sati *et al.*, 2019).

En los últimos años ha crecido el interés por reemplazar el uso de hexano, y otros disolventes orgánicos derivados de petroquímicos peligrosos, por alternativas menos dañinas para la salud y el medio ambiente (Mahmood *et al.*, 2017). Esta necesidad se ha hecho cada vez más latente por la obligación de cumplir con una legislación que se está volviendo más restrictiva con este tipo de compuestos, al mismo tiempo de que mejora la competitividad de la industria química (Yara-Varón *et*

al., 2016). Estos disolventes alternativos usados para la extracción de aceites comestibles deben mostrar una baja o nula toxicidad, deben ser biodegradables, deben tener un grado alto de pureza y minimizar la contaminación de los compuestos extraídos (Mahmood *et al.*, 2017; Yara-Varón *et al.*, 2016). Para este propósito, los disolventes renovables producidos a partir de biomasa (biodisolventes) han surgido como una nueva generación de productos químicos altamente buscados para el diseño de procesos de separación ecoeficientes (Mahmood *et al.*, 2017). Entre los biodisolventes utilizados en la extracción de los aceites microalgales, se ha utilizado acetato de etilo para extraer los lípidos de biomasa húmeda de *Ankistrodesmus falcatus*. A partir de este proceso se obtuvo un rendimiento de extracción cercano al 83%, que aumentó hasta más del 90% cuando la biomasa se sometió a un pretratamiento de campo eléctrico pulsado (Zbinden *et al.*, 2013). Este disolvente también ha sido usado en la extracción de los lípidos de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis sp.* El rendimiento de la extracción fue del 11,7% con la biomasa húmeda de *Chlorella vulgaris*, mientras que, utilizando lactato de etilo, se obtuvo con la misma biomasa, un 20,8% de rendimiento por peso seco de microalgas (Mahmood *et al.*, 2017). Con la biomasa húmeda de *Nannochloropsis sp.*, se observó una tendencia similar, donde se alcanzó un 13,6% de rendimiento utilizando acetato de etilo y 31,1% por peso seco de microalgas al utilizar lactato de etilo como disolvente (Mahmood *et al.*, 2017). Por otro lado, se extrajeron los aceites de biomasa húmeda de *Nannochloropsis oculata* utilizando p-cimeno, que proporcionó un rendimiento lipídico del 21,45%, limoneno, con el que se obtuvo un 18,73% de rendimiento y pineno, con el que se alcanzó un 18,75% de rendimiento. Estos compuestos también fueron utilizados para extraer los lípidos de biomasa húmeda de *Dunaliella salina*, obteniéndose rendimientos que se situaban por debajo del 4%, un resultado cercano al obtenido a través de una extracción de Bligh y Dyer (4,03%) (Tanzi *et al.*, 2013).

## 6.2. Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

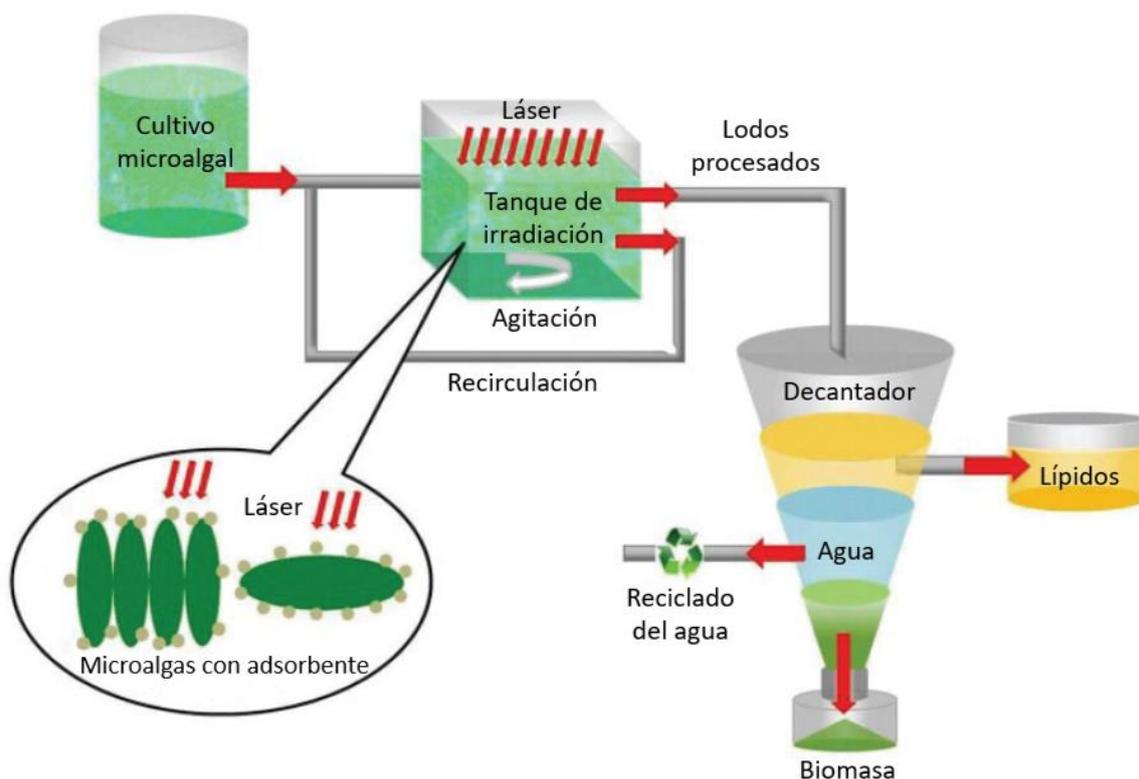
La extracción de los aceites microalgales utilizando dióxido de carbono supercrítico supone una alternativa más respetuosa con el medio ambiente que las extracciones con disolventes orgánicos (Obeid *et al.*, 2018). Este método utiliza CO<sub>2</sub> a una temperatura y una presión superiores al punto crítico de este compuesto, de manera que se modifican sus propiedades fisicoquímicas para disolver los lípidos de las microalgas (Xue *et al.*, 2020). Su eficacia en la extracción lipídica se basa en que los fluidos supercríticos tienen una densidad y un poder disolvente comparable al de los líquidos, pero una viscosidad y difusividad bajas similares a las de los gases (Ramírez, 2005), lo que aumenta su penetración en las células y las velocidades de transferencia de los solutos desde el interior de las células al seno del disolvente (Patel *et al.*, 2020). Estas propiedades se consiguen sometiendo el CO<sub>2</sub> a una temperatura y una presión algo superiores a su temperatura y presión críticas, que son 31°C y 7,3 MPa, respectivamente. Estas condiciones críticas no son demasiado altas, lo que permite que no se requiera un gran costo para su compresión y que sea apropiado para la extracción de lípidos termosensibles (Patel *et al.*, 2020). Este tipo de extracción tiene algunas ventajas con respecto a la extracción con disolventes orgánicos convencionales, ya que el CO<sub>2</sub> es un compuesto sin toxicidad, no inflamable, fácil de reciclar, respetuoso con el medio ambiente y económico (Cheng *et al.*, 2011). Por otro lado, el uso de esta técnica facilita el proceso de extracción por la facilidad de separar el CO<sub>2</sub> del extracto crudo obtenido, y la facilidad de reutilizarlo, lo que hace que el proceso sea más barato.

Debido a su naturaleza apolar, el CO<sub>2</sub> supercrítico muestra una alta selectividad hacia los lípidos neutros, que, junto con su incapacidad para solubilizar los fosfolípidos y otros compuestos polares de las células, hacen que el proceso sea altamente específico hacia los triglicéridos (Xue *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2020). Esta característica es la responsable de que el rendimiento de la extracción lipídica dependa de la composición química de los lípidos microalgales y de que su capacidad extractiva sea menor en microalgas con un alto contenido en lípidos polares (Obeid *et al.*, 2018). En estos casos se suele añadir disolventes polares como cosolventes del CO<sub>2</sub> (el etanol y el metanol son usados frecuentemente para este fin), lo que permite aumentar el rendimiento de la extracción de los lípidos (Xue *et al.*, 2020).

Mediante esta técnica se ha conseguido extraer aceite de la biomasa seca de *Scenedesmus obliquus* con un rendimiento del 25% y de biomasa liofilizada de *Nannochloropsis oculata* con un rendimiento de extracción cercano al 20%, aunque se consiguió aumentar este valor hasta el 41% utilizando etanol como cosolvente (Obeid *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2020). También se ha conseguido extraer los aceites de concentrados de la microalga *Pavlova sp.* con un rendimiento del 34%, aunque este valor aumentó hasta el 98,7% cuando se pretrató la biomasa seca triturándola en un molino de bolas (Cheng *et al.*, 2011). Además, se consiguió un 21% de rendimiento de extracción al utilizar esta técnica en la extracción lipídica de biomasa seca de *Chlorella protothecoides* (Viguera *et al.*, 2016). Por otra parte, también se utilizó CO<sub>2</sub> supercrítico para extraer los lípidos de biomasa húmeda de *Desmodesmus subspicatus*, obteniéndose un rendimiento de extracción de lípidos del 45%. Este valor aumentó un 17% cuando se extrajeron los aceites de la misma biomasa sometida a un pretratamiento de rotura celular con ultrasonidos (Altenhofen *et al.*, 2017).

### 6.3. Extracción con láser y adsorbente

Este método de extracción de lípidos microalgales supone otra alternativa al uso de métodos de extracción química (Kim *et al.*, 2017). Esta técnica se basa en el uso de un láser para romper las paredes celulares de las microalgas y extraer fácilmente los lípidos que almacenan en su interior (Tautorus y Low, 1994; Figura 7). Posteriormente, se utiliza un adsorbente que retira del medio las clorofilas y los carotenoides para purificar parcialmente los lípidos extraídos (Issariyakul y Dalai, 2010; Figura 7). Este tipo de extracción se lleva a cabo en un tanque de irradiación que contiene espejos en su interior para maximizar la reflectancia del láser y mejorar la eficiencia del proceso (Kumar *et al.*, 2019). En este tanque se introduce el cultivo de microalgas para ser irradiado con un láser azul de 445 nm y se le añade como adsorbente carbón activo, ya que es un compuesto que no impide que la energía del láser llegue hasta la pared celular (Kim *et al.*, 2017). A través de este método se han extraído los aceites de un cultivo de *Scenedesmus sp.* con un rendimiento del 81,8% (cantidad de lípidos extraídos con respecto al contenido total de lípidos) utilizando láseres con una potencia total de 75 W. La eficiencia de la extracción aumentó hasta un 90,8% cuando se llevó a cabo un pretratamiento del cultivo con microondas (Kim *et al.*, 2017). Este proceso presenta la ventaja de que puede llevarse a cabo directamente sobre el cultivo de microalgas, eliminando así otros procesos que alargan el procedimiento, como el secado de la biomasa. Además, este método tiene la ventaja de ser un método económico y respetuoso con el medio ambiente (Kumar *et al.*, 2019).



**Figura 7.** Método de extracción de lípidos mediante irradiación con láser y purificación con un adsorbente. (Tomada de Kim *et al.*, 2017).

### 7. Purificación de compuestos lipídicos útiles en la síntesis de lípidos estructurados

Tras la separación del extracto lipídico de los restos celulares, los lípidos contenidos en el disolvente de extracción se deben purificar. Esta purificación permite que estos aceites sean aptos para su uso como sustrato en reacciones enzimáticas (Ramírez, 2005). Los aceites de microalgas en bruto suelen contener compuestos no lipídicos, como proteínas y carbohidratos, debido a que algunos disolventes pueden extraerlos junto con los lípidos (como esteroides, carotenos y clorofilas) (Jiménez *et al.*, 2020b). Además de estos compuestos, estos aceites también contienen lípidos polares y neutros diferentes a los acilglicéridos o ácidos grasos que se usan en la síntesis de lípidos estructurados. Desde esta perspectiva, cualquier fracción bioquímica que no se pueda utilizar en la síntesis de lípidos estructurados es un contaminante y deberá eliminarse de estos aceites crudos (Halim *et al.*, 2012; Ramírez, 2005). Para separar estos lípidos útiles en la síntesis de lípidos estructurados del resto de compuestos se utilizan diferentes métodos de purificación, como la destilación molecular, el fraccionamiento con disolventes o la cristalización de lípidos, que se aplica con frecuencia en la producción industrial (Li *et al.*, 2018).

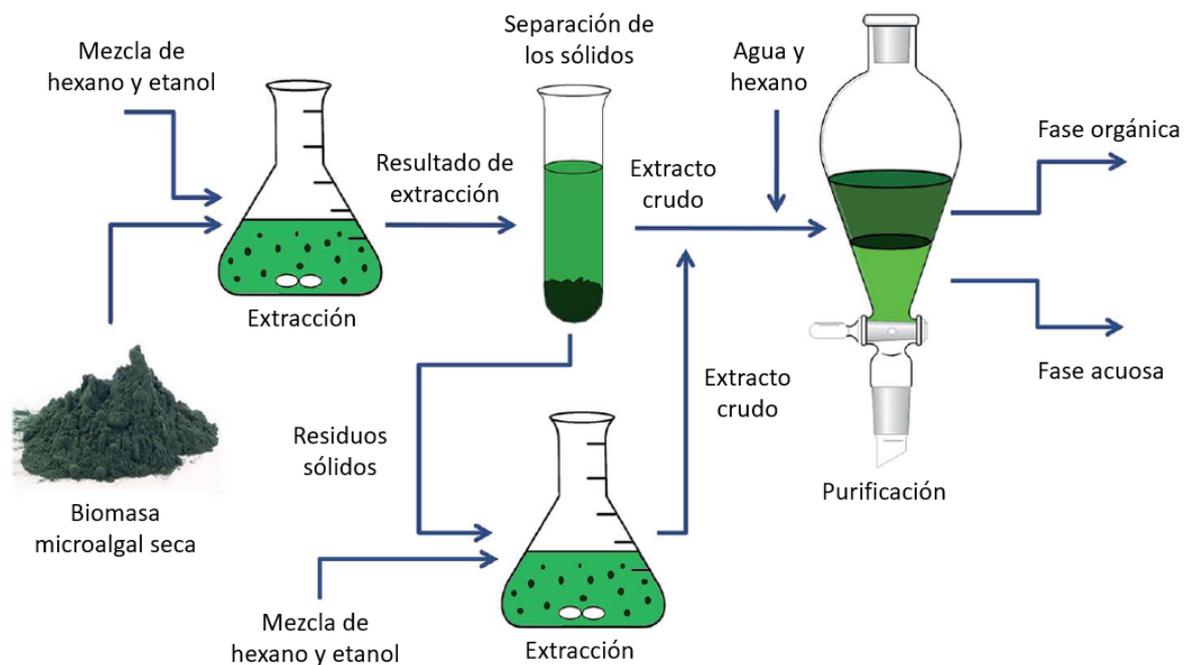
Por otro lado, estas técnicas de purificación también se utilizan para purificar glicéridos parciales utilizados en la síntesis de lípidos estructurados, como diglicéridos y monoglicéridos (Wang *et al.*, 2018). Estos lípidos se separan de los ésteres etílicos, triglicéridos y monoglicéridos o diglicéridos (según el acilglicérido de interés) que están contenidos en el producto de la reacción de síntesis de

estos glicéridos parciales (Zhang *et al.*, 2018; Esteban *et al.*, 2009). Además, se pueden utilizar estos métodos para purificar ácidos grasos concretos para producir un determinado triglicérido estructurado (Morales-Medina *et al.*, 2016). Estos ácidos grasos de interés son separados del resto de ácidos grasos, acilglicéridos parciales y glicerina contenidos en el producto de la reacción que permite la obtención de concentrados de un ácido graso determinado (Liu *et al.*, 2015).

### **7.1. Purificación mediante sistemas bifásicos de etanol-hexano**

La técnica basada en un sistema etanol/hexano permite separar los compuestos más hidrofílicos de los lípidos del extracto lipídico bruto, así como extraer y purificar parcialmente los lípidos saponificables de las microalgas de forma simultánea (Xue *et al.*, 2020; Figura 8). La purificación de estas especies lipídicas se basa en el concepto de "lo similar disuelve lo similar", de manera que se aprovecha la selectividad del disolvente polar por los componentes más polares y la del disolvente no polar por los lípidos (Sati *et al.*, 2019). Las técnicas más utilizadas para este fin se basan en sistemas de cloroformo/metanol, diclorometano/etanol, ciclohexano/1-butanol, hexano/isopropanol y hexano/etanol, aunque el sistema hexano/etanol es el más indicado para su uso en la industria alimentaria debido a que es el más seguro y el menos contaminante (Jiménez *et al.*, 2020b; Ramírez, 2005). Este método consiste en añadir una mezcla hidroalcohólica y n-hexano al extracto lipídico para que se forme un sistema bifásico en el que los compuestos más hidrofílicos permanezcan en la fase hidroalcohólica y los lípidos se disuelvan en la fase hexánica (Esteban *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2020a). En esta extracción líquido-líquido se consigue recuperar la mayor parte de los lípidos saponificables en la fase hexánica, donde quedarán concentrados con un mayor grado de pureza; mientras que algunos lípidos polares, como algunos pigmentos (los más polares) y otros productos no lipídicos (más polares), quedarán disueltos en la fase hidroetanolica (Ramírez, 2005; Yang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

Este método ha sido utilizado en la purificación de lípidos saponificables ricos en ácido eicosapentaenoico (EPA), en la que se aumentó la concentración de estos lípidos del 20% al 42% del peso del extracto lipídico, con un rendimiento cercano al 100% (Jiménez *et al.*, 2020b). También se ha utilizado esta técnica en la purificación de los lípidos saponificables contenidos en un extracto bruto, consiguiendo aumentar la concentración de estos compuestos desde el 12% hasta el 31% (p/p), con un rendimiento del 85%. Este pequeño incremento en la pureza se debe al bajo contenido de lípidos saponificables que contenía el extracto lipídico inicial (Navarro *et al.*, 2015). Además, esta técnica se ha utilizado para separar 2-monoglicéridos (2-MAG) ricos en PUFAs de aceites que tenían una concentración inicial del 19,5% de esta especie lipídica. Tras este proceso, se consiguió aumentar la concentración de 2-MAG hasta el 90%, con un rendimiento cercano al 90% (Esteban *et al.*, 2009). Esta técnica también se ha usado para purificar 2-MAG ricos en DHA de un aceite con un contenido inicial de este lípido de aproximadamente el 29%. Una vez realizado este proceso de separación, se obtuvo un aceite con una pureza de 2-MAG del 94,5%, que se consiguió con un rendimiento de extracción del 70% (Zhang *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Extracción y purificación simultáneas de lípidos de biomasa microalgal mediante un sistema bifásico hexano-etanol-agua. (Tomada de Najafabadi *et al.*, 2015).

Mediante una extracción secuencial de lípidos de la biomasa de la microalga *Nannochloropsis gaditana* con hexano y etanol se han obtenido lípidos polares ricos en EPA. El interés de estos productos radica en que la biodisponibilidad de los ácidos grasos omega-3 es mayor en los lípidos polares (fosfolípidos y glucolípidos) que en los lípidos neutros (mayoritariamente triacilglicerolos) (Jiménez *et al.*, 2020a). En este estudio se consiguió aumentar la concentración de lípidos polares desde el 57,6% hasta el 87,1% y la concentración de EPA desde el 23,7% hasta el 35,2%, con rendimientos cercanos al 80% (Jiménez *et al.*, 2020a). Por este método también se obtuvieron concentrados ricos en lípidos neutros con bajo contenido en EPA, que se pueden usar en la síntesis de lípidos estructurados.

## 7.2. Purificación mediante destilación molecular

Esta técnica separa las especies lipídicas contenidas en el aceite microalgal basándose en las diferencias de volatilidad o puntos de ebullición de los distintos componentes del extracto lipídico (Wang *et al.*, 2018). La destilación molecular de estos aceites se suele realizar a altos vacíos para lograr temperaturas de operación relativamente bajas (cerca a los 140°C), ya que, si se realizara la destilación convencional a 230-260°C, se degradarían los compuestos lipídicos sensibles al calor, como los PUFAs (García *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Estas temperaturas superiores a los 200°C provocarían que los ácidos grasos que portan los acilglicéridos sufrieran alteraciones como oxidación, pérdidas de insaturaciones o la formación de compuestos cíclicos (Ramírez, 2005). Como se ha indicado, este inconveniente se resuelve realizando la operación a altos vacíos, lo que permite disminuir la temperatura de ebullición de las diferentes especies lipídicas y minimizar su tiempo de residencia (García *et al.*, 2016).

Esta técnica se ha usado para purificar monoacilgliceroles (MAG) ricos en ácidos grasos omega-3 a partir de un aceite que contenía un 67% de MAG. El proceso se llevó a cabo a 155°C y dio como resultado un flujo de destilado con un 91% de MAG y un rendimiento del 94% (García *et al.*, 2016). También se realizó una destilación molecular a 75°C para incrementar la concentración de ésteres etílicos de DHA y EPA hasta más del 83%, a partir de un extracto lipídico con una concentración inicial cercana al 30%, alcanzando un rendimiento de más del 80% (Lin *et al.*, 2014). Por otro lado, se purificaron triglicéridos ricos en ácidos grasos omega-3 hasta más del 95% mediante esta metodología. Este proceso se realizó a 140°C, y se consiguió aumentar la concentración de triglicéridos desde el 66,21% hasta el 99,85%, con un contenido en ácidos grasos omega-3 del 88,73% y un rendimiento de más del 98% (Li *et al.*, 2017). Esta técnica también se ha usado para purificar diacilgliceroles ricos en ácido caprílico a partir de un aceite con una concentración de diglicéridos cercana al 40%. El contenido de diglicéridos aumentó hasta más del 60% con un rendimiento del 85% al llevar a cabo el proceso a 160°C (Li *et al.*, 2018). Además, se ha utilizado la destilación molecular para purificar triglicéridos ricos en ácidos grasos omega-3 a partir de un aceite con un contenido en triglicéridos del 65,12%. Se consiguió aumentar la pureza de triglicéridos hasta el 98,75% realizando el proceso a 140°C y consiguiendo un rendimiento de hasta el 98,66% (Li *et al.*, 2016).

### **7.3. Purificación mediante cristalización a baja temperatura**

Este procedimiento se basa en la insolubilidad de los lípidos polares, ceras y otros lípidos complejos, en algunos disolventes a baja temperatura (como acetona, acetonitrilo o disoluciones de urea en metanol y etanol) (Huynh *et al.*, 2010; Mu *et al.*, 2016). Gran parte de los lípidos saponificables permanecen disueltos en el disolvente a baja temperatura, mientras que la fracción de lípidos insolubles forman cristales y precipitan (Navarro *et al.*, 2015). Una de estas técnicas consiste en disolver el extracto lipídico en estos disolventes (por ejemplo, en acetona) y luego mantener esta mezcla a una temperatura cercana a 4°C durante al menos 24 horas, para provocar la cristalización de las ceras y los lípidos polares, y posteriormente separar la fracción cristalina del resto de la disolución (Jiménez *et al.*, 2020b). Por cristalización con acetona se ha logrado incrementar la pureza de los lípidos saponificables de un extracto lipídico, desde el 31% hasta el 95% de pureza y con un rendimiento de más del 80%; en este extracto purificado predominaron lípidos como triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres (Navarro *et al.*, 2015). También se ha usado esta técnica para purificar triglicéridos ricos en ácido esteárico. En este proceso, se cristalizó un aceite con 47,2% de contenido de este tipo de triglicérido en acetona, y se aumentó su concentración hasta un 89,7%, con un rendimiento de recuperación cercano al 70% (Ghazani, 2018). Además, se han purificado ácidos grasos ricos en DHA a partir de un aceite con una concentración inicial de DHA del 38,63%. Para ello, se purificó el DHA hasta obtener una concentración del 64,81%, a través de una cristalización en acetonitrilo y con rendimiento del 53,58%. Por otro lado, realizando una cristalización en acetona del mismo aceite, se obtuvo una concentración de DHA del 53,87% y se logró un rendimiento del 62,46% (Mu *et al.*, 2016). La acetona, también fue el disolvente utilizado para concentrar PUFAs a partir de un extracto lipídico que contenía un 45,5% de estos ácidos grasos. Por este método se obtuvo un aceite con más del 80% en peso de PUFAs y con un rendimiento de extracción superior al 90% (Morales-Medina *et al.*, 2016). La cristalización a baja

temperatura con acetonitrilo también se utilizó para concentrar 2-MAG ricos en PUFAs de un aceite con un contenido inicial del 26% (en peso). Después de la purificación, se obtuvo un aceite con un contenido de 2-MAG del 94,15% y con un rendimiento del 82,64% (Zhu *et al.*, 2017).

Además, se ha utilizado la cristalización con urea para aumentar la concentración de ácido oleico de un extracto lipídico con una concentración inicial del 70% en peso. Tras la aplicación de esta técnica, se obtuvo un aceite con una pureza del 99% en ácido oleico, con un rendimiento de extracción del 92% (Aldaw *et al.*, 2018). Esta metodología también se ha utilizado para concentrar diacilglicéridos ricos en DHA, aumentando el contenido de diglicéridos de un aceite desde el 48,4% al 75,1% con un rendimiento cercano al 80% (Wang *et al.*, 2018).

## **8. Síntesis de lípidos estructurados**

La síntesis de acilglicéridos estructurados se puede realizar mediante catálisis química o catálisis enzimática, aunque la síntesis por vía enzimática se ha convertido en la metodología principal para la obtención de lípidos estructurados debido a que presenta más ventajas (Adamczak, 2004).

La mayoría de las legislaciones alimentarias permiten el uso de enzimas como catalizadores, por lo que la biocatálisis supone una alternativa para llevar a cabo multitud de procesos en la industria alimentaria (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Entre las ventajas que presentan las enzimas sobre los catalizadores químicos, destaca su capacidad para catalizar reacciones en condiciones suaves de presión y temperatura (Speranza y Macedo, 2012). Esto supone una gran ventaja debido a que no se necesita un biorreactor altamente resistente a altas temperaturas, presiones extremas y compuestos corrosivos, lo cual requiere una alta inversión de capital (Gupta *et al.*, 2013). Además, al operar en estas condiciones, se minimiza la formación de productos secundarios, lo que facilita la posterior separación y procesamiento de los productos (Gupta *et al.*, 2003). Por otro lado, la búsqueda de procesos que sean más respetuosos con el medio ambiente ha despertado un gran interés en la sustitución de catalizadores inorgánicos por el uso de enzimas para la producción de lípidos estructurados (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Esto ha provocado que el uso de estos biocatalizadores en esta industria esté experimentando un gran crecimiento en las últimas décadas (Schmid *et al.*, 2001). A pesar de ello, el uso de enzimas está limitado por el alto costo de su aislamiento y purificación. Esto se debe a que las enzimas son de naturaleza lábil, por lo que su aislamiento del entorno natural puede causar desnaturalización y disminución de la actividad. Además, su uso también se puede ver limitado por la baja estabilidad química que presentan algunas enzimas en los disolventes orgánicos usados en estas reacciones (Gupta *et al.*, 2013).

En la síntesis de lípidos estructurados se usan diferentes clases de biocatalizadores como lipasas, esterasas y fosfolipasas (Speranza y Macedo, 2012), aunque las lipasas son los catalizadores más versátiles en el campo de la biotecnología lipídica y son los que tienen una mayor variedad de aplicaciones industriales (Schörken y Kempers, 2009). Por ello, el uso de lipasas para la producción de lípidos estructurados es una técnica que se ha utilizado durante muchos años con resultados prometedores (Speranza y Macedo, 2012).

### 8.1. Lipasas utilizadas en la síntesis de lípidos estructurados

Las lipasas son enzimas que tienen la función natural de catalizar la escisión de los enlaces éster existentes entre las cadenas de ácido graso y el esqueleto de glicerina presentes en los acilglicéridos y producir diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol (Hayes, 2004). Aunque, catalizan reacciones de hidrólisis en sus medios naturales (acuosos), estas enzimas son también capaces de catalizar reacciones de síntesis en medios no acuosos (Casas-Godoy *et al.*, 2012). Esta característica hace posible su uso en la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los acilglicéridos a través del intercambio de ácidos grasos (Willis *et al.*, 1998), lo que ha convertido a las lipasas en unos catalizadores con un gran potencial para su uso en la modificación de grasas y aceites para uso alimentario y nutracéutico (Gupta *et al.*, 2013). Por ello, el uso de lipasas para modificar la composición de ácidos grasos de triacilglicéridos ha experimentado un aumento significativo en los últimos años (Speranza y Macedo, 2012).

Otros aspectos que convierten a las lipasas en una gran herramienta biotecnológica, es su selectividad hacia diferentes grupos acilo según su longitud de cadena o su grado de saturación, su amplia especificidad de sustrato y su propiedad regioselectiva (Kapoor y Gupta, 2012; Tabla 6). En particular, su regioselectividad es una propiedad clave para la síntesis de lípidos estructurados, ya que es responsable de la capacidad de estas enzimas para catalizar la producción de lípidos con distribuciones específicas de ácidos grasos (Schörken y Kempers, 2009). Concretamente, la regioselectividad o especificidad posicional *sn*-1,3 que presentan algunas lipasas las convierte en enzimas con un enorme potencial para su uso como biocatalizadores para la producción de lípidos estructurados, convirtiéndose en una de las características más buscadas para el uso en la síntesis de lípidos estructurados (Jala *et al.*, 2012; Tabla 6). Además, el uso de estas enzimas presenta otras ventajas, como la disponibilidad de un gran número de lipasas comerciales robustas y de herramientas para su optimización y producción, así como que no necesitan cofactores o coenzimas para su funcionamiento (Casas-Godoy *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013).

La baja estabilidad operativa de algunas lipasas se ha convertido en una de las principales limitaciones para su uso en la producción de lípidos estructurados (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Este inconveniente se ha intentado resolver inmovilizando las lipasas sobre un soporte inerte, de manera que la enzima está confinada en una región definida del espacio, reteniendo su actividad catalítica para usos repetitivos (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000). La inmovilización enzimática supone una ventaja sobre el uso de lipasas libres, puesto que la inmovilización de la enzima permite la reutilización del lote de enzimas, facilita la separación y la purificación de los productos, mejora la estabilidad térmica y química de las enzimas, reduce el costo del proceso, mejora el control de la reacción, se obtienen mejores rendimientos de conversión, y permite desarrollar procesos continuos a gran escala con una alta eficiencia. Sin embargo, es habitual llevar a cabo el proceso por lotes y a pequeña escala usando lipasas libres (Gupta *et al.*, 2013). Por lo tanto, la inmovilización de enzimas es una de las técnicas más útiles para mejorar la aplicación de enzimas a nivel industrial (Yücel, 2012).

Hoy en día, uno de los principales factores que limitan el uso de lipasas a nivel industrial es su alto costo, lo que implica que su uso suela estar restringido a procesos donde el valor de los productos obtenidos es alto (Gupta *et al.*, 2013). Sin embargo, se espera que los avances en investigaciones sobre las diferentes aplicaciones que pueden tener las lipasas lograrán aumentar su demanda en un futuro cercano, lo que disminuirá el coste de su fabricación, haciendo que estos procesos enzimáticos sean más competitivos (Gandhi, 1997).

Debido a la importancia y la gran variedad de aplicaciones que tienen estas enzimas en la industria, se han purificado lipasas de muchas fuentes diferentes, entre las que destacan las obtenidas de plantas superiores, animales y microorganismos (hongos y bacterias) (Ferreira-Dias *et al.*, 2013; Tabla 6). En particular, las lipasas microbianas son las más utilizadas, porque se pueden extraer fácilmente y con altos rendimientos, aunque las lipasas extraídas de plantas superiores muestran algunas ventajas sobre las microbianas, como su menor costo y su gran versatilidad y estabilidad en medios orgánicos (Paques y Macedo, 2006). Entre ellas, la lipasa extraída del látex de *Carica papaya* ha surgido como un biocatalizador prometedor (Tecelão *et al.*, 2012).

La mayoría de las lipasas de origen animal tienen un pH óptimo comprendido entre 8 y 9, mientras que las de origen microbiano tienen pH óptimos comprendidos entre 5 y 10,8 (Ramírez, 2005; Javed *et al.*, 2018). Dada la naturaleza adaptable de las bacterias, la dependencia de la actividad y la estabilidad de la lipasa con el pH depende de las condiciones de cultivo; así si los microorganismos estaban creciendo a pH alcalino, la lipasa producida tendrá un pH óptimo alcalino (Ramírez, 2005). Con respecto a la temperatura, la mayoría de las lipasas presentan una actividad óptima entre los 30°C y los 40°C (Abed *et al.*, 2016), aunque las lipasas bacterianas presentan condiciones óptimas de temperatura que se encuentran entre los 15°C y 70°C (Javed *et al.*, 2018).

Uno de los factores clave a la hora de seleccionar una lipasa para usarla como catalizador en la producción de lípidos estructurados es que tenga una alta estabilidad operativa, ya que si no el proceso no sería rentable (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, se ha estudiado la estabilidad operativa de varias lipasas y se obtuvieron resultados prometedores con las lipasas comerciales Novozyme 435 y Lipozyme TL IM, que presentaron una vida media de 17 días y de 6 días (respectivamente) en una interesterificación a 70°C, llevada a cabo en un reactor de lecho fluidizado operando en continuo (Osório *et al.*, 2005; Osório *et al.*, 2006). También se han obtenido buenos resultados con la lipasa inmovilizada rROL de *Rhizopus oryzae*, logrando una vida media de 8 días en una acidólisis realizada en un reactor tanque agitado en discontinuo a 60°C (Ferreira-Dias *et al.*, 2013).

**Tabla 6.** Selectividad posicional y con respecto a longitud del ácido graso de algunas de las lipasas usadas en la síntesis de triglicéridos estructurados. Ácido grado de cadena media (M); ácido graso de cadena larga (L); ácido graso de cadena corta (C). (Adaptada de Ramírez, 2005; Adamczak, 2004).

Fuente	Selectividad según la longitud del ácido graso	Selectividad posicional
<i>Alcaligenes sp.</i>	No selectiva	1,3 >> 2
<i>Aspergillus niger</i>	No selectiva	1,3 >> 2
<i>Candida antarctica</i>	M y L > C	2
Enzima de páncreas de cerdo	C > M y L	1,3
<i>Humicola lanuginosa</i>	No selectiva	1,3 >> 2
<i>Mucor javanicus</i>	M y L >> C	1,3 > 2
<i>Penicillium camembertii</i>	No selectiva	2
<i>Penicillium roquefortii</i>	C y M >> L	1,3
<i>Pseudomonas cepacia</i>	No selectiva	1,3 > 2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	M y L > C	1,3 > 2
<i>Pseudomonas sp.</i>	No selectiva	1,3 > 2
<i>Rhizomucor miehei</i>	C > M y L	1 > 3 >> 2
<i>Rhizopus arrhizus</i>	C y M > L	1,3
<i>Rhizopus delemar</i>	M y L > C	1,3 >> 2
<i>Rhizopus oryzae</i>	M y L > C	1,3 >> 2

## 8.2. Síntesis enzimática de lípidos estructurados en una única etapa

En la producción de lípidos estructurados se utilizan lipasas para que catalicen la hidrólisis de glicéridos en presencia de agua o la síntesis a través de esterificaciones (reacción inversa de la hidrólisis) (Akoh *et al.*, 2002). A través de esta reacción de síntesis enzimática se puede llevar a cabo una esterificación en la que los ácidos grasos libres reaccionan con glicerol para producir lípidos estructurados (Akoh y Kim, 2017). Mediante esta reacción se han sintetizado triglicéridos estructurados utilizando concentrados de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos a partir de las microalgas *Phaeodactylum tricorutum* y *Porphyridium cruentum* y glicerol en una relación 1,2:3 (v/p) (Robles *et al.*, 1999). La reacción se realizó en un matraz con agitación magnética a 50°C, a una velocidad de agitación de 200 rpm y usando como catalizador la lipasa Novozym 435 de *Candida antarctica* y hexano como disolvente. Así se obtuvieron triglicéridos con un 42,5% de ácido eicosapentaenoico con un rendimiento del 96,5% a partir del aceite de *P. tricorutum* y triglicéridos que contenían un 43,4% de ácido araquidónico y un 45,6% de EPA con un rendimiento del 89,3% a partir del concentrado de PUFAs de *P. cruentum* (Robles *et al.*, 1999).

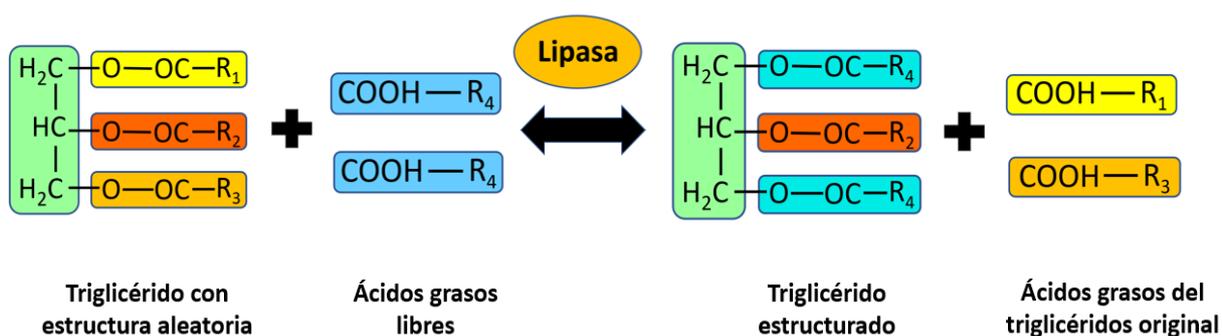
Además de la esterificación, las lipasas pueden catalizar otras reacciones de síntesis, como las reacciones de interesterificación, acidólisis y alcoholisis (Speranza y Macedo, 2012). Estas reacciones consisten en un intercambio de ácidos grasos, en el que ocurrirá un tipo de reacción dependiendo de

si se intercambian los ácidos grasos entre aceite-aceite (interesterificación), aceite-ácido graso (acidólisis) o aceite-alcohol (alcoholisis) (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).

Entre los factores que influyen en estos procesos enzimáticos destacan: el tipo de lipasa utilizada, la composición del sustrato, la cantidad de agua en el sistema, las concentraciones de los sustratos, la carga de lipasa, el modo de operación, la temperatura de reacción, el medio de reacción y la acil-migración (Zam, 2015; Korma, *et al.*, 2018). Entre ellos, la acil-migración es uno de los factores que hay que tener bajo un mayor control porque afecta de manera muy negativa al rendimiento del proceso, aunque una de las alternativas para minimizar este problema es realizar el proceso en dos pasos (Rodríguez *et al.*, 2012). Generalmente esta reacción implica la migración espontánea de grupos acilo desde la posición central *sn-2* a las posiciones extremas *sn-1,3*, aunque también puede ocurrir la migración en sentido contrario (Akoh *et al.*, 2002). Esta reacción secundaria modifica la posición de los ácidos grasos en el triglicérido estructurado que se desea sintetizar. Además, es inevitable que se produzca durante la síntesis enzimática, por lo que no solo se sintetizará el producto buscado, sino que también se producirán lípidos estructurados indeseables (Ferreira-Dias *et al.*, 2013). Por otro lado, la cantidad de agua en el sistema supone también un factor importante a controlar, ya que una acumulación de agua puede provocar la hidrólisis del producto, afectando al rendimiento de la reacción (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017; Abed *et al.*, 2016). Por esta razón, en las reacciones de síntesis, como la esterificación, el agua debe eliminarse a medida que se va formando en el sistema (Akoh y Kim, 2017).

### 8.2.1. Síntesis de lípidos estructurados mediante acidólisis

La acidólisis consiste en el intercambio de grupos acilo entre un ácido y un éster (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017; Figura 9). Esta reacción permite obtener triglicéridos estructurados a través de la incorporación de nuevos ácidos grasos a acilglicéridos (Willis *et al.*, 2017).



**Figura 9.** Esquema representativo de una reacción de acidólisis entre un acilglicérido y ácidos grasos libres. (Adaptada de Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).

Una de las ventajas que presentan las reacciones de acidólisis es que permiten predecir la composición del producto de reacción de una forma fácil, por lo que se usan con bastante frecuencia para obtener triglicéridos estructurados (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017). Las principales desventajas

de esta reacción son la necesidad de purificar los productos finales y la necesidad de saponificar los aceites para obtener ácidos grasos libres previamente (Ferreira-Dias y Tecelão, 2014).

A través de esta reacción se han obtenido triglicéridos estructurados ricos en ácidos grasos insaturados a partir de aceite de *Schizochytrium sp.* y ácidos grasos libres ricos en ácido oleico (Wang *et al.*, 2015). En este trabajo se optimizó la reacción modificando algunas condiciones de reacción como la cantidad de lipasa, la relación entre la cantidad de los sustratos utilizados y la temperatura de reacción. Para hallar las condiciones óptimas se llevó a cabo la reacción a escala de laboratorio en matraces con agitación magnética en los que se sintetizó el lípido estructurado a 60°C, 65°C y 70°C; se utilizó una relación molar de aceite de *Schizochytrium sp.* y de ácidos grasos libres de 1:1, 1:3 y 1:5, y una carga de lipasa con respecto al peso total de los sustratos del 3%, 5%, 7% y del 9%. Cada una de estas reacciones se llevó a cabo con la lipasa inmovilizada Lipozyme RM IM de *R. miehei* en un medio libre de disolventes y con agitación constante a 200 rpm durante 6 horas. Tras los experimentos se determinó que las condiciones óptimas de reacción eran: una temperatura de 65°C, una carga de lipasa del 7% y una relación molar entre el aceite de microalga y los ácidos grasos libres de 1:3 (Wang *et al.*, 2015). Bajo estas condiciones, los triglicéridos contenidos en el aceite de la microalga *Schizochytrium sp.* se convirtieron en el lípido estructurado buscado con un rendimiento del 93% y su contenido en ácidos grasos insaturados aumentó del 70,2% al 90,9% en las posiciones *sn*-1,3. El lípido estructurado obtenido en este estudio tiene gran utilidad para su uso en las formulaciones de alimentos infantiles en las que se quiere aportar los beneficios de los ácidos grasos insaturados. Para ello, estos lípidos estructurados se pueden mezclar con otras grasas teniendo en cuenta la composición química de la grasa de la leche humana (Wang *et al.*, 2015).

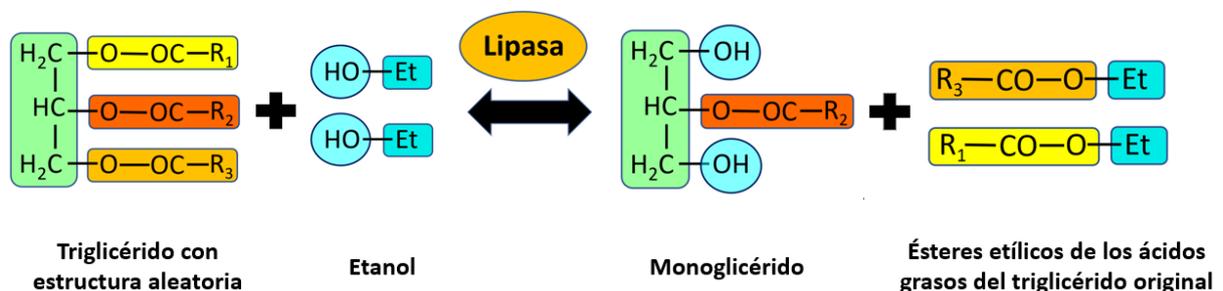
En otro estudio también se obtuvieron lípidos estructurados a partir de microalgas para su uso como sustitutos de grasa de la leche humana (He *et al.*, 2017). En este caso se sintetizaron triglicéridos estructurados con ácido palmítico en posición *sn*-2 y con cuatro tipos de ácidos grasos libres omega-3 en posición *sn*-1,3. Para realizar la reacción se usó un aceite de la microalga *Nannochloropsis oculata*, con un alto contenido en triacilgliceroles ricos en ácido palmítico en la posición *sn*-2, y ácidos grasos libres ricos en  $\alpha$ -linolénico, ácido estearidónico, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) procedentes de la microalga *Isochrysis galbana*. En esta reacción se empleó una relación molar ácidos grasos libres/triglicéridos de 3:1. La síntesis se llevó a cabo en matraces agitados a 200 rpm, sin disolvente y catalizando la reacción con cuatro lipasas inmovilizadas diferentes: Novozym 435, Lipozyme 435, TL-IM y RM-IM; las temperaturas de reacción ensayadas fueron 40°C, 50°C, 60°C y 65°C, y los tiempos de reacción fueron de 12, 24 y 36 horas para hallar las condiciones óptimas de operación. A partir de este proceso de acidólisis se obtuvieron triglicéridos formados por un 17,12% de ácidos grasos omega-3 y por un 68,13% de ácido palmítico en la posición *sn*-2 en las condiciones óptimas de reacción, que fueron 24 h y 60°C para las reacciones con las enzimas Novozym 435 y Lipozyme TL-IM y de 50°C para las catalizadas por Lipozyme 435 y RM-IM (He *et al.*, 2017).

También se sintetizaron triacilgliceroles estructurados a partir de microalgas para su uso en fórmulas infantiles en un trabajo en el que se comparó una acidólisis realizada en un reactor de lecho

fluidizado en continuo con un reactor de tanque agitado en discontinuo a escala de laboratorio (Wang *et al.*, 2016). Para llevar a cabo la síntesis de triglicéridos con ácido palmítico en posición *sn*-2 y ácidos grasos omega-3 en posición *sn*-1,3 se utilizaron ácidos grasos libres obtenidos a partir de aceite de *Schizochytrium sp.* y tripalmitina en una proporción molar de 1:7. Estos autores comprobaron que con una proporción mayor de ácidos grasos libres del aceite de microalga se acidificaba la fase acuosa que rodea la lipasa y se inhibe la enzima (Wang *et al.*, 2016). También se utilizó como biocatalizador la lipasa Lipozyme RM IM y hexano como disolvente. Las reacciones se realizaron a 60°C y a una agitación de 180 rpm en el tanque agitado. Tras los procesos de síntesis se obtuvo un rendimiento del 74,7% en la reacción llevada a cabo en el tanque agitado en discontinuo y un rendimiento del 81,3% en la reacción realizada en el reactor de lecho fluidizado. Además del mayor rendimiento del producto observado en la reacción llevada a cabo en el reactor de lecho fluidizado, también se observó que el tiempo de reacción se redujo en un 87,5% en comparación con el necesario en un reactor por lotes y que los tiempos de reutilización de la lipasa aumentaron 2,25 veces en comparación con el del reactor discontinuo (Wang *et al.*, 2016). Esto se debe a que la agitación violenta de la mezcla en el reactor discontinuo puede degradar la lipasa, lo que reduce su actividad y su posibilidad de reutilización (Schwab *et al.*, 2009). Además, la reacción en un reactor discontinuo provoca el deterioro oxidativo del aceite, lo que limita la comercialización de los productos (Dimakou *et al.*, 2007). Por ello, a pesar de que la síntesis de lípidos estructurados en un reactor discontinuo es un método simple y fácil de escalar y operar, el proceso en un reactor de lecho fluidizado permite la obtención en lípidos estructurados de mayor calidad y eficiencia, lo que se traduce en un proceso más rentable para producir productos de alto valor a partir de microalgas (Wang *et al.*, 2016).

### 8.2.2. Síntesis de lípidos estructurados mediante alcoholisis

La alcoholisis es el intercambio de un ácido graso entre un éster y un alcohol (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017). En la síntesis de lípidos estructurados, esta reacción se utiliza para provocar la transferencia de grupos acilo de un triacilglicérido a un alcohol para producir monoglicéridos y diglicéridos (Willis *et al.*, 2017; Figura 10).



**Figura 10.** Esquema representativo de una reacción de alcoholisis entre un triglicérido y etanol. (Adaptada de Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).

Una de las ventajas que presenta esta reacción enzimática es que supone un método eficaz y ecológico para la síntesis de lípidos estructurados (Tang *et al.*, 2015). A pesar de ello, este proceso tiene la desventaja de que se puede producir una desactivación de la lipasa causada por un exceso de alcohol en el sistema, derivado del alcohol agregado en la reacción o del glicerol producido por la hidrólisis de los acilglicéridos (Zhang *et al.*, 2018). Otro problema de este tipo de reacción es la facilidad con la que se produce la migración del grupo acilo desde la posición 2 del monoglicérido a las posiciones 1 o 3; esta migración puede ser catalizada por el soporte de inmovilización de la lipasa, los disolventes o las altas temperaturas, entre otros factores (Esteban *et al.*, 2009).

La reacción de alcoholisis enzimática se usa en la producción de monoglicéridos y diglicéridos como productos con utilidades en la industria alimentaria o como una base para la síntesis de triglicéridos estructurados simétricos en procesos en dos etapas (Irimescu *et al.*, 2002).

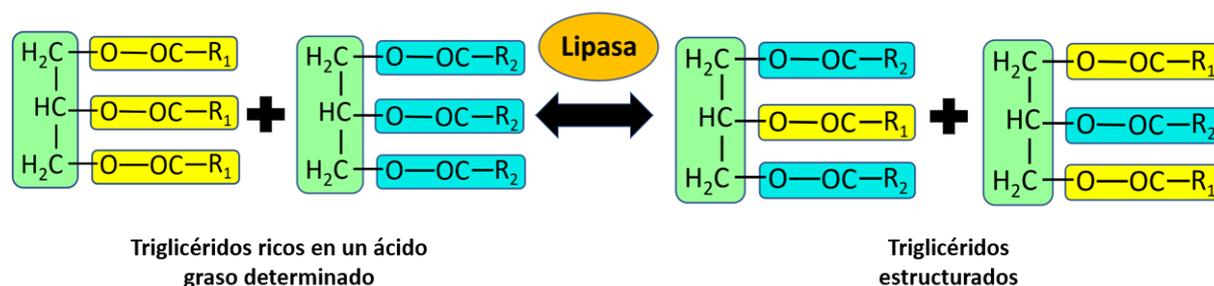
A través de esta reacción se ha sintetizado 2-docosahexaenoilglicerol a partir de aceite de *Schizochytrium sp.* con un contenido en DHA del 48% (Zhang *et al.*, 2018). El porcentaje de DHA ubicado en posición *sn*-2 supone un 61% de los ácidos grasos ubicados en esa posición en el aceite de partida, lo que permite escindir los ácidos grasos en las posiciones *sn*-1,3 de los triglicéridos para sintetizar este 2-MAG a través de una alcoholisis. Para estudiar el efecto de la proporción de aceite y etanol en el rendimiento de la reacción, se llevaron a cabo reacciones con aceite de *Schizochytrium sp.* y etanol anhidro en una proporción molar de 1:2, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60 y 1:90. También se intentó optimizar el proceso estudiando el efecto de la temperatura y el tiempo de reacción, así como el tipo y la carga de lipasa utilizada. Para ello se realizó la operación a 25, 30, 35 y 40°C y durante 2, 4, 6, 8 y 12 horas. Además, se catalizó la reacción utilizando 5 lipasas diferentes: Novozym 435 y Lipozyme 435 de *Candida antarctica*, Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* y la lipasa NS 40086 de *Aspergillus oryzae*; y se utilizaron cargas de lipasa del 6%, 8%, 10%, 12% y 14%. Estas reacciones se llevaron a cabo en matraces con agitación magnética a 300 rpm y sin utilizar disolventes orgánicos. Tras el estudio se concluyó que las condiciones óptimas para realizar esta alcoholisis son utilizar Lipozyme 435 como catalizador de la reacción, una temperatura de 30°C, una relación molar de aceite de microalga y etanol de 1:60, una carga de lipasa del 8% (p/p) y una duración de 2 horas. En estas condiciones se obtuvo un aceite con un contenido de 2-docosahexaenoilglicerol del 31%, que podría utilizarse para sintetizar triglicéridos estructurados simétricos con DHA en posición *sn*-2 (Zhang *et al.*, 2018).

En otro trabajo también se realizó una alcoholisis para producir 2-monoacilgliceroles ricos en omega-3, donde los principales ácidos grasos poliinsaturados omega-3 que portaban estos acilglicéridos fueron el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Esteban *et al.*, 2009). Además, en este estudio se comparó la síntesis de estos lípidos estructurados realizada en un tanque agitado y en un reactor de lecho empacado, así como el modo de operación de cada biorreactor. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y etanol absoluto en una proporción molar de 1:79. Para catalizar las reacciones se usó la lipasa Novozym 435 inmovilizada y se utilizó acetona como disolvente. Las reacciones se realizaron a 35°C y con agitación constante a 300 rpm en el caso del biorreactor de tanque agitado. El mayor

rendimiento de 2-monoglicérol fue del 65% y se obtuvo en la reacción realizada en el tanque agitado operado en modo discontinuo. Utilizando el mismo tipo de biorreactor, pero operando en modo continuo, se alcanzó un rendimiento del 53%, mientras que realizando la reacción en un reactor de lecho empacado se logró un 52,6% de rendimiento operando en modo continuo y un 36% de rendimiento en modo discontinuo. La razón por la que la reacción realizada en el tanque agitado en modo discontinuo haya obtenido un mejor rendimiento, se debe a que la velocidad de la reacción es mayor en este biorreactor y porque la degradación de los 2-monoglicéridos a glicerina debido a la acil-migración comienza a tiempos mayores (Esteban et al., 2009).

### 8.2.3. Síntesis de lípidos estructurados por interesterificación

La síntesis de triglicéridos estructurados mediante reacciones de interesterificación se lleva a cabo a través de intercambios de ácidos grasos entre acilglicéridos, alterando así la composición química y las propiedades físicas de las grasas interesterificadas (Willis *et al.*, 2017; Figura 11). Estas reacciones de intercambio de grupos acilo tienen algunas desventajas, como la dificultad de controlar y predecir la composición y la estructura del producto final debido, entre otras cosas, al alto grado de acil-migración que ocurre durante la reacción (Ferreira-Dias y Tecelão, 2014). Por ello, esta reacción apenas se emplea en la obtención de triglicéridos estructurados con una composición en ácidos grasos y una estructura muy específica (Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).



**Figura 11.** Esquema representativo de una reacción de interesterificación entre dos moléculas triacilglicéridos. (Adaptada de Şahin-Yeşilçubuk y Akoh, 2017).

La reacción de interesterificación ha sido utilizada en la síntesis de triglicéridos estructurados análogos a la grasa de margarina, pero libres de grasas trans (Pande y Akoh, 2013). Para realizar esta reacción se utilizó una mezcla de un aceite con triglicéridos ricos en ácido linoleico (L) y ácido esteárico y un aceite con triglicéridos ricos en ácido palmítico (P) y ácido oleico (O) en una proporción molar de 2:1. La interesterificación se llevó a cabo en un tanque agitado en discontinuo a escala de laboratorio con una agitación de 200 rpm y utilizando hexano como disolvente. Además, se realizó la reacción utilizando dos lipasas inmovilizadas diferentes: Novozym 435 y Lipozyme TL IM. Las condiciones de operación para la reacción catalizada por Novozym 435 fueron de 50°C y un tiempo de reacción de 20 h, y de 57°C y 6,5 h de duración para la reacción con Lipozyme TL IM. Tras la finalización de ambos procesos, se obtuvieron aceites con un 28,5% de triglicéridos con estructura POP (palmítico-oleico-palmítico) y un 16,3% con forma PLP (palmítico-linoleico-palmítico) de la reacción catalizada por

Novozym 435 y aceites con un 26,6% de triglicéridos con la forma POP y un 17,5 % con la forma POL de la reacción catalizada por Lipozyme TL IM. Estas reacciones lograron alcanzar un rendimiento del 87,3% para la reacción catalizada por Novozym 435 y un rendimiento del 94,8% en la que se usó Lipozyme TLIM. Estas grasas que contienen perfiles de triglicéridos muy diversos y con una gran diversidad de ácidos grasos con longitudes de cadena diferente, tienden a cristalizar de la misma forma que las grasas que componen las margarinas (Ribeiro *et al.*, 2009). Por ello, estos lípidos estructurados pueden utilizarse en la producción de margarina libre de grasas trans y en la formulación alimentos libres de grasas trans en la industria alimentaria (Pande y Akoh, 2013).

En otro trabajo también se utilizó una interesterificación para sintetizar triacilglicéridos ricos en ácidos grasos de cadena corta y de cadena larga utilizando triacetina y ésteres metílicos de ácido oleico en una proporción molar de 3:1 (Cao *et al.*, 2013). Tras optimizar las condiciones de reacción, se llevó a cabo la síntesis en un matraz con agitación a 300 rpm y sin usar disolventes. Además, la reacción se catalizó con la lipasa Novozyme 435 a una temperatura de 50°C, con una carga de lipasa del 4% (p/v) y durante 24 horas. En estas condiciones se sintetizó un aceite con un 52,4 % de triacilglicéridos con dos ácidos grasos de cadena corta y uno de cadena larga formados por un 57% de ácido oleico y un 29% de ácido acético (C2:0). Estos lípidos estructurados componen unos aceites bajos en calorías que podrían usarse en la industria alimentaria o como un aceite funcional para suprimir la obesidad inducida por una alta ingesta de grasas (Cao *et al.*, 2013).

### **8.3. Síntesis enzimática de lípidos estructurados en dos etapas**

Los procesos de síntesis enzimática llevados a cabo en dos etapas se basan en la combinación de dos de las reacciones que pueden catalizar las lipasas: esterificación, hidrólisis, alcoholisis, acidólisis e interesterificación (Wang *et al.*, 2019b). Aunque el proceso de dos etapas más típico consiste en realizar una primera etapa de alcoholisis y una segunda etapa de esterificación (Irimescu *et al.*, 2002).

Estos procesos de síntesis en dos etapas son útiles para la producción de triglicéridos simétricos, ya que es difícil lograr rendimientos altos en la producción estos triglicéridos en un proceso de una única etapa (Irimescu *et al.*, 2002). Por otro lado, estos procesos permiten aprovechar la selectividad que presentan algunas lipasas a diferentes ácidos grasos en reacciones de acidólisis, esterificación e hidrólisis, combinando estas reacciones en un proceso (He *et al.*, 2016). Además, los procesos en dos etapas suponen una ventaja frente a los procesos llevados a cabo en un único paso porque permiten obtener lípidos estructurados con un mayor grado de pureza y en un tiempo menor (Wang *et al.*, 2019b; Li *et al.*, 2017). Esto se debe a que estos procesos tienen una mayor tasa de incorporación de ácidos grasos específicos y una tasa más baja de migración de grupos acilo; además el producto final se purifica de una manera más sencilla (Soumanou *et al.*, 2013). Por ello, mediante los procesos en dos etapas se alcanzan rendimientos más altos que en los procesos formados por una etapa única (He *et al.*, 2018).

Este tipo de proceso ha sido utilizado para producir triacilgliceroles estructurados de tipo MLM, con ácido caprílico en las posiciones *sn*-1,3 y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la posición *sn*-2, a partir de aceite de *Isochrysis galbana* (He *et al.*, 2018). En la primera etapa se realizó una alcoholisis de los triglicéridos contenidos en el aceite de microalgas para la producción de 2-monoacilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga. Esta reacción se llevó a cabo en un tanque agitado a escala de laboratorio operando en discontinuo, con una agitación de 400 rpm, a 25°C, y durante 12 horas. Como mezcla de reacción se utilizó una mezcla de etanol anhidro y aceite de microalgas en una proporción molar de 24:1, y Lipozyme TL IM como catalizador, con una carga del 5% del peso de los reactivos. En estas condiciones, se alcanzó un rendimiento de 2-monoaglicerol del 36,08%. Tras la alcoholisis, se centrifugó el producto de la reacción a 5000 rpm durante 10 minutos para eliminar la lipasa inmovilizada. Posteriormente, se purificaron los monoglicéridos contenidos en la disolución producto de la centrifugación en mezclas etanol-agua en una relación 9:1 (v/v) y tres extracciones sucesivas de los monoglicéridos con hexano. A partir de este proceso de purificación se logró una pureza de monoglicéridos del 91,57% (He *et al.*, 2018).

Una vez obtenido un aceite con una alta concentración en 2-monoglicéridos, se llevó a cabo la segunda reacción, que consiste en una esterificación en la que se utilizó el aceite obtenido en el paso anterior y una mezcla de ácidos grasos libres rica en ácido caprílico en una proporción molar de 1:3. Esta reacción se realizó en matraces con agitación magnética, a 40°C, durante 24 horas y con una carga de lipasa del 10%. Además, se usó como catalizador la lipasa Lipozyme TL IM (con especificidad posicional *sn*-1,3) utilizada en la alcoholisis y se realizó la operación en ausencia de disolventes y utilizando hexano, para conocer la opción con la que se logra un mayor rendimiento (He *et al.*, 2018). Tras el experimento se obtuvo un rendimiento en el triglicérido estructurado de tipo MLM del 32,27% en la reacción realizada sin disolventes y un 60,52% en la reacción en la que se usó hexano. Este mayor rendimiento obtenido en la reacción con hexano se puede deber a que el hexano juega un papel crítico en el aumento de la solubilidad de los sustratos (Soumanou *et al.*, 2013), a la disminución de la viscosidad de la mezcla de reacción (Rodríguez *et al.*, 2012) y a que el hexano contribuye al desplazamiento de la reacción enzimática hacia la síntesis del triglicérido estructurado (Wei *et al.*, 2015). Los triglicéridos obtenidos tienen un gran potencial para su uso en alimentación infantil y para el desarrollo de productos de alto valor para personas adultas (He *et al.*, 2018).

En otro estudio también se utilizó un proceso de dos etapas para la producción de triglicéridos con estructura MLM, con la diferencia de que se aplicaron ultrasonidos en la segunda reacción enzimática (Wang *et al.*, 2019a). Este bioproceso consta de un primer paso de alcoholisis en el que se sintetizaron 2-monoacilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga y un segundo paso de esterificación de los 2-monoacilglicéridos obtenidos con ácido caprílico. En la reacción de alcoholisis de los triacilgliceroles se utilizó una mezcla de aceite de microalgas, aceite de colza, aceite de coco y aceite de palma en una proporción 0,39:0,35:0,22:0,03 (p/p/p/p) y etanol seco en una proporción molar de 1:3. Esta reacción se ha realizado en un matraz agitado y utilizando Lipozyme RM IM inmovilizada como biocatalizador. Además, se llevó a cabo a 40°C, con una agitación de 200 rpm y durante 5 horas. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento en 2-monoglicéridos de más del 45%. Tras la alcoholisis se centrifugaron los productos de reacción a 6000 rpm durante 6 min para

eliminar el biocatalizador y el producto centrifugado se añadió a una mezcla hidroalcohólica (9:1 v/v) y hexano para purificar los 2-monoacilglicéridos producidos en la reacción. Después de este proceso se obtuvieron 2-monoacilglicéridos con distintos ácidos grasos en la posición *sn*-2: oleico, eicosapentaenoico, docosahexaenoico, esteárico y palmítico, con una pureza de más del 90%.

En la segunda etapa del bioproceso se produjeron triglicéridos estructurados del tipo MLM por esterificación de los 2-monoacilglicéridos con ácido caprílico aplicando ultrasonidos durante la reacción enzimática. Para ello se llevó a cabo una esterificación catalizada por Lipozyme TL IM, reutilizada de la reacción anterior, en matraces agitados magnéticamente a 200 rpm. En esta reacción se utilizó una mezcla de los monoglicéridos obtenidos en la alcoholisis y ácidos grasos libres ricos en ácido caprílico en una proporción de 1:1,5 (p/p) y hexano como disolvente. Además, se realizaron diferentes reacciones utilizando ultrasonidos con potencias de 50, 100, 150, 200 y 250 W y frecuencias de 20, 25, 30, 35 y 40 KHz y en ausencia ultrasonidos. También se realizó la esterificación a diferentes temperaturas (30, 35, 40, 45, 50 y 55°C) y durante 1, 2, 3 y 4 horas (Wang *et al.*, 2019a). Tras estudiar el efecto de estas variables en la reacción, se decidió que las condiciones óptimas de reacción se consiguen con una intensidad ultrasónica de 150 W, una frecuencia de ultrasonido de 30 KHz y realizando la reacción a 35°C y durante 4 horas. Bajo estas condiciones se obtuvieron triglicéridos con estructura MLM con un rendimiento cercano al 65% que pueden utilizarse en nutrición enteral y parenteral.

Una vez evaluados los efectos del tratamiento ultrasónico en la síntesis de triglicéridos con estructura MLM, estos autores concluyeron que el tratamiento con ultrasonidos aumenta la actividad y la solubilidad de la lipasa, lo que redujo el tiempo de reacción y mejoró el rendimiento de síntesis de los lípidos MLM (Wang *et al.*, 2019a). Sin embargo, se observó que la actividad de Lipozyme RM IM disminuyó después de su cuarto ciclo, en comparación con la reacción sin tratamiento ultrasónico. Además, este tratamiento aumentó la frecuencia de contacto entre la lipasa y los ácidos grasos libres, reduciendo así la cantidad de lipasa en la reacción (Wang *et al.*, 2019a). Esto logró incrementar la tasa de inserción de ácidos grasos en los acilglicéridos y permitió reducir la temperatura de reacción óptima del proceso, en comparación con el método convencional (Wang *et al.*, 2019a).

En otro estudio se llevaron a cabo dos etapas de acidólisis para producir triglicéridos estructurados con ácido palmítico en la posición *sn*-2 y ácido oleico en las posiciones *sn*-1,3 (Wang *et al.*, 2019b). Además, se comparó este proceso con otro en el que se realizó una acidólisis en una única etapa, bajo las mismas condiciones que el proceso en dos etapas. Para llevar a cabo estas reacciones se utilizaron como materia prima ácidos grasos libres ricos en ácido oleico y un aceite rico en tripalmitina en una proporción de 0,3:1 (p/p) y Lipozyme RM IM como biocatalizador. La primera acidólisis del proceso en dos etapas se realizó en un matraz agitado sin disolventes, a 300 rpm y a 60°C durante 6 horas. Tras esta primera reacción, se eliminó la lipasa del producto de reacción por filtración y los ácidos grasos libres por extracción con mezclas hidroalcohólicas y hexano. Tras este proceso se obtuvieron los triglicéridos contenidos en el producto de la reacción totalmente puros. En la segunda etapa de acidólisis, se mezclaron los triglicéridos sintetizados en el paso anterior con

ácido oleico adicional, en las mismas condiciones de reacción que en la primera acidólisis. Además, se utilizó la lipasa reciclada de la primera etapa de acidólisis. En estas condiciones se obtuvieron triglicéridos estructurados con un 68,7% de ácido palmítico en la posición *sn*-2 y un contenido total de ácido oleico del 53,5% con un rendimiento del 71,8%.

El estudio comparativo entre este proceso de dos etapas y el realizado en una única etapa, demostró que la síntesis de 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerol (OPO) en dos pasos es más efectiva que la síntesis en un único paso (Wang *et al.*, 2019b). Esto se debe a que en la acidólisis en dos pasos había menos inhibición por el producto que en el proceso en un único paso, ya que en el proceso en dos etapas se elimina el ácido palmítico formado durante la reacción. Esto permite a la lipasa esterificar el ácido oleico de forma preferente en las posiciones *sn*-1,3 (Wang *et al.*, 2019b).

También se ha utilizado un proceso de dos etapas para la síntesis de 1,3-docosahexenoil-2-palmitoilglicerol (DPD) a partir de aceite de microalgas, para su uso como ingrediente funcional en alimentos saludables y productos nutraceuticos (Liu *et al.*, 2015). En la primera etapa se realizó una reacción de alcoholisis, para sintetizar tripalmitina, usando una relación molar 5:1 glicerina:palmitato de etilo, obtenido a partir de aceite de *Schizochytrium sp.* Esta reacción se realizó en un biorreactor de tanque agitado en discontinuo a escala de laboratorio y se catalizó con la lipasa Novozym 435 inmovilizada, con una carga del 10% del peso de los reactivos. El reactor operó a 65°C, con una agitación de 200 rpm y durante 17 horas. Al finalizar la alcoholisis, se filtró al vacío el producto de la reacción y se eliminaron los ésteres de ácidos grasos libres mediante destilación molecular, obteniendo la tripalmitina con una pureza de más del 85%.

En la segunda etapa del proceso se sintetizó un triglicérido de tipo DPD mediante acidólisis. Para ello, se utilizó la tripalmitina producida en la primera etapa y ácidos grasos libres obtenidos de un aceite rico en DHA de *Schizochytrium sp.*, en una relación molar de 1:9; como catalizador se empleó la lipasa Lipozyme RM IM inmovilizada. El DHA utilizado como dador de grupos acilo se usó en forma de ácidos grasos libres y también en forma de ésteres etílicos. Además, se realizó la reacción en un tanque agitado en discontinuo, con una agitación de 200 rpm y realizando la reacción con hexano y en ausencia de disolventes. También se llevó a cabo la operación a 40, 50, 60 y 70°C y durante diferentes tiempos de reacción (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas). A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que se obtienen mejores rendimientos sin utilizar disolventes y utilizando un tiempo de reacción de 10 horas y una temperatura de 60°C. Además, se obtuvieron mayores tasas de incorporación de DHA y menores tasas de acil-migración utilizando ésteres etílicos del ácido graso dador de grupos acilo (DHA) que utilizando los ácidos grasos libres (Liu *et al.*, 2015). Realizando la reacción bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento del 87,24% en triglicéridos con un 51,6% de ácido palmítico y un 30,13% de ácido docosahexaenoico.

## 9. Bibliografía

Abed, S., Ali, A., Noman, A., Niazi, S., Ammar, A. y Bakry, A. (2016). Structured lipids: Enzymatic synthesis, health benefits and nutraceutical characteristics - A Review. *International Journal of Research in Agricultural*, volumen 3, número 4, págs. 206-215.

Abou-Shanab, R., Matter, I., Kim, S., Oh, Y., Choi, J. y Jeon, B. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and bioenergy*, volumen 35, número 7, págs. 3079-3085.

Adamczak, M. (2004). The application of lipases in modifying the composition, structure and properties of lipids-a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, volumen 13, número 1, págs. 3-10.

Akoh, C. y Kim, B. (2017). Structured lipids. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, Akoh, C., editorial Taylor & Francis, Boca Ratón (EE.UU.), cuarta edición, págs. 941-972.

Akoh, C., Sellappan, S., Fomuso, L. y Yankah, V. (2002). Enzymatic synthesis of structured lipids. *Lipid biotechnology*, Kuo, T. y Gardner, H., editorial CRC Press, Nueva York (EE.UU.), primera edición, págs. 430-457.

Aldaw, N., Haroun, M., Nasser, M. y Mousa, Y. (2018). Isolation and ultra-purification of oleic acid extracted from olive oil using urea crystallization. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, volumen 11, número 2, págs. 624-627.

Alfieri, A., Imperlini, E., Nigro, E., Vitucci, D., Orrù, S., Daniele, A., Buono, P. y Mancini, A. (2018). Effects of plant oil interesterified triacylglycerols on lipemia and human health. *International journal of molecular sciences*, volumen 19, número 1.

Alhattab, M., Kermanshahi-Pour, A. y Brooks, M. (2019). Microalgae disruption techniques for product recovery: influence of cell wall composition. *Journal of Applied Phycology*, volumen 31, número 1, págs. 61-88.

Altenhofen, M., Barbosa, G., Brito, C., Arjonilla, L., Gaspar, R. y Kieckbusch, T. (2017). Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volumen 92, número 3, págs. 573-579.

Auerbach, M., Klemann, L. y Heydinger, J. (2001). Reduced-energy lipids. *Structured and modified lipids*, Gunstone, F., editorial CRC Press, Nueva York (EE.UU.), primera edición, págs. 485-510.

Barman, N., Satpati, G., Senroy, S., Khatoon, N., Sen, R., Kanjilal, S. y Pal, R. (2012). Mapping algae of Sundarban origin as lipid feedstock for potential biodiesel application. *Journal of Algal Biomass Utilization*, volumen 3, número 2, págs. 42-49.

Bart, J., Palmeri, N. y Cavallaro, S. (2010). Feedstocks for biodiesel production. *Biodiesel Science and Technology*, Bart, J., Palmeri, N. y Cavallaro, S., editorial CRC Press, Boca Ratón (EE.UU.), séptima edición, págs. 130-225.

Beacham, T., Bradley, C., White, D., Bond, P. y Ali, S. (2014). Lipid productivity and cell wall ultrastructure of six strains of *Nannochloropsis*: implications for biofuel production and downstream processing. *Algal research*, volumen 6, págs. 64-69.

Bernaerts, T., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. y Van Loey, A. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal research*, volumen 32, número 1, págs. 150-161.

Bernhoft, A. (2010). A brief review on bioactive compounds in plants. *Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals*, Bernhoft, A., The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo (Noruega), volumen 50, págs. 11-17.

Bligh, E. y Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, volumen 37, número 8, págs. 911-917.

Cao, Y., Qi, S., Zhang, Y., Wang, X., Yang, B. y Wang, Y. (2013). Synthesis of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification of triacetin with camellia oil methyl esters and preliminary evaluation of their plasma lipid-lowering effect in mice. *Molecules*, volumen 18, número 4, págs. 3733-3744.

Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. y Marty, A. (2012). Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases*, Sandoval, G., editorial Humana Press, Hertfordshire (Reino Unido), primera edición, págs. 3-30.

Castejón, N. y Señoráns, F. (2020). Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil, algae and other new omega-3 sources: a review. *New Biotechnology*, volumen 57, págs. 45-54.

Cheirsilp, B. y Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, volumen 110, págs. 510-516.

Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R., Drogui, P. y Surampalli, R. (2018). The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volumen 90, págs. 336-346.

Cheng, C., Du, T., Pi, H., Jang, S., Lin, Y. y Lee, H. (2011). Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology*, volumen 102, número 21, págs. 10151-10153.

D'Alessandro, E. y Antoniosi, N. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volumen 58, págs. 832-841.

D'hondt, E., Martin-Juarez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K. y Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. *Microalgae-based biofuels and bioproducts*, Gonzalez-Fernandez C. y Muñiz, R., editorial Woodhead Publishing, Duxford (Reino Unido), primera edición, págs. 133-154.

Da Silva, R., Soares, D., Lourenço, M., Soares, F., Da Silva, K., Gonçalves, M. y Gioielli, L. (2010). Structured lipids obtained by chemical interesterification of olive oil and palm stearin. *LWT-Food Science and Technology*, volumen 43, número 5, págs. 752-758.

- De Bhowmick, G., Koduru, L. y Sen, R. (2015). Metabolic pathway engineering towards enhancing microalgal lipid biosynthesis for biofuel application - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volumen 50, número 1, págs. 1239-1253.
- Deshmukh, S., Kumar, R. y Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. *Fuel Processing Technology*, volumen 191, págs. 232-247.
- Dimakou, C., Kiokias, S., Tsaprouni, I. y Oreopoulou, V. (2007). Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophysics*, volumen 2, número 38.
- Dorval, N., Parisien, A., Wang, B. y Lan, C. (2009). Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of biotechnology*, volumen 141, número 1-2, págs. 31-41.
- Druschky, K. y Pscheidl, E. (2000). Different effects of chemically defined structured lipids containing  $\omega$ 3 or  $\omega$ 6 fatty acids on nitrogen retention and protein metabolism in endotoxemic rats. *Nutrition Research*, volumen 20, número 8, págs. 1183-1192.
- El-Kassas, H. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum sp.* grown under nutrient stress conditions. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, volumen 39, número 4, págs. 233-239.
- Elumalai, S., Sakthivel, R. y Ganesh, S. (2011). Ultrastructural and analytical studies of biodiesel producing microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Senedesmis sp.*) collected from Tamil Nadu, India. *Current Botany*, volumen 2, número 6, págs. 19-25.
- Esteban, L., Muñío, M., Robles, A., Hita, E., Jiménez, M., González, P., Camacho, B. y Molina, E. (2009). Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. *Biochemical Engineering Journal*, volumen 44, número 2-3, págs. 271-279.
- Ferreira, M. y Tonetto, G. (2017). What is the importance of structured triglycerides and diglycerides?. *Enzymatic Synthesis of Structured Triglycerides*, Ferreira, M. y Tonetto, G., editorial Springer, Cham (Suiza), primera edición, págs. 1-16.
- Ferreira-Dias, S. y Tecelão, C. (2014). Human milk fat substitutes: Advances and constraints of enzyme-catalyzed production. *Lipid Technology*, volumen 26, número 8, págs. 183-186.
- Ferreira-Dias, S., Sandoval, G., Plou, F. y Valero, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, volumen 16, número 3.
- Folch, J., Lees, M. y Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, volumen 226, número 1, págs. 497-509.
- Gandhi, N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 74, número 6, págs. 621-634.
- Gao, Y., Yang, M. y Wang, C. (2013). Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource technology*, volumen 147, número 1, págs. 484-491.

- García, Á., Sanz, M., Falkeborg, M., Beltrán, S. y Guo, Z. (2016). Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. *Food chemistry*, volumen 190, págs. 960-967.
- Ghazani, S. (2018). Molecular origins of cocoa butter triclinic polymorphism (Tesis doctoral). Universidad de Guelph, Ontario, Canadá.
- Guo, Y., Cai, Z., Xie, Y., Ma, A., Zhang, H., Rao, P. y Wang, Q. (2020). Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, volumen 19, número 2, págs. 759-800.
- Gupta, R., Rathi, P. y Bradoo, S. (2003). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical reviews in food science and nutrition*, volumen 43, número 6, págs. 635-644.
- Gupta, S., Bhattacharya, A. y Murthy, C. (2013). Tune to immobilize lipases on polymer membranes: techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, volumen 2, número 3, págs. 171-190.
- Halim, R., Danquah, M. y Webley, P. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology advances*, volumen 30, número 3, págs. 709-732.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L. y Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass (Informe de investigación). Wageningen UR Food and Biobased Research, Wageningen, Países Bajos.
- Hashim, S. y Babayan, V. (1978). Studies in man of partially absorbed dietary fats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, volumen 31, número 10, págs. 273-276.
- Hayes, D. (2004). Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 81, número 12, págs. 1077-1103.
- He, Y., Li, J., Guo, Z. y Chen, B. (2018). Synthesis of novel medium-long-medium type structured lipids from microalgae oil via two-step enzymatic reactions. *Process biochemistry*, volumen 68, págs. 108-116.
- He, Y., Li, J., Kodali, S., Chen, B. y Guo, Z. (2016). The near-ideal catalytic property of *Candida antarctica* lipase A to highly concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids in monoacylglycerols via one-step ethanolysis of triacylglycerols. *Bioresource technology*, volumen 219, págs. 466-478.
- He, Y., Qiu, C., Guo, Z., Huang, J., Wang, M. y Chen, B. (2017). Production of new human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis of microalgae oils from *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana*. *Bioresource technology*, volumen 238, págs. 129-138.
- He, Y., Wu, T., Sun, H., Sun, P., Liu, B., Luo, M. y Chen, F. (2019). Comparison of fatty acid composition and positional distribution of microalgae triacylglycerols for human milk fat substitutes. *Algal Research*, volumen 37, págs. 40-50.
- Hita, E. (2007). Obtención de triglicéridos estructurados por acidólisis catalizada con lipasas (Tesis Doctoral). Universidad de Almería, Almería, España.
- Huerlimann, R., De Nys, R. y Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and bioengineering*, volumen 107, número 2, págs. 245-257.

Huynh, L., Kasim, N. y Ju, Y. (2010). Extraction and analysis of neutral lipids from activated sludge with and without sub-critical water pre-treatment. *Bioresource technology*, volumen 101, número 22, págs. 8891-8896.

Ikedo, I., Sasaki, E., Yasunami, H., Nomiya, S., Nakayama, M., Sugano, M., Imaizumi, K. y Yazawa, K. (1995). Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, volumen 1259, número 3, págs. 297-304.

Irimescu, R., Iwasaki, Y. y Hou, C. (2002). Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 79, número 9, págs. 879-883.

Issariyakul, T. y Dalai, A. (2010). Biodiesel production from greenseed canola oil. *Energy & fuels*, volumen 24, número 9, págs. 4652-4658.

Jala, R., Hu, P., Yang, T., Jiang, Y., Zheng, Y. y Xu, X. (2012). Lipases as biocatalysts for the synthesis of structured lipids. *Lipases and phospholipases*, Sandoval, G., editorial Humana Press, Hertfordshire (Reino Unido), primera edición, págs. 403-433.

Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A. y Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, volumen 132, número 1, págs. 23-34.

Jiménez, M., Robles, A., González, P., Esteban, L., Orta, S. y Molina, E. (2020a). Simultaneous extraction and fractionation of lipids from the microalga *Nannochloropsis sp.* for the production of EPA-rich polar lipid concentrates. *Journal of Applied Phycology*, volumen 32, número 1, págs. 1117-1128.

Jiménez, M., Robles, A., Macías, M., Esteban, L., González, P., Navarro, E., Hita, E. y Molina, E. (2020b). Obtaining highly pure EPA-rich lipids from dry and wet *Nannochloropsis gaditana* microalgal biomass using ethanol, hexane and acetone. *Algal Research*, volumen 45.

Kapoor, M. y Gupta, M. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, volumen 47, número 4, págs. 555-569.

Karemore, A., Pal, R. y Sen, R. (2013). Strategic enhancement of algal biomass and lipid in *Chlorococcum infusionum* as bioenergy feedstock. *Algal Research*, volumen 2, número 2, págs. 113-121.

Katchalski-Katzir, E. y Kraemer, D. (2000). Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, volumen 10, número 3, págs. 157-176.

Kaur, S., Sarkar, M., Srivastava, R., Gogoi, H. y Kalita, M. (2012). Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. *New Biotechnology*, volumen 29, número 3, págs. 332-344.

Kim, M., Hwang, H., Nzioka, A. y Kim, Y. (2017). Enhanced lipid extraction from microalgae in biodiesel production. *Hemijaska Industrija*, volumen 71, número 2, págs. 167-174.

- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R. y Sauerwald, T. (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development*, volumen 65, número 2, págs. 3-18.
- Korma, S., Zou, X., Ali, A., Abed, S., Jin, Q. y Wang, X. (2018). Preparation of structured lipids enriched with medium-and long-chain triacylglycerols by enzymatic interesterification for infant formula. *Food and bioproducts processing*, volumen 107, págs. 121-130.
- Kumar, V., Arora, N., Nanda, M. y Pruthi, V. (2019). Different cell disruption and lipid extraction methods from microalgae for biodiesel production. *Microalgae biotechnology for development of biofuel and wastewater treatment*, Asraful, M., Wang, Z., editorial Springer, Singapore, primera edición, págs. 265-292.
- Lama, R. y Moráis, A. (2005). Las grasas en la alimentación infantil. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados. *Anales de pediatría del Hospital Infantil Universitario La Paz*, Madrid (España), volumen 63, número 3, págs. 16-23.
- Li, D., Wang, W., Li, X., Durrani, R., Yang, B. y Wang, Y. (2017). Preparation of highly pure n-3 PUFA-enriched triacylglycerols by two-step enzymatic reactions combined with molecular distillation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 94, número 2, págs. 225-233.
- Li, D., Wang, W., Qin, X., Li, X., Yang, B. y Wang, Y. (2016). A novel process for the synthesis of highly pure n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA)-enriched triglycerides by combined transesterification and ethanolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, volumen 64, número 34, págs. 6533-6538.
- Li, G., Chen, J., Ma, X., Zhang, Z., Liu, N. y Wang, Y. (2018). Enzymatic preparation and facile purification of medium-chain, and medium-and long-chain fatty acid diacylglycerols. *LWT*, volumen 92, págs. 227-233.
- Lin, W., Wu, F., Yue, L., Du, Q., Tian, L. y Wang, Z. (2014). Combination of urea complexation and molecular distillation to purify DHA and EPA from sardine oil ethyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 91, número 4, págs. 687-695.
- Lindgren, B., Ruokonen, E., Magnusson-Borg, K. y Takala, J. (2001). Nitrogen sparing effect of structured triglycerides containing both medium-and long-chain fatty acids in critically ill patients; a double blind randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, volumen 20, número 1, págs. 43-48.
- Liu, Y., Guo, Y., Sun, Z., Jie, X., Li, Z., Wang, J., Wang, Y. y Xue, C. (2015). Production of structured triacylglycerols containing palmitic acids at sn-2 position and docosahexaenoic acids at sn-1,3 positions. *Journal of oleo science*, volumen 64, número 11, págs. 1227-1234.
- Ma, Y., Gao, Z., Wang, Q. y Liu, Y. (2018). Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. *Bioresource technology*, volumen 263, págs. 631-641.
- Maffei, G., Bracciale, M., Broggi, A., Zuorro, A., Santarelli, M. y Lavecchia, R. (2018). Effect of an enzymatic treatment with cellulase and mannanase on the structural properties of *Nannochloropsis* microalgae. *Bioresource technology*, volumen 249, págs. 592-598.
- Mahmood, W., Theodoropoulos, C. y Gonzalez-Miquel, M. (2017). Enhanced microalgal lipid extraction using bio-based solvents for sustainable biofuel production. *Green Chemistry*, volumen 19, número 23, págs. 5723-5733.

- Morales-Medina, R., De León, G., Munio, M., Guadix, A. y Guadix, E. (2016). Mass transfer modeling of sardine oil polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration by low temperature crystallization. *Journal of Food Engineering*, volumen 183, págs. 16-23.
- Mu, H. y Porsgaard, T. (2005). The metabolism of structured triacylglycerols. *Progress in lipid research*, volumen 44, número 6, págs. 430-448.
- Mu, H., Zhang, H., Li, Y., Zhang, Y., Wang, X., Jin, Q. y Wang, X. (2016). Enrichment of DPAn-6 and DHA from *Schizochytrium sp.* oil by low-temperature solvent crystallization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, volumen 55, número 3, págs. 737-746.
- Mühling, M., Belay, A. y Whitton, B. (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (Spirulina) strains. *Journal of Applied Phycology*, volumen 17, número 2, págs. 137-146.
- Najafabadi, H., Pazuki, G. y Vossoughi, M. (2015). Experimental study and thermodynamic modeling for purification of extracted algal lipids using an organic/aqueous two-phase system. *RSC Advances*, volume 5, número 2, págs. 1153-1160.
- Navarro, E., Robles, A., González, P., Jiménez, M., Esteban, L., Martín, L., Castillo, B. y Molina, E. (2015). Enzymatic production of biodiesel from *Nannochloropsis gaditana* lipids: Influence of operational variables and polar lipid content. *Bioresource Technology*, volumen 187, págs. 346-353.
- Obeid, S., Beaufile, N., Camy, S., Takache, H., Ismail, A. y Pontalier, P. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, volumen 34, págs. 49-56.
- Ohse, S., Bianchini, R., Ávila, R., Gordo, R., Badiale, E. y Cunha, P. (2015). Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *Idesia*, volumen 33, número 1, págs. 93-101.
- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, volumen 20, número 4-6, págs. 459-466.
- Olmstead, I., Kentish, S., Scales, P. y Martin, G. (2013). Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass. *Bioresource technology*, volumen 148, págs. 615-619.
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A. y Olabi, A. (2018). Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volumen 93, págs. 16-26.
- Osborn, H. y Akoh, C. (2002). Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, volumen 1, número 3, págs. 110-120.
- Osório, N., Da Fonseca, M. y Ferreira-Dias, S. (2006). Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous-packed-bed reactors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, volumen 108, número 7, págs. 545-553.
- Osório, N., Gusmão, J., Da Fonseca, M. y Ferreira-Dias, S. (2005). Lipase-catalysed interesterification of palm stearin with soybean oil in a continuous fluidised-bed reactor. *European Journal of Lipid Science and Technology*, volumen 107, número 7-8, págs. 455-463.

- Pande, G. y Akoh, C. (2013). Enzymatic synthesis of trans-free structured margarine fat analogs with high stearate soybean oil and palm stearin and their characterization. *LWT-Food Science and Technology*, volumen 50, número 1, págs. 232-239.
- Paques, F. y Macedo, G. (2006). Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*, volumen 29, número 1, págs. 93-99.
- Patel, A., Matsakas, L., Sartaj, K. y Chandra, R. (2020). Extraction of lipids from algae using supercritical carbon dioxide. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Inamuddin, Asiri, A. y Isloor, A., editorial Elsevier, Ámsterdam (Países Bajos), primera edición, págs. 17-39.
- Patel, A., Mikes, F. y Matsakas, L. (2018). An overview of current pretreatment methods used to improve lipid extraction from oleaginous microorganisms. *Molecules*, volumen 23, número 7, págs. 1-22.
- Ramírez, A. (2005). Purificación de ácido eicosapentaenoico (EPA) mediante reacciones enzimáticas (Tesis doctoral). Universidad Almería, Almería, España.
- Ribeiro, A., Basso, R., Grimaldi, R., Gioielli, L. y Gonçalves, L. (2009). Instrumental methods for the evaluation of interesterified fats. *Food analytical methods*, volumen 2, número 4, págs. 282-302.
- Robles, A., Esteban, L., Giménez, A., Camacho, B., Ibáñez, M. y Molina, E. (1999). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *Journal of Biotechnology*, volumen 70, número 1-3, págs. 379-391.
- Rodolfi, L., Chini, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. y Tredici, M. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, volumen 102, número 1, págs. 100-112.
- Rodríguez, A., Esteban, L., Martín, L., Jiménez, M., Hita, E., Castillo, B., González, P. y Robles, A. (2012). Synthesis of 2-monoacylglycerols and structured triacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by enzyme catalyzed reactions. *Enzyme and microbial technology*, volumen 51, número 3, págs. 148-155.
- Rosenberg, J., Oyler, G., Wilkinson, L. y Betenbaugh, M. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in Biotechnology*, volumen 19, número 5, págs. 430-436.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote-Verhalle, R., Goiris, K., Muylaert, K. y Foubert, I. (2014). Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry*, volumen 160, págs. 393-400.
- Sahin, N., Akoh, C. y Karaali, A. (2005). Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. *Journal of agricultural and food chemistry*, volumen 53, número 14, págs. 5779-5783.
- Şahin-Yeşilçubuk, N. y Akoh, C. (2017). Biotechnological and novel approaches for designing structured lipids intended for infant nutrition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 94, número 8, págs. 1005-1034.
- Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C., Ghosh, T., Patidar, S., Bhattacharya, S. y Mishra, S. (2013). Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*, volumen 89, págs. 53-58.

- Sajjadi, B., Chen, W., Raman, A. y Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volumen 97, págs. 200-232.
- Sati, H., Mitra, M., Mishra, S. y Baredar, P. (2019). Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review. *Algal Research*, volumen 38, págs. 1-12.
- Schmid, A., Dordick, J., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. y Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, volumen 409, número 6817, págs. 258-268.
- Schörken, U. y Kempers, P. (2009). Lipid biotechnology: industrially relevant production processes. *European journal of lipid science and technology*, volumen 111, número 7, págs. 627-645.
- Schwab, M., Sax, G., Schulze, S. y Winter, G. (2009). Studies on the lipase induced degradation of lipid based drug delivery systems. *Journal of controlled release*, volumen 140, número 1, págs. 27-33.
- Soumanou, M., Pérignon, M. y Villeneuve, P. (2013). Lipase-catalyzed interesterification reactions for human milk fat substitutes production: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, volumen 115, número 3, págs. 270-285.
- Speranza, P. y Macedo, G. (2012). Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties. *Process biochemistry*, volumen 47, número 12, págs. 1699-1706.
- Sproston, M., Ifeduba, E. y Akoh, C. (2017). Structured lipids for food and nutraceutical applications. Recuperado de: [http://www.informmagazine-digital.org/informmagazine/february\\_2017/MobilePagedArticle.action?articleId=1070550#articleId1070550](http://www.informmagazine-digital.org/informmagazine/february_2017/MobilePagedArticle.action?articleId=1070550#articleId1070550)
- Tang, W., Wang, X., Huang, J., Jin, Q. y Wang, X. (2015). A novel method for the synthesis of symmetrical triacylglycerols by enzymatic transesterification. *Bioresource Technology*, volumen 196, págs. 559-565.
- Tanzi, C., Vian, M. y Chemat, F. (2013). New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource technology*, volumen 134, págs. 271-275.
- Taurus, C. y Low, N. (1994). Possible causes for decreased stability of canola oil processed from green seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, volumen 71, número 10, págs. 1123-1128.
- Tecelão, C., Rivera, I., Sandoval, G. y Ferreira-Dias, S. (2012). *Carica papaya* latex: A low-cost biocatalyst for human milk fat substitutes production. *European journal of lipid science and technology*, volumen 114, número 3, págs. 266-276.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J. y Nieto, S. (2002). El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista chilena de nutrición*, volumen 29, número 2, págs. 106-115.
- Viguera, M., Marti, A., Masca, F., Prieto, C. y Calvo, L. (2016). The process parameters and solid conditions that affect the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of the lipids produced by microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, volumen 113, págs. 16-22.

- Wang, J., Liu, X., Wang, X., Dong, T., Zhao, X., Zhu, D., Mei, Y. y Wu, G. (2016). Selective synthesis of human milk fat-style structured triglycerides from microalgal oil in a microfluidic reactor packed with immobilized lipase. *Bioresource technology*, volumen 220, págs. 132-141.
- Wang, J., Wang, X., Zhao, X., Liu, X., Dong, T. y Wu, F. (2015). From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids. *Bioresource technology*, volumen 184, págs. 405-414.
- Wang, Q., Xie, Y., Johnson, D., Li, Y., He, Z. y Li, H. (2019a). Ultrasonic-pretreated lipase-catalyzed synthesis of medium–long–medium lipids using different fatty acids as sn-2 acyl-site donors. *Food Science & Nutrition*, volumen 7, págs. 2361–2373.
- Wang, X., Wang, X., Wang, W., Jin, Q. y Wang, X. (2018). Synthesis of docosapentaenoic acid-enriched diacylglycerols by enzymatic glycerolysis of *Schizochytrium sp.* oil. *Bioresource technology*, volumen 262, págs. 278-283.
- Wang, X., Zou, S., Miu, Z., Jin, Q. y Wang, X. (2019b). Enzymatic preparation of structured triacylglycerols with arachidonic and palmitic acids at the sn-2 position for infant formula use. *Food chemistry*, volumen 283, págs. 331-337.
- Wang, Z., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S. y Goodenough, U. (2009). Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic cell*, volumen 8, número 12, págs. 1856-1868.
- Wei, W., Feng, Y., Zhang, X., Cao, X. y Feng, F. (2015). Synthesis of structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol in both solvent and solvent-free system. *LWT-Food Science and Technology*, volumen 60, número 2, págs. 1187-1194.
- Willis, W., Ghazani, S. y Marangoni, A. (2017) Enzymatic interesterification. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*, Akoh, C., editorial Taylor & Francis, Boca Ratón (EE.UU.), cuarta edición, págs. 899-939.
- Willis, W., Lencki, R. y Marangoni, A. (1998). Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, volumen 38, número 8, págs. 639-674.
- Wu, G., Zaniolo, O., Schuster, H., Schlotzer, E. y Pradelli, L. (2017). Structured triglycerides versus physical mixtures of medium-and long-chain triglycerides for parenteral nutrition in surgical or critically ill adult patients: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, volumen 36, número 1, págs. 150-161.
- Xue, Z., Yu, Y., Yu, W., Gao, X., Zhang, Y. y Kou, X. (2020). Development prospect and preparation technology of edible oil from microalgae. *Frontiers in Marine Science*, volumen 7, número 402.
- Yang, F., Cheng, C., Long, L., Hu, Q., Jia, Q., Wu, H. y Xiang, W. (2015). Extracting lipids from several species of wet microalgae using ethanol at room temperature. *Energy & Fuels*, volumen 29, número 4, págs. 2380-2386.
- Yap, B., Crawford, S., Dumsday, G., Scales, P. y Martin, G. (2014). A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. *Algal Research*, volumen 5, págs. 112-120.

Yara-Varón, E., Selka, A., Fabiano-Tixier, A., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Bily, A., Touaibia, M. y Chemat, F. (2016). Solvent from forestry biomass. Pinane a stable terpene derived from pine tree byproducts to substitute n-hexane for the extraction of bioactive compounds. *Green Chemistry*, volumen 18, número 24, págs. 6596-6608.

Yu, W., Ansari, W., Schoepp, N., Hannon, M., Mayfield, S. y Burkart, M. (2011). Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial cell factories*, volumen 10, número 91.

Yücel, Y. (2012). Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on olive pomace powder using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural biotechnology*, volumen 1, número 1, págs. 39-44.

Zam, W. (2015). Structured lipids: methods of production, commercial products and nutraceutical characteristics. *Progress in Nutrition*, volumen 17, número 3, págs. 198-213.

Zbinden, M., Sturm, B., Nord, R., Carey, W., Moore, D., Shinogle, H. y Stagg-Williams, S. (2013). Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnology and Bioengineering*, volumen 110, número 6, págs. 1605-1615.

Zhang, Y., Wang, X., Zou, S., Xie, D., Jin, Q. y Wang, X. (2018). Synthesis of 2-docosahexaenoylglycerol by enzymatic ethanolysis. *Bioresource technology*, volumen 251, págs. 334-340.

Zhu, Y., Jin, Q., Wang, X. y Wang, X. (2017). Purification of 1,2-Diacylglycerols by a two-step crystallization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, volumen 56, número 8, págs. 2197-2204.