

C/5523



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

## DESARROLLO DE PROCESOS ENZIMÁTICOS SELECTIVOS PARA APLICACIONES NUTRICIONALES

### TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

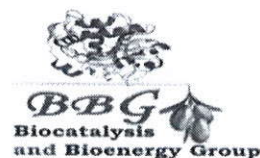
**Ramiro Baeza Jiménez**

DIRECTORES:

**Cristina Otero Hernández**  
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – CSIC

**Hugo Sergio García Galindo**  
UNIDA – Instituto Tecnológico de Veracruz

Madrid, 2013



## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>RESUMEN</b>	<b>Pag.</b> <b>iv</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>x</b>
	<b>ÍNDICE DE FÍGURAS</b>	<b>xi</b>
	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Alimentos funcionales	<b>1</b>
1.2	Lípidos estructurados	<b>3</b>
1.2.1	Síntesis	<b>3</b>
1.2.2	Ácidos grasos omega-3 y omega-6	<b>4</b>
1.3	Ácido linoleico conjugado (CLA)	<b>6</b>
1.4	Ácidos docosahexaenoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA)	<b>8</b>
1.5	Ácido $\gamma$ - linolénico (GLA)	<b>10</b>
1.5.1	Funciones bioquímicas y biológicas del GLA	<b>10</b>
1.6	Fosfolípidos (PL)	<b>11</b>
1.6.1	Importancia nutracéutica y funcional de los fosfolípidos	<b>13</b>
1.6.2	Modificación química de fosfolípidos	<b>13</b>
1.6.3	Modificación enzimática de fosfolípidos	<b>14</b>
1.7	Lisofosfolípidos	<b>18</b>
1.8	Acilglicéridos	<b>19</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1	Objetivo general	
2.2	Objetivos específicos	
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
3.1	Biocatalizadores	<b>22</b>
3.2	Fosfolípidos, lisofosfolípidos y PUFA	<b>22</b>
3.3	Aceites	<b>23</b>
3.4	Reactivos	<b>23</b>
3.5	Producción de fosfatidilcolina estructurada (SPC) con un elevado contenido en CLA	<b>24</b>
3.5.1	Inmovilización de PLA <sub>1</sub>	<b>24</b>
3.5.2	Reacciones de acidólisis	<b>24</b>
3.5.3	Análisis de SPC	<b>25</b>
3.6	Producción optimizada de SPC por el método de superficie de respuesta (RSM)	<b>25</b>
3.6.1	Análisis del perfil de fosfolípidos	<b>25</b>
3.6.2	Diseño experimental y análisis estadístico	<b>26</b>

## INDICE DE CONTENIDO

3.7	Producción de lisofosfatidilcolina (LPC) a partir de fosfatidilcolina (PC)	27
3.7.1	Reacción enzimática de hidrólisis	27
3.7.2	Análisis del perfil de lisofosfolípido	28
3.7.3	Cálculo del grado de hidrólisis	28
3.8	Producción de diacilglicéridos ricos en n-3	29
3.8.1	Reacción enzimática de glicerolisis	29
3.8.2	Análisis del perfil de glicéridos	30
3.8.3	Separación de glicéridos	30
3.8.4	Análisis de ácidos grasos	30
3.8.5	Diseño experimental y análisis estadístico	31
3.8.6	Efecto del tipo de agitación	31
3.8.7	Efecto de la temperatura	32
3.8.8	Efecto de la velocidad de reacción	33
3.9	Producción de un aceite enriquecido en GLA en un sistema libre de solvente	33
3.9.1	Preparación de ácidos grasos a partir del aceite	33
3.9.2	Reacción enzimática de esterificación	34
3.9.3	Análisis de productos	34
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
4.1	Primera etapa (2009 – 2010)	35
4.1.1	Inmovilización de enzimas	35
4.1.2	Preparación de fosfolípidos ricos en PUFA. Desarrollo de la metodología	36
4.2	Segunda etapa (2010 – 2011)	36
4.2.1	Desarrollo y optimización de la síntesis de fosfolípidos ricos en PUFA	36
4.3	Tercera etapa (2010 – 2012)	42
4.3.1	Producción de LPC	42
4.3.2	Producción de diglicéridos ricos en PUFA	44
4.4	Cuarta etapa (2012 – 2013)	48
4.4.1	Enriquecimiento de un aceite en GLA	48
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>56</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>59</b>
<b>VII.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>65</b>
	Artículo I	66
	Artículo II	67
	Artículo III	68
	Artículo IV	69
	Artículo V	70
	Artículo VI	71

## RESUMEN

La investigación sobre los efectos benéficos de los alimentos en la salud humana ha experimentado un crecimiento exponencial en la última década, debido a que los consumidores son cada vez más conscientes de la relación que existe entre una dieta balanceada y un óptimo estado de salud. Lo anterior ha llevado a la producción de alimentos funcionales o nutraceuticos, entre los cuales se incluyen alimentos que han sido fortificados, enriquecidos, modificados o mejorados. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar diferentes procesos enzimáticos en los que el perfil de ácidos grasos del producto original fuera cambiado para incorporar ácidos grasos de valor nutricional y funcional.

En la primera etapa de esta tesis doctoral se prepararon fosfolípidos (PL) ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Para el desarrollo de esta tarea se emplearon los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA); y los PUFA: CLA (ácido linoleico conjugado), DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico). Las variables a evaluar eran la relación molar de sustratos (1:1, 1:5, 1:8 y 1:10; PL:PUFA), temperatura (30, 40, 50 y 60°C), tiempo de reacción (4, 8, 12, 24 y 48h) y la carga de enzima (10, 20 y 30% p/p con respecto a la mezcla de sustratos). De los experimentos realizados, los mejores resultados se obtuvieron para la reacción de interesterificación de PC y CLA bajo las siguientes condiciones: relación molar 1:8 (PC:CLA), 8 h, 50°C, 300 rpm (agitación orbital) y 10% enzima, logrando incorporar el 21,5% del CLA en PC.

La segunda etapa consistió en el desarrollo y optimización de la síntesis de fosfolípidos ricos en PUFA. Para realizar esta tarea se emplearon PC y CLA. Los parámetros que se evaluaron son: relación molar de sustratos (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10; PC:CLA), temperatura (20, 30, 40, 50 y 60°C) y la carga de enzima (2, 5, 10, 15 y 20%; en peso con respecto a la mezcla de sustratos). Paralelamente a estos estudios, se empleó la metodología de superficie de respuesta para optimizar el sistema de reacción y definir la interacción y efecto de las variables de estudio en la incorporación de CLA en PC. Las condiciones óptimas encontradas son: relación molar 1:4 (PC:CLA), 24 h, 50°C, 200 rpm (agitación orbital) y 15% enzima, logrando incorporar el 90% del CLA en PC.

Siguiendo la misma línea de investigación, en la tercera etapa de esta tesis doctoral se estudió la formación de lisofosfatidilcolina (LPC) a partir de PC, empleando dos sistemas de reacción (etanol y agua) y enzimas libres e inmovilizadas (15% en peso con respecto al total de PC), evaluando el efecto de la temperatura (30, 40, 50 y 60°C). De este estudio se encontró que el medio empleado, así como el tipo de biocatalizador, claramente determinan la cinética de reacción. La fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) y la lipasa Novozym 435, ambas inmovilizadas, convirtieron PC en LPC en presencia de etanol, con rendimientos de 50% y 58,51%, respectivamente, tras 48 h de reacción a 50°C. Sin embargo, el mayor grado de hidrólisis (70%) se alcanzó con la lipasa PS tras 48 h de reacción a 60°C y 200 rpm (agitación orbital), en presencia de agua. Parte de este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz (Veracruz, México).

La cuarta etapa de esta tesis consistió en la preparación de diglicéridos ricos en PUFA, complementando un trabajo de master realizado en el mismo laboratorio del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC. Para ello se emplearon aceite de pescado y glicerol. Los parámetros evaluados son la relación molar de sustratos (1; 1,4; 2; 2,6 y 3; aceite/glicerol), temperatura (40, 44, 50, 56 y 60°C) y la carga de enzima (5, 7, 10, 13 y 15% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) mediante la metodología de superficie de

respuesta. Las condiciones de reacción que nos condujeron a la mayor obtención (50%) de DAG son: relación molar 2 (aceite:glicerol), 60°C y 15% de enzima, con una agitación orbital de 200 rpm tras 24 h. Paralelamente a estos experimentos, se evaluó también el efecto de la agitación (orbital y magnética) empleando diferentes temperaturas (65, 70, 75, 80, 85 y 90°C) y velocidades de agitación (300, 500, 700 y 900 rpm). Las condiciones óptimas para alcanzar la mayor cantidad de DAG fueron: 65°C, una relación molar aceite:glicerol de 3:1, agitación magnética a 500 rpm y 15% p/p de enzima, después de 2,5 h, con un rendimiento de 60%. La composición del diglicérido obtenido es: EPA (11,32%), DPA (8,34%) y DHA (69,71%).

La quinta etapa de esta tesis consistió en el enriquecimiento de ácido  $\gamma$ -linolénico (GLA) catalizado por la lipasa de *Candida rugosa* en un sistema libre de solvente. Se empleó un aceite (evening primrose oil) que contenía 8.8% p/p de GLA. Los experimentos incluyeron la evaluación de diferentes cargas de enzima (5, 10, 15 y 20%, p/p con respecto a la mezcla de sustratos), temperatura (10, 20, 30, 40, 50 y 60°C) y relaciones molares (1:4, 1:6, 1:8, 1:10 y 1:12, EPO-FA:BtOH). De los resultados obtenidos se obtuvo un incremento en el contenido de GLA hasta del 70% a 30°C, agitación magnética a 400 rpm, 10% p/p de enzima y una relación molar 1:10 tras 24 h de reacción. Posteriormente, empleando tamiz molecular (10% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) y bajo las condiciones óptimas se pudo incrementar el contenido de GLA a 83,74% tras 36 h de reacción. Esta etapa se realizó en el Departamento de Alimentos y Nutrición del Colegio de Ciencias de la Salud, en la Universidad de Corea (Seúl, Corea del Sur).

Finalmente podemos decir que los diferentes procesos enzimáticos que se desarrollaron a lo largo de esta tesis nos condujeron satisfactoriamente a la preparación de productos ricos en ácidos grasos de valor nutricional y funcional y por otro lado aprovechar la especificidad de las enzimas en los distintos sistemas de reacción que empleamos. Las condiciones de reacción encontradas tienen ventajas sobre otros procesos reportados en la literatura entre las que podemos mencionar temperaturas más bajas, sistemas libres de solventes y un mayor contenido de los diferentes PUFA estudiados.

## ABSTRACT

Research focused on the benefits of food and human health has been widely explored in the past decade, given that consumers are more concerned about the relationship between diet and wellness. This has led to the development of functional foods or nutraceuticals, namely, fortified, enriched, modified and enhanced foods. For this reason, the aim of the present thesis was to design and carry out selective enzymatic processes to modify the fatty acid composition of several starting materials to prepare enriched products with an elevated content of functional fatty acids.

In the first step of the thesis, different phospholipids (PL) were enriched in polyunsaturated fatty acids (PUFA). We employed these PL: phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidic acid (PA); and the PUFA were: CLA (conjugated linoleic acid), DHA (docosahexaenoic acid) and EPA (eicosapentaenoic acid). The variables explored were substrates molar ratio (1:1, 1:5, 1:8 & 1:10; PL:PUFA), temperature (30, 40, 50 & 60°C), reaction time (4, 8, 12, 24 & 48h) and enzyme loading (10, 20 & 30%, w/w with respect to the total sum of substrates). For the trials conducted, the best conditions for the interesterification reaction between PC and CLA were: 1:8 ratio (PC:CLA), 8 h, 50°C, 300 rpm (orbital agitation) and 10% of enzyme, yielding a 21,5% incorporation of CLA into PC.

The second step consisted in the optimization of enriched PC with CLA. To achieve this, we tested substrates molar ratio (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 and 1:10; PC:CLA), temperature (20, 30, 40, 50 and 60°C) and enzyme loading (2, 5, 10, 15 and 20%; w/w with respect to the total amount of substrates).

We employed surface respond methodology to optimize the reaction and define the interaction and effect of the parameters tested on the incorporation of CLA into PC. The optimal conditions obtained were: 1:4 ratio (PC:CLA), 24 h, 50°C, 200 rpm (orbital agitation) and 15% of enzyme, with a yield of 90% incorporation of CLA into PC.

The third stage of the thesis was conducted to prepare lysophosphatidylcholine (LPC) from PC, employing two reaction schemes (ethanol and water) and either free or immobilized enzymes (15% w/w with respect to the total amount of PC), considering different temperatures (30, 40, 50 & 60°C). We observed that both of the reaction systems used, as well as the type of biocatalyst, clearly influenced the reaction course. Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) and Novozym 435, both immobilized were able to convert PC into LPC in the presence of ethanol, yielding 50% and 58,51%, respectively, after 48 h at 50°C. However, the highest degree of hydrolysis (70%) was attained by lipase PS after 48 h at 60°C and 200 rpm (orbital agitation), in the presence of water. This work was carried out at the Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos from the Instituto Tecnológico de Veracruz (Veracruz, México).

The fourth stage of this thesis was aimed to the preparation of PUFA-enriched diacylglycerols, to complete a Master project carried out in the same laboratory at the Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC. For this purpose we used fish oil and glycerol. The parameters studied were substrates molar ratio (1:1; 1:1,4; 1:2; 1:2,6 & 1:3; oil:glycerol); temperature (40, 44, 50, 56 & 60°C) and enzyme loading (5, 7, 10, 13 & 15%, w/w with respect to the total amount of substrates) under surface response methodology. The optimal conditions which conducted us to the highest production of diacylglycerols (50%) were: a ratio of 1:2 (oil:glycerol), 60°C and 15% of enzyme, at 200 rpm (orbital agitation) after 24 h. After that, we further studied the effect of the type of agitation (orbital or magnetic), temperature (65, 70, 75, 80, 85 & 90°C) and speed (300, 500, 700 & 900 rpm). For these trials we achieved the highest production of diacylglycerols (60%) using a ratio of 1:3 (oil:glycerol), 65°C and 15% of enzyme, at 500 rpm



(magnetically agitated). After 2,5 h of reaction time the structured diacylglycerols contained: EPA (11,32%), DPA (8,34%) and DHA (69,71%).

The last step of this thesis focused on the lipase-catalysed enrichment of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) in a solvent-free system. The oil used (evening primrose oil) contained 8,8 wt % of GLA. For the variables studied, we had different substrates molar ratios (1:4, 1:6, 1:8, 1:10 & 1:12, EPO-FA:BtOH), temperatures (10, 20, 30, 40, 50 & 60°C), and enzyme loadings (5, 10, 15 & 20% w/w, with respect to substrates mixture) were employed. In the first part of our experimental work, we elevated the percentage of GLA from 8,87 to 70 wt. % at 30°C, 400 rpm, with 10% enzyme for a 1:10 ratio after 24h. Next, by using molecular sieves (10% w/w, with respect to substrates mixture) under the indicated optimal conditions we were able to produce an even higher GLA content (83,7 wt %) after 36h. This fifth stage of the thesis was carried out at the Department of Food and Nutrition of the College of Health Sciences from Korea University (South Korea).

Finally, we can conclude that the enzymatic processes developed in this thesis, successfully conduct us to the preparation of high-PUFA content products which fatty acids residues to provide functional and nutritional benefits. The enzymes employed were specific in the different reaction systems used. The conditions found in the different stages have several advantages compared to others reported in the literature, namely, mild reaction conditions, solvent-free systems and an elevated content of the different PUFA incorporated.

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
Tabla 1. Funciones bioquímicas y biológicas del CLA	<b>7</b>
Tabla 2. Funciones bioquímicas y biológicas del DHA y EPA	<b>9</b>
Tabla 3. Reacciones enzimáticas de interesterificación para sintetizar fosfatidilcolina estructurada (SPC)	<b>17</b>
Tabla 4. Diseño experimental empleado en la síntesis de SPC	<b>27</b>
Tabla 5. Diseño experimental empleado en la síntesis de glicéridos estructurados	<b>32</b>
Tabla 6. Composición en ácidos grasos (% p/p) de SPC para las condiciones óptimas de reacción	<b>42</b>
Tabla 7. Composición en ácidos grasos (% p/p) del aceite de partida (EPO) y de los productos enriquecidos	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FÍGURAS

	<b>Pag.</b>	
Figura 1.	Interesterificación química entre dos triglicéridos	<b>4</b>
Figura 2.	Producción enzimática de lípidos estructurados	<b>5</b>
Figura 3.	Proceso enzimático de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6	<b>8</b>
Figura 4.	Estructura y tipo de fosfolípidos	<b>12</b>
Figura 5.	Modo de acción de las diferentes fosfolipasas en PC	<b>15</b>
Figura 6.	Estructura química de acilglicéridos	<b>19</b>
Figura 7.	Reacción enzimática de hidrólisis	<b>29</b>
Figura 8.	Efecto de la relación molar de sustratos en la producción de SPC	<b>39</b>
Figura 9.	Efecto de la temperatura en la producción de SPC	<b>40</b>
Figura 10.	Efecto de la carga de enzima en la producción de SPC	<b>41</b>
Figura 11.	Rendimiento total de PC <i>vs</i> contenido de CLA y grado de hidrólisis durante la reacción de acidólisis para las condiciones óptimas encontrada	<b>42</b>
Figura 12.	Grado de hidrólisis obtenido con la Lipasa PS en agua	<b>44</b>
Figura 13.	Efecto de las variables de reacción en la producción de DAG enriquecidos en PUFA	<b>45</b>
Figura 14.	Efecto del tipo de agitación en la producción de DAG	<b>47</b>
Figura 15.	Efecto de la temperatura en la producción de DAG y MAG	<b>47</b>
Figura 16.	Efecto de la velocidad de agitación en la producción de DAG y MAG	<b>48</b>
Figura 17.	Efecto de la relación molar de sustratos en el contenido de GLA	<b>51</b>
Figura 18.	Efecto de la temperatura en el contenido de GLA	<b>51</b>
Figura 19.	Efecto de la carga de enzima en el contenido de GLA	<b>52</b>
Figura 20.	Efecto de la adición de tamiz molecular en el contenido de GLA	<b>52</b>

**ABREVIATURAS**

<b>ALA</b>	Ácido $\alpha$ -linolénico
<b>ARA</b>	Ácido araquidónico
<b>BtOH</b>	Butanol
<b>CLA</b>	Ácido linoleico conjugado
<b>DAG</b>	Diacilglicéridos
<b>DEt</b>	Grado de etanolisis
<b>DH</b>	Grado de hidrólisis
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico
<b>EPO</b>	<i>Evening primrose oil</i>
<b>EPO-FA</b>	Ácidos grasos de EPO
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>GLA</b>	Ácido $\gamma$ -linolénico
<b>GPC</b>	Glicerol-3-fosfatidilcolina
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>LA</b>	Ácido linoléico
<b>LPC</b>	Lisofosfatidilcolina
<b>LPL</b>	Lisofosfolípidos
<b>MAG</b>	Monoacilglicéridos
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>PLA<sub>1</sub></b>	Fosfolipasa A <sub>1</sub>
<b>PUFA</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SPC</b>	Fosfatidilcolina estructurada
<b>TAG</b>	Triacilglicéridos
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>VA</b>	Ácido vaccénico

## I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha observado un significativo aumento en investigación, desarrollo y producción de alimentos funcionales o nutracéuticos con características especiales que mejoren la salud y ayuden en el tratamiento o prevención de enfermedades. Un ejemplo representativo de este nuevo tipo de alimentos son los lípidos estructurados.

### 1.1 Alimentos funcionales o nutracéuticos

El término “alimento funcional” se usó por primera vez en Japón en 1984 cuando se estudiaban las relaciones entre nutrición, satisfacción sensorial, fortificación y modulación fisiológica. En 1991, el Ministerio de Salud japonés, gestionó la aprobación de una normativa para un tipo de alimento llamado FOSHU (*foods for specified health uses*). Este tipo corresponde a alimentos fortificados con componentes especiales que confieren efectos fisiológicos positivos (Siró *et al.*, 2008). Años después, este concepto se extendió a Estados Unidos y Europa, regiones que a diferencia de Japón, no consideraban un alimento funcional como un grupo diferente de alimentos. Desde entonces, el interés por los alimentos funcionales ha llevado a la investigación y desarrollo de métodos que permiten su disponibilidad en el mercado, como ha sucedido con los pre- y probióticos, productos que reducen el colesterol y aún mejor, los que ayudan en el tratamiento de enfermedades.

Hasta ahora, no hay una definición única aceptada para estos alimentos puesto que en la mayoría de los países no hay una legislación que delimite entre un alimento convencional y otro funcional. En ese sentido, la

acción concertada de la Comisión Europea en la ciencia de los alimentos en Europa (FuFoSE), coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), refiere: “un producto alimenticio solo puede considerarse funcional si junto con el impacto nutricional básico tiene efectos benéficos en una o más funciones del organismo humano que pueden mejorar tanto la condición general y física y/o reducir el riesgo de evolución de una enfermedad”.

Las principales vías estratégicas para la producción de alimentos funcionales consisten en: modificar la composición de la materia prima, modificar el proceso tecnológico o modificar la composición de un alimento (Fogliano y Vitaglione, 2005). El empleo de cualquiera de los métodos anteriores o la combinación de los mismos ha resultado en 4 tipos de alimentos funcionales (Kotilainen *et al.*, 2006; Spence, 2006):

1. Fortificados. Un alimento con nutrientes adicionales. Ejemplo de este grupo son los jugos fortificados con vitamina C
2. Enriquecidos. Alimentos con nuevos nutrientes o componentes añadidos que de forma natural no estaban presentes en el alimento. Ejemplo de este grupo son los probióticos y los lípidos y fosfolípidos estructurados
3. Alterados. Alimentos de los que un compuesto nocivo ha sido eliminado, reducido o reemplazado por otro que es benéfico. Ejemplo de esto es la adición de fibra a la carne
4. Mejorados. Alimentos obtenidos tras mejorar las condiciones de crecimiento, modificaciones en la dieta del animal, o manipulación genética.

Por su parte, los nutraceuticos fueron definidos en 1989 por la Fundación para la Innovación en Medicina (New York, USA) y su acepción no difiere mucho de la de un alimento funcional, por lo que muchas veces se consideran equivalentes. Un nutraceutico puede definirse como cualquier

sustancia que puede considerarse alimento o parte de un alimento y confiere beneficios médicos o en la salud incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades. (DeFelice, 1992). Como nutraceuticos se consideran nutrientes aislados, suplementos alimenticios, alimentos obtenidos por ingeniería genética, productos herbolarios y productos procesados como cereales, sopas y bebidas. Una serie de productos representativos de nutraceuticos son: fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas, minerales, vitaminas y antioxidantes (Andlauer y Fürst, 2002). Con respecto a los PUFA, merece la pena mencionar que las familias representativas son los ácidos grasos omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6).

Por lo anteriormente mencionado, es evidente que la investigación en el campo de los nutraceuticos y la alimentación funcional se ha enfocado en los siguientes ámbitos: (a) crecimiento y desarrollo, (b) metabolismo de sustancias, (c) defensa contra el estrés oxidativo, (d) enfermedades cardiovasculares, (e) funcionamiento del tracto intestinal y (f) funciones psicológicas y conductuales.

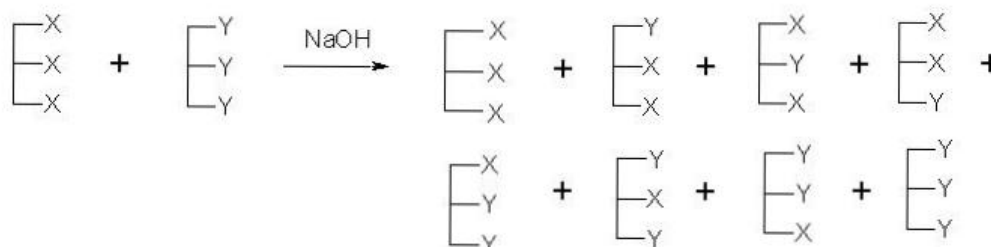
### **1.2 Lípidos estructurados**

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

#### **1.2.1 Síntesis**

Los procesos de interesterificación química se han aplicado tradicionalmente a la modificación de grasas y aceites, ya que son baratos y fáciles de llevar a cabo. No obstante, la reacción carece de especificidad y no

ofrece control respecto a la distribución posicional de los ácidos grasos en el producto final, tal y como se puede observar en la Figura 1.



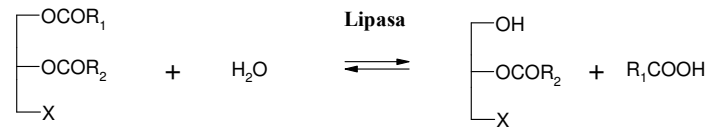
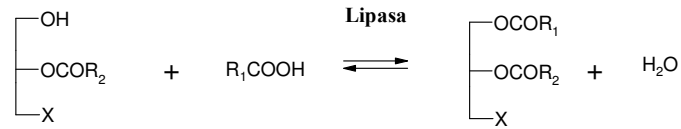
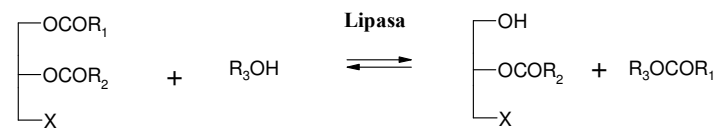
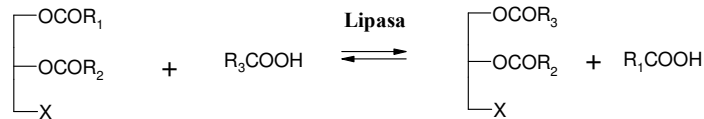
**Figura 1.** Interesterificación química entre dos triglicéridos.

Por el contrario, las reacciones catalizadas por enzimas permiten controlar la distribución posicional de los ácidos grasos en el producto final, debido a su selectividad y regioespecificidad. Además de hidrolizar glicéridos, obteniéndose glicerol y ácidos grasos libres, las lipasas pueden catalizar otro tipo de reacciones, tales como esterificación directa, alcoholisis, acidolisis, interesterificación y aminolisis (Figura 2). Especialmente interesantes son las estrategias sintéticas que se basan en el empleo de lipasas *sn*-1,3-regioespecíficas, ya que permiten modificar los ácidos grasos que ocupan las posiciones *sn*-1,3, no alterando la posición *sn*-2 de los glicéridos.

### 1.2.2 Ácidos grasos omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6)

Los ácidos grasos son biomoléculas compuestas por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo terminal. Estas biomoléculas pueden clasificarse en dos grandes grupos: saturados (suelen ser perjudiciales para la salud), e insaturados (beneficiosos para el organismo). Por el número de insaturaciones, el segundo grupo puede dividirse en mono y poliinsaturados. De gran interés para el desarrollo de esta tesis doctoral son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). En este grupo de ácidos grasos, la posición de los dobles enlaces se indica con la letra griega “ω” o con la letra “n”, destacando la familia de los n-3 y los n-6.



**Hidrólisis:****Esterificación:****Alcoholisis:****Acidolisis:****Figura 2.** Producción enzimática de lípidos estructurados

Los ácidos  $\alpha$ -linolénico (ALA, n-3) y el ácido linoléico (LA, n-6), son los respectivos precursores de los ácidos grasos n-3 y n-6 que están involucrados en muchos procesos metabólicos del cuerpo humano. El ALA está presente en ciertos aceites vegetales, semillas, verduras de hoja verde, legumbres y frutos secos. Por su parte, el LA se encuentra en granos, carne y en las semillas de la mayoría de las plantas. Los denominados esenciales, como LA, ALA y araquidónico (ARA), son aquéllos que no pueden ser sintetizados por el organismo humano, por lo que se deben obtener por medio de la dieta.

Los ácidos grasos n-3 y n-6 empleados en la presente investigación son: linoleico conjugado (CLA), docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y  $\gamma$ -linolénico (GLA), y a continuación se describen.

### 1.3 Ácido linoleico conjugado (CLA)

El CLA tiene la misma longitud de cadena que el LA, pero en el CLA los dobles enlaces están conjugados en lugar de estar separados por metilenos. Por ello, la estructura química del CLA es una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido octadecadienoico, con dobles enlaces en las posiciones [9,11], [10,12], [8,10], [7,9] y [11,13]. Hasta 18 isómeros de CLA están identificados y disponibles comercialmente, siendo dos los isómeros principales: cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12.

El CLA se sintetiza tanto por biohidrogenación en el rumen o por síntesis endógena en tejido. En esta última vía el CLA es sintetizado a partir del ácido vaccénico (VA), por acción de la enzima  $\Delta$ -9 desaturasa (Bauman *et al.*, 1999). La primera etapa en la biohidrogenación del LA resulta en la formación del isómero cis-9,trans-11 (conocido como ácido ruménico), debido a la isomerización y transposición del doble enlace  $\Delta$ -12. Esta primera etapa incluye también la producción de VA, que es el principal ácido graso trans-monoin saturado presente en leche, yogurt, queso, mantequilla y carne (Parodi, 1997; Parodi, 2003).

Ha habido un particular interés por los efectos benéficos del CLA en la salud humana desde las primeras observaciones reportadas por Pariza y su grupo cuando investigaban compuestos cancerígenos en carne (Pariza y Hargreaves, 1985). Desde entonces, el CLA ha sido objeto de múltiples estudios que se resumen en la Tabla 1.

Los estudios en humanos sobre CLA se han centrado en obesidad, así como en enfermedades cardiovasculares, Diabetes Mellitus, respuestas inmune e inflamatoria, metabolismo de lípidos, cáncer, y de huesos. Las investigaciones más recientes abordan la interacción del CLA con otros suplementos como el calcio, creatina, picolinato de cromo o VA. Los efectos del CLA en el metabolismo de la glucosa en humanos están todavía inconclusos y sus posibles efectos en el síndrome metabólico son controvertidos.

**Tabla 1.** Funciones bioquímicas y biológicas del CLA

<b>¿DONDÉ?</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Corazón</b>	El CLA reduce el colesterol total, triacilglicéridos (TAG), colesterol-LDL e incrementa el colesterol-HDL de acuerdo a diversos estudios en modelos animales. En estudios con humanos se ha encontrado que reduce el nivel de colesterol en sangre. Se ha reportado también que el CLA disminuye el riesgo de padecer hipertensión en ratas obesas y diabéticas, al igual que en ratas no obesas espontáneamente hipertensas. Además se ha investigado la capacidad del CLA para inhibir la agregación plaquetaria y la producción de TXA <sub>2</sub>
<b>Cáncer</b>	El CLA no solo reduce las etapas de iniciación, promoción y progresión durante el desarrollo de diversos tipos de cáncer (piel, estomago no glandular, colon, mama e hígado), sino que también reduce la metástasis. El CLA puede estar implicado en la producción de eicosanoides que interfieren con los procesos de señalización celular, inhibiendo la síntesis de DNA y promoviendo la apoptosis, así mismo, inhibiendo la angiogénesis
<b>Diabetes</b>	En diferentes estudios se ha reportado que el CLA está implicado en la pérdida de masa corporal, reducción de los niveles de azúcar, triglicéridos e insulina en sangre y en una mejor utilización de la glucosa en personas diabéticas. Estudios <i>in vitro</i> han demostrado que el isómero t10,c12 reduce el peso. Sin embargo, en personas no diabéticas con sobrepeso, el CLA puede promover la resistencia a la insulina y con ello producir un estado prediabético
<b>Respuesta inmune e inflamatoria</b>	Se ha demostrado que el CLA puede incrementar los niveles de inmunoglobulina A, G y M en ratas; reduce la inflamación de colon y modula la producción de citosinas, prostaglandinas, y leucotrieno B <sub>4</sub> ; mejora la respuesta inmune al regular el factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>Huesos</b>	El CLA incrementa los niveles de osteocalcina, de la actividad fosfatasa alcalina y la absorción de calcio. Los estudios <i>in vivo</i> con pollos, ratas y cerdos de temprana edad han demostrado que en presencia de CLA hay un aumento en la densidad ósea. En humanos, una investigación concluyó que suplementos de CLA en hombres mayores no tuvo ningún efecto en marcadores óseos; sin embargo, en un trabajo reciente se hace referencia a que el CLA podría tener un efecto benéfico en la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas. Aun así, hay todavía cierta controversia en la interacción del CLA y el calcio de dieta
<b>Grasa corporal</b>	Se ha reportado que el CLA tiende a reducir la grasa corporal, particularmente la abdominal, modificar el perfil lipídico en suero y disminuir la absorción de glucosa. Una reducción de la grasa corporal puede mejorar la respuesta a insulina, aunque no ha sido completamente elucidado

**Fuente:** Baeza-Jiménez y García-Galindo, 2013

**1.4 Ácidos docosahexaenóico (DHA) y eicosapentaenóico (EPA)**

A partir de ALA se produce EPA (ácido eicosapentaenoico, 20:5 n-3) y DHA (ácido docosahexaenoico, 22:6 n-3) a través de un proceso enzimático de desaturación y elongación (ver Figura 3). El EPA y el DHA son precursores de un grupo de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos) que poseen propiedades anti-inflamatorias, anti-trombóticas, anti-arritmicas y vasodilatadoras. El consumo de pescado y aceite de pescado provee directamente de EPA y DHA.

El DHA es el principal componente estructural de la materia gris del cerebro, la retina y es un componente importante del tejido cardiaco (Birch *et al.*, 2007; Innis, 2008). En la retina las funciones incluyen fotosensibilidad, cinéticas de transporte, actividad de enzimas acopladas a membrana, receptores de membrana y fluidez de la membrana (Nayaran *et al.*, 2006). Así mismo hay estudios que describen el importante papel que desempeña el DHA durante el embarazo (Otto *et al.*, 2001; Montgomery *et al.*, 2003; Al *et al.*, 1995; Zeijdner *et al.*, 1997).



**Fuente:** Baeza-Jiménez y García-Galindo, 2013

**Figura 3.** Proceso enzimático de síntesis de ácidos grasos n-3 y n-6

Por otro lado, el EPA puede contribuir a adelgazar la pared arterial en ciertos individuos, lo cual puede resultar en hemorragias serias (Ward y Singh, 2005). Sin embargo, estudios recientes señalan que el EPA puede ser útil en el tratamiento de desórdenes cerebrales tales como la esquizofrenia (Fenton *et al.*, 2000; Peet, 2004) y en ciertas condiciones en pacientes con cáncer (Tisdale, 1999). En el caso de la esquizofrenia, el EPA es capaz de modificar anomalías en fosfolípidos, inhibiendo a la fosfolipasa PLA<sub>2</sub> o activando una ligasa de Coenzima A (Richardson *et al.*, 2000). En la Tabla 2 se resumen las principales funciones bioquímicas y biológicas del DHA y EPA.

**Tabla 2.** Funciones bioquímicas y biológicas del DHA y EPA

<b>¿DONDE?</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>Corazón</b>	El EPA y DHA contribuyen a reducir el nivel de TAG en sangre, en mejorar la dilatación arterial en pacientes con colesterol alto y poseen un efecto antitrombótico. Lo anterior contribuye también en reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Así mismo son benéficos para las arritmias y reducir el riesgo de ataques cardíacos. Además, el EPA y DHA parecen reducir la mortalidad no solo entre pacientes que han sufrido ya un ataque cardíaco sino también entre personas mayores
<b>Cáncer</b>	DHA y EPA inhiben la ciclooxigenasa, de este modo se reduce la cantidad de prostaglandinas y se incrementa la actividad lipooxigenasa
<b>Estructura de membrana</b>	DHA y EPA son los componentes mayoritarios de PL. En particular, el DHA es el principal componente de los PL de membrana que se encuentra en estructuras neuronales del cerebro y la retina. Normalmente se encuentran en la posición <i>sn-2</i> del PL
<b>Diabetes</b>	Se ha encontrado que el EPA incrementa la habilidad de los eritrocitos para captar la glucosa. Así mismo, el EPA y el DHA permiten los tejidos absorber y metabolizar la glucosa más eficientemente en ausencia de insulina
<b>Desórdenes neuropsiquiátricos</b>	EPA y DHA tienen efecto en el receptor de neurotransmisores y en las proteínas G, a través de las propiedades biofísicas de la membrana celular y segundos mensajeros
<b>Pulmón</b>	El EPA se ha asociado con la disminuir el riesgo de padecer asma. También tiene efectos benéficos en el tratamiento de fibrosis cística y enfisema

**Fuente:** Baeza-Jiménez y García-Galindo, 2013

### 1.5 Ácido $\gamma$ - linolénico (GLA)

Al igual que otros PUFA, los tres dobles enlaces en el GLA (*cis*-6,9,12-ácido octadecatrienoico) están dispuestos en una cadena de metilenos. Se sintetiza a partir de LA y es el primer precursor de ARA por acción de la enzima  $\Delta$ -6 desaturasa.

Las fuentes más comunes de GLA son aceites de plantas pertenecientes a las familias Boraginaceae, Onagraceae y Saxifragaceae. Los niveles máximos de GLA en estos aceites difícilmente sobrepasa el 25% con respecto al total de ácidos grasos (Gunstone, 1992; Horrobin, 1992). *Borago officinalis* y *Echium fastuosum* son dos especies de Boraginaceae, que contienen 22.7% y 23.5% de GLA, respectivamente. Otra fuente ampliamente usada es el *Evening Primrose* (*Oenothera biennis* L.). Este es un cultivo bianual de flores amarillas que florece durante la noche. Se cultiva en Norteamérica, Australia, China, y Europa. Las semillas contienen aproximadamente 15% de proteína, 43% de celulosa y lignina y 24% de aceite (Whipkey *et al.*, 1988). El aceite contiene 65-80% de LA, 7-14% de GLA, pero no concentraciones importantes de n-3 (Wolf *et al.*, 1983; Hudson, 1984). Aunque el contenido de GLA es menor en esta planta, de ella se extrae un aceite disponible comercialmente y que ha sido el más usado en aplicaciones clínicas y farmacéuticas.

Dado que el ser humano es capaz de sintetizar GLA a partir del LA, una dieta rica en productos avícolas (la yema de huevo contiene 16% de LA) y porcinos provee el LA necesario para su conversión a GLA.

#### 1.5.1 Funciones bioquímicas y biológicas del GLA

El GLA es un ácido graso esencial, cuya ausencia en la dieta es responsable de una amplia gama de afecciones tales como eccema atópico, neuropatía diabética, artritis reumatoide y trastornos cardiovasculares, reproductivos y autoinmunes. El potencial terapéutico del GLA ha sido en el

tratamiento de dichos padecimientos, así como en cáncer, infecciones virales, osteoporosis y alcoholismo (Horrobin, 1992).

En enfermedades asociadas a la edad avanzada, la enzima  $\Delta$ -6 desaturasa es menos activa y por tanto afecta la síntesis de GLA, que a su vez afecta a la síntesis de prostaglandinas (Das, 2007). Los estudios en los que se suministra GLA en la dieta han revelado un retraso en el desarrollo de aterosclerosis (Fan y Chapkin, 1998). También ejerce una eficacia clínica en una variedad de padecimientos como vasodilatación, supresión de inflamación crónica, reducción de la presión sanguínea y la inhibición de las células proliferativas del músculo liso asociadas al desarrollo de placas ateroscleróticas (Fan *et al.*, 1995; Zurier *et al.*, 1996). Se ha reportado que las fórmulas infantiles con GLA pueden ser tomadas por niños que no son amamantados (Uauy y Mena 1999). El GLA también afecta el metabolismo del colesterol al reducir el colesterol total (de manera más eficiente que el LA), LDL e incrementar HDL. Al igual que otros n-6, el GLA tiene un efecto de antiagregación plaquetaria.

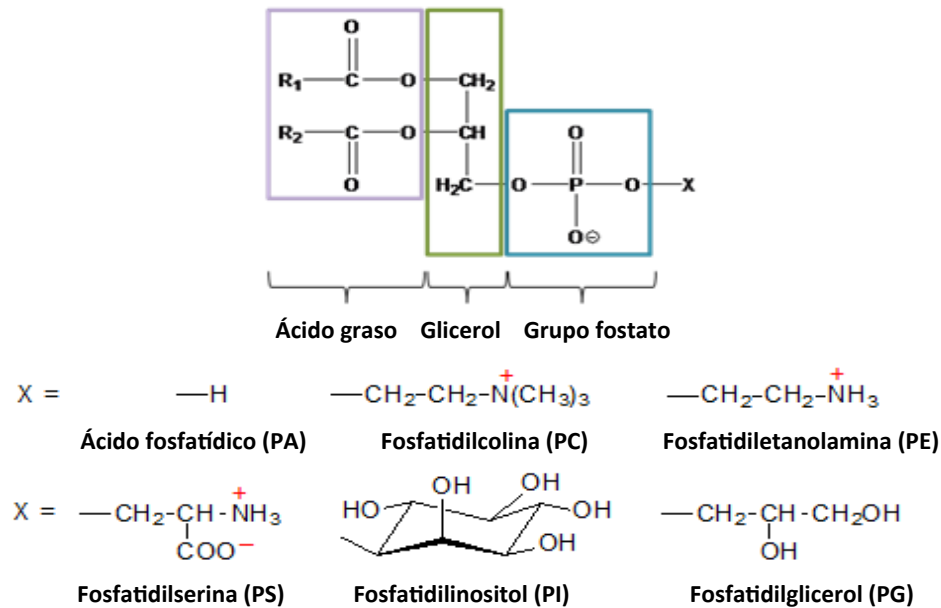
El GLA puede incrementar la síntesis de prostaglandinas de serie 1 en tejido. Sin embargo, a largo plazo una alta concentración de GLA con respecto a los PUFA n-3 puede derivar en problemas inflamatorios, plaquetarios y de vasoconstricción. Esto ocurre como consecuencia de un efecto inhibitorio de la ciclooxigenasa.

### **1.6 Fosfolípidos (PL)**

Los fosfolípidos (PL) son moléculas constituidas por una parte apolar, diacilo, y otra polar donde se encuentran el grupo fosfato y el sustituyente X (Figura 4). Estas moléculas se encuentran presentes en todos los organismos de forma ubicua.

## INTRODUCCIÓN

La naturaleza del acilo y el tipo de sustituyente X determinan la clasificación, propiedades y funciones biológicas del PL. Aquellos PL que teniendo un solo grupo acilo en la posición 1 o 2 del glicerol están en sus correspondientes liso formas (monoacilglicerofosfolípidos) y los compuestos de 2 grupos diacilglicerofosfatidil en las posiciones 1 y 3 de la misma molécula de glicerol se denominan cardiolipina.



Fuente: AOCS Lipid Library

**Figura 4.** Estructura y tipo de fosfolípidos.

Los PL son los ingredientes funcionales de la lecitina. Una de sus características más importantes es la anfifilia, como resultado de la presencia de grupos alquilo o acilo hidrófobos y grupos hidrófilos polares (Figura 4). Su naturaleza anfifílica les permite formar agregados con el agua, tales como micelas, micelas inversas o vesículas de doble capa. A nivel fisiológico, los PL son los principales componentes de la membrana celular.



### **1.6.1 Importancia nutracéutica y funcional de los fosfolípidos**

Los PL se clasifican en 4 clases principales: glicerofosfolípidos, esfingolípidos, éter fosfolípidos y fonofosfolípidos, dependiendo de la cadena de carbonos y del tipo de enlaces (Hawthorne y Ansell, 1982). En contraste con otras especies, los glicerofosfolípidos han sido ampliamente usados en alimentos, farmacia y otras industrias. Al ser moléculas anfifílicas y surfactantes naturales, los PL comerciales son empleados en panadería, como aditivos al chocolate para reducir la viscosidad y prevenir la cristalización, en la fabricación de productos instantáneos, o como estabilizantes de margarinas.

Las funciones de los PL son múltiples, únicas y fundamentales para la vida. Los recientes avances en biología y bioquímica de lípidos refuerzan esa perspectiva. Primeramente los PL son componentes integrales de la membrana y sirven para aislar al organismo del exterior y mantener la vida en condiciones adversas. La segunda función importante de los PL en la célula es regular la permeabilidad y procesos de señalización. Por sus propiedades físicas, biocompatibilidad y funciones nutricionales, los PL son biomoléculas de alto valor en las industrias de alimentos, cosméticos y farmacia. Entre otras aplicaciones, los PL pueden emplearse como emulsificantes, componentes de cosméticos, en preparación de liposomas y formulaciones médicas (Guo *et al.*, 2005).

### **1.6.2 Modificación química de fosfolípidos**

Las propiedades químicas y físicas de los PL dependen de sus estructuras moleculares. Dicha estructura puede modificarse por vía química y enzimática con el propósito de obtener un producto con propiedades fisiológicas y tecnológicas que no posee el PL original. De esta forma se obtiene un fosfolípido estructurado. Los métodos químicos empleados para la síntesis y modificación de los PL incluyen la hidrólisis para producir lisofosfolípidos (LPL), hidrogenación e hidroxilación de dobles enlaces en la cadena de ácidos grasos y acetilación del grupo amino en PE (Guo *et al.*, 2005). Los objetivos principales de la síntesis química consisten en proveer a

los compuestos de una estructura química definida para una evaluación precisa de los procesos bioquímicos y de la actividad específica de las enzimas, preparar análogos de bioactivos naturales para el desarrollo de medicamentos novedosos y el desarrollo de procesos de bajo costo y de fácil escalado para productos potencialmente aplicables. Químicamente se han obtenido PL de productos naturales y semisintéticos. El mayor avance en la síntesis de PL fue la síntesis estereoquímica de esfingolípidos y éster o éter glicerofosfolípidos. El mayor problema es cómo construir una estructura quiral y mantenerla después del proceso químico.

### **1.6.3 Modificación enzimática de fosfolípidos**

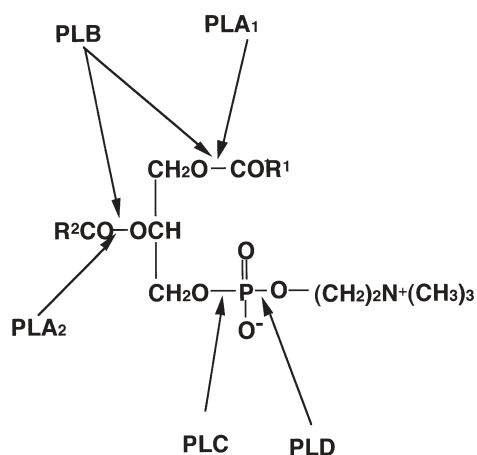
La modificación enzimática de PL tiene algunas ventajas respecto a los métodos químicos. La selectividad o especificidad de las enzimas es una de las propiedades más importantes de las mismas que hacen más simple y fácil esta modificación; tienen lugar en condiciones cercanas al ambiente, preservando las propiedades originales de los PL sensibles al calor o al oxígeno; se reduce enormemente el uso de solventes tóxicos y nocivos, simplificando las complicadas etapas de purificación, y disminuyendo el solvente residual en el producto; así mismo constituye una alternativa más segura para la modificación de PL con aplicaciones en alimentos, cosméticos y farmacia (Guo *et al.*, 2005).

Las fosfolipasas han sido ampliamente usadas en la hidrólisis de PL. Estas enzimas tienen funciones cruciales en la regulación celular, metabolismo y biosíntesis de PL. Dependiendo del mecanismo de acción, se clasifican en diferentes clases: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C y D (PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB, PLC y PLD, respectivamente) (Richmond y Smith, 2011). En la Figura 5 se esquematiza el modo de acción de cada fosfolipasa en PC. La modificación enzimática de los PL puede dividirse en dos categorías: modificación de los grupos acilo y modificación del grupo de cabeza.

Las fosfolipasas A<sub>1</sub> (fosfatidilcolina 1-acilhidrolasa, EC 3.1.1.32) y A<sub>2</sub> (fosfatidilcolina 2-acilhidrolasa, EC 3.1.1.4) pertenecen a las acilhidrolasas, que hidrolizan los enlaces éster 1 y 2 del PL respectivamente. La fosfolipasa

## INTRODUCCIÓN

que hidroliza ambos enlaces acil éster se denomina fosfolipasa B (EC 3.1.1.5). La lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5) es una enzima que preferentemente cataliza monoacilfosfolípidos a glicerofosfolípidos. Las fosfolipasas C (fosfatidilcolina colinafosfohidrolasa, EC 3.1.4.3) y D (fosfatidilcolina fosfatidohidrolasa, EC 3.1.4.4) muestran una actividad similar a las fosfodiesterasas que rompen el enlace fosforo - oxígeno entre el glicerol y el fosfato y el del fosfato con el grupo polar, respectivamente.



Fuente: Iwasaki & Yamane, 2004

**Figura 5.** Modo de acción de las diferentes fosfolipasas en PC.

La PLA<sub>1</sub> es de gran interés para los alcances de esta tesis doctoral. Esta enzima representa a un grupo muy diverso de fosfolipasas con actividad 1-acil hidrolasa que han sido identificadas y caracterizadas de diversas fuentes. Entre ellas, la PLA<sub>1</sub> de *E. coli* contiene 269 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular estimado de 31 kDa. Esta enzima pertenece a la familia de serina hidrolasas. El calcio es requerido para la dimerización *in vitro* y es también requerido para la actividad catalítica de la enzima, ya que promueve la polarización del grupo éster carbonilo del sustrato y estabiliza con moléculas de agua la carga negativa de los intermediarios durante la catálisis (Snijder y Dijkstra, 2000). La PLA<sub>1</sub> es también reconocida como triacilglicerol lipasa y posee una secuencia similar a la de las lipasas hepática

y pancreática humanas y a la lipasa pancreática GPLRP2. PLA<sub>1</sub> se diferencia de éstas por tener un *lid* (tapa) muy corto y faltarle el giro  $\beta$ 9. A tales diferencias se atribuye la actividad de PLA<sub>1</sub>, cuya triada catalítica es Ser-His-Asp (Richmond y Smith, 2011).

El otro importante grupo de enzimas empleado en la modificación de PL son las lipasas. Este grupo (triacilglicerol hidrolasas; EC 3.1.1.3) pertenece a la familia de las serina-hidrolasas y se encuentra en animales, plantas, hongos y bacterias. La triada catalítica (Ser-His-Asp/Glu) es similar al de las serina-proteasas y por ende se piensa que el mecanismo catalítico procede de la misma forma. Tres tipos de lipasas pueden identificarse de acuerdo al sitio de reconocimiento del sustrato: (a) las lipasas de la familia Rhizomucor (*Thermomyces lanuginosa*) con sus centros activos cubiertos por un lid en la superficie de la enzima; (b) lipasas de las familias *Pseudomonas* y *Candida antártica* con sitio activo y lid en forma de embudo y (c) lipasas de la familia de *Candida rugosa* con sitio activo en zonas tipo túnel conteniendo al lid en el segmento externo (Jaeger *et al.*, 1999; Zarevúcka y Zdeněk, 2008). Este grupo de enzimas ha sido ampliamente usado en la modificación de grasas y aceites, detergentes, industria del papel, farmacéuticas y síntesis orgánica. Un gran número de lipasas de mamíferos, bacterias y hongos han sido clonadas y caracterizadas.

La modificación enzimática de PL se basa en el reconocimiento posicional y selectivo de las PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> y las lipasas específicas 1,3. Existen dos mecanismos de reacción principales para llevar a cabo dicha modificación. El primero de ellos ocurre en dos etapas: hidrólisis y re-esterificación con el grupo acilo que ha incorporarse. El segundo mecanismo ocurre en una sola etapa de interesterificación entre PL y ácidos grasos o sus esteres (Adlercreutz *et al.*, 2004).

Los parámetros que afectan a esta modificación enzimática han sido evaluados y reportados para diferentes sistemas de reacción con el objetivo de producir fosfatidilcolina estructurada (SPC) y se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Reacciones enzimáticas de interesterificación para sintetizar fosfatidilcolina estructurada (SPC)

Referencia	Incorporación	Relación molar	Carga de enzima	Temperatura
Kim <i>et al.</i> (2010)	43% de n-3 PUFA en PC	1:8 (PC/n-3 PUFA)	15% PLA <sub>1</sub> inmovilizada	50°C
Chojnacka <i>et al.</i> (2009)	28% ALA en la posición <i>sn</i> -1 de PC de huevo	1:5.5 (PC/ALA)	20% Novozyme 435	52 – 55°C
	25% ALA en la posición <i>sn</i> -2	1:13 (PC/ALA)	60% PLA <sub>2</sub> en exceso	25°C por 48 h y 40°C por otras 48 h
Garcia <i>et al.</i> (2008)	35% de n-3 PUFA en PC	1:8 (PC/n-3 PUFA)	10% PLA <sub>1</sub> inmovilizada	50°C
Kim <i>et al.</i> (2007)	28% de n-3 PUFA en PC	1:10 (PC/n-3 PUFA)	10% PLA <sub>1</sub>	55°C
Vikbjerg <i>et al.</i> (2007)	25% de CA en PC	9 (CA/PC)	30% PLA <sub>2</sub> inmovilizada	45°C
	30 y 20% de CLA y DHA en PC respectivamente	3 (FA/PL)		
Hossen & Hernandez (2005)	16% de CLA en PC de soya	1:5 (PL/CLA)	20% Lipozyme TL IM	57°C
Vikbjerg <i>et al.</i> (2005)	49% de CA en PC	6 (CA/PC)	40% Lipozyme RM IM	55°C
Peng <i>et al.</i> (2002)	35% de CA ~30% de CLA 18.9% de EPA y DHA en PC	5.5:1 (FA/PL)	20% Lipozyme TL IM	60°C

**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados, **PC:** fosfatidilcolina, **PLA<sub>1</sub>:** fosfolipasa A<sub>1</sub>, **ALA:** ácido  $\alpha$ -linolénico, **PLA<sub>2</sub>:** fosfolipasa A<sub>2</sub>, **CA:** ácido cáprico, **CLA:** ácido linoleico conjugado, **DHA:** ácido docosahexaenoico, **FA:** ácido graso, **PL:** fosfolípido, **EPA:** ácido eicosapentaenoico

**Fuente:** Baeza *et al.*, 2012

### 1.7 Lisofosfolípidos (LPL)

En la literatura se encuentran diversos trabajos relacionados con PL y PL estructurados, pero pocos acerca de lisofosfolípidos (LPL). Estos últimos compuestos son glicerofosfolípidos en los que la posición *sn*-1 (1-LPL) o bien la posición *sn*-2 (2-LPL) no está esterificada. Los LPL desempeñan funciones biológicas esenciales como la señalización, así como en la síntesis de PL por acción de aciltransferasas específicas. Además los LPL tienen aplicaciones versátiles en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, como resultado de sus propiedades emulgentes, consideradas mejores que las de los PL (D'Arrigo y Servi, 2010). Recientemente se ha reportado que algunos LPL, específicamente el ácido lisofosfatídico, son biomarcadores y potenciales agentes terapéuticos contra cierto tipo de enfermedades (Richmond y Smith, 2011).

El LPL más estudiado es la lisolecitina obtenida vía hidrólisis de un residuo de ácido graso presente en la lecitina. En esta tesis doctoral se ha estudiado la síntesis de lisofosfatidilcolina (LPC), presente en pequeñas concentraciones en la membrana celular (Birgbauer y Chun, 2006) y con propiedades similares a PC; es un buen agente emulsificante y solubilizante y un útil intermediario en la síntesis de PC para aplicaciones en alimentos, cosméticos, agroquímicos y farmacéuticos (Reblova y Pokorny, 1995; Dennis *et al.*, 2006).

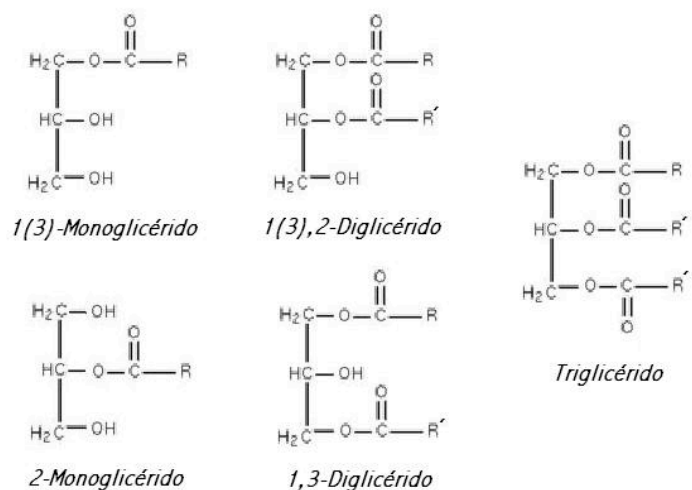
Se ha reportado la producción enzimática de LPL vía hidrólisis catalizada por PLA<sub>1</sub> (Mustranta *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1997), PLA<sub>2</sub> (Mustranta *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2001; Adlercreutz y Wehtje, 2004) y lipasas (Haas *et al.*, 1994; Mustranta *et al.*, 1994; Sarney *et al.*, 1994; Kim y Kim, 2000; Virto y Adlercreutz, 2000). PLA<sub>2</sub> y las lipasas específicas 1,3 se han empleado para modificar PC en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1, respectivamente. La reacción más importante es la hidrólisis catalizada por PLA<sub>2</sub> para producir 1-acil LPC, un efectivo bioemulsificante e importante intermediario en la síntesis de PC.

La materia prima que más se ha usado para producir LPC es glicerol-3-fosfatidilcolina (GPC). Este compuesto es inmisible en medios no polares, por lo que se precisa de solventes polares. Las diferentes estrategias reportadas previas a nuestro estudio están recopiladas en la publicación de Baeza *et al.* (2013b).

El contenido de agua del medio tiene un importante efecto en la síntesis de LPC. Durante la esterificación de GPC afecta el equilibrio de reacción (esterificación *vs.* hidrólisis), origina agregados enzimáticos y limita la transferencia de materia. En nuestro trabajo (Baeza *et al.*, 2013b) referimos las diferentes técnicas empleadas para reducir el contenido de agua en los sistemas de reacción reportados en la literatura.

### 1.8 Acilglicéridos

Los principales componentes de grasas y aceites son acilglicéridos, es decir, monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) y triacilglicéridos (TAG), y tienen muchas aplicaciones comerciales (Akoh y Min, 2002). En la Figura 6 se muestra la estructura química de estos compuestos.



**Fuente:** AOCS Lipid Library

**Figura 6.** Estructura química de acilglicéridos

En la industria alimentaria, los TAG son los principales componentes de los aceites empleados. Se ha reportado que algunos aceites ricos en ácidos grasos saturados causan enfermedades cardiovasculares, desarrollo prematuro de aterosclerosis en personas obesas (Prentice y Poppitt, 1996; Hopkins, 2003; Kolovou *et al.*, 2004). Los DAG son componentes naturales minoritarios de grasas y aceites comestibles. Tradicionalmente, se utilizan como emulgentes, junto con MAG, para la preparación de alimentos, cosméticos y para aplicaciones farmacéuticas (Hernández-Martín y Otero, 2008), y como reactivos de partida en aplicaciones sintéticas (preparación de fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas). Los 1,3-DAG poseen efectos beneficiosos sobre la prevención de la obesidad y la lipemia, a pesar de tener el mismo valor energético y digestibilidad que los TAG, lo que los convierte en potenciales alternativas a los aceites tradicionales. (Maki *et al.*, 2002). Los DAG se pueden sintetizar químicamente a partir de grasas y aceites mediante reacciones de glicerolisis a altas temperaturas (220-260°C) en presencia de un catalizador básico, como los hidróxidos sódico y potásico. Sin embargo, tanto la pureza como el rendimiento son bajos cuando se emplea esta metodología. La tecnología enzimática permite sintetizar DAG no sólo empleando condiciones más suaves de reacción, sino también con un alto rendimiento y especificidad posicional, por lo que este tipo de catálisis es preferible frente a la química tradicional.

El aceite de pescado es bien reconocido por su alto contenido de ácidos grasos n-3, siendo EPA y DHA los componentes mayoritarios. Este aceite ha sido empleado en diversos sistemas de reacción con el objeto de incorporar sus n-3 y de esta forma sintetizar productos ricos en EPA y DHA. Se sugiere revisar los siguientes estudios: Jennings y Akoh, 1999; Garcia *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2013; Baeza *et al.*, 2013c.

Se ha hecho mención de estos componentes porque como complemento de un trabajo de master, durante esta tesis doctoral se desarrolló la síntesis de DAG estructurados, ricos en EPA y DHA mediante una reacción de glicerolisis catalizada por lipasa (Miranda *et al.*, 2013; Baeza *et al.*, 2013c).



## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Desarrollar procesos enzimáticos selectivos para aplicaciones nutricionales

### **2.2 Objetivos específicos**

- Inmovilización de fosfolipasas
- Preparación de fosfolípidos ricos en PUFA
- Desarrollar y optimizar la síntesis selectiva de fosfolípidos ricos en PUFA
- Preparación de diglicéridos ricos en PUFA
- Enriquecimiento de GLA catalizado por lipasa en un sistema libre de solvente

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Biocatalizadores

Los 4 biocatalizadores empleados durante la presente investigación fueron: PLA<sub>1</sub>, Novozym 435, Lipasa PS y *Candida rugosa*. La fosfolipasa PLA<sub>1</sub> (Lecitase® Ultra) está comercialmente disponible en forma de una solución que contiene 1,5% de proteína y fue suministrada por Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Esta enzima fue inmovilizada en Duolita A568 (Rohm and Haas; Barcelona, Spain). La lipasa Novozym 435 de *Candida antarctica* (inmovilizada en una resina acrílica macroporosa) fue igualmente suministrada por Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). La Lipasa de *Burkholderia cepacia* (PS), fue adquirida de Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japón) y la lipasa de *Candida rugosa* (Lipase OF) fue obtenida de Meito Sangyo Co., LTD (Nagoya, Japón).

#### 3.2 Fosfolípidos, lisofosfolípidos y PUFA

Los fosfolípidos empleados para el desarrollo de este trabajo doctoral fueron: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA), todos ellos suministrados por Larodan Fine Chemicals (Malmoe, Sweden). Así mismo, se empleó lecitina de soja con un contenido en peso de 98% de PC, fue adquirida de Shenyang Tianfeng Bioengineering Technology Co. (Shenyang, Liaoning, China).

Para la identificación del lisofosfolípido formado se empleó como estándar L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina de soja, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tres fueron los PUFA empleados en las distintas reacciones estudiadas. El CLA utilizado (en forma de ácido graso libre) contiene principalmente los isómeros c-9, t-11 y t-10, c-12 (representan el 92% en peso). Este ácido fue suministrado por Lipid Nutrition (Wormerveer, The Netherlands). El DHA y EPA fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 3.3 Aceites

El primer aceite con el que se trabajó fue el de aceite de pescado rico en n-3 obtenido de Ocean Nutrition (Nova Scotia, Canada). Este aceite contiene (% en peso): EPA, (10,43%), DPA (7,2%) y DHA (64,46%). Con este aceite se llevaron a cabo reacciones de glicerolisis para producir diglicéridos estructurados con un elevado contenido de PUFA n-3.

El segundo aceite empleado fue Evening primrose, adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Este aceite contiene 8,87% en peso de ácido gamma-linolenico (GLA) y el objetivo fue concentrar dicho PUFA mediante una reacción selectiva de esterificación.

### 3.4 Reactivos

Los reactivos trilinoleína ( $\geq 99\%$ ), 1,2 dipalmitina ( $\geq 99\%$ ), 1,3 dioleína ( $\geq 99\%$ ), 1-monooleína ( $\geq 99\%$ ) y el ácido araquídico ( $\geq 99\%$ ), empleados como estándares en las reacciones de glicerolisis fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). En la misma casa comercial se adquirieron el derivatizante metóxido de sodio (0,5M en metanol) y los alcoholes etanol (95%) y butanol (99%) para las reacciones de hidrólisis y esterificación, respectivamente. Para determinar la composición en ácidos grasos de los distintos productos obtenidos se utilizó como estándar la mezcla de ácidos grasos Supelco 37 FAME Mix (Bellefonte, PA, USA).

Todos los solventes empleados para las determinaciones cromatográficas (GC y HPLC) fueron grado HPLC, suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) o Scharlab (Barcelona, España).

### **3.5 Producción de fosfatidilcolina estructurada (SPC) con un elevado contenido en CLA**

Este estudio se llevó a cabo empleando como reactivos lecitina de soja (98% en peso de PC) y CLA (92%, conteniendo los isómeros *c*-9, *t*-11 y *t*-10, *c*-12). La producción de fosfatidilcolina estructurada (SPC) con CLA consistió en las siguientes etapas:

#### **3.5.1 Inmovilización de PLA<sub>1</sub>**

La solución comercial de esta enzima fue mezclado con volúmenes iguales del buffer 0,1N Tris-HCl a pH 7. 20 mL de esta suspensión se mezclaron con 4g de soporte (Duolita A568) y se dejaron en agitación (SI 50, Stuart Scientific, UK) a 50°C y 300 rpm, durante la noche. Tras esto, 50 µL de muestra se mezclaron con 450 µL de buffer para determinar el contenido de proteína. Este protocolo fue adaptado de García *et al.*, 2008.

#### **3.5.2 Reacciones de acidólisis**

Para alcanzar el mayor porcentaje de incorporación de CLA en PC se evaluaron diferentes cargas de enzima (2, 5, 10, 15 y 20%, con respecto a la mezcla de sustratos), temperaturas (20, 30, 40, 50 y 60°C) y diferentes relaciones molares de sustratos (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10, PC:CLA). Se mezclaron 4 g de mezcla de sustratos PLA<sub>1</sub> inmovilizada para reaccionar en reactores de 25 mL. Dichos reactores fueron agitados en un incubador orbital (SI 50, Stuart Scientific, UK) a 200 rpm durante 24 h. Se tomaron diferentes muestras para monitorear la incorporación de CLA en PC. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

**3.5.3 Análisis de SPC**

Las muestras tomadas para el seguimiento de la reacción fueron analizadas por cromatografía de gases (GC). Los metil ésteres de los ácidos grasos esterificados fueron preparados por derivatización selectiva de 200 µL de mezcla de reacción con 0,5 mL de cloroformo (Scharlab; Barcelona, Spain) y 0,5 mL de metóxido de sodio 0,5M en metanol. Después de incubar por 5 min, fueron añadidos 0,2 mL de agua y 2 mL de hexano (Scharlab). Todo este volumen de reactivos fue agitado y se recuperaron posteriormente los metil esterios en la fase orgánica.

Un µL de dicho extracto fue inyectado en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, acoplado con una columna Phenomenex ZB-WAX plus (30 m X 0,32 mm X 0,25 µm). Las temperaturas del inyector y detector (FID) son 250 and 300°C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo constante a 200°C durante 20 min. Los isómeros de CLA en SPC fueron identificados por el tiempo de retención de los mismos.

**3.6 Producción optimizada de SPC por el método de superficie de respuesta (RSM)**

Este estudio se llevó a cabo para optimizar la incorporación de CLA en PC, por lo que los mismos reactivos fueron empleados. Así mismo, las reacciones de acidólisis fueron desarrolladas bajo las mismas condiciones descritas en el punto 4.5.2, empleando como reactivos lecitina de soja (98% en peso de PC) y CLA (92%, conteniendo los isómeros *c*-9, *t*-11 y *t*-10, *c*-12). La producción de SPC con CLA consistió en las siguientes etapas:

**3.6.1 Análisis del perfil de fosfolípidos**

Este análisis fue realizado por cromatografía de líquidos empleando un detector *laser light scattering* (HPLC-ELSD). El sistema de análisis consta de una bomba LaChrome L-7100 (Merck-Hitachi), una columna de sílica (250 mm X 4,6 mm ID X 5µm) fase normal Kromasil (Análisis Vínicos; Ciudad

Real, España) y un inyector automático LaChrome L-7200 (Merck-Hitachi). El volumen de inyección fue de 10 µL para todas las muestras analizadas. La separación y cuantificación de PC, CLA, SPC y LPC se llevó a cabo a 35°C bajo condiciones isocráticas y un flujo de 0,8 mL/min. La fase móvil empleada consistía de hexano:isopropanol:agua (17:66:17, v/v). Un detector ELSD modelo 55 de Sedex (S.E.D.E.R.E., Alfortville, France) fue empleado con una presión de 2,1 bar con aire como gas nebulizador a 65°C.

Por otro lado el porcentaje de incorporación de CLA en PC fue determinado como se describió en el punto 4.5.3.

### **3.6.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

Los experimentos se realizaron usando un diseño de composición central para investigar los efectos lineal, cuadrático y el producto cruzado de las 3 variables de estudio, cada una con 5 niveles. También se incluyeron 4 puntos centrales. Las variables de estudio fueron: la carga de enzima ( $X_1$ ), la temperatura ( $X_2$ ) y la relación molar de sustratos ( $X_3$ ), teniendo como variable de respuesta el porcentaje de incorporación de CLA en PC ( $y_1$ ). El diseño experimental utilizado se muestra en la Tabla 4. Para predecir la variable dependiente ( $y_1$ ), un modelo de regresión polinomial de segundo orden se estudio de la siguiente manera:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

donde:  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$ , representan los coeficientes de los efectos lineal, cuadrático y cruzado, respectivamente.

Con el propósito de estudiar las diferentes variables independientes y posteriormente determinar las óptimas condiciones para la incorporación, se realizaron los correspondientes análisis de varianza y de superficie de respuesta mediante el software JMPin 4.0.4 (SAS Institute, Inc.).

**Tabla 4.** Diseño experimental empleado en la síntesis de SPC

<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>y<sub>1</sub></b>
<b>1</b>	5	30	4	60,54
<b>2</b>	5	30	8	47,43
<b>3</b>	15	30	4	77,42
<b>4</b>	15	30	8	75,05
<b>5</b>	5	50	4	61,38
<b>6</b>	5	50	8	53,71
<b>7</b>	15	50	4	87,46
<b>8</b>	15	50	8	77,94
<b>9</b>	10	40	2	67,62
<b>10</b>	10	40	10	72,72
<b>11</b>	2	40	6	27,98
<b>12</b>	20	40	6	78,02
<b>13</b>	10	23	6	57,44
<b>14</b>	10	57	6	78,90
<b>15</b>	10	40	6	73,60
<b>16</b>	10	40	6	72,43
<b>17</b>	10	40	6	72,23
<b>18</b>	10	40	6	75,07

**X<sub>1</sub>**: carga de enzima (% con respecto a la mezcla de sustratos), **X<sub>2</sub>**: temperatura (°C), **X<sub>3</sub>**: relación molar de sustratos (mol CLA/mol PC), **y<sub>1</sub>**: porcentaje de incorporación (CLA en PC)

### **3.7 Producción de lisofosfatidilcolina (LPC) a partir de fosfatidilcolina (PC)**

Este estudio se desarrolló a partir de lecitina de soja (98% en peso de PC) empleando dos medios de reacción: agua y etanol. Así mismo, se emplearon 3 enzimas diferentes: una fosfolipasa inmovilizada (PLA<sub>1</sub>), una lipasa inmovilizada (Novozym 435) y una lipasa en forma libre (PS Amano). Para la producción de LPC se trabajó de acuerdo a las siguientes etapas:

#### **3.7.1 Reacción enzimática de hidrólisis**

La enzima PLA<sub>1</sub> fue inmovilizada como se indicó anteriormente. Para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis se mezcló PC en 1 L de agua destilada (sistema A) o en 1 L de etanol (sistema B) para obtener dos sistemas de reacción con una concentración de 150 mg PC/mL. En todas las reacciones se añadió, 15% de las diferentes enzimas (en peso, con respecto al

peso total de PC) para mezclarlo con 5 mL de los sistemas A y B. La reacción procedió en reactores de 25 mL agitados a 200 rpm durante 72 h, y se evaluó el efecto de la temperatura (30, 40, 50 y 60°C). Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear el grado de hidrólisis. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

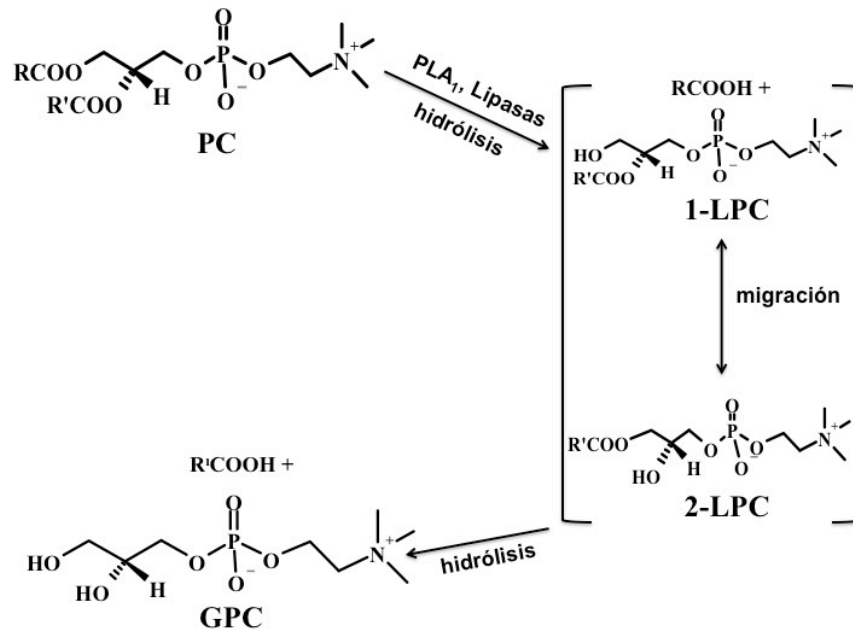
### **3.7.2 Análisis del perfil de lisofosfolípido**

Este análisis se realizó en condiciones similares al descrito en el punto 4.6.1. Sin embargo, en este nuevo análisis, el HPLC consistió en una bomba binaria Waters 1525 (Waters Corp., Milford, MA), acoplada a una columna de sílica fase normal (Partisil 250 mm X 4,6 mm X 5  $\mu$ m) y un inyector automático Waters 717plus. La cuantificación e identificación de los reactivos y productos se realizó por medio de un detector de UV-vis Waters 2487 a una longitud de onda de 230 nm, de acuerdo al tiempo de retención obtenido para los estándares. Las correspondientes curvas de calibración se construyeron relacionando la absorbancia ( $A_{230}$ ) y la concentración (mg/mL).

### **3.7.3 Cálculo del grado de hidrólisis**

Para determinar el progreso de la reacción se empleó una aproximación similar a la reportada en un trabajo previo (Baeza *et al.*, 2012b). Para este nuevo estudio, el grado de hidrólisis (DH) se definió como:  $100\% - \text{rendimiento total de PC}$ . Este último valor se refiere a la relación LPC formada y la suma de PC sin reaccionar y LPC formada. Para las reacciones que tuvieron lugar en el sistema B, se usó DEt, para referir al grado de etanolisis. Para nuestros cálculos no incluimos GPC, ya que bajo las condiciones analíticas de nuestro estudio, dicho compuesto no fue identificado aun cuando puede formarse durante la hidrólisis de PC (ver Figura 7).





FUENTE: Baeza et al., 2013b

**Figura 7.** Reacción enzimática de hidrólisis

### 3.8 Producción de diacilglicéridos ricos en n-3

El tercer grupo de interés en el presente trabajo doctoral es el de DAG. Por ello se realizaron reacciones de glicerolisis empleando como materia prima un aceite de pescado cuyo contenido en n-3 es: EPA, (10,43%), DPA (7,2%) y DHA (64,46%). Las reacciones enzimáticas fueron catalizadas por Novozym 435 y en primer estudio se optimizó la producción de DAG estructurados en n-3 (Miranda *et al.*, 2013) y un segundo se evaluaron los efectos de la temperatura y el tipo y velocidad de agitación (Baeza *et al.*, 2013c). Las etapas del primer trabajo fueron las siguientes:

#### 3.8.1 Reacción enzimática de glicerolisis

Para preparar la mayor cantidad de DAG posible, en las reacciones de glicerolisis desarrolladas se evaluaron diferentes cargas de enzima (5, 7, 10, 13 y 15%, con respecto a la mezcla de sustratos), temperaturas (40, 44, 50,

56 y 60°C) y relaciones molares de sustratos (1; 1,4; 2; 2,6 y 3, aceite/glicerol). 3 g de mezcla de reacción se combinaron con la enzima para iniciar la reacción en reactores de 25 mL que se colocaron en un incubador (SI 50, Stuart Scientific UK) a 200 rpm durante 24 h. Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear la incorporación de n-3 en DAG y MAG. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

### **3.8.2 Análisis del perfil de glicéridos**

Este análisis se realizó en el mismo equipo descrito en la sección 4.6.1. Sin embargo, la separación cromatográfica se realizó de acuerdo al método de Hernández-Martín y Otero (2008). El volumen de inyección fue de 20 µL; la temperatura de operación fue de 40°C y la del detector 90°C.

### **3.8.3 Separación de glicéridos**

Los diferentes glicéridos producidos fueron separados por cromatografía en capa fina (TLC). Para el desarrollo de dichas placas (Silica gel 60 F<sub>254</sub>) se empleó como fase móvil hexano:dietil eter:ácido fórmico (80:20:2 %v/v). Las distintas bandas fueron visualizadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v) y calentamiento. Los distintos glicéridos fueron identificados al compararlos con los distintos *R<sub>f</sub>* obtenidos para los estándares. Las bandas correspondientes a MAG, DAG y TAG fueron raspadas y disueltas en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v). Posteriormente, la solución resultante fue filtrada y derivatizada para ser analizada por GC.

### **3.8.4 Análisis de ácidos grasos**

Los metil esteres de los ácidos grasos esterificados fueron preparados por derivatización selectiva de 200 µL de la solución filtrada anteriormente con 0,5 mL de cloroformo (Scharlab; Barcelona, Spain) y 0,5 mL de metóxido de sodio 0,5M en metanol. Después de incubar por 5 min, 0,2 mL de agua y 2 mL de hexano (Scharlab) fueron añadidos. Todo este volumen de reactivos fue agitado y recuperar posteriormente los metil esteres en la fase orgánica.

Un  $\mu\text{L}$  de dicho extracto fue inyectado en cromatógrafo de gases Agilent 6890N, acoplado con una columna Phenomenex ZB-WAX plus (30 m X 0,32 mm X 0,25  $\mu\text{m}$ ). Las temperaturas del inyector y detector (FID) son 250 and 300°C, respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo en 50°C durante 2 min para posteriormente alcanzar 220°C a razón de 30°C/min. Esta última temperatura permaneció constante por 25 min y posteriormente se elevó la temperatura a 255°C y se mantuvo por 7 min. Los distintos ácidos grasos fueron identificados de acuerdo al tiempo de retención del estándar Supelco 37 FAME Mix.

### **3.8.5 Diseño experimental y análisis estadístico**

Esta parte del estudio se realizó bajo el mismo modelo descrito en el punto 4.6.2. Las variables de estudio son: carga de enzima ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) y relación molar de sustratos ( $X_3$ ), teniendo como variable de respuesta la producción de DAG ( $y_1$ ). El diseño experimental utilizado se muestra en la Tabla 5.

### **3.8.6 Efecto del tipo de agitación**

A partir de esta etapa se describe la metodología seguida para desarrollar el segundo manuscrito (Baeza *et al.*, 2013c) derivado de esta parte de la tesis. Con tal propósito, se evaluó el efecto de las agitaciones orbital (SI 50, Stuart Scientific, UK) y magnética (Ikamag RCT, IKA®-Werke GmbH & Co. KG). Para ambos sistemas se emplearon 3 g de mezcla de sustratos combinados con 15% de enzima en reactores de 25 mL agitados a 200 rpm, 60°C, con una relación molar de sustratos 3:1 (aceite:glicerol) durante 24 h. Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear la incorporación de n-3 en DAG y MAG. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

**Tabla 5.** Diseño experimental empleado en la síntesis de glicéridos estructurados

<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>y<sub>1</sub></b>
<b>1</b>	7	44	1.4	38,99
<b>2</b>	7	44	2.6	38,28
<b>3</b>	13	44	1.4	36,88
<b>4</b>	13	44	2.6	39,01
<b>5</b>	7	56	1.4	41,57
<b>6</b>	7	56	2.6	41,44
<b>7</b>	13	56	1.4	47,00
<b>8</b>	13	56	2.6	46,97
<b>9</b>	10	50	1	34,66
<b>10</b>	10	50	3	39,89
<b>11</b>	5	50	2	39,62
<b>12</b>	15	50	2	35,37
<b>13</b>	10	40	2	36,78
<b>14</b>	10	60	2	43,74
<b>15</b>	10	50	2	35,89
<b>16</b>	10	50	2	36,51
<b>17</b>	10	50	2	39,50
<b>18</b>	10	50	2	45,46

**X<sub>1</sub>**: carga de enzima (% con respecto a la mezcla de sustratos), **X<sub>2</sub>**: temperatura (°C), **X<sub>3</sub>**: relación molar de sustratos (aceite/glicerol), **y<sub>1</sub>**: producción de DAG

### **3.8.7 Efecto de la temperatura**

En el primer manuscrito derivado de esta parte de la tesis (Miranda *et al.*, 2013) se encontró que la temperatura era la variable de control. Por ello se decidió evaluarla nuevamente en un rango diferente (65, 70, 75, 80, 85 y 90°C). 3 g de mezcla de sustratos combinados con 15% de enzima en reactores de 25 mL agitados a 300 rpm, con una relación molar de sustratos 3:1 (aceite:glicerol) durante 24 h. Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear la incorporación de n-3 en DAG y MAG. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

**3.8.8 Efecto de la velocidad de reacción**

3 g de mezcla de sustratos fueron combinados con 15% de enzima en reactores de 25 mL, agitados a diferentes velocidades (300, 500, 700 y 900 rpm), con una relación molar de sustratos 3:1 (aceite:glicerol), 65°C, durante 24 h. Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear la incorporación de n-3 en DAG y MAG. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

**3.9 Producción de un aceite enriquecido en GLA en un sistema libre de solvente**

Esta última parte de la tesis doctoral consistió en incrementar el contenido del GLA, ácido graso n-6, mediante reacciones enzimáticas de esterificación catalizadas por *C. rugosa* entre el aceite Evening primrose y butanol, en un sistema libre de solvente. La parte experimental incluyó las siguientes etapas:

**3.9.1 Preparación de ácidos grasos a partir del aceite**

A partir de nuestra materia prima, Evening primrose oil (EPO), se prepararon los ácidos grasos libres correspondientes para llevar a cabo las reacciones de esterificación. Para ello 150g de EPO se añadieron a una solución de NaOH (60g) en agua destilada (150 mL). Esta mezcla se mantuvo en reflujo durante 40 min a 500 rpm. Posteriormente, la mezcla se vertió en un embudo de separación y se añadieron agua destilada (300 mL) y HCl (180 mL). Acto seguido se adicionaron hexano (750 mL) y agua destilada (300 mL). Finalmente se realizaron 3 lavados con agua destilada (150 mL) para recuperar la fase superior que contiene los ácidos grasos, de donde el solvente fue removido en un rotavapor.

Este protocolo fue adaptado de Kim *et al.* (2006). El peso molecular obtenido para los ácidos grasos producidos (EPO-FA) fue de 278,9 g/mol.

**3.9.2 Reacción enzimática de esterificación**

Las reacciones de esterificación tuvieron lugar en reactores de 50 mL (3,5 cm diámetro interno, 8 cm altura) concéntricos y enchaquetados con agua de calentamiento para el control de temperatura. La agitación magnética se mantuvo constante en 400 rpm bajo una atmósfera de nitrógeno. 5 g de mezcla de reactivos fueron empleados para desarrollar las diferentes reacciones y evaluar los siguientes parámetros: relación molar de sustratos (1:4, 1:6, 1:8, 1:10 y 1:12, EPO-FA:BtOH), temperatura (10, 20, 30, 40, 50 y 60°C) y carga de enzima (5, 10, 15 y 20%, con respecto a la mezcla de sustratos). Diferentes muestras fueron tomadas para monitorear el incremento en el contenido de GLA. Las reacciones se realizaron y analizaron por duplicado.

**3.9.3 Análisis de productos**

Las muestras de reacción (200 µL) fueron disueltas en cloroformo (1 mL) y filtradas a través de microfiltros de nylon (0,45 µm). Tras esto, se procedió a la separación de productos mediante TLC, empleando como fase móvil éter de petróleo:diétil éter:ácido acético (100:20:1, v/v/v). La detección se consiguió con una solución 0,2% (p/v) de 2,7-diclorofluoresceína en metanol y luz UV. Las bandas correspondientes a los butil ésteres y ácidos grasos fueron metiladas con 14% BF<sub>3</sub> en metanol.

La composición del producto obtenido se determinó por GC (Varian 3800, Varian Inc., Walnut Creek, CA), empleando una columna capilar de sílica Supelcowax 10 (30 m × 0,32 mm i.d.; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Las temperaturas del inyector y el FID eran 240 y 250°C, respectivamente. El horno se mantuvo en 180°C por 1 min y posteriormente la temperatura se incrementó a 210°C a razón de 1,5°C/min. Los diferentes ácidos grasos obtenidos fueron identificados con los tiempos de retención del estándar. El ácido heptadecanoico se utilizó como estándar interno.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En esta sección se presenta un resumen global de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral. En primera instancia se desarrolló una metodología para la síntesis enzimática de fosfolípidos ricos en PUFA. Posteriormente se trabajó en el desarrollo y optimización de la síntesis de fosfolípidos ricos en PUFA, y siguiendo la misma línea de investigación, se estudió la formación de LPC a partir de PC. Se emplearon dos sistemas de reacción (etanol y agua) y enzimas libres e inmovilizadas. Posteriormente, complementando un trabajo de máster, se estudió la preparación de diglicéridos ricos en PUFA. Finalmente, se alcanzó el objetivo de enriquecer un aceite vegetal en GLA, a través de un proceso selectivo catalizado por la lipasa de *Candida rugosa* en un sistema libre de solvente.

### **4.1 Primera etapa (2009 – 2010)**

#### **4.1.1 Inmovilización de enzimas**

Se trabajó con Duolite A 568 (Rohm and Haas, Barcelona) como soporte y la enzima Lecitase® Ultra (Novozymes, Denmark). El objeto de esta tarea era identificar la mejor relación enzima-soporte para la inmovilización de esta fosfolipasa. De las pruebas realizadas, las condiciones óptimas de inmovilización fueron: 20 mL de la suspensión enzima-buffer, 12 h, 50°C y 300 rpm. Bajo estas condiciones se inmovilizaron 52 mg proteína/g soporte de una solución inicial que contenía 75 mg proteína/g soporte, es decir, el 70%.

### **4.1.2 Preparación de fosfolípidos ricos en PUFA. Desarrollo de la metodología**

Para el desarrollo de esta tarea se emplearon los fosfolípidos: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA), y los PUFA: CLA (Natural Asa, Hovdebygda, Norway), DHA y EPA (Sigma Aldrich). Las variables a evaluar fueron la relación molar de sustratos (PL:CLA de 1:1, 1:5, 1:8, 1:10), temperatura (30, 40, 50, 60°C), tiempo de reacción (4, 8, 12, 24, 48h) y la carga de enzima (10, 20, 30% en peso respecto del peso total de sustratos).

De los experimentos realizados, los mejores resultados se obtuvieron para la reacción de interesterificación de PC y CLA bajo las siguientes condiciones: relación molar 1:8 (PC:CLA), 18 h, 50°C, 300 rpm (agitación orbital) y 10% enzima, logrando incorporar el 21,5% del CLA en PC.

Los resultados obtenidos en esta primera etapa fueron presentados como carteles: “Biocatalyzed synthesis of phospholipids derived from phosphatidic acid”, y “Biocatalyzed synthesis of phospholipids derived from phosphatidylcholine”, en el **3<sup>rd</sup> Annual World Congress of Industrial Biotechnology** celebrado del 25 – 27 de Julio de 2010 en Dalian, China.

## **4.2 Segunda etapa (2010 – 2011)**

### **4.2.1 Desarrollo y optimización de la síntesis de fosfolípidos ricos en PUFA**

A partir de los resultados obtenidos en la primera etapa, se amplió el estudio de la producción de fosfolípidos estructurados centrándonos en la preparación de PC enriquecida en CLA. Las variables que se evaluaron fueron: relación molar de sustratos (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10; PC:CLA), temperatura (20, 30, 40, 50 y 60°C) y la carga de enzima (2, 5, 10, 15, 20%; en peso con respecto a la mezcla de sustratos). Para a estos estudios se empleó la metodología de superficie de respuesta para optimizar el sistema de



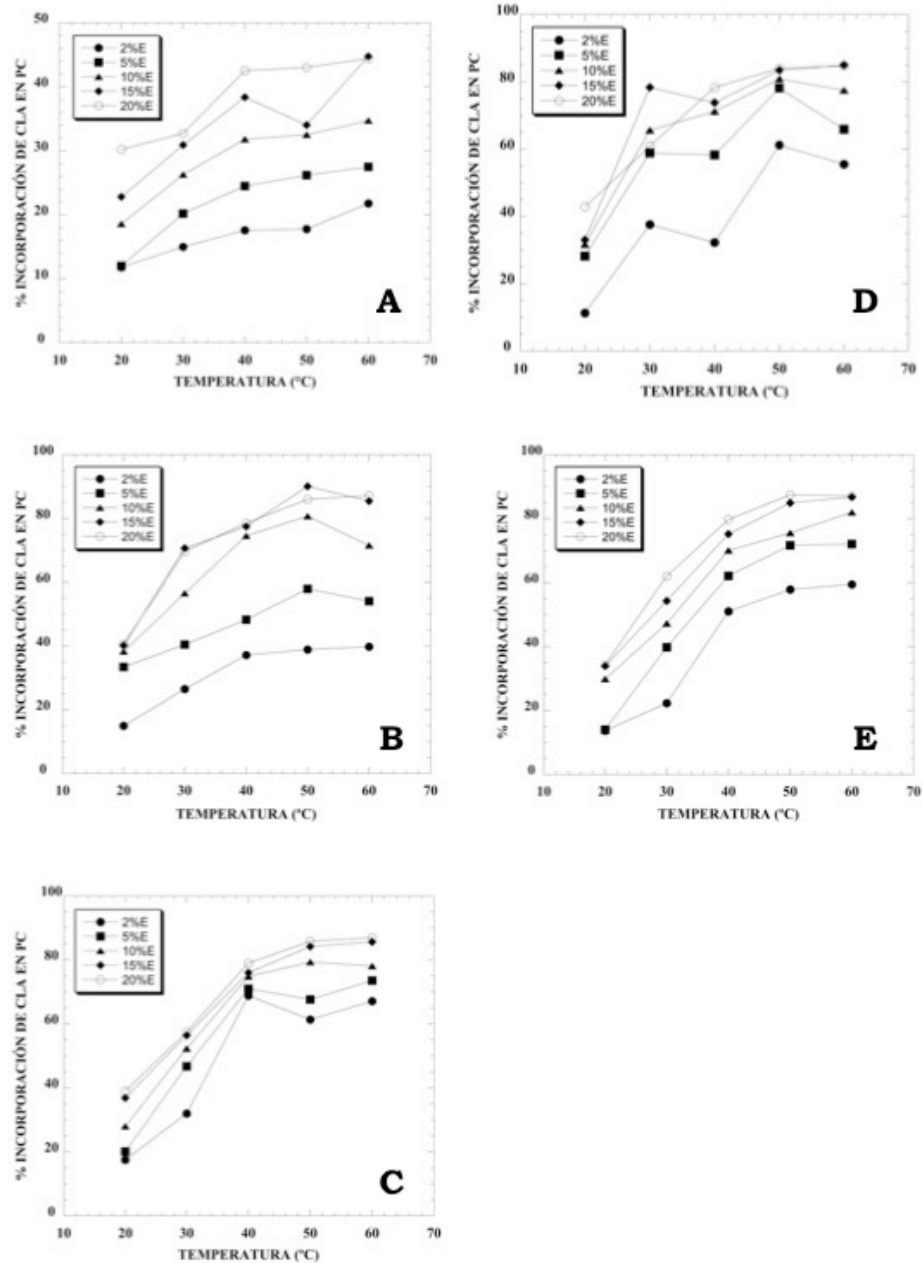
reacción y definir el efecto de las variables de estudio en la incorporación de CLA en PC y la interacción entre las mismas.

Del trabajo experimental realizado durante esta etapa se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

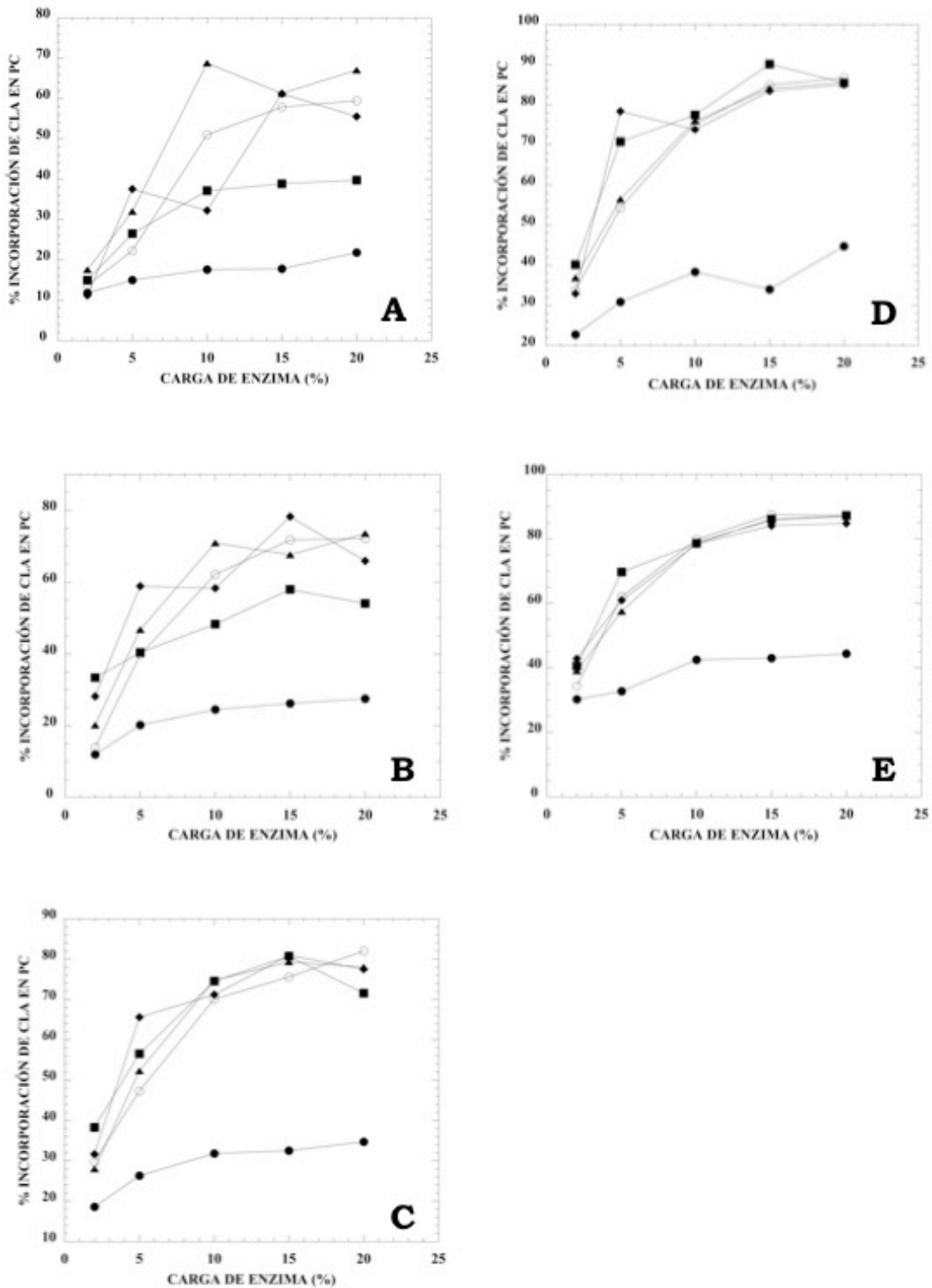
1. Un incremento en la concentración de ácido graso libre (mayor relación molar) favoreció el rendimiento global de la reacción. Como se observa en la Figura 8, el empleo de mayor exceso molar de CLA permite obtener mayores porcentajes de incorporación de éste. Así por ejemplo, para la menor relación molar (1:2, PC:CLA) el máximo porcentaje de CLA incorporado fue de 40% (Figura 8A) y a medida que el exceso molar de CLA aumentó, el porcentaje de este ácido en el producto superó el 60%. Este fenómeno estuvo claramente favorecido por una mayor carga de enzima en el sistema de reacción.
2. Al evaluar el efecto de la temperatura se encontró que se alcanzan mayores porcentajes de incorporación con el aumento de dicha variable (Figura 9), excepto para las reacciones con la menor relación molar (1:2, PC:CLA). A partir de 40°C, para las relaciones molares 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10, las cinéticas obtenidas produjeron tendencias similares independientemente del contenido de enzima presente, llegando todas ellas a un 80% de incorporación (Figuras 9A y 9B).
3. Con respecto al efecto de la carga de enzima (Figura 10), los menores porcentajes de incorporación de CLA (40%) se tuvieron con la menor carga de enzima (2%, Figura 10A). A partir de una carga de enzima de 10%, el contenido de CLA alcanzó el 60% (Figuras 10C, 10D, 10E). Los incrementos en el contenido de CLA por acción de diferentes cargas de enzima fueron favorecidos por el incremento de la temperatura.

4. Las condiciones de reacción que condujeron a la mayor incorporación (90%) de CLA en PC fueron: relación molar 1:4 (PC:CLA), 50°C y 15% enzima, con una agitación orbital de 200 rpm tras 24 h. La composición de SPC producida se muestra en la Tabla 6
5. La metodología de superficie de respuesta nos permitió observar que la carga de enzima es la variable que tiene un efecto significativo en la incorporación de CLA en PC. Así mismo, los valores de  $R^2$  y ANOVA dan cuenta de que el modelo propuesto lleva a una correcta estimación del sistema de estudio
6. El proceso de interesterificación incluye reacciones de hidrólisis y esterificación. Durante la producción de SPC, se forma LPC en la primera etapa de la reacción, que rápidamente se convierte en reactivo de la segunda reacción. La formación de LPC afecta la producción de SPC, favorece la migración de grupos acilo y disminuye el rendimiento y pureza de SPC. Este fenómeno de hidrólisis fue más evidente a medida que el contenido de CLA en PC aumentó (Figura 11). Para las condiciones óptimas encontradas el grado de hidrólisis fue de 87,4% y la formación de LPC de 51.87 mM.
7. Comparado con otros estudios en la literatura, el porcentaje de incorporación obtenido en esta tesis doctoral es el más alto que hasta ahora haya sido reportado (Ver Tabla 3)
8. Lo anteriormente mencionado hizo posible la publicación de 2 trabajos científicos:
  - **R. Baeza-Jiménez**, J. González-Rodríguez, In-H. Kim, H.S. García and C. Otero. 2012. Use of immobilized phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed acidolysis for the production of structured phosphatidylcholine with an elevated conjugated linoleic acid content. *Grasas y Aceites*. 63(1): 44-52
  - **Ramiro Baeza-Jiménez**, Juan A. Noriega-Rodríguez, Hugo S. Garcia and Cristina Otero. 2012. Structured phosphatidylcholine with elevated content of conjugated linoleic acid: optimization by response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114, 1261-1267

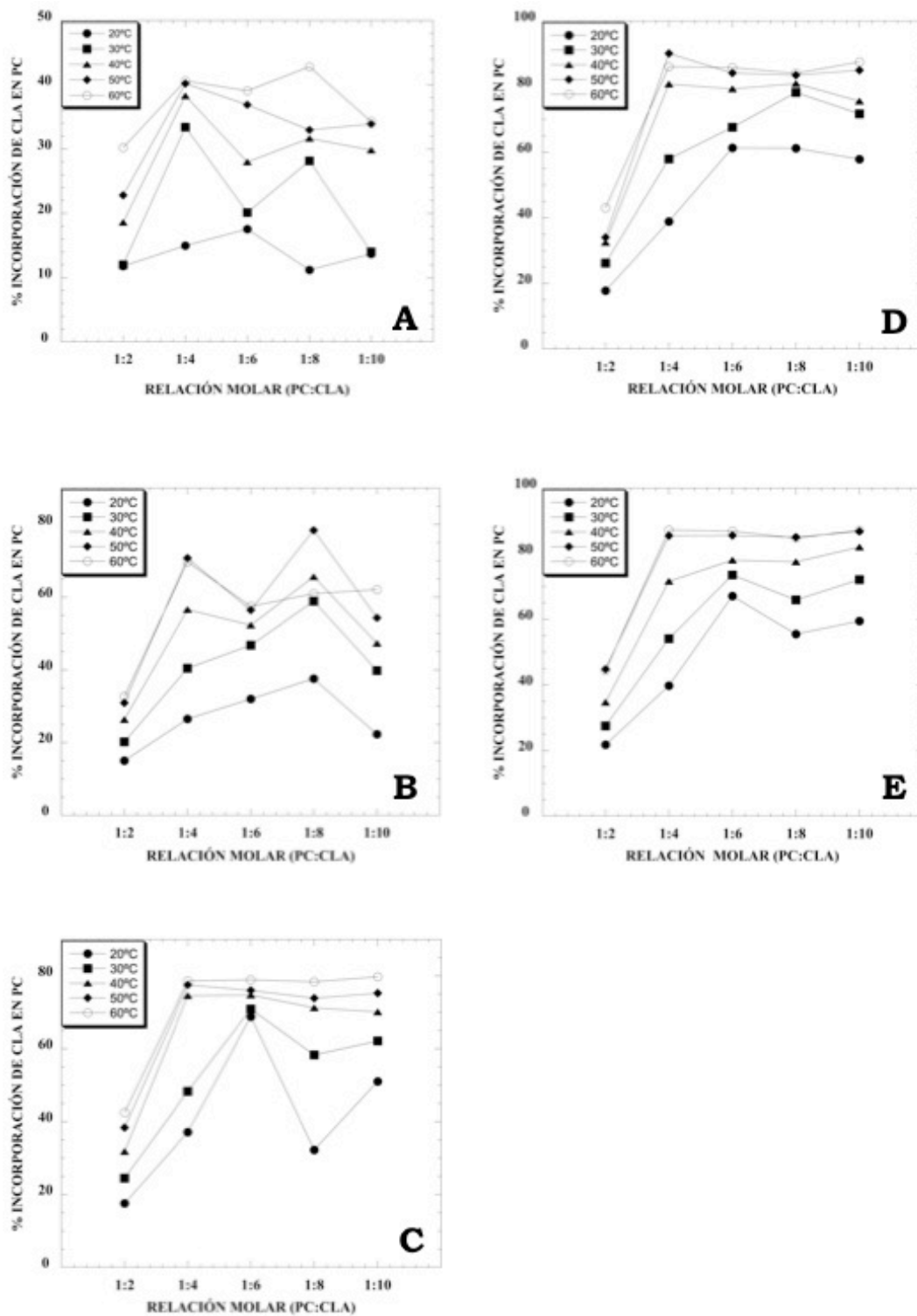
Así mismo, estos trabajos se presentaron como cartel en el **XIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos** (Zacatecas, Zacatecas, México. 26 y 27 de Mayo de 2011), y el **II Congreso Internacional de la AMIDIQ** (San José del Cabo, BCS, México. 1 – 4 de Mayo de 2012).



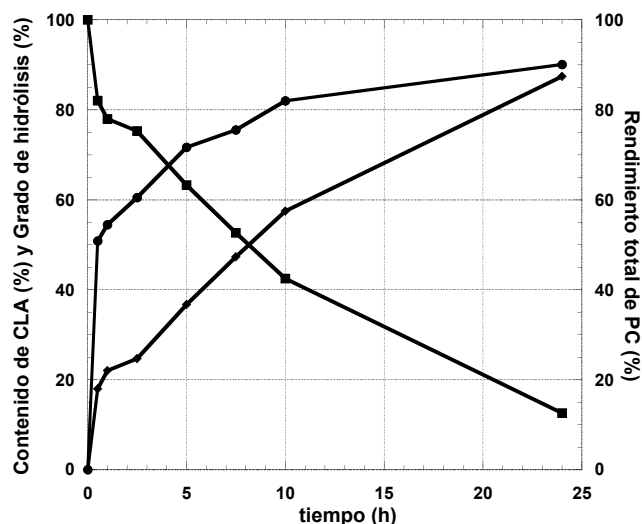
**Figura 8.** Efecto de la relación molar sustratos en la producción de SPC. **A.** 1:2, **B.** 1:4, **C.** 1:6, **D.** 1:8, **E.** 1:10. Condiciones de reacción: 20, 30, 40, 50 y 60°C; 2, 5, 10,15 y 20% p/p de enzima con respecto a la mezcla de sustratos, con una agitación orbital de 200 rpm durante 24 h



**Figura 9.** Efecto de la temperatura en la producción de SPC. **A.** 20°C, **B.** 30°C, **C.** 40°C, **D.** 50°C, **E.** 60°C. Condiciones de reacción: relaciones molares (PC:CLA) 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10; 2, 5, 10,15 y 20% p/p de enzima con respecto a la mezcla de sustratos, con una agitación orbital de 200 rpm durante 24 h.



**Figura 10.** Efecto de la carga de enzima en la producción de SPC. **A.** 2%, **B.** 5%, **C.** 10%, **D.** 15%, **E.** 20% p/p. Condiciones de reacción: 20, 30, 40, 50 y 60°C; relaciones molares (PC:CLA) 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10; 2, 5, 10,15 y 20% de enzima con respecto a la mezcla de sustratos, con una agitación orbital de 200 rpm durante 24 h.



**Figura 11.** Rendimiento total de PC (■) vs contenido de CLA (●) y el grado de hidrólisis (◆) durante la reacción de acidólisis para las condiciones óptimas encontradas (experimento 7, Tabla 4): 50°C, relación molar 1:4 (PC:CLA) y 15% p/p enzima

**Tabla 6.** Composición en ácidos grasos (% p/p) de SPC obtenida en condiciones óptimas de reacción: 50°C, relación molar 1:4 (PC:CLA) y 15% p/p de enzima

ÁCIDO GRASO	PC	CLA	SPC		
			5h	10h	24h
C16:0	15,2±0,23	0,69±0,16	0,71±0,19	0,74±0,13	0,77±0,23
C18:0	5,65±0,29	5,54±0,04	5,77±0,24	5,33±0,19	5,48±0,39
C18:1	71,7±0,08	1,45±0,14	4,53±0,3	3,45±0,4	3,06±0,24
C18:2	6,29±0,06				
CLA*		92,15±0,25	71,69±0,35	82,02±0,29	90,1±0,04

\*CLA (c-9,t-11 + t-10,c-12)

### 4.3 Tercera etapa (2010 – 2012)

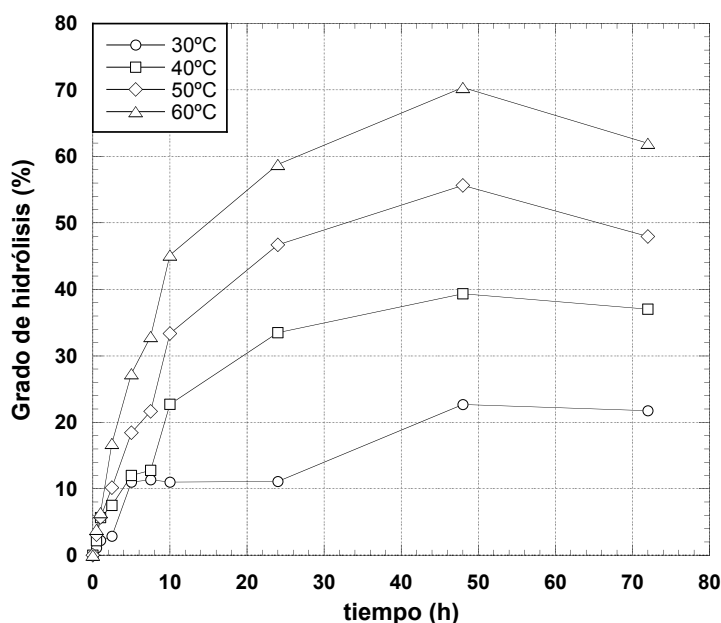
#### 4.3.1 Producción de LPC

Debido a que la formación de LPC afecta al mecanismo de producción de SPC, y a las propiedades biológicas y funcionales que posee, en esta etapa de la tesis se definió como objetivo el estudiar la formación de LPC a partir de PC empleando diferentes sistemas de reacción y enzimas.

Del trabajo experimental realizado durante esta etapa se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

1. El medio empleado (etanol o agua), así como el tipo de biocatalizador (libre o inmovilizados), claramente determinan la cinética de reacción.
2. La PC se disolvió completamente en etanol pero se formó una emulsión opaca cuando se empleó agua como medio de reacción. El etanol fue empleado como medio de reacción ya que es un solvente que se ha empleado en los procesos de extracción reportados en la literatura.
3. Las enzimas PLA<sub>1</sub> (fosfolipasa) y Novozym 435 (lipasa), ambas inmovilizadas, convirtieron PC en LPC en presencia de etanol, con rendimientos de 50% y 58,51%, respectivamente, tras 48 h de reacción a 50°C.
4. El mayor grado de hidrólisis (70%) se alcanzó con la lipasa de *Burkholderia cepacia* (PS) tras 48 h de reacción a 60°C, en presencia de agua (Figura 12).
5. La temperatura tuvo un papel importante en el grado de hidrólisis de PC para las diferentes enzimas. Sin embargo, por encima de 50°C para las enzimas inmovilizadas el efecto fue negativo
6. Lo anteriormente mencionado nos condujo a la siguiente publicación científica:
  - **Ramiro Baeza-Jiménez**, Leticia X. López Martínez, Cristina Otero, In-Hwan Kim and Hugo S. García. 2013. Enzyme – catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. DOI 10.1002/jctb.4040

Este trabajo se completó durante una estancia en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz (Veracruz, México).



**Figura 12.** Grado de hidrólisis obtenido con la Lipasa PS en agua después de 72 h con una agitación orbital de 200 rpm, 15% p/p de enzima y diferentes temperaturas: 30°C (O), 40°C (□), 50°C (◇) y 60°C (△).

#### 4.3.2 Producción de diglicéridos ricos en PUFA

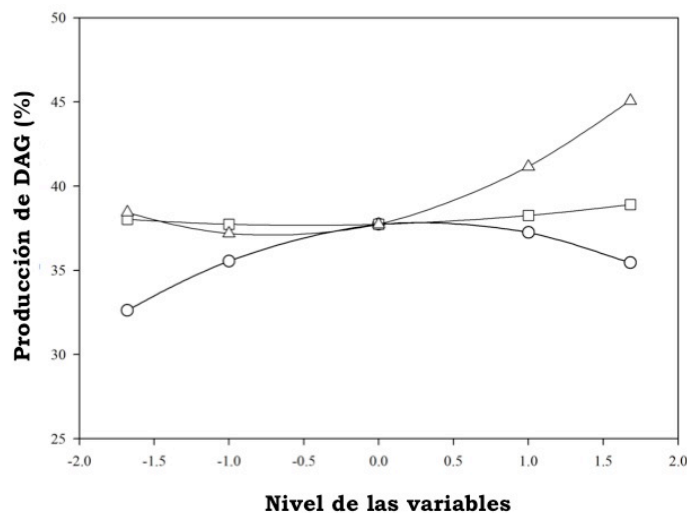
Bajo el esquema de preparación de alimentos funcionales, esta parte de la tesis se enfocó en la producción de diglicéridos ricos en PUFA obtenidos por reacciones de glicerolisis. Este trabajo experimental hizo posible la publicación de 2 trabajos científicos:

- Kelhy Miranda, **Ramiro Baeza-Jiménez**, Juan A. Noriega-Rodríguez, Hugo S. García and Cristina Otero. 2013. Optimization of structured diacylglycerols production containing  $\omega$ -3 via enzyme-catalysed glycerolysis of fish oil. *European Food Research and Technology*. 236: 435–440
- **Ramiro Baeza-Jiménez**, Kelhy Miranda, Hugo S. García and Cristina Otero. 2013. Lipase-catalysed glycerolysis of fish oil to obtain diacylglycerols. *Grasas y Aceites*. 64(3): 237-242



De la primera publicación se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

1. Para relaciones molares mayores de 2, se obtienen menores cantidades de DAG (Figura 13)
2. La carga de enzima parece tener un efecto neutro en la producción de DAG (Figura 13)
3. La metodología de superficie de respuesta permitió determinar que la temperatura es la variable con un efecto más significativo en la producción de DAG enriquecidos en PUFA. Así mismo, los valores de  $R^2$  y ANOVA dan cuenta de que el modelo propuesto lleva a una correcta estimación del sistema de estudio.
4. Las condiciones de reacción que condujeron a la mayor obtención (50%) de DAG fueron: relación molar 2 (aceite:glicerol), 60°C y 15% p/p de enzima, con una agitación orbital de 200 rpm por 24 h



**Figura 13.** Efecto de las variables de reacción en la producción de DAG enriquecidos en PUFA: relación molar, carga de enzima y temperatura

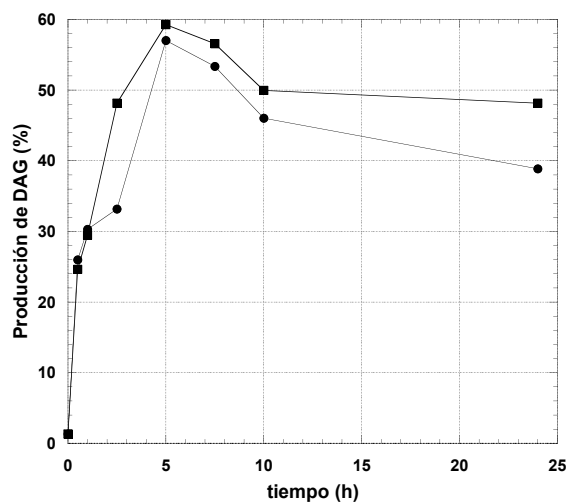
Los resultados obtenidos de este trabajo se presentaron como cartel en el **5th International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing** (Nuevo Vallarta, Nayarit, México. 24 – 26 de Octubre de 2012).

En lo que respecta a la segunda publicación se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

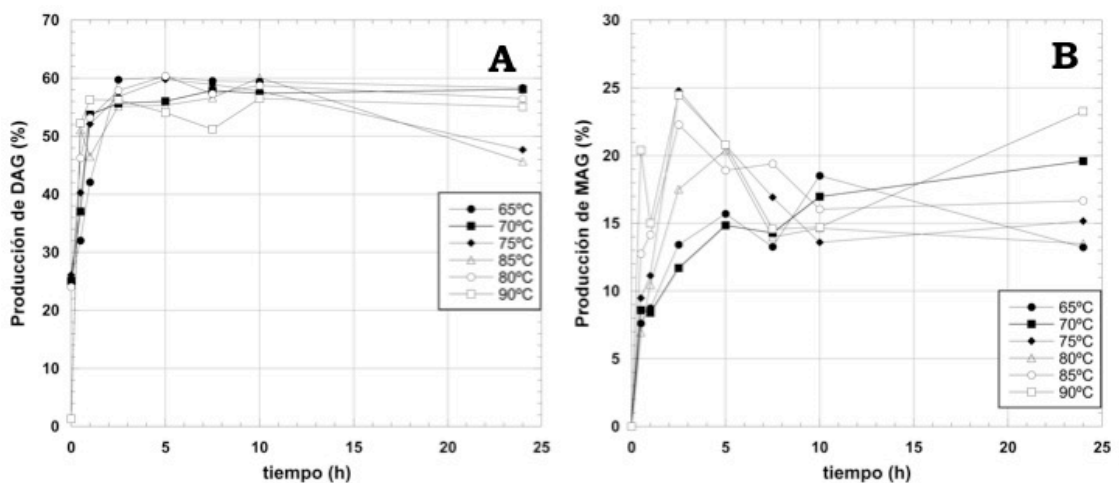
1. Al evaluar el efecto del tipo de agitación, orbital y magnética, se observó que esta última era más efectiva, ya que permitió obtener una mayor producción de DAG (60%) después de 5 h (Figura 14). Por ello, los experimentos posteriores se realizaron empleando 300 rpm de agitación magnética
2. Respecto a la temperatura, se alcanzó una rápida producción de DAG (50-53% tras 1 h de reacción) para las temperaturas más altas (80-90°C). Sin embargo, mientras la reacción proseguía el contenido de DAG alcanzó 60% para las temperaturas más bajas (Figura 15A). Por ello, se definió 65°C como la mejor temperatura para la producción de DAG. Como el mecanismo de reacción del sistema empleado implica también la formación de MAG, observamos que a 75 y 90°C se alcanzó un contenido de aproximadamente 25% de MAG después de 2,5 h de reacción (Figura 15B). Con fines prácticos, se definió 75°C como la mejor temperatura para la producción de MAG
3. En lo que concierne a la velocidad de agitación, los efectos más significativos se observaron durante las 2,5 h de reacción, tiempo en el que a 500 y 700 rpm se produjeron las más altas concentraciones de DAG (Figura 16A). Con 900 rpm se tuvieron bajas concentraciones de DAG debido a que esta excesiva velocidad de agitación favorece la distribución de la enzima por las paredes del reactor, disminuyendo su concentración y disponibilidad en el medio de reacción. Por otro lado, con una velocidad de agitación de 300 rpm se tuvo la más baja conversión de DAG, debido a que no permite obtener una mezcla homogénea de reacción. En el caso de MAG, la agitación a 900 rpm

favoreció la conversión durante la primera media hora y se mantuvo constante a lo largo del proceso. Sin embargo, el máximo contenido en MAG (18.57%) se alcanzó con 500 rpm tras 7,5 h de reacción (Figura 16B). Por ello, se definió 500 rpm como la mejor velocidad de agitación para la obtención de ambos glicéridos (MAG y DAG).

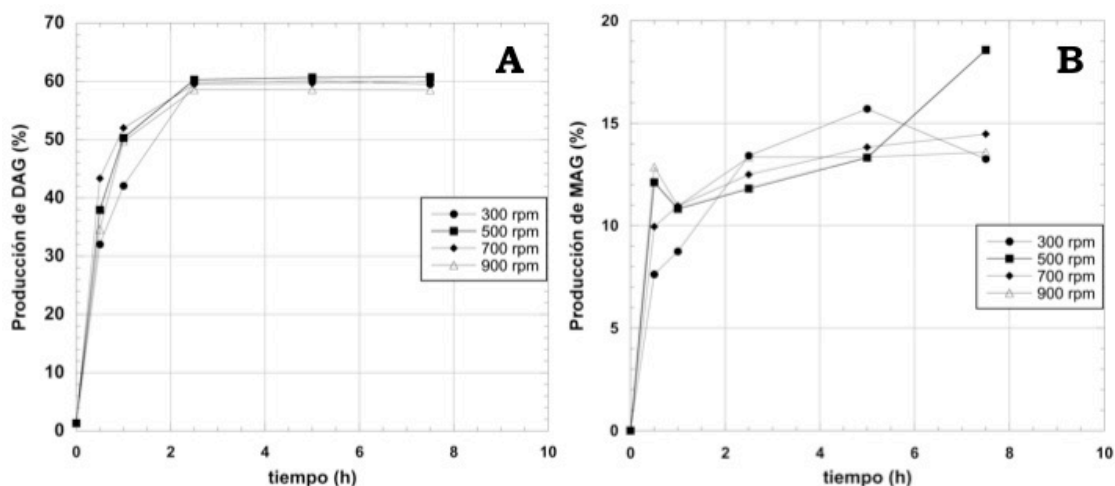
- La composición del diglicérido estructurado producido en condiciones óptimas fue la siguiente: EPA (11,32%), DPA (8,34%) y DHA (69,71%).



**Figura 14.** Efecto del tipo de agitación en la producción de DAG a 200 rpm, 60°C y una relación molar de sustratos de 3:1 (aceite:glicerol) durante 24 h: orbital (●), magnética (■)



**Figura 15.** Efecto de la temperatura en la producción de DAG (A) y MAG (B) a 300 rpm y una relación molar de sustratos de 3:1 (aceite:glicerol) durante 24 h: 65°C (●), 70°C (■), 75°C (◆), 80°C (○), 85°C (△) y 90°C (□)



**Figura 16.** Efecto de la velocidad de agitación en la producción de DAG (A) y MAG (B) a 65°C y una relación molar de sustratos de 3:1 (aceite:glicerol) durante 24 h: 300 rpm (●), 500 rpm (■), 700 rpm (◆) y 900 rpm (△).

#### 4.4 Cuarta etapa (2012 – 2013)

##### 4.4.1 Enriquecimiento de un aceite en ácido gama-linolenico (GLA)

Se empleó un aceite (*evening primrose oil*) que contenía 8,8% p/p de GLA. La mezcla de sus ácidos grasos libres obtenidos vía saponificación, fue sometida a reacciones de esterificación directa con butanol catalizadas por *C. rugosa* (en forma libre). Del trabajo experimental realizado durante esta etapa se obtuvieron los siguientes resultados y conclusiones:

1. En lo que se refiere a la especificidad de la enzima empleada, los ácidos oleico (18:1n-9) y linoleico (18:2n-6) fueron los primeros en ser esterificados, seguidos de palmítico (16:0) y esteárico (18:0). Por la baja preferencia de la enzima por GLA, este ácido fue enriquecido satisfactoriamente en la fracción sin esterificar (Tabla 7)
2. Al evaluar el efecto de la relación molar (EPO-FA:BtOH), observamos que cuando el exceso de alcohol es elevado el proceso se hace menos selectivo, acortándose las diferentes preferencias de la enzima por GLA

- y el resto de ácidos grasos. Así, la selectividad de la reacción de esterificación con butanol aumentó hasta una relación molar óptima de 1:10 (Figura 17).
3. Cuando se estudió el efecto de la temperatura, encontramos que durante las primeras 12 h de reacción el contenido de GLA era similar a 20, 30 y 50°C, mientras que a 40°C era mayor. Para el mismo periodo de tiempo, los menores contenidos se obtuvieron a 10° y 60°C. Sin embargo, el mayor contenido de GLA (66,6%) fue obtenido a 30°C después de 24 h de reacción (Figura 18).
  4. Cuando se probó el efecto de la carga de enzima, encontramos que habíamos estado trabajando con la carga óptima (10% p/p). A fin de precisar más, se estudiaron reacciones de esterificación con dos nuevas cargas de enzima (7,5 y 12,5% p/p), que rindieron contenidos menores de GLA que con la carga 10%. La máxima concentración de GLA obtenida fue de 70% después de 24 h de reacción (Figura 19).
  5. En todas las cinéticas de reacción obtenidas al explorar el efecto de las diferentes variables de reacción, se observó siempre un perfil de disminución en el contenido de GLA tras haber alcanzado el contenido máximo. La reacción inversa a la esterificación es la hidrólisis, por lo que el equilibrio del sistema indica que a medida que procede la reacción hay más agua en el medio que puede afectar la actividad enzimática. Este incremento en el contenido de agua afecta a la interfase lípido-agua del complejo lipasa-éster, lo que resulta en reorganizaciones estructurales en la región del sitio activo de la enzima.
  6. Por lo descrito en el punto anterior, procedimos a adicionar tamiz molecular (10% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) para minimizar el efecto de hidrólisis. Cuando el tamiz se adicionó al principio de la reacción el contenido de GLA fue siempre menor en todos los puntos monitoreados con respecto a las otras pruebas

(Figura 20). El efecto contrario se observó con la adición de tamiz a las 12 h, que permitió enriquecer el aceite de partida a 83,7% en GLA tras 36 h de reacción a 30°C, 400 rpm (agitación magnética) y 10% p/p de enzima

7. Lo anteriormente mencionado nos permitió elaborar la siguiente publicación científica, actualmente en proceso de revisión:

- **Ramiro Baeza-Jiménez**, Da Som No, Cristina Otero, Hugo S. García, In-Hwan Kim. 2013. Lipase – catalysed enrichment of  $\gamma$ -Linolenic acid from evening primrose oil in a solvent-free system. *LWT- Food Science and Technology*. Submitted

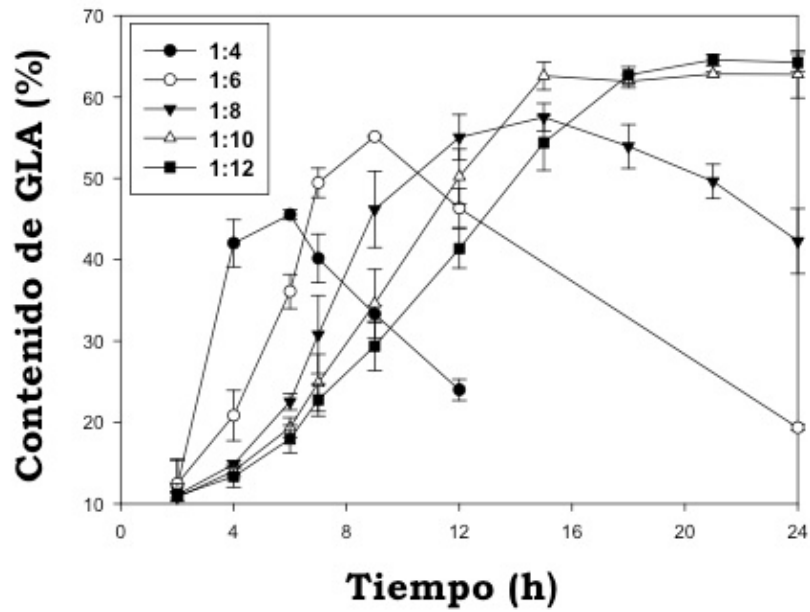
Este trabajo se llevó a cabo durante una estancia en el Departamento de Alimentos y Nutrición del Colegio de Ciencias de la Salud, en la Universidad de Corea (Seúl, Corea del Sur).

Los resultados obtenidos de esta última etapa de la tesis se presentaron como ponencia en el **104th AOCS Annual Meeting & Expo** (Montréal, Québec, Canada. 28 de Abril – 1 de Mayo de 2013).

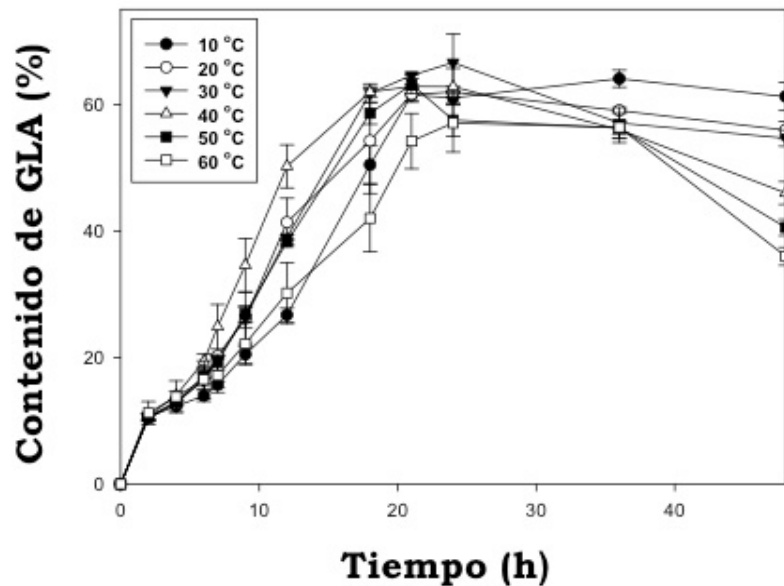
**Tabla 7.** Composición en ácidos grasos (% p/p) del aceite de partida (EPO) y de los productos enriquecidos

<b>Ácido graso</b>	<b>EPO</b>	<b>Producto 1</b>	<b>Producto 2</b>
16:0	6,24	3,66	-
18:0	1,91	2,52	-
18:1 (n-9)	6,06	-	-
18:1 (n-7)	0,63	-	-
18:2 (n-6)	76,3	23,79	16,26
<b>GLA</b>	<b>8,87</b>	<b>69,92</b>	<b>83,74</b>

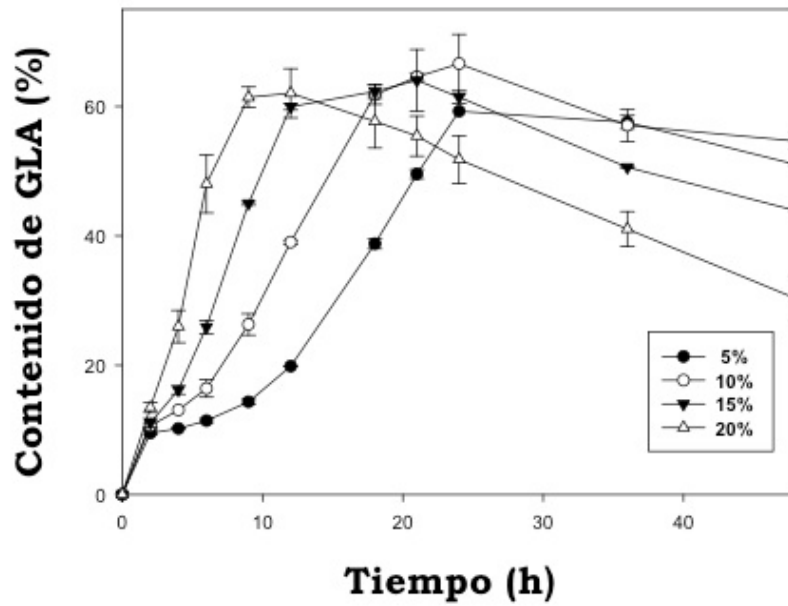
Producto 1 se refiere al producto obtenido con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 30°C, 10% (p/p) de enzima y 400 rpm, después de 24 h. Producto 2 es el obtenido bajo condiciones similares a las del producto 1 más la adición de tamiz molecular (10% p/p después de 12 h de reacción) después de 36 h.



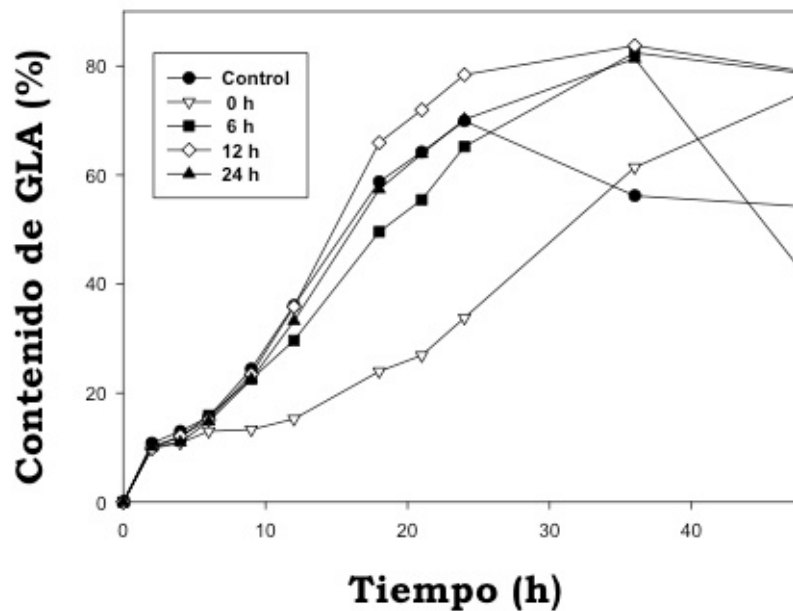
**Figura 17.** Efecto de la relación molar de sustratos en el contenido de GLA a 40°C, 400 rpm y 10% (p/p) de enzima. 1:4 (□), 1:6 (○), 1:8 (▲), 1:10 (Δ) y 1:12 (■), EPO-FA:BtOH



**Figura 18.** Efecto de la temperatura en el contenido de GLA con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 400 rpm y 10% (p/p) de enzima. 10°C (●), 20°C (○), 30°C (▼), 40°C (Δ), 50°C (■) y 60°C (□)



**Figura 19.** Efecto de la carga de enzima (% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) en el contenido de GLA con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 400 rpm y 30°C. 5% (●), 10% (○), 15% (▼) & 20% (△)



**Figura 20.** Efecto de la adición de tamiz molecular (10% p/p con respecto a la mezcla de sustratos) en el contenido de GLA con una relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH), 400 rpm, 30°C y 10% (p/p) de enzima. Control (sin tamiz, ●), 0 h (▽), 6 h (■), 12h (◇) y 24h (▲).



## V. CONCLUSIONES

A lo largo de esta tesis doctoral, se han realizado estudios de diferentes sistemas de reacciones enzimáticas selectivas, que han permitido conocer el efecto de las variables que los afectan. Las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios se enuncian a continuación:

1. Para las reacciones de interesterificación entre los PL y los diferentes PUFA, el orden de reactividad para ambas especies es: PC>PE>PA>PI y CLA>EPA>DHA, respectivamente. Por esto, la etapa de optimización de la producción de fosfolípidos estructurados se llevó a cabo empleando como sustratos PC y CLA.
2. El estudio de los efectos de la carga de enzima, temperatura y relación molar de sustratos en las distintas cinéticas de reacción de incorporación de CLA en PC, reveló que la carga de biocatalizador es el parámetro con un efecto más significativo. El porcentaje de incorporación de CLA se favorece utilizando mayores cargas de enzima, aun cuando se empleen diferentes temperaturas.
3. Para la optimización del proceso de producción de SPC, el coeficiente de regresión total ( $R^2$ ) y el ANOVA indicaron que el modelo propuesto estima correctamente el sistema de estudio. Las condiciones óptimas indicadas por el modelo son una relación molar 1:4 (PC:CLA), 50°C y 15% (p/p) de PLA<sub>1</sub>, durante 24 h y agitación orbital a 200 rpm. Con estas condiciones se alcanzó el 90% de incorporación de CLA en PC, el porcentaje más alto hasta ahora reportado en la literatura.

4. El proceso de interesterificación incluye una etapa de hidrólisis seguida de otra de esterificación. La hidrólisis implica la formación de LPC, la cual es más evidente a medida que se produce una mayor cantidad de SPC. Bajo las condiciones óptimas de reacción, el grado de hidrólisis es de 87,4%.
5. El estudio específico de la reacción de hidrólisis de PC para producir LPC catalizada por enzimas inmovilizadas (PLA<sub>1</sub> y Novozym 435), permitió conocer que el etanol es un mejor medio de reacción que el agua, ya que en esta última forma una emulsión que dificulta su difusión a través de los poros del soporte.

La hidrólisis en medio acuoso catalizada por la enzima libre no presentó limitaciones de transferencia de materia, y como consecuencia en este sistema se alcanzó el mayor grado de hidrólisis (70%). Este hecho está favorecido positivamente por el incremento de la temperatura.

6. En los procesos de preparación de diglicéridos ricos en PUFA, vía glicerólisis de aceite de pescado, la temperatura es la variable que mayor efecto ejerce, comparada con la carga de enzima y la relación molar. La temperatura necesaria para obtener la mayor producción de DAG (50% a 60°C) es menor que la requerida por los procesos previamente reportados en la literatura. Además, nuestro sistema de reacción es libre de solventes y surfactantes. La evaluación adicional del tipo y velocidad de agitación, y re-optimización de la temperatura, permitió obtener un contenido más alto de DAG (60% a 65°C) que el que se produjo en la primera parte. La mejor velocidad encontrada para DAG, 500 rpm, favorece también la producción de MAG.
7. La preparación enzimática selectiva de concentrados de GLA a partir del aceite de primrose saponificado, fue satisfactoriamente implementada mediante la butanolisis catalizada por la lipasa nativa de *C. rugosa* en un sistema libre de solvente. El alto grado de

## CONCLUSIONES

enriquecimiento alcanzado durante el estudio de este proceso esta altamente favorecido por la baja preferencia de *C. rugosa* por el GLA frente al resto de ácidos grasos.

El BtOH inhibe la reacción de esterificación, requiriéndose mayores tiempos de reacción para elevar el contenido de GLA en exceso de este alcohol. Nosotros proponemos que la polaridad del BtOH ejerce un efecto negativo sobre la actividad catalítica de la enzima, que en nuestro caso fue más evidente por tratarse de una enzima libre. El estudio de la temperatura indicó que a 30°C es posible alcanzar el mayor enriquecimiento en GLA (70%). Esta temperatura resulta ventajosa respecto a la de otros reportes de la literatura, que o bien usan temperaturas demasiado bajas (estudios que implican cristalización o formación de complejos de urea) o temperaturas demasiado altas (procesos de esterificación a 60°C). Por otro lado, la carga óptima de enzima encontrada para este proceso es 10% p/p.

En todas las condiciones de reacción estudiadas, el porcentaje de GLA disminuye tras haber alcanzado su valor máximo, dado que la selectividad del proceso comienza a disminuir cuando el resto de ácidos grasos han sido esterificados.

Como consecuencia del progreso de la reacción de esterificación se acumula un exceso de agua en el medio, que aumenta la hidratación de la enzima. La adición de tamiz molecular permitió incrementar el contenido de GLA hasta 83,7%. El tiempo óptimo para la adición del tamiz es 12 h después del inicio de la reacción, en las condiciones óptimas encontradas: 30°C, 10% p/p enzima, relación molar 1:10 (EPO-FA:BtOH) y agitación magnética a 400 rpm.

## VI. CONCLUSIONS

During the course of this thesis, several enzymatic reaction systems were conducted and we were able to obtain a better understanding of the variables affecting such systems. The conclusions derived from those studies are as follows:

1. In the interesterification reactions between the different PL and PUFA, the reactivity order was: PC>PE>PA>PI and CLA>EPA>DHA, respectively. Thus, optimization for the production of structured phospholipids was carried out with PC and CLA as substrates.
2. The evaluation of different substrates molar ratios, temperatures and enzyme loadings, revealed that the latter had the most significant effect in the extent of reaction. A higher percentage of incorporation of CLA was achieved with higher enzyme loadings, even when different temperatures were employed.
3. During the optimized production of SPC, the total correlation coefficient ( $R^2$ ) and ANOVA suggest that the model represents well the relationship between the main variables and the response. The optimal conditions defined by the model were: a substrates ratio of 1:4 (PC:CLA), 50°C and 15% (w/w) of PLA<sub>1</sub>, for 24 h at 200 rpm (orbital agitation). Under these reaction conditions we achieved the highest incorporation of CLA into PC ever reported in literature.
4. Because the interesterification process includes both hydrolysis and esterification; formation of LPC was involved. For higher SPC production, greater amounts of LPC were detected in the reaction

## CONCLUSIONS

mixture. Under the optimal conditions, the degree of hydrolysis calculated was 87,4%.

5. The enzymatic reaction study focussed on the hydrolysis of PC for preparing LPC by immobilized enzymes (PLA<sub>1</sub> and Novozym 435), allowed us to find out that ethanol was a better reaction system than water. In the latter, PC formed an emulsion which meant mass transfer limitations through the support.

The free enzyme-catalysed hydrolysis showed no mass transfer limitations and as a consequence we were able to reach the highest degree of hydrolysis (70%). This was favoured by increasing the temperature used.

6. In the experiments intended to prepare PUFA-enriched diacylglycerols, via lipase-catalysed glycerolysis of fish oil, temperature was the most significant variable. The highest content of DAG (50%) was attained at 60°C, which is a lower temperature compared to other works reported previously in the technical literature. Additionally, our reaction system is both solvent- and surfactant-free. A further evaluation of the type and speed of agitation, and a re-optimization of temperature, led us to reach an even higher DAG content (60% at 65°C). The optimal speed for DAG, as well as for MAG, was found at 500 rpm.
7. The lipase-catalysed enrichment of GLA from EPO-FA was successfully produced in a solvent-free system by *C. rugosa*. Because *C. rugosa* exhibited low preference for GLA, this residue was highly enriched in the free fatty acid fraction.

BtOH inhibited the esterification reaction, and longer reaction times were required to increase the content of GLA when the alcohol was in excess. We propose that the polarity of BtOH may have exerted a negative effect on the activity of the enzyme, which caused greater damage to the free enzyme. When different temperatures were explored, 30°C yielded the highest percentage of GLA (70%). Thus, this

## CONCLUSIONS

temperature was considered as the most convenient for safety and as an economical/practical approach. Other reports in the literature refer to low-temperature systems, namely; winterization, crystallization and urea fractionation, as well as high-temperature esterification systems. The optimal enzyme loading for this system was 10% (w/w).

In all the experiments performed, the content of GLA decreased after a maximal value was reached. We propose that the selectivity of the process is reduced when the other fatty acids of the starting material have been already esterified.

The reverse of esterification reaction is hydrolysis; hence, as long as esterification proceeds, hydrolysis becomes more relevant. In the case of synthetic reactions, water molecules formed during the synthetic reaction tended to accumulate in the reaction mixture, producing in some cases excessively hydrated conditions for the enzyme. By addition of molecular sieves, we were able to obtain a more elevated GLA content, 83,7%. The optimal time for the addition of molecular sieve was found after 12 h of reaction under the optimal conditions: 30°C, 10% w/w of the enzyme, for a 1:10 ratio (EPO-FA:BtOH) at 400 rpm (magnetic agitation).

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Al MD, van Houwelingen AC, Kester AD, Hasaart TH, de Jong AE, Hornstra G. (1995). Maternal essential fatty acid patterns during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *Brit J Nutr* 74:55-68.

Adlercreutz D, Wehtje E. (2004). An enzymatic method for the synthesis of mixed-acid phosphatidylcholine. *JAOCs* 81: 553-557

Akoh C, Min D. (2002). Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Marcel Dekker. Second edition

Andlauer W, Fürst P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook. *Food Res Int* 35: 171-176

**Baeza-Jiménez R**, García-Galindo HS. (2013). Lípidos Funcionales de Origen Animal EN “*Los Alimentos Funcionales: Un Nuevo Reto para la Industria de Alimentos*”, editado por González Aguilar, G.A., Vallejo Córdoba, B., González Córdoba, A.F., García, H.S., y Álvarez Parrilla. Ed. Trillas

**Baeza-Jiménez R**, López-Martínez LX, Otero C, Kim IH, García HS. (2013b). Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine. *J Chem Technol Biotechnol* DOI 10.1002/jctb.4040

**Baeza-Jiménez R**, Miranda K, Garcia HS, Otero C. (2013c). Lipase-catalysed glycerolysis of fish oil to obtain diacylglycerols. *Grasas Aceites*, 64(3): 237-242

**Baeza-Jiménez R**, No DS, Otero C, García HS, Kim IK. (2013d). Lipase – catalysed enrichment of  $\gamma$ -Linolenic acid from evening primrose oil in a solvent-free system. *LWT- Food Science and Technology*. Submitted

**Baeza-Jimenez R**, Gonzalez-Rodriguez J, Kim IH, Garcia HS, Otero C. (2012). Use of immobilized phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed acidolysis for the production of structured phosphatidylcholine with an elevated conjugated linoleic acid content. *Grasas Aceites*, 63(1): 44-52

**Baeza-Jiménez R**, Noriega-Rodriguez JA, Garcia HS, Otero C. (2012b). Structured phosphatidylcholine with elevated content of conjugated linoleic acid: optimization by response surface methodology. *Eur J Lipid Sci Technol* 114: 1261-1267

Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc Am Soc Anim Sci* Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.

- Birch EE, Garfield S, Castaneda Y, Wheaton DH, Uauy R, Hoffman D. (2007). Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long- chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Hum Dev* 83: 279–84.
- Birgbauer E, Chun JN. (2006). New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell Mol Life Sci* 63: 2695–2701
- Chojnacka A, Gladkowski W, Kielbowicz G, Wawrzenczyk C. 2009. Enzymatic enrichment of egg-yolk phosphatidylcholine with  $\alpha$ -linolenic acid. *Biotechnol. Lett.* 31, 705–709
- D'Arrigo P, Servi S. (2010). Synthesis of lysophospholipids. *Molecules* (Basel, Switzerland) 15: 1354–1377
- Das UN. (2007). A defect in the activity of D6 and D5 desaturases may be a factor in the initiation and progression of atherosclerosis. *Prostag Leukotr and Ess* 76: 251–268
- DeFelice SL. (1992). The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. Economic and regulatory reforms. *Genet Eng News* 12: 13–15
- Dennis EA, Brown HA, Deems RA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Shaw W, Subramaniam S, Russell DW, VanNieuwenhze MS, White SH, Witztum JL and Wooley J. (2006). The LIPID MAPS approach to lipidomics, in *Functional Lipidomics*, ed. by Feng L and Prestwich GD. CRC Press, Boca Raton, FL, Chap. 1, pp. 1-15
- Fan YY, Chapkin RS. (1998). Importance of dietary  $\gamma$ -linolenic acid in human health and nutrition. *J Nutr* 128: 1411–1414.
- Fan YY, Ramos KS, Chapkin RS. (1995). Dietary  $\gamma$ -linolenic acid modulates macrophage-vascular smooth muscle cell interactions: evidence for a macrophage-derived soluble factor that down regulates DNA synthesis in smooth muscle cells. *Arterioscl Throm Vas* 15: 1397–1403.
- Fenton WS, Hibbeln J, Knable M. (2000). Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 47: 8–21
- Fogliano V, Vitaglione P. (2005). Functional foods: Planning and development. *Mol Nutr Food Res* 49: 256 – 262
- Garcia HS, Kim I, López-Hernández A, Hill Jr. CG. (2008). Enrichment of lecithin with n-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A<sub>1</sub>. *Grasas Aceites.* 59(4): 368-374
- Garcia HS, Arcos J, Ward DJ, Hill CG. (2000). Synthesis of glycerides containing n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid by solvent-free acidolysis of fish oil. *Biotechnol Bioeng* 70: 587-591



- Gunstone, F.D. (1992). Gamma linolenic acid. Occurrence and physical and chemical properties. *Prog Lipid Res.* 13: 145–161
- Guo Z, Vikbjerg AF, Xu X. (2005). Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnol. Adv.* 23: 203–259
- Haas MJ, Scott K, Jun W, Janssen G. (1994). Enzymatic phosphatidylcholine hydrolysis in organic solvents: An examination of selected commercially available lipases. *JAOCS* 71: 483–490
- Hawthorne JN, Ansell GB. (1982). Phospholipids, New Comprehensive Biochemistry. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press
- Hernández-Martín E, Otero C. (2008). Selective enzymatic synthesis of lower acylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 325–333
- Hopkins PN. (2003). Familial hypercholesterolemia—improving treatment and meeting guidelines. *Int J Cardiol* 89: 13–23
- Horrobin DF. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog Lipid Res* 31: 163–194
- Hossen M, Hernandez E. (2005). Enzyme catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 730–736
- Hudson BJB. (1984). Evening primrose (*Oenothera* spp.) oil and seed. *JAOCS* 61: 540–543
- Innis SM. (2008). Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res* 1237: 35–43
- Iwasaki Y, Yamane T. (2004). Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 90: 151–171
- Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* 53: 315–351
- Jennings B, Akoh CC. (1999). Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid content to produce structured lipids. *JAOCS* 76: 1133–1137
- Kim IH, Garcia HS, Hill Jr. CG. (2010). Synthesis of Structured Phosphatidylcholine Containing n-3 PUFA Residues via Acidolysis Mediated by Immobilized Phospholipase A<sub>1</sub>. *JAOCS* 87: 1293–1299

- Kim IH, Garcia HS, Hill Jr. CG. (2007). Phospholipase A<sub>1</sub>-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in n-3 polyunsaturated fatty acid residues. *Enz. Microb. Technol.* 40: 1130-1135
- Kim IH, Hill, CG Jr. (2006). Lipase-catalyzed acidolysis of menhaden oil with pinolenic acid. *JAOCS* 83: 109-115
- Kim J, Lee C, Oh J, Kim B. (2001). Production of egg yolk lysolecithin with immobilized phospholipase A<sub>2</sub>. *Enzyme Microb Technol* 29: 587-592
- Kim J, Kim B. (2000). Lipase-catalyzed synthesis of lysophosphatidylcholine using organic cosolvent for in situ water activity control. *JAOCS* 77: 791-797
- Kim JK, Kim MK, Chung GH, Choi CS, Rhee JS. (1997). Production of lysophospholipid using extracellular phospholipase A<sub>1</sub> from *Serratia* sp. MK1. *J Microbiol Biotechnol* 7: 258-261
- Kolovou G, Daskalova D, Mastorakou I, Anagnostopoulou K, Cokkinos DV. (2004). Regression of Achilles tendon xanthomas evaluated by CT scan after hypolipidemic treatment with simvastatin. *Angiology* 55: 335-339
- Kotilainen L, Rajalahti R, Ragasa C, Pehu E. (2006). Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. Agriculture and Rural Development Discussion Paper 30
- Maki KC, Davidson MH, Tsushima R, Matsuo N, Tokimitsu I, Umporowicz DM, Dicklin MR, Foster GS, Ingram KA, Anderson BD, Frost SD, Bell M. (2002). Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Am J Clin Nutr* 76: 1230-1236
- Miranda K, **Baeza-Jiménez R**, Noriega-Rodríguez JA, Garcia HS, Otero C. (2013). Optimization of structured diacylglycerols production containing ω-3 via enzyme-catalysed glycerolysis of fish oil. *Eur Food Res Technol* 236: 435-440
- Montgomery C, Speake BK, Cameron A, Sattar N, Weaver LT. (2003). Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Brit J Nutr* 90: 135-145
- Mustranta A, Forsell P, Aura AM, Suortti T, Poutanen K. (1994). Modification of phospholipids with lipases and phospholipases. *Biocatalysis* 9: 181-194
- Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M. (2006). Physiological Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA)—A Review. *Food Rev Int* 22:291-307
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hornstra G. (2001). Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am J Clin Nutr* 73:302-7
- Pariza MW, Hargreaves WA. (1985). *Carcinogenesis* 6: 591-3

- Parodi PW. (1997). *J Nutr* 127:1055–60
- Parodi PW. (2003). In: Sebedio J-L, Christie WW, Adlof R, editors. *Advances in conjugated linoleic acid research*, vol. 2. Champaign (IL): AOCS Press; p. 101–22
- Peet M. (2004). Nutrition and schizophrenia: beyond omega-3 fatty acids. *Prostag Leuktr Ess* 70: 417–22
- Peng L, Xu X, Mu H, Høy CE, Adler-Nissen J. (2002). Production of phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enz. Microb. Technol.* 31: 523-532
- Prentice AM, Poppitt SD. (1996). Importance of energy density and macronutrients in the regulation of energy intake. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20: S18–23
- Reblova Z, Pokorny J. (1995). Effect of Lecithin on the Stabilization of Foods, in *Phospholipids: Characterization, Metabolism, and Novel Biological Applications*, ed. by Cevc G and Paltauf F. AOCS Champaign, IL, USA, pp. 378–383
- Richardson AJ, Easton T, Puri BK. (2000). Red cell and plasma fatty acid changes accompanying symptom remission in a patient with schizophrenia treated with eicosapentaenoic acid. *Eur Neuropsychopharm* 10: 189–193.
- Richmond GS, Smith TK. (2011). Phospholipases A<sub>1</sub>. *Int J Mol Sci* 12: 588-612
- Sarney DB, Fregapane G, Vulson EN. (1994). Lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor. *JAOCS* 71: 93–96
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite* 51: 456–467
- Snijder HJ, Dijkstra BW (2000). Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochim Biophys Acta* 1488: 91–101
- Spence JT. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *JFCA* 19: S4–S6
- The lipid library. AOCS. Available at: <http://lipidlibrary.aocs.org/index.html>
- Vikbjerg AF, Mu H, Xu X. (2007). Synthesis of structured phospholipids by immobilized phospholipase A<sub>2</sub> catalyzed acidolysis. *J. Biotechnol.* 128: 545-554
- Vikbjerg AF, Mu H, Xu X. (2005). Parameters affecting incorporation and by-product formation during the production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis in solvent-free system. *J. Mol. Catal. B-Enzym* 36: 14-21

## BIBLIOGRAFÍA

- Virto C, Adlercreutz P. (2000). Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme Microb Technol* 26: 630–635
- Ward OP, Singh A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem* 40: 3627–3652
- Whipkey A, Simon JE, Janick J. (1998). In vivo and in vitro lipid accumulation in *Borago officinalis* L. *JAOCs* 65: 979-984
- Wolf RB, Kleiman R, England RE. (1983). New sources of  $\gamma$ -linoleic acid. *JAOCs* 60: 1858-1860
- Uauy R, Mena P. (1999). Requirements for long-chain polyunsaturated fatty acids in the preterm infant. *Curr Opin Pediatr* 11: 115–120.
- Xu X, Fomuso LB, Akoh CC. (2000). Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a packed bed reactor. *JAOCs* 77: 171-176.
- Zarevúcka M, Zdeněk W. (2008). Plant Products for Pharmacology: Application of Enzymes in Their Transformations. *Int J Mol Sci* 9: 2447-2473
- Zeijdner EE, van Houwelingen AC, Kester AD, Hornstra G. (1997). Essential fatty acid status in plasma phospholipids of mother and neonate after multiple pregnancy. *Prostag Leuktr Ess* 56: 395-401
- Zurier RB, Rossetti RG, Jacobson EW, DeMarco DM, Liu NY, Temming JE, White BM, Laposata M. (1996). Gamma-linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis: a randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis and Rheum* 39: 1808–1817