



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos
Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Cinética de Esterificación-Enzimática del Ácido Eicosapentaenoico y
Ácido Docosahexaenoico del Aceite de Sardina (*Sardinops sagax caeruleus*)**

TESIS

que para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Juan Antonio Noriega Rodríguez

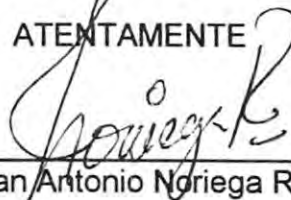
DEL AUTOR

Este trabajo titulado "Cinética de Esterificación-Enzimática del Ácido Eicosapentaenoico y Ácido Docosahexaenoico del Aceite de Sardina (*Sardinops sagax caeruleus*)" se presenta como uno de los requisitos para la obtención del Grado de Maestro en Ciencias, especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos, de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de la Universidad de Sonora, para ponerla a disposición de los interesados. Se puede obtener autorización para reproducir y/o referirse a este escrito, en su totalidad o en parte, a través del Coordinador del Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos, cuando considere que dicha propuesta apoye el avance académico.

En cualquier otra situación se debe obtener autorización del autor.

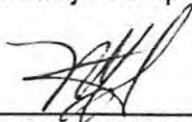
ATENTAMENTE



Juan Antonio Noriega R.

APROBACIÓN DEL ASESOR

Este trabajo se aprobó en la fecha que se señala a continuación:



c. Dr. Nohemí Gámez Meza

31 de Enero del 2002

Fecha

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios**, porque Tu eres el primero en mi vida y mi fiel ayudador.

A la **Universidad de Sonora**, especialmente a los compañeros investigadores, secretarías y trabajadores del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) y del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA).

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca de estudio, así mismo al **Sistema de Investigadores del Mar de Cortez** por el apoyo financiero para el desarrollo del presente proyecto de investigación (SIMAC 980101017).

Al **Dr. Hugo Sergio García** y **c. Dr. Julio Cesar Vinay** por su apreciable asesoría y permitirme trabajar en los laboratorios de UNIDA del Instituto Tecnológico de Veracruz.

Un reconocimiento y agradecimiento especial a mi asesora **c. Dr. Nohemí Gámez Meza** por compartir su amplios conocimientos y experiencia profesional.

Al comité de Tesis: **Dr. Jesús Manuel Barrón H.**, **Dra. Reyna Luz Vidal Q.** y **M.C. Lorena Bringas Alvarado**, porque con sus observaciones y recomendaciones mejoraron significativamente este trabajo.

A la **M.C. Gudelia Figueroa** por su asesoría en los aspectos estadísticos de esta investigación.

A la **Academia de Tecnología de Recursos Naturales** del DICTUS en especial a los compañeros y amigos del Laboratorio 2 por compartir sus materiales y conocimientos: **Jesús Ortega**, **Lorena Bringas**, **Dina Nubes**, **Nohemí Gamez** y **Luis Angel Medina**.

A mi querida y amada esposa **Beatriz Camacho**, mi ayuda idónea.

MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIA

A mi preciosa hija **Johanna Beatriz** quien llegó a la familia en el momento preciso, esperando ser el padre que te enorgullezcas de él.

A mi esposa **Beatriz Camacho**, para que juntos, en común acuerdo construyamos un buen futuro a nuestra familia.

A todos los **Jóvenes de Sendero de Vida**, que nuestro motivo sea siempre hacer los trabajos con excelencia.

A **Carlos Mexía** y su familia, ejemplos de integridad.

A mi suegra **Adela Camacho**, ejemplo de enteresa y a toda su familia.

A mis padres **Marcelino y Francisca Noriega** por su cariño y amor en todo momento.

A toda **mi Familia**: hermanos y hermanas, cuñados y cuñadas, sobrinos y sobrinas.

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
ANTECEDENTES BIBLIGRÁFICOS.....	6
Estado actual del Aceite de Sardina.....	6
Composición del aceite de sardina.....	6
Principales usos de los aceite de pescado.....	7
Técnicas para Obtener Glicéridos con AGPI n-3.....	10
Destilación molecular	10
Cromatografía en columna	11
Fluidos supercríticos.....	12
Métodos biotecnológicos.....	12
Cristalización.....	13
Cristalización con urea.....	14
Catálisis enzimática.....	14
Tipos de Reacciones Catalizadas por Lipasas.....	16
Hidrólisis enzimática.....	19

CONTENIDO (continuación)

	Página
Esterificación enzimática.....	19
Cinética Enzimática.....	23
Efecto de la concentración de sustrato.....	24
Mecanismo de formación de acilglicéridos.....	29
Efecto de la temperatura	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Esterificación Enzimática.....	34
Análisis de Reactantes y Productos.....	35
Cuantificación de ácidos grasos libres.....	37
Cuantificación de glicéridos.....	38
Selección de la Enzima.....	40
Grado de esterificación.....	41
Actividad enzimática.....	41
Diseño Experimental.....	42
Efecto de los tratamientos.....	45
Optimización de las condiciones de reacción.....	45
Cinética de Esterificación Enzimática.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
Análisis de Reactantes y Productos.....	48
Composición de ácidos grasos libres.....	48

CONTENIDO (continuación)

	Página
Composición de glicéridos.....	50
Selección de la Enzima.....	53
Optimización de las Condiciones de Reacción.....	55
Grado de esterificación global.....	57
Grado de incorporación del AEP.....	61
Grado de incorporación del ADH.....	65
Formación de triacilglicéridos.....	70
Formación de diacilglicéridos.....	75
Formación de monoacilglicéridos	78
Condiciones óptimas de reacción.....	82
Cinética de Esterificación Enzimática.....	82
Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación.....	86
Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación del AEP y ADH	90
Efecto de la temperatura.....	92
CONCLUSIONES.....	96
RECOMENDACIONES.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....	98

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Variación del Contenido de AEP y ADH en el Aceite de Sardina Monterrey (<i>Sardinops sagax caeruleus</i>), Proveniente del Golfo de California.....	8
2. Reacciones Catalizadas Enzimáticamente por Diferentes Lipasas para Obtener Concentrados de AGPI n-3.....	17
3. Proporción de Solventes Utilizados para el Análisis de Glicéridos en HPLC.....	39
4. Arreglo General para el Diseño de Composición Central Rotable....	43
5. Variables Independientes y sus Niveles Establecidos para el Diseño de Composición Central Rotable.....	44
6. Composición del Concentrado de AGPI n-3 Obtenido en los Laboratorios del DICTUS.....	49
7. Resultados de la Esterificación del Concentrado de AGPI n-3 del Aceite de Sardina por Distintas Enzimas.....	56
8. Condiciones Adecuadas para Obtener los Máximos Niveles de Esterificación de los Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina al Glicerol con Lipasa NV-435.	69
9. Parámetros Estimados por Regresión Polinomial para cada Producto Formado Durante la Esterificación.....	73
10. Condiciones adecuadas para la Formación de MAG, DAG y TAG en la Esterificación Enzimática de los Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina con Lipasa NV-435.....	83
11. Parámetros Cinéticos para la Esterificación de los Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina al Glicerol por la Enzima NV-435.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama general del mecanismo de la hidrólisis de triacilglicéridos...	20
2. Diagrama general del mecanismo de la esterificación ácidos grasos..	21
3. Montaje experimental de los reactores tipo tanque agitado para las reacciones enzimáticas.....	36
4. Cromatogramas de la composición de AGL por cromatografía de gases durante la reacción de esterificación.....	51
5. Cromatogramas de la clase de lípidos por HPLC durante la reacción de esterificación.....	52
6. Grado de esterificación con diferente lipasas comerciales.....	54
7. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura sobre el grado de esterificación global (GE).....	58
8. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre el grado de esterificación global.....	60
9. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre el porcentaje de incorporación del AEP.....	62
10. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la esterificación enzimática del AEP.....	64
11. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura sobre el porcentaje de incorporación del ADH.....	67
12. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la esterificación enzimática del ADH.	68
13. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura sobre la formación de TAG.....	71
14. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la formación de TAG.....	74

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
15. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura sobre la formación de DAG.....	76
16. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la formación de DAG.....	77
17. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperaturas sobre la formación de MAG.....	79
18. Superficie de respuesta para el efecto de la proporción molar (B) y la temperatura (A) sobre la de formación de MAG.....	81
19. Cinética de esterificación enzimática del concentrado de AGPI n-3 al glicerol por la enzima NV-435.....	85
20. Cinética de esterificación enzimática del concentrado de AGPI n-3 al glicerol por la enzima NV-435 para distintas concentraciones de sustrato.....	87
21. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación de los AGPI n-3 al glicerol.....	88
22. Cinética de esterificación enzimática del AEP (A) y ADH (B) al glicerol por la enzima NV-435.....	91
23. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación del AEP y ADH.....	93
24. Efecto de la temperatura sobre las velocidad de esterificación global.	94

RESUMEN

Uno de los métodos que está siendo estudiado para la obtención de productos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) es la catálisis enzimática, debido a que se efectúan eficientemente a temperaturas, pH y presiones ordinarias. Sin embargo, existe muy poca información donde se establezcan los parámetros cinéticos que puedan ayudar en el diseño de reactores a nivel industrial. En este trabajo se estudió la cinética de esterificación del ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH) al glicerol, con el fin de obtener los parámetros cinéticos y las mejores condiciones para la obtención de un producto lipídico enriquecido con AGPI n-3. Como sustrato se utilizó un concentrado de AGPI n-3 (80.53 %p/p) proveniente del aceite de sardina. Los resultados mostraron que para obtener niveles altos de esterificación del concentrado de AEP y ADH al glicerol (85-99%), se requiere relaciones molares de 0.48-1.2 mol AGL/mol glicerol, tiempos de reacción mayores de 5.75 h y temperaturas menores a 45°C, sin embargo, dependiendo del producto que se desee obtener, estas condiciones deben ser modificadas. Para obtener niveles altos de triacilglicéridos (>55%) se requiere una proporción molar inicial de 3.0 a 4.5 mol AGL/mol glicerol, tiempos de reacción mayores a 12 h y temperaturas superiores a los 60°C. Para obtener altos niveles de diacilglicéridos (35%) se requiere proporción molar de 0.4 a 1.0 mol AGL/mol glicerol, tiempos de reacción de 5 a 7 h y temperaturas de 55°C. Para obtener

altos niveles de monoacilglicéridos (80-85%) se requiere una relación molar mayor a 4.2 mol AGL/mol glicerol, tiempos de reacción menor a las 2 h y temperaturas de 30°C. Se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} (0.0153 mmol/mol total*h), K_m (0.3714 mol glicerol/mol AGL) y la energía de activación ($E_a = 25.91\text{kJ/mol}$) para la reacción de esterificación global del concentrado de AGPI n-3 al glicerol. Se determinaron los parámetros cinéticos para la esterificación de AEP ($V_{max} = 0.0350$ mmol/mol total*h; $K_m = 0.0724$ mol glicerol/mol AGL) y ADH ($V_{max} = 0.0717$ mmol/mol total*h; $K_m = 0.1177$ mol glicerol/mol AGL) al glicerol.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se encuentran agrupados en dos tipos de familias: la omega-3 (n-3) y la omega-6 (n-6). En las dos últimas décadas se les ha dado una considerable atención a las funciones biológicas de los AGPI n-3, atribuida a los beneficios fisiológicos. Se ha estudiado el efecto de los AGPI n-3 sobre la reducción de la presión sanguínea y de lípidos plasmáticos, el incremento del tiempo de coagulación sanguínea y activación de la función inmune (Dyerberg y Bang, 1979; Bang y col., 1980; Hughes, 1995; Howe, 1995).

Los ácidos grasos n-3 y n-6 no son sintetizados por el humano, por lo tanto, deben ser ingeridos a través de la dieta. El ácido linoleico n-6, es precursor de la familia de los AGPI n-6 y sus metabolitos mas importantes son el ácido eicosatrienoico (20:3 n-6) y el ácido araquidónico (20:4 n-6). Por otro lado, el ácido α -linolénico n-3, es precursor de la familia de los AGPI n-3 y sus principales metabolitos son los ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3) y docosahexaenoico (22:6 n-3). Las dos familias de AGPI aunque muy similares en su estructura química presentan funciones fisiológicas independientes e irremplazables mutuamente (Singer y col., 1986). Aún cuando el ácido α -linolénico n-3 da origen a los ácidos eicosapentaenoico (AEP) y docosahexaenoico (ADH), la conversión es limitada, principalmente cuando la ingesta del ácido linoleico n-6 es alta, debido a que ambos compiten por el

mismo complejo enzimático requerido para la elongación y desaturación de los AGPI, es por ello, que se requiere de un balance adecuado en la ingesta de AGPI n-6 y n-3 (Singer y col., 1986).

Los expertos consideran que la ingesta del AEP y del ADH está por abajo de los niveles óptimos. Se cree que la proporción óptima de n-6 a n-3 en las dietas para el humano debe ser de cinco (intervalo de 4-7) a uno, sin embargo, en las dietas de los países occidentales la proporción se ha disparado a alrededor de 40 a uno (Eaton y Konner, 1985; Gerster, 1995). La British Nutrition Foundation (1992) recomienda consumir pescado de dos a tres veces por semana, o de aceite de pescado de 3-4 g/día (aunque el contenido de AEP y ADH varía substancialmente dentro de cada especie en función de la época del año y tipo de tejido), ó 1.2 g/día de AEP y ADH. Por otro lado, aunque no existe una recomendación de ingesta diaria por la National Research Council y la American Heart Association, ésta última recomienda un consumo de AGPI de al menos 10% del consumo calórico total (Hwang, 1992).

Los aceites marinos son considerados las fuentes más importantes de AGPI n-3, por lo que, las investigaciones sobre los métodos de extracción y concentración de éstos compuestos a partir de aceites de pescado, han tomado relevancia. Las técnicas que han resultado efectivas para obtener fracciones concentradas de éstos ácidos a escala comercial son imprácticas y altamente costosas, tal es el caso de la producción por microorganismos (Yaguchi y

col., 1997; Vazhappilly y Chen, 1998) y la extracción por fluidos supercríticos (Nilsson y col., 1989; Kadota y col., 1996). Esto hace necesario el avance del desarrollo tecnológico en esta rama, que proporcione alternativas viables.

El aceite de sardina que se produce en nuestro país (7,000 toneladas) carece de valor comercial y la mayor parte se desecha, debido a la alta susceptibilidad a la oxidación, por ser un aceite altamente poliinsaturado. Lo anterior no ha permitido que se aprecien sus propiedades nutricionales, mientras que en otros países se han desarrollado tecnologías para su aprovechamiento.

Una metodología que está siendo ampliamente estudiada para la obtención de productos enriquecidos con AEP y ADH es la catálisis enzimática. Debido a la alta sensibilidad de los AGPI a la oxidación, las reacciones enzimáticas pueden ser una buena opción a estudiar para la obtención de aceites con altos niveles y bajas pérdidas de AGPI, debido a que se llevan a cabo eficientemente a temperaturas, pH y presiones ordinarias. Aun cuando existen trabajos para establecer algunas condiciones en las reacciones de esterificación, existe muy poca información donde se establezcan los parámetros cinéticos que puedan ayudar en el diseño de los reactores a nivel industrial. Aunado a esto, es necesario el desarrollo de una tecnología tendiente a la obtención de productos alternativos para el aprovechamiento del aceite de sardina de México.

Los productos que pueden obtenerse por medio de la esterificación enzimática son: monoacilglicéridos (MAG), diacilglicéridos (DAG) y triacilglicéridos (TAG), los cuales, tienen una amplia aplicación en la industria alimentaria. Los MAG y DAG son utilizados como emulsificantes mientras que los TAG componen el 98% de los aceites comestibles. En este trabajo se estudió la cinética de esterificación del AEP y ADH al glicerol con el fin de obtener los parámetros de reacción y las condiciones más adecuadas para la preparación de glicéridos con alto contenido de AGPI n-3.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación enzimática del ácido eicosapentaenoico y del ácido docosahexaenoico provenientes del aceite de sardina (*Sardinops sagax caeruleus*) para la obtención de glicéridos ricos en AGPI n-3.

Objetivos Específicos

- ◆ Seleccionar la enzima de estudio mediante experimentación preliminar.
- ◆ Evaluar el efecto de la concentración de sustrato (proporción molar de AGL) sobre la esterificación enzimática del AEP y ADH al glicerol.
- ◆ Evaluar el efecto de la temperatura sobre la esterificación enzimática del AEP y ADH al glicerol.
- ◆ Determinar la composición de los productos esterificados mediante cromatografía de gases y HPLC.
- ◆ Obtener las condiciones óptimas de proporción molar, tiempo y temperatura para la incorporación del AEP y ADH al glicerol y la formación de acilglicéridos.
- ◆ Determinar el tiempo necesario para la máxima esterificación.
- ◆ Obtener los parámetros cinéticos V_{max} y K_m y la energía de activación (E_a).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En México la captura de los pelágicos menores (peces gregarios de talla de 10 a 30 cm de largo) ha representado en promedio el 30% de la captura mundial y de ésta el 80% se captura en el Golfo de California (SEMARNAP, 1998-1999). Los principales puertos pesqueros del noroeste del país son Guaymas y Yavaros, Sonora, con una descarga promedio del 44% y 21%, respectivamente (Cisneros-Mata y col., 1995).

Estado Actual del Aceite de Sardina

Se estima que del total de recursos pesqueros que se capturan al año en México, el 80% se destinan para la fabricación de harina y aceite de pescado. En nuestro país se ha reportado una producción nacional anual promedio de 7,000 ton de aceite de pescado en los últimos años (SEMARNAP, 1999).

Composición del aceite de sardina

La composición del aceite de pescado puede variar según la estación del año, área de captura, alimento que la especie esta consumiendo, madurez sexual y edad del pescado (Bandarra, 1997). Según Gámez y col. (1999), los ácidos grasos más abundantes en el aceite crudo de sardina, capturada en el Golfo de California fueron los ácidos: palmítico (19%), palmitoleico (8.5%),

esteárico (6%), oleico (14%), eicosapentaenoico (20%) y docosahexaenoico (13%). El contenido de ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH), representó el 90% del total de los AGPI y constituyó la tercera parte del total de los ácidos grasos.

Con respecto al contenido individual de AEP y de ADH, se presentó una variación entre ellos, en la Tabla 1, se observa que en el mes de febrero, existe un incremento significativo en el porcentaje de AEP, con una disminución proporcional de ADH en el aceite de sardina. Sin embargo, no se observa una variación significativa en el contenido total de AGPI de la familia n-3. Según Bandarra y col., 1997 la proporción lipídica de la sardina del Golfo de California, se incrementa en febrero (mes en que la sardina está desovando) del 2% del peso total de la especie hasta alrededor del 8% en el mes de junio, época que corresponde a la engorda o postdesove.

Principales usos de los aceites de pescado

Los lípidos pueden ser sometidos a numerosas manipulaciones tecnológicas con el propósito de mejorar sus características físico-químicas, su apariencia, sus propiedades organolépticas y su estabilidad. Entre los procesos más conocidos están la refinación, las reacciones de interesterificación ya sean químicas o enzimáticas y los procesos de fraccionamiento selectivo, entre otros.

Tabla 1. Variación del Contenido de Acido Eicosapentaenoico (AEP) y Acido Docosahexaenoico (ADH) en el Aceite de Sardina Monterrey (*Sardinops sagax caeruleus*), Proveniente del Golfo de California.

Ácidos Grasos	Noviembre (predesove)	Febrero (desove)	Junio (engorda)
AEP	17.32 ± 2.46	23.91 ± 0.98*	18.26 ± 1.30
ADH	14.40 ± 1.31	9.61 ± 1.69*	13.43 ± 2.06
Ácidos Saturados	34.46 ± 2.10	30.72 ± 0.84	32.78 ± 0.92
Ac. Monoinsaturados	23.79 ± 1.47	22.82 ± 1.58	24.78 ± 1.65
Ac. Poliinsaturados	35.98 ± 3.31	39.21 ± 2.03	36.66 ± 1.25
AGPI n-3	32.49 ± 2.93	36.22 ± 1.81	33.95 ± 1.34

Medias de 6 harineras ± desviación estándar (% ésteres metílicos). AGPI n-3, ácidos grasos poliinsaturados omega-3. *Diferencias significativas en cada renglón (p<0.05).

Fuente: Gámez y col., 1999 .

La aplicación de estas tecnologías ha permitido el desarrollo de un amplio número de productos, en los cuales, los lípidos son utilizados en una variedad de formas de mayor valor agregado y de características innovadoras tanto en apariencia como en valor nutricional. Uno de los procedimientos tecnológicos más utilizados en el procesamiento de grasas y aceites es la hidrogenación catalítica, con el fin de obtener formas sólidas y semisólidas de los aceites, facilitando su manejo y principalmente su estabilidad a la oxidación (Valenzuela, 1997).

Los aceites de pescado han sido masivamente utilizados en algunos países para la fabricación de margarinas y mantecas de bajo costo, utilizando el proceso de hidrogenación, sin embargo, durante este proceso, el aceite de pescado pierde su poliinsaturación, además de dar origen a una gran variedad de isómeros geométricos y posicionales (Valenzuela, 1997). Se ha probado que la formación de estos isómeros, provoca daño en las membranas microsomales y en la actividad enzimática (Morgado y col. 1998). Por lo anterior, se ha sugerido el consumo de aceites de origen marino en forma directa, después de ser correctamente refinados, para la fortificación de alimentos como carnes, mayonesas, aderezos y enlatados (Bimbo, 1997). Actualmente se investiga la forma de purificar y concentrar los AGPI n-3 de los aceites de pescado, con el fin de obtener productos que mantengan la integridad de estos ácidos y que se puedan aprovechar sus propiedades nutricionales.

Técnicas para Obtener Glicéridos con AGPI n-3

La obtención de glicéridos, conteniendo ácidos grasos n-3 a partir de los aceites marinos, es una operación compleja. Existen diferentes métodos de concentración de AGPI n-3, algunos de los cuales, se aplican en combinación con el fin de aumentar la eficiencia y el rendimiento en la concentración.

Destilación molecular

La separación por destilación molecular está en función del peso molecular de la sustancia y de su presión de vapor. Es una técnica antigua que requiere de altas temperaturas ($\approx 250^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, el estrecho intervalo de los pesos moleculares de los ésteres de ácidos grasos permite sólo un enriquecimiento por longitud de cadena más que por compuestos individuales (Stirton, 1962).

Stout y col., (1990) muestran la dificultad de concentrar AGPI n-3 a partir de aceite de pescado en su forma natural (triacilglicéridos, TAG). La destilación del aceite de menhaden como tal, concentró de 16 a 19.5% de AEP, sin embargo, su etil éster se incrementó de 15.9 a 28.4%, mientras que el ADH se elevó de 8.4 a 17.3% en la forma de TAG, en la forma éster se elevó de 9.0 a 43.9%.

La exposición de los AGPI a altas temperaturas durante la destilación puede inducir a la hidrólisis, oxidación térmica, polimerización e isomerización (Wanasundara y col., 1989). Por lo tanto, se prefieren los diseños de métodos de concentración de AGPI n-3 que involucren temperaturas y tiempos de proceso bajos, para minimizar la degradación térmica de los AGPI (Ogata y col., 1996).

Cromatografía en columna

Este método se ha empleado principalmente para aislar clases específicas de lípidos, se basa en dar cierta polaridad al material de soporte de la columna, dependiendo de las moléculas que se deseen separar. Los lípidos neutros, los ácidos grasos libres (AGL) y los fosfolípidos pueden separarse por medio de esta técnica, eluyendo los primeros con cloroformo seguido de otra elución con metanol, para obtener a los fosfolípidos. En forma similar, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados pueden ser separados con hexano en una primera elución, cuando la columna ha sido protonada, para después obtener a los AGPI con diclorometano. Con esta técnica, se han logrado obtener concentrados con 80-90% de AGPI n-3, a partir de aceite de pescado en forma de ésteres-metílicos (Wilson y col., 1993). También ha sido aplicada la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la obtención de productos concentrados de AGPI n-3, partiendo de ésteres de etilo. Se han obtenido purezas del 99%, sin embargo, la recuperación ha sido baja, del orden del 23% para el éster del ADH (Yamamura y Shimonura, 1997).

Fluidos supercríticos

El fraccionamiento de ácidos grasos o ésteres del aceite de pescado por medio de CO₂ supercrítico se basa en las diferencias en la solubilidad de los compuestos individuales (coeficiente de distribución, CD). Las sustancias consideradas como solventes en este proceso son los hidrocarburos ligeros y el dióxido de carbono, este último es el más usado. Estos solventes tienen puntos de sublimación o de ebullición por abajo de la temperatura ambiente, por lo que los productos extraídos pueden ser obtenidos prácticamente libres de solvente por medio de la despresurización. Se han logrado alcanzar purezas del 100% de AEP partiendo de un concentrado por cristalización con urea (Nilsson y col., 1989), sin embargo, el equipo que se necesita para este proceso es sumamente caro (Kadota y col., 1996). Por otra parte, obtener altas concentraciones por esta técnica requiere de tratamientos previos que aumentan el costo de producción, además, los ácidos grasos deben estar en forma de ésteres metílicos o etílicos, los cuales son los menos asimilables por el organismo humano y son menos estables que cuando se encuentran esterificados al glicerol (Lawson y Hughes, 1988).

Métodos biotecnológicos

Esta técnica es relativamente nueva. Algunos reportes muestran que los microorganismos son capaces de producir AGPI n-3 como componentes de sus

membranas (Kyle y col., 1992). Bajpai y col. (1991) obtuvieron a partir de *Thraustochytrium aureum*, 510 mg/L de ADH en 40 h; Li y Ward (1994b) reportaron la producción de 850 mg/L de ADH en 5 días a partir de *Thraustochytrium roseum*. Singh y Ward obtuvieron 1433 mg/L de ADH en 8 días con *Thraustochytrium roseum*. Yaguchi y col. (1997) reportaron la producción mas alta de ADH a partir de *Schizochytrium sp.* (15.5g/L en 5 días). A pesar de estas producciones, los rendimientos de AEP y ADH obtenidos con el cultivo de microorganismos y algas son bajos al compararse con los métodos enzimáticos (Vazhappilly y Chen, 1998).

Cristalización

Tradicionalmente, la cristalización o hibernación ha sido empleada para facilitar el manejo y brillantez de los aceites vegetales y sus derivados. En la industria alimentaria, este proceso se ha utilizado en la elaboración de aceites para aderezos. Una técnica común ha sido la refrigeración del aceite en tanques de almacenamiento, en la que, después de un período de tiempo, se separa la porción líquida de la parcialmente sólida, la cual se sedimenta en el fondo del tanque. Este es un método de fraccionamiento que se basa en la diferencia en composición de fases líquidas y sólidas en equilibrio (Stirton, 1962). El número de insaturaciones de los ácidos grasos determina, en parte, su punto de congelación, generalmente, los ácidos grasos más insaturados tienen más bajo punto de congelación que los saturados del mismo número de carbonos, por lo

tanto, se han logrado mejores eficiencias en las separaciones de AGPI, cuando éstos están en forma libre o como ésteres-metilicos. Esto se debe a que los ácidos grasos saturados esterificados al glicerol, solidifican a temperaturas más bajas que en su forma libre, debido a su asociación con los AGPI de la misma molécula del triacilglicérol (Kissil y Koven, 1990).

Cristalización con urea

La urea tiene la propiedad de formar cristales con hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres que posean más de 6 carbonos unidos en cadena recta. Esta propiedad se ha utilizado para separar los ácidos grasos saturados (cadena recta) de los insaturados (Haagsma y col., 1982), sin embargo, este método no se usa aisladamente, sino que se combina con otros métodos de concentración, dado sus bajos rendimientos (17-20% vol.) (Ganga y col., 1998).

Catálisis enzimática

Una metodología que está siendo ampliamente estudiada para la obtención de productos enriquecidos con AEP y ADH es la catálisis enzimática. Debido a la alta sensibilidad de los AGPI a la oxidación, las reacciones enzimáticas pueden ser una buena opción a estudiar para la obtención de aceites con altos niveles, debido a que se llevan a cabo eficientemente a

temperaturas, pH y presiones ordinarias. El enriquecimiento enzimático con ácidos grasos poliinsaturados n-3 de los triacilglicéridos del aceite de pescado se ha llevado a cabo por varias reacciones de transesterificación: la esterificación directa del glicerol con AEP y ADH como ácidos grasos puros; la interesterificación de la tributirina con etil ésteres de AEP y ADH puros (Haraldsson y col., 1997); esterificación directa de AGL del aceite de atún con alcoholes (Shimada y col., 1997). Un gran número de lipasas han sido estudiadas en diferentes sistemas de reacción (por lotes o continuo con lecho empacado) (García y col., 1992; Tanaka y col., 1992; Shimada y col., 1996; Haraldsson y col., 1997; y Wanasundara y Shahidi, 1998)

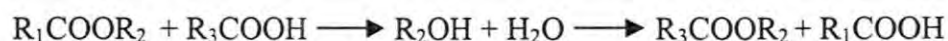
Tipos de Reacciones Catalizadas por Lipasas

Las lipasas se conocen como las enzimas importantes en el metabolismo de los lípidos, las cuales promueven la hidrólisis parcial o completa de los ésteres del glicerol. En los últimos diez años se ha incrementado el interés por las reacciones catalizadas por lipasas como resultado de los estudios que han mostrado que, bajo condiciones apropiadas, los biocatalizadores pueden promover la formación de ésteres así como la hidrólisis de ellos. Con una selección adecuada de las enzimas y los sustratos, es posible controlar tanto la acilación y la deacilación para producir ácidos grasos específicos o triacilglicéridos. Esta habilidad se ha desarrollado al mismo tiempo que se

incrementa la demanda por moléculas lipídicas con estructuras específicas que no se encuentran disponibles por fuentes naturales.

Las lipasas pueden catalizar una serie de reacciones que dependen del tipo de sustrato y proceso. Los términos para los tipos de las reacciones referidos en la literatura son: acidólisis, alcoholólisis, esterificación, interesterificación y transesterificación (Tabla 2). Sin embargo, el significado de estos términos no ha sido consistente en la literatura científica.

Acidólisis. Reacción entre un éster (triacilglicérido) y un ácido graso. El resultado es un intercambio de grupos acilos.



Alcoholólisis. Reacción entre un éster (triacilglicérido) y un alcohol, el cual puede ser un glicerol o metanol, resultando un intercambio de fracciones alcohólicas.



Hidrólisis. Reacción entre un éster y una molécula de agua, en presencia de un catalizador químico o enzimático.

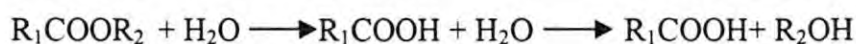
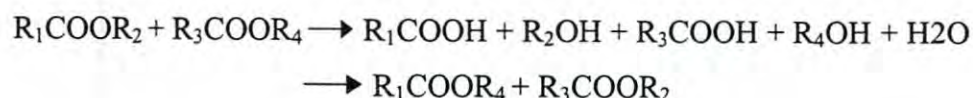


Tabla 2. Reacciones Catalizadas Enzimáticamente por Diferentes Lipasas para Obtener Concentrados de AGPI n-3.

Tipo de Reacción	Enzima	Sustrato	Contenido de n-3 (%)	Referencia
Acidólisis	<i>Rhizomucor miehei</i>	Aceite Menhaden	-	Xu y col. (2000).
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Aceite Menhaden	25 ^a	García y col. (2000).
	<i>Candida rugosa</i>	Aceite vegetal+AEP y ADH	32-35	Senanayake y Shahidi (1999).
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Aceite vegetal+AEP	43	Akoh y col. (1996).
	<i>Candida antarctica</i>	Aceite de pescado		Yamane y col. (1992).
Alcoholisis	<i>Rhizomucor miehei</i>	Aceite de atún	53 ^a	Shimada y col. (1998).
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Aceite hígado de bacalao	50-60	Li y Ward (1993).
Hidrólisis	<i>Candida rugosa</i>	Aceites de foca y menhaden	54	Wanasundara y Shahidi (1998).
	<i>Candida rugosa</i>	Aceites de foca y menhaden	44	Wanasundara y Shahidi (1998).
	<i>Candida rugosa</i>	Aceite de pescado	50	Moore y McNeill (1996).
	<i>Geotrichum candidum</i>	Aceite de sardina	-	Ikemoto y Ota, (1996).
	<i>Geotrichum candidum</i>	Aceite de atún	57	Shimada y col. (1994).
	<i>Candida rugosa</i>	Aceite de pescado y de atún	53	Tanaka y col. (1992).
	<i>Candida rugosa</i>	Aceite de sardina y de hígado de bacalao	50	Hoshino y col. (1990)
	<i>Aspergillus niger</i>	Aceite de capelín	32	Lie y Lambersten (1986).
	<i>Candida cylindracea</i>	Fosfolípidos de bacalao	64	Tocher y col. (1986).
	Fosfolipasa A ₂			
Interesterificación	<i>Mucor meihei</i>	Aceite hígado de bacalao	60-65	Haraldsson y Hoskuldsson (1989).
Esterificación	<i>Candida antarctica</i>	AEP, ADH + glicerol	35	Haraldsson y col. (1995).
	<i>Mucor miehei</i>	Concentrado de AG	52	Lie y Molin (1992).
	<i>Cromobacterium viscosum</i>	del aceite de pescado		

^a % mol.

Transesterificación. Término comúnmente usado para el intercambio de un éster (triacilglicerol) por otro éster que puede ser otro triacilglicérido o un etil éster, el resultado es un intercambio de grupos acilos entre dos ésteres.



Interesterificación. Término general para las reacciones entre un éster y un ácido graso, un alcohol u otro éster (incluye acidólisis, alcoholólisis y transesterificación).

Esterificación. Reacción entre un ácido y un alcohol, o entre compuestos conteniendo grupos carbonilos e hidroxilos.

Debido a la selectividad de las lipasas, es posible obtener productos difíciles de obtener por la mayoría de las reacciones químicas convencionales, estas enzimas pueden mostrar más de un tipo de selectividad. La especificidad usualmente referida a la hidrólisis de triacilgliceroles no es siempre la misma para la esterificación. Los sistemas de reacción usualmente consisten de lipasa (libre o algunas veces en alguna forma inmovilizada) con su agua asociada, los reactantes, o a veces un solvente (agua y/o solvente orgánico), y posiblemente material adicional tales como sílice o alguna malla molecular para la eliminación de la formación de agua (Gunstone, 1999).

Hidrólisis enzimática

Las lipasas tienen la capacidad de romper el enlace éster que existe entre el ácido graso y el glicerol, liberando los ácidos grasos en presencia de agua (Figura 1). Se conocen lipasas que tienen una actividad débil sobre los AGPI (ácido α -linolénico, 18:3 n-3; ácido araquidónico, 20:4 n-6; AEP, 20:5 n-3; y ADH 22:6 n-3). Por otro lado, se ha observado que algunas lipasas de *Pseudomonas* (Amano AK) actúan más fuertemente sobre las uniones ésteres de ADH que de los ésteres de AEP, sin embargo, en condiciones alcohólicas tienen una actividad alta sobre los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, una baja actividad sobre el AEP y el ADH y a la vez buena tolerancia a la deficiencia de agua (Shimada y col., 1997b). Por otro lado, la lipasa *C. cylindracea* (Sigma Co.) y la *P. roqueforti* (Amano) presentan actividades bajas en las mismas condiciones alcohólicas (Haraldsson y col. 1997). Se han obtenido glicéridos que contienen aproximadamente 50% de ADH por hidrólisis selectiva del aceite de atún con la lipasa de *Candida rugosa* (Shimada y col., 1994). A pesar de esto, no se han logrado rendimientos altos.

Esterificación enzimática

En la esterificación los AGL son ligados al glicerol por la acción de enzimas (Figura 2). Según el contenido de agua en el sistema de reacción las lipasas catalizan la hidrólisis o la esterificación.

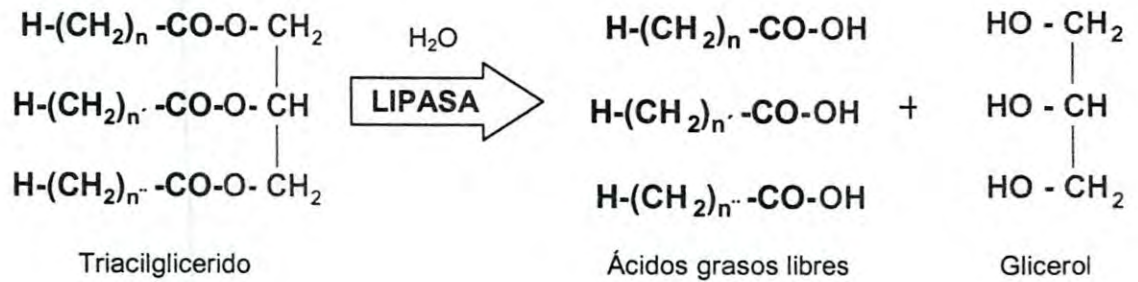


Figura 1. Diagrama general del mecanismo de la hidrólisis de triacilglicéridos.

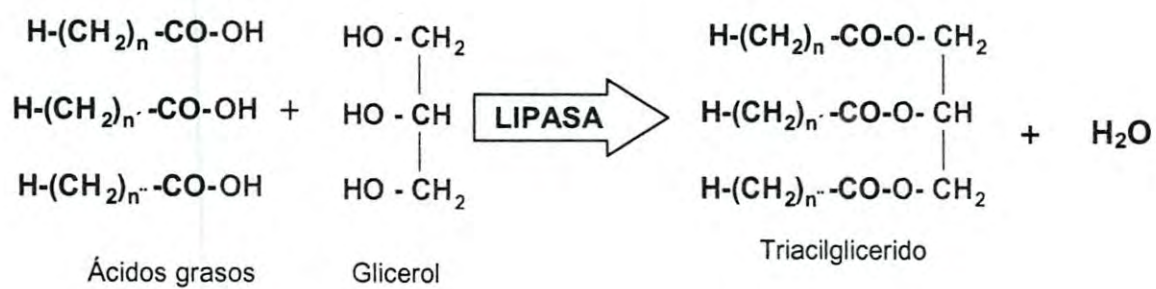


Figura 2. Diagrama general del mecanismo de la esterificación de ácidos grasos al glicerol.

Una reacción que es conducida en un medio con menos de 1% de agua, usualmente se considera bajo condiciones micro acuosas, comúnmente se requiere mucho menos de ese porcentaje para un comportamiento óptimo de la enzima. Se sabe que las enzimas requieren al menos una cantidad de agua mínima para mantener su estructura tridimensional, por lo tanto, el contenido de agua juega un papel muy importante en términos de actividad, estabilidad térmica y la dirección de la reacción (Shimada y col., 1999b)

La esterificación de AEP y ADH con glicerol puede ser llevada a cabo de dos formas, la primera en presencia de solventes tales como hexano, isooctano y piridina/hexano (Akoh y Mutua, 1994; Li y Ward, 1994a), la segunda, es la esterificación directa en ausencia de solventes (Kosugi y Azuma, 1994; Tanaka y col., 1992.). Sin embargo, se ha observado que el uso de solventes durante la esterificación inhibe los problemas de polimerización, los cuales son asociados con la forma libre del AEP y ADH (Kosugi y Azuma, 1994). Shimada y col., (1996 y 1997a) lograron una esterificación selectiva sin solventes orgánicos usando alcohol lauril como sustrato y una enzima de *Rhizopus delemar*, alcanzando una concentración de ADH del 23 al 90%, a partir de AGL del aceite de atún. Los AGL sin reaccionar fueron extraídos de la mezcla de reacción con *n*-hexano y sometidos a esterificación una vez más, incrementándose a 91% en peso de ADH, con un rendimiento del 88%. Tanaka y col. (1992), emplearon una enzima de *Candida cylindracea* y aceite de atún para producir triacilglicéridos ricos en ADH, incrementando el nivel de 25% a 50%.

Los resultados hasta hoy, muestran la necesidad de maximizar el contenido de AEP y ADH en la composición de los aceites y minimizar las pérdidas de éstos. Los estudios indican que los parámetros involucrados en la reacción de hidrólisis y esterificación son: cantidad de lipasa, contenido de agua, actividad de la enzima, tiempo de reacción, equilibrio en función de la composición del lípido y la composición inicial de AEP y ADH, por lo que es necesario estudiar la cinética de esta reacción.

Cinética Enzimática

Las lipasas son proteínas de alto peso molecular con actividad catalítica altamente específica para la conversión de sustratos a productos (Ecuación 1). Estas enzimas se pueden obtener de las células de los organismos vivos como plantas, animales y microorganismos, por medio de operaciones de bioseparación (Shuler y Kargi, 1992).



Las lipasas son solubles en agua y tienen acción catalítica sobre los lípidos, son extremadamente eficientes en formar o romper uniones éster cuando se encuentran en una interfase aceite-agua. Las principales ventajas de las reacciones catalizadas por lipasas, sobre los métodos químicos, son su amplio rango en la selectividad y especificidad, esto permite un grado alto en el control

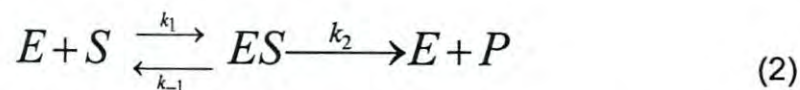
de las condiciones de las reacciones. Sin embargo, se deben considerar algunos factores como temperatura, pH, contenido de agua, y cantidad de enzima. Además, la especificidad de las lipasas puede variar según la estructura del sustrato: longitud de la cadena, número de insaturaciones y la posición de la unión éster en el triacilglicérido (Quinlan y Moore, 1993).

Efecto de la concentración de sustrato

Los aspectos moleculares de la interacción enzima-sustrato no son todavía bien comprendidos, algunos estudios usando rayos X y espectroscopia RMN, han revelado la presencia del complejo enzima-sustrato (*ES*). En la mayoría de los casos esta interacción es por medio de fuerzas débiles como Van Der Waals o enlaces de puente de hidrógeno, donde el sustrato se enlaza en un sitio específico de la enzima conocido como el sitio activo. Una solución enzimática tiene un número fijo de sitios activos, a altas concentraciones de sustrato todos estos sitios podrían ser ocupados por el sustrato y se diría que la enzima se encuentra saturada (Shuler y Kargi, 1992).

Un modelo matemático para una interacción sencilla enzima-sustrato, fue primeramente desarrollada por V.C.R. Henri en 1902 y posteriormente por M. L. Menten en 1913. el cual es conocido comúnmente como la cinética de Michaelis-Menten o cinética de saturación. Actualmente, se tiene conocimiento que en los sistemas biológicos pueden tener lugar interacciones enzima-sustrato más complejas como las reacciones multisustrato-multienzima (Shuler y Kargi, 1992).

El análisis de la actividad de una enzima está basada en el cambio físico o químico del sustrato (S) o del producto (P) en una mezcla de reacción.



$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (3)$$

Donde: v es la velocidad de formación del producto o el consumo de sustrato en mol/L-s.

La velocidad de variación del complejo ES es:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (4)$$

Debido a que la enzima no se consume, la ecuación de conservación de la enzima produce lo siguiente:

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (5)$$

Para obtener una solución analítica se requiere asumir un rápido equilibrio entre la enzima y el sustrato para formar el complejo ES , entonces se puede utilizar la constante de equilibrio (K_m) expresada en términos de la concentración del sustrato.

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (6)$$

Si la enzima es conservada, entonces la concentración del complejo ES es:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{(k_{-1}/k_1) + [S]} \quad (7)$$

o bien:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{(K'_m) + [S]} \quad (8)$$

Substituyendo en la ecuación de velocidad de formación del producto se tiene:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{K'_m + [S]} = \frac{V_m[S]}{K'_m + [S]} \quad (9)$$

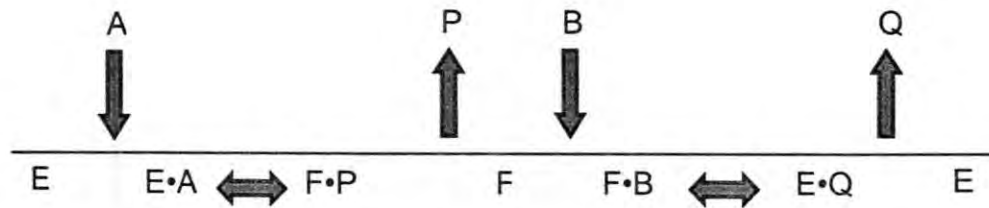
donde: $V_m = k_2 (E_0)$

En este caso, V_m es la inversa de la velocidad de la reacción. Si se agrega más enzima V_m cambia; sin embargo, la adición de más sustrato no tiene influencia en V_m . Comúnmente la K'_m es llamada la constante de Michaelis-Menten. Un valor bajo de K'_m sugiere que la enzima tiene una alta afinidad por el sustrato., también, K'_m corresponde a la concentración de sustrato para la cual se tiene la mitad de la velocidad máxima V_m (Shuler y Kargi, 1992).

Las expresiones de velocidad derivadas del mecanismo de Michaelis-Menten no son adecuadas para describir las reacciones multisustrato-

multiproducto catalizadas enzimáticamente. Con el fin de superar las dificultades de este modelo, se han propuesto otros mecanismos cinéticos complejos.

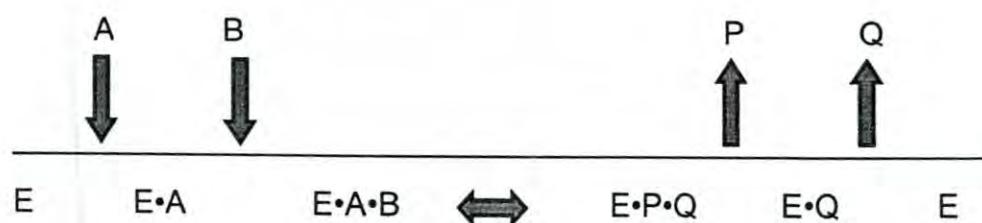
Mecanismo unimolecular multiple enzima-sustrato. En la revisión de Malcata y col. (1992), se establece que se ha encontrado por analogía con los mecanismos asociados con la catálisis por otras hidrolasas de serina, que las lipasas siguen dos etapas en el mecanismo de reacción llamado Pin Pong Bi-Bi:



La primera etapa es el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina sobre la unión éster, resultando la formación de una enzima acilada y la liberación de una fracción alcohólica del sustrato inicial; la segunda etapa es la hidrólisis de la enzima acilada. Este mecanismo ha sido fuertemente apoyado por estudios cinéticos con la lipasa pancreática y la lipasa de *Candida rugosa* (Miller y col., 1991).

Dependiendo del sustrato y de la enzima, cualquiera de las dos etapas pueden ser restringidas, en el caso de la lipasa de *Chromobacterium* la etapa restringida es la acilación de la enzima (Sugiura e Isobe, 1976); por lo tanto, la

expresión de la velocidad de reacción corresponde a un mecanismo Bi-Bi ordenado:



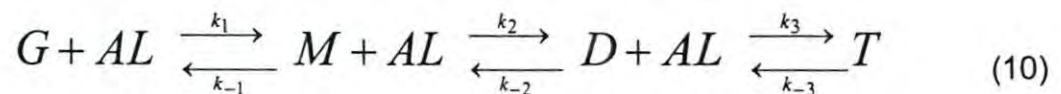
La diferencia entre el mecanismo Bi-Bi ordenado y el Ping Pong Bi-Bi es que la molécula de agua al ser altamente polar puede tener dificultad para penetrar al sitio activo donde se encuentra el sustrato (glicérido con un ácido graso de cadena larga). En sistemas macroacuosa, el agua forma una monocapa cercana al sitio activo, mientras que en sistemas microacuosa una pseudo-monocapa (moléculas de agua alrededor de los grupos cargados de la enzima) está presente, consecuentemente la concentración de agua puede ser tomada como constante. Si esta situación prevalece, la expresión de la velocidad corresponderá a un mecanismo Uni-Bi ordenado. Wang (1981) ha sugerido el mecanismo Uni-Bi aleatorio en el cual la liberación del alcohol y la acilación del producto ocurre aleatoriamente en vez de secuencialmente (primero liberación del alcohol y luego la acilación del producto).

Sin embargo, Janssen y col. (1999), no están de acuerdo con los modelos cinéticos usados (modelos de Ping-Pong) principalmente para describir las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, debido a que éstos están basados en las condiciones de velocidad inicial sin tomar en cuenta todos los

productos. El primer producto en la reacción de esterificación por lipasas es el agua, compuesto que normalmente está presente.

Mecanismo de formación de acilglicéridos.

Lortie y col. (1993), propusieron un mecanismo para la esterificación del ácido oleico al glicerol, a continuación se muestra una simplificación a los modelos de Lortie y col. (1993), donde se descartan los pasos de isomerización y el efecto de la actividad de agua.



donde: G = glicerol.

AL = ácidos grasos libres.

M = monoacilglicéridos.

D = diacilglicéridos.

T = triacilglicéridos.

k_i = constantes de reacción

Para este esquema, es posible escribir las siguientes ecuaciones para las constantes de equilibrio. Considerando que el sistema conteniendo la enzima inmovilizada, los sustratos sin reaccionar (AGL y glicerol), y los productos (MAG, DAG, TAG) se encuentran en equilibrio, las constantes de equilibrio aparente pueden ser definidas como:

$$K_1 = \frac{[M]}{[G][AL]} \quad (11)$$

$$K_2 = \frac{[D]}{[M][AL]} \quad (12)$$

$$K_3 = \frac{[T]}{[D][AL]} \quad (13)$$

La estimación de las constantes de equilibrio puede realizarse por el algoritmo de regresión para multirespuesta.

Considerando la concentración total de DAG y MAG, el balance para el glicerol y los AGL esta dado por:

$$[G]_0 = [G] + [M] + [D] + [T] \quad (14)$$

$$[AL]_0 = [AL] + [M] + 2[D] + 3[T] \quad (15)$$

La cual puede ser escrita solamente en términos de AGL y glicerol como:

$$[G]_0 = [G] + K_1[G][AL] + K_1K_2[G][AL]^2 + K_1K_2K_3[G][AL]^3 \quad (16)$$

$$[AL]_0 = [AL] + K_1[G][AL] + 2K_1K_2[G][AL]^2 + 3K_1K_2K_3[G][AL]^3 \quad (17)$$

Este sistema de ecuaciones no lineales puede resolverse por métodos numéricos como el método de Gauss-Newton.

Las cinéticas de formación y consumo de cada uno de los reactantes y productos formados estarán dados por las siguiente serie de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dM}{dt} = k_1[G][AL] - k_{-1}[M] - k_2[M][AL] + k_{-2}[D] \quad (18)$$

$$\frac{dD}{dt} = k_2[M][AL] - k_{-2}[D] - k_3[D][AL] + k_{-3}[T] \quad (19)$$

$$\frac{dT}{dt} = k_3[D][AL] - k_{-3}[T] \quad (20)$$

$$\frac{dAL}{dt} = k_{-3}[T] + k_{-2}[D] + k_{-1}[M] - k_1[G][AL] \quad (21)$$

Este sistema de ecuaciones diferenciales puede ser resuelto por el método de Runge-Kutta.

Efecto de la temperatura

La actividad enzimática se incrementa conforme se eleva la temperatura, a ésta se le llama activación por temperatura; aclarando que las temperaturas elevadas pueden desnaturalizar a la enzima disminuyendo considerablemente su actividad. La velocidad de reacción varía de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (Shuler y Kargi, 1992).

$$v = k_2[E] \quad (22)$$

Siendo:

$$k_2 = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (23)$$

Donde: $[E]$ es la concentración de la enzima activa.

A es el factor pre-exponencial.

E_a es la energía de activación (kcal/mol).

R es la constante de los gases.

T es la temperatura en grados Kelvin.

Una gráfica de $\ln v$ contra $1/T$ representa una línea recta cuya pendiente es $-E_a/R$ (Shuler y Kargi, 1992).

Desactivación térmica. Se conoce que las lipasas pierden actividad conforme pasa el tiempo, en esta desactivación, una lipasa puede sufrir cambios estructurales reversibles o irreversibles, tales procesos son frecuentemente caracterizados por cinéticas de primer orden. La vida media de lipasas inmovilizadas es definida como $\ln\{2\}/k_d$, donde k_d es la constante de desactivación de primer orden.

Es posible incrementar significativamente la estabilidad térmica de una lipasa al inmovilizarla sobre un soporte sólido. La energía de activación asociada con la de desactivación de lipasas inmovilizadas varía de aproximadamente 75 a 144 kJ/mol, dichos valores son mas bajos que el intervalo usualmente asociado

con la desactivación térmica de enzimas, esto porque la mayoría de las lipasas son estabilizadas térmicamente por la inmovilización (Malcata y col., 1992). Aunque los modelos de desactivación de primer orden son ampliamente usados, estos no describen adecuadamente el comportamiento de las enzimas. Malcata y col. (1992) probaron tres series de modelos para describir el cambio en la actividad de la lipasa de *Aspergillus niger* inmovilizada sobre polipropileno: (a) la lipasa natural es convertida a su forma inactiva; (b) la lipasa natural es convertida a su forma inactiva en uno de dos procesos paralelos, el otro en el cual conduce a otra forma estable activa; y (c) la lipasa natural es alterada a otra forma activa y ambas formas son susceptibles a la desactivación. Análisis estadísticos indicaron que el segundo modelo proveyó el mejor ajuste.

Considerando la importancia de los AGPI n-3 en la salud del humano, particularmente en el desarrollo neurológico de los infantes, y que el aceite de sardina constituye una de las mejores fuentes de AGPI n-3, la aplicación de lipasas en la obtención de concentrados de AGPI constituye la metodología más viable. La concentración de sus componentes nutricionales elevaría su valor agregado. Por lo tanto, es necesario conocer detalladamente la cinética de la reacción a fin de tener las mejores condiciones de aplicación de éste aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). En este trabajo se estudió la cinética de la esterificación del AEP y ADH al glicerol, utilizando enzimas comerciales, con el fin de obtener glicéridos con alta concentración de AGPI n-3. Los concentrados de ácidos grasos n-3 fueron provistos por los laboratorios del DICTUS, y fueron obtenidos por hidrólisis química del aceite de sardina refinado y concentrados por cristalización con urea. Todos los reactivos utilizados en esta investigación fueron grado analítico y cromatográfico.

Esterificación Enzimática.

La esterificación se llevó a cabo en frascos de vidrio (tipo vial con tapón de rosca), colocando una proporción molar de glicerol y de ácidos grasos libres concentrados (peso total aproximado 1000 mg), sin usar solventes. He y Shahidi (1997) concluyeron que los concentrados de AEP y ADH provenientes de aceites de pescado pueden ser fácilmente esterificados en forma directa sin usar solventes. Para evitar la oxidación de los ácidos grasos se agregó 0.02 % (p/p ácidos grasos) de TBHQ a la mezcla de reacción y se eliminó el oxígeno por desplazamiento con nitrógeno.

Los frascos de reacción (10 mL) fueron colocados sobre placas de agitación magnética (Corning PC-420) dentro de una incubadora (New Brunswick G27) a temperatura y agitación constante (Figura 3). Después de agitar la mezcla de reactantes por 5 min se adicionaron 50 mg de enzima (5% p/peso de reactantes) para iniciar la esterificación de los ácidos grasos al glicerol reemplazando nuevamente la atmósfera de nitrógeno.

Para monitorear el curso de la cinética de esterificación se tomaron dos muestras: una de 50 μ l para analizar por cromatografía de gases la composición de ácidos grasos libres en la mezcla de reacción y otra de 10 μ l para determinar la formación de acilglicéridos por HPLC. Después de cada muestreo, el oxígeno se desplazaba con nitrógeno. Para eliminar el agua producida durante la reacción, se agregaron cantidades equimolares (20 %p/p reactantes) de mallas moleculares de 1.6 mm y 4 Å diámetro de poro (SIGMA) después de transcurrir 45 min de reacción. Según Robles y col (1999) es preferible agregar las mallas moleculares al iniciar la reacción de esterificación.

Análisis de Reactantes y Productos

Las muestras colectadas, tanto al inicio, como en el transcurso de la reacción de esterificación, fueron analizadas para determinar la composición de ácidos grasos libres y el contenido de glicéridos. Con esta información se realizaron los balances de masa y molar.

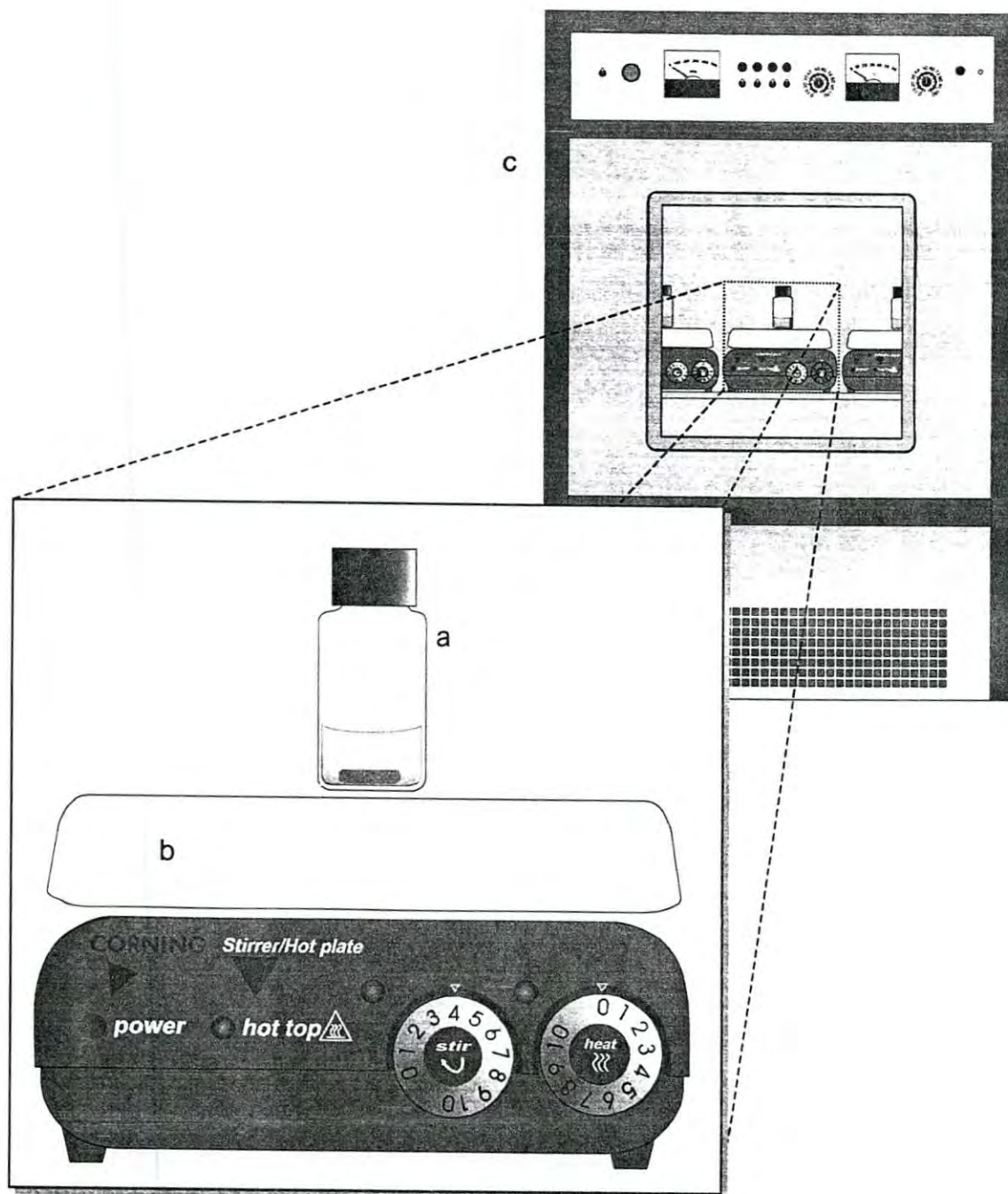


Fig. 3. Montaje experimental de los reactores tipo tanque agitado para las reacciones enzimáticas. a. Reactor de 50 ml; b. Termoplaca para agitación magnética; c. Incubadora.

Cuantificación de ácidos grasos libres

Para determinar la composición de ácidos grasos libres, los concentrados de AGPI n-3 así como las muestras de la reacción de esterificación (50 μ L), fueron analizados por cromatografía de gases.

Los ácidos grasos fueron convertidos a sus correspondientes ésteres-metílicos utilizando BF_3 como catalizador (Ce 2-66; AOCS, 1994), posteriormente fueron inyectados al cromatógrafo (Varian 3400) provisto de una columna capilar Omega Wax 250 (Supelco, Inc. Bellefonte P.A. 16823-0048 USA. 30 m x 0.25 mm, con 0.20 μ m de grosor de película). Como detector se usó detector de ionización de flama y un procesador de datos PE-Nelson 1020.

Se utilizó el siguiente programa de temperatura para la columna: 180°C (2 min), 180-205°C (6°C/min). La temperatura del inyector y la del detector fueron de 250° y 260 °C, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador.

Los picos del cromatograma fueron identificados por comparación de los tiempos de retención de sus correspondientes estándares. Todos los análisis se realizaron por duplicado y la concentración fue expresada como porcentaje en peso del ácido graso utilizando el ácido heptadecanoico (C17:0) como estándar interno.

Cuantificación de glicéridos

Los glicéridos formados fueron extraídos de la muestra (10 μ l) agregando 5 mL de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1). Alícuotas de 1000 μ L de esta solución fueron transferidas a tubos de 13x100 con tapón de rosca. Los solventes fueron evaporados utilizando nitrógeno y el material no evaporado fue resuspendido en 1 mL de hexano:2-propanol (90:10) para la inyección posterior al HPLC.

Para cuantificar el porcentaje de mono-, di- y triacilglicéridos formados por la esterificación y los ácidos grasos libres sin reaccionar, se utilizó un equipo de HPLC (Varian 9012), con un detector ELSD 500 (Evaporative Light Scattering Detector; Alltech). Se utilizó una columna Lichrosorb Si60 (Supelco, Inc; 250 x 4.6 mm, 50 μ m de tamaño de partícula) y un volumen de inyección de 10 μ L. La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C utilizando un chaqueta para columna (ALTECH) conectada a un baño con recirculación de agua (Thermomix 1420; B. Braun). El sistema de solventes fue hexano y una mezcla de hexano:2 propanol-acetato de etilo (80:10:10) con 0.1% de una solución de ácido fórmico al 10% en 2-propanol). El programa de solventes para la elución de la columna fue el utilizado por Liu y col (1993) con algunas modificaciones (Tabla 3). Todos los solventes utilizados para los análisis fueron grado HPLC y sometidos a filtración (0.45 μ m) y desgasificación antes de usarse.

Tabla 3. Proporción de Solventes Utilizados para el Análisis de Glicéridos en HPLC.

Tiempo	Flujo (mL/min)	%A	%B	% Ac. Fórmico
0.0	1.5	85	15	0.1
6.0	1.5	85	15	0.1
6.2	1.5	2	98	0.1
12.9	1.5	2	98	0.1
13.0	1.5	85	15	0.1
15.0	1.5	85	15	0.1

A = hexano, B = hexano+2-propanol+acetato de etilo (80:10:10). Ac. Fórmico: Solución de ácido fórmico al 10% en 2-propanol.

Fuente: Liu y col., 1993.

Los picos del cromatograma fueron identificados por sus correspondientes estándares comerciales de mono-, di- y triglicéridos (SIGMA-ALDRICH 178-8, 178-9 y 178-13, respectivamente). Todos los análisis se realizaron por duplicado y la concentración fue expresada como porcentaje en área (Arcos y Gil, 2000). La cantidad de cada componente fue calculada como porcentaje de la cantidad inicial de ácidos grasos, utilizando la curva de calibración de los estándares (Selmi y col, 1998).

Selección de la Enzima

En experimentación preliminar se estudió la actividad de esterificación de las siguientes enzimas: Las enzimas PS-C Amano I y PS-C Amano II de *Pseudomonas cepacia* ambas inmovilizadas en celita; PS-D Amano I de *Pseudomonas cepacia*, inmovilizada sobre tierras diatomeas; las enzimas libres AK20 de *Pseudomonas sp.*, A12 de *Aspergillus niger*, FAP-15 de *Rhizopus oryzae*, todas proporcionadas por Amano Internacional Enzyme, Corp.(Japón); además la enzima Novozym 435 de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica macroporosa, proporcionada por NOVO Nordisk (Dinamarca).

La selección de la lipasa para este trabajo, se realizó en base a su actividad enzimática y al grado de esterificación global, después de la reacción de esterificación bajo las mismas condiciones: relación molar 0.16 mol AGL/mol glicerol; temperatura, 40°C; cantidad de enzima 5% peso/peso de reactantes; tiempo de reacción, 9 h.

Las condiciones de reacción fueron establecidas en base a la literatura. Se decidió utilizar 5% de enzima debido a que al usar cantidades pequeñas de enzima se obtiene un mejor seguimiento de las reacciones en función del tiempo (Lortie y col. 1993). Además, varios autores han investigado que no existe un cambio significativo en la cantidad de enzima utilizada después del 5% (Mc Neill y col. 1996; He y Shahidi, 1997; Esteban y col., 1998).

Grado de esterificación

El grado de esterificación fué determinado por la relación de AGL en los glicéridos y al inicio de la reacción mediante la siguiente expresión (Li y Ward, 1993a):

$$GE(\%) = \frac{AGL_i - AGL_f}{AGL_i} \times 100 \quad (24)$$

Donde: GE = grado de esterificación.

AGL_i = ácido graso libre al inicio de la reacción

AGL_f = ácido graso libre al final

Actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática fue realizada de la siguiente manera: 50 mg de enzima se agregaron a la mezcla de AGL y glicerol en una proporción 0.16 mol AGL/mol glicerol, después de agitar la mezcla por 15 min a

40°C, se analizó el contenido de AGL por titulación con una solución etanólica de KOH 0.1 N. Una unidad de actividad enzimática fue definida como los micromoles de ácidos grasos esterificados al glicerol por gramo de enzima por minuto (Wanasundara y Shahidi, 1998a).

Diseño Experimental

Se seleccionó un diseño de composición central rotatable (DCC) tipo Box-Wilson (Myers y Montgomery, 1995), el cual ha sido ampliamente utilizado para el estudio de reacciones enzimáticas (Xu y col. 2000; Wanasundara y Shahidi, 1998b; Krishna y col., 1999). Las variables respuesta fueron: grado de esterificación (Y_1), porcentaje de incorporación de AEP (Y_2), y porcentaje de incorporación de ADH (Y_3), además, se monitorearon los niveles de formación de MAG, DAG y TAG.

Las variables independientes a estudiar fueron: proporción molar de ácidos grasos/glicerol (X_1), tiempo (X_2) y temperatura (X_3) (Tabla 4). Los niveles de estudio para cada uno de las variables fueron establecidos en base a la literatura y a la experimentación preliminar (Tabla 5).

En total fueron 18 corridas experimentales, de las cuales 8 corresponden al diseño factorial 2^3 , 6 puntos axiales y 4 repeticiones en el centro. Los experimentos se aleatorizaron con el fin de evitar sesgo en la respuesta, causada por factores externos.

Tabla 4. Arreglo General para el Diseño de Composición Central Rotable.

Corrida	Variable		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

X_1 = proporciones molares de ácidos grasos/glicerol, X_2 = Tiempo (h), X_3 = Temperatura ($^{\circ}$ C).
Fuente: Myers y Montgomery, 1995.

Tabla 5. Variables Independientes y sus Niveles Establecidos para el Diseño de Composición Central Rotable.

Variable Independiente	Símbolo	Nivel de las variables codificada				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Relación AGL/glicerol (mol/mol)	X_1	0.48	1.5	3.0	4.5	5.52
Tiempo de reacción (h)	X_2	0.7	2.75	5.75	8.75	10.8
Temperatura de reacción (°C)	X_3	38	45	55	65	72

X_1 = proporciones molares de ácidos grasos/glicerol, X_2 = Tiempo (h), X_3 = Temperatura (°C).

Se utilizó un modelo de segundo orden para la predicción de las variables individuales dependientes Y_i (grado de esterificación, porcentaje incorporación de AEP, porcentaje incorporación de ADH) bajo el modelo siguiente:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \chi_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \chi_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (25)$$

Donde: β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} , son respectivamente la intersección, el efecto lineal, efecto cuadrático y la interacción en la regresión.

Efecto de los tratamientos

Para conocer el efecto de los tratamientos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA); la prueba de diferencia de medias (Tuckey-Kramer); una regresión polinomial para el establecimiento del modelo matemático utilizando el paquete estadístico JMPin 3.2.1. (SAS Institute Inc. 1997).

Optimización de las condiciones de reacción

Para determinar las condiciones óptimas de concentración de sustrato, tiempo y temperatura para la incorporación de AEP y ADH al glicerol y para la formación de MAG, DAG y TAG se realizó un análisis de superficie de respuesta utilizando el paquete estadístico JMPin 3.2.1.(SAS Inc., 1997).

Cinética de Esterificación Enzimática

Para realizar el estudio cinético, las reacciones de esterificación fueron monitoreadas en los intervalos de tiempo establecidos desde 0 hasta las 24 h. Para obtener los parámetros cinéticos de la esterificación enzimática, se determinaron los valores de la velocidad inicial. Para obtener las velocidades específicas de esterificación se modeló cada cinética individual utilizando todos los datos generados.

Para describir el proceso de hidrólisis se ha utilizado un modelo cinético de pseudo-primer orden, sin embargo, este modelo no puede describir los perfiles de concentración de AGL como función del tiempo. Por lo tanto, el modelo se ha extendido por la incorporación de un proceso de desactivación de primer orden dependiente del tiempo (Dicks y Lee, 1999) como:

$$k = k_0 e^{-k_d t} \quad (26)$$

en el cual k_0 [mol glicéridos/(mol total*h)] es la velocidad inicial (actividad inicial) y k_d es la constante de desactivación para la lipasa (1/h). Resolviendo la ecuación diferencial resultante, se muestra que el grado de esterificación en función del tiempo puede ser descrita por:

$$GE_t = 1 - \exp\left[\frac{k_0}{k_d} (e^{-k_d t} - 1)\right] \quad (27)$$

Este modelo se utilizó para ajustar a los datos experimentales con ayuda del programa SIGMA Plot 2000, y fueron determinadas así, las constantes de velocidad inicial (k_0) y de desactivación (k_d). Por medio del modelo de Michaelis-Menten (Ecuación 9) se determinaron los valores de K_m , y V_m , y mediante el modelo de Arrhenius (Ecuación 23) se obtuvo la energía de activación (E_a).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La esterificación enzimática puede utilizarse para la obtención de glicéridos y lípidos estructurados, la cual puede llevarse a cabo por una gran variedad de enzimas, bajo distintas condiciones de reacción. En el presente trabajo se establecieron las condiciones más adecuadas de concentración de sustrato, tiempo y temperatura para lograr la mayor incorporación de ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) al glicerol en ausencia de solventes, además de determinar los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación.

Análisis de Reactantes y Productos

Los concentrados de AGPI n-3 obtenidos del aceite de sardina (*Sardinops sagax caeruleus*) por cristalización con urea constituyen una excelente materia prima para la esterificación al glicerol en la formación de glicéridos con alto contenido de AEP y ADH.

Composición de ácidos grasos libres.

El nivel de AGPI n-3 encontrado en el concentrado utilizado en este estudio fue de 81.43% (p/p), dado por el ácido octadecatetraenoico (C18:4), el AEP (C20:5) y el ADH (C22:6) (Tabla 6). El resto de los componentes del concentrado está formado por ácidos grasos monoinsaturados de cadena larga.

Tabla 6. Composición del Concentrado de AGPI n-3 Obtenido en los Laboratorios del DICTUS.

Ácido Graso	% Peso	% mol	PM (g/gmol)
C16:1	0.29	0.32	254.39
Desconocido	7.87	—	—
C18:1	6.82	6.92	282.44
C18:4 (n-3)	10.42	10.81	276.40
C20:5 (n-3)	18.21	17.27	302.43
C22:6 (n-3)	52.80	46.11	328.47
Total*	96.41	74.19	286.86
AGPI n-3	81.43	81.45	—

*El total no suma el 100% porque algunos picos del cromatograma no fueron identificados y/o su composición es muy pequeña.

Considerando la composición de los ácidos grasos en el concentrado y los pesos moleculares correspondientes, se calculó el peso molecular promedio del concentrado (286.86 g/gmol), el cual fue utilizado para obtener las proporciones molares y para realizar todos los balances molares en la presente investigación.

La Figura 4 muestra el cromatograma del concentrado correspondiente al análisis de AGL por CG. Se puede observar que durante la esterificación tanto la altura como el área de los picos fue disminuyendo con respecto al estándar interno, debido a la esterificación de los ácidos grasos llevada a cabo.

Composición de glicéridos

La cuantificación de la formación de acilglicéridos se realizó por HPLC, utilizando un detector ELSD. La Figura 5 muestra los cromatogramas para acilglicéridos al inicio y durante la reacción de esterificación, donde se puede apreciar notablemente la formación de los productos de reacción. El pico correspondiente a los TAG incrementa apreciablemente su altura y área después de transcurridas 10 h de reacción, sin embargo, los picos correspondientes a los DAG y a los MAG disminuyen su área y altura o permanecen constantes durante el transcurso de la reacción, dependiendo de las condiciones de operación.

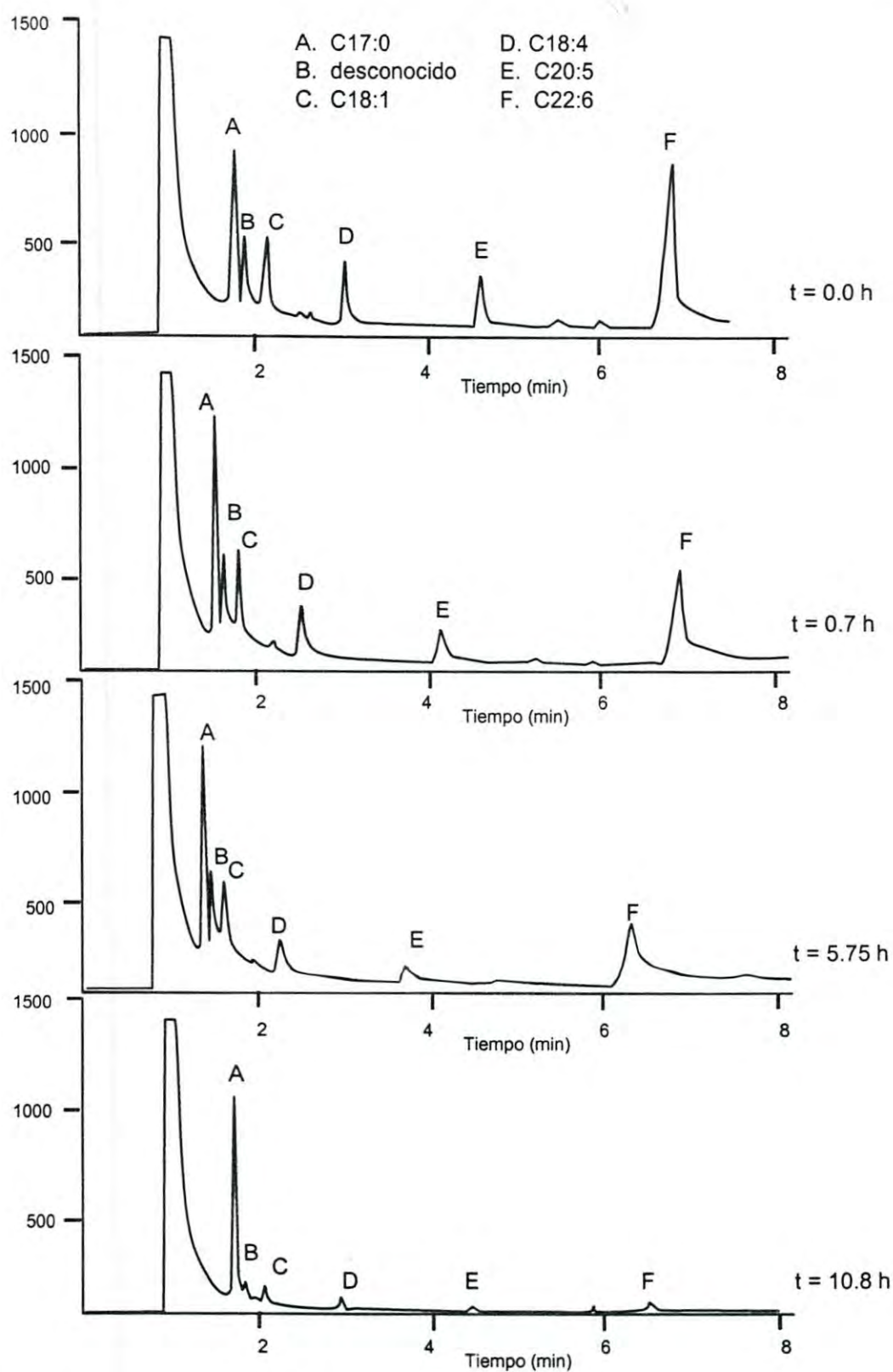


Figura 4. Cromatogramas de la composición de AGL por cromatografía de gases durante la reacción de esterificación.

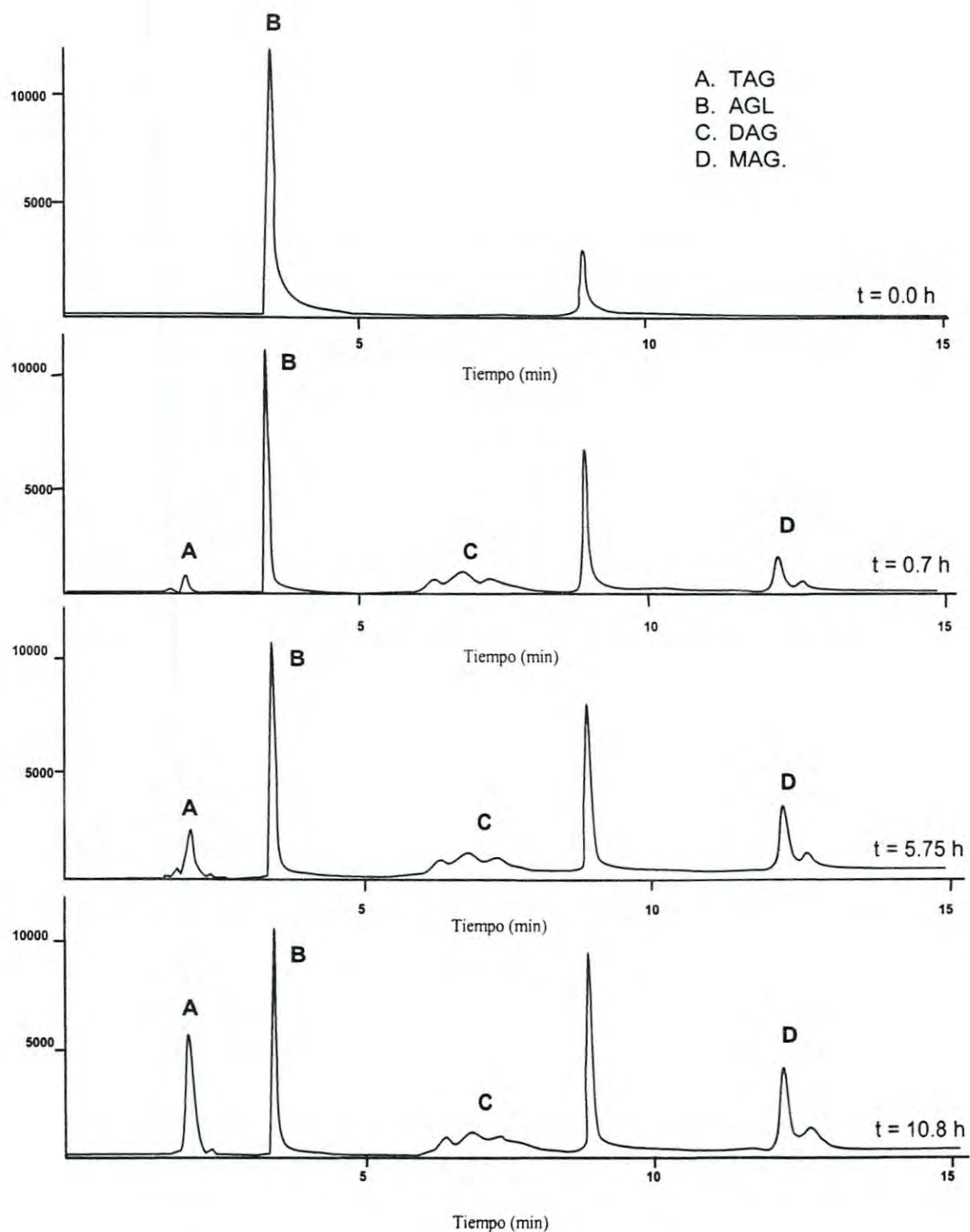


Figura 5. Cromatogramas de las clases de lípidos por HPLC durante la reacción de esterificación.

Selección de la Enzima

Para seleccionar la enzima a utilizar en el presente estudio, se llevaron a cabo reacciones de esterificación con distintas enzimas comerciales bajo las mismas condiciones de reacción: relación molar, 0.16 mol AGL/mol glicerol; temperatura, 40°C; cantidad de enzima, 5% p/p de reactantes; y tiempo de corrida, 9 h. Los resultados mostraron que todas las enzimas pueden ser útiles para la esterificación de los AGPI n-3, pero con actividad diferente cada una de ellas. Algunos estudios de esterificación de AGPI n-3 muestran que las enzimas presentan diferente actividad para incorporar los AGPI al glicerol y una selectividad nula hacia el tipo de ácidos grasos (Osada y col., 1990; Lie y Molin 1992).

La Figura 6 muestra el grado de esterificación de las enzimas en estudio. Se puede observar que todas las enzimas alcanzan el equilibrio después de 7 h de reacción, sin embargo, la velocidad de esterificación es alta en la primera hora de reacción y después de este tiempo no existe una considerable formación de glicéridos. Haraldsson y col. (1995) obtuvieron el 91% de incorporación del AEP y ADH al glicerol después de 6 h de reacción, sin embargo, para completar el 100% de incorporación tuvieron que transcurrir 72 h. Esteban y col. (1998) obtuvieron porcentaje de esterificación de AGPI n-3 del 68.5 al transcurrir 48 h y solamente se incrementó a 73.8% después de 96 h de reacción.

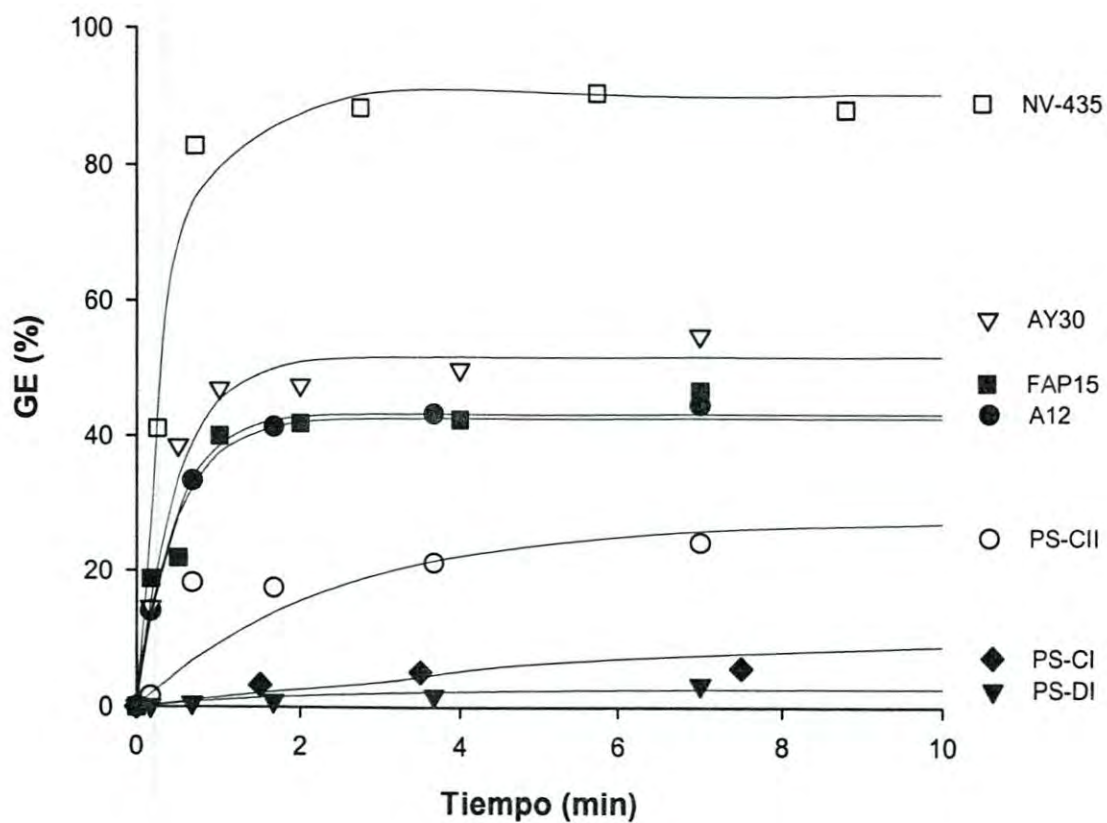


Figura 6. Grado de esterificación con diferentes lipasas comerciales. Relación molar, 0.16 mol AGL/mol glicerol; temperatura, 40°C; cantidad de enzima 5% (p/p reactantes); tiempo, 9 h.

La Tabla 7 muestra el nivel máximo de esterificación alcanzado por las distintas lipasas estudiadas, así como la actividad específica y la velocidad de reacción inicial de cada una de ellas. Los resultados muestran que la enzima de *Candida antarctica* (Novozym 435) es la que presentó un nivel mayor de esterificación y una actividad específica mayor que el resto de las enzimas.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Esteban y col. (1998) quienes encontraron que la enzima NV-435 presentó un nivel de esterificación y de formación de TAG mayor que las enzimas de *Pseudomonas* (PS) y de *Mucor miehei*. Por tal motivo, en el presente estudio se seleccionó la enzima NV-435 para estudiar la cinética de esterificación de los AGPI n-3 al glicerol para obtener las condiciones óptimas de formación de acilglicéridos, así como los parámetros cinéticos de la reacción.

Optimización de las Condiciones de Reacción

Se ha encontrado reportado en la literatura, que dependiendo de los productos deseados (acilglicéridos), las condiciones de operación para la esterificación deben variar. En el presente estudio, fueron establecidos los niveles de concentración de sustrato (relación molar), tiempo y temperatura, tanto para esterificación del AEP y ADH como para la formación de acilglicéridos (MAG, DAG y TAG) en la región experimental seleccionada.

Tabla 7. Resultados de la Esterificación del Concentrado de AGPI n-3 del Aceite de Sardina por Distintas Enzimas*.

Nombre Comercial de la Enzima	Velocidad Inicial k_0	Actividad U	GE (%)
<i>NV-435</i>	0.2343	67.26	90.82
<i>AY-30</i>	0.1095	63.33	55.0
<i>PS-CI</i>	0.0015	61.33	57.0
<i>FAP-15</i>	0.0908	61.70	46.9
<i>A-12</i>	0.0986	43.45	44.7
<i>PS-CII</i>	0.0115	12.40	24.2
<i>PSDI</i>	0.0006	2.07	3.3

*Relación molar, 0.16 mol AGL/mol glicerol; temperatura, 40°C; cantidad de enzima 5% (p/p reactantes); tiempo, 9 h.

U: Una unidad fue definida como los micromoles de ácidos grasos esterificados al glicerol por gramo de enzima en un minuto; k_0 , mmol glicéridos/(mol total*h); *GE*. grado de esterificación.

Grado de esterificación global

En esta investigación se logró experimentalmente un nivel de esterificación máximo de los AGL al glicerol del 93% bajo las condiciones de: proporción molar, 1.5 mol AGL/mol glicerol; tiempo de 8.75 h y 45°C de temperatura. Esteban y col. (1998) reportaron niveles de 92.4% de esterificación global alcanzadas después de transcurrir 24 h de reacción.

No se encontró un efecto significativo ($P < 0.05$) de las variables probadas ni de sus interacciones sobre el nivel de esterificación global, dentro de la región experimental. Sin embargo, se puede observar en la Figura 7 que la esterificación global es mayor cuando se tiene una proporción molar baja y un tiempo de reacción cercano al valor central. Esteban y col. (1998), encontraron que el nivel de esterificación global es alto (>90%) cuando se utilizan relaciones molares bajas de 0.06–1.0 mol AGL/mol glicerol.

En cuanto a la temperatura de reacción se observó que la esterificación disminuye ligeramente al utilizar altas temperaturas. Esteban y col. (1998), no encontraron un efecto de la temperatura sobre el grado de esterificación. Sin embargo, se ha sugerido el uso de bajas temperaturas en la esterificación de AGPI para prevenir la descomposición térmica y la polimerización durante la reacción (Kosugy y Azuma, 1994).

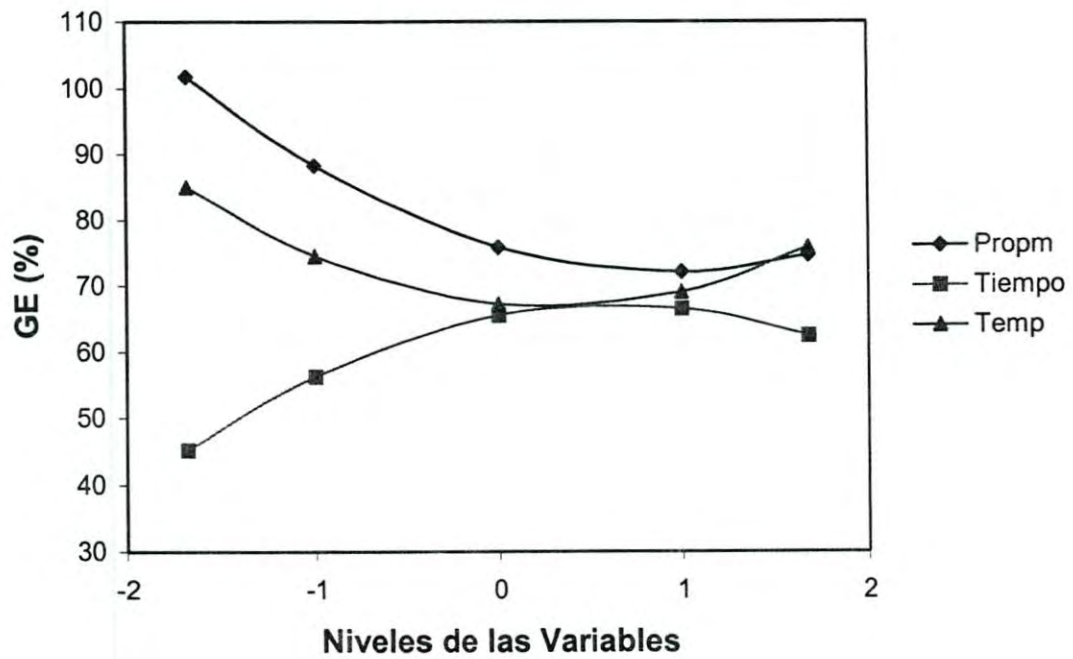


Figura 7. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura sobre el grado de esterificación global (GE).

Por lo tanto, para alcanzar altos niveles de esterificación con la enzima *C. antártica* (NV-435), es preferible utilizar proporciones molares entre 0.48-3.0 mol AGL/mol glicerol y bajas temperaturas, por tiempos de exposición mayores a 5 h. Estos resultados concuerdan con las investigaciones de varios autores quienes han utilizado la enzima de *C. antártica* (Haraldsson y col.,1995; Kosugy y Azuma, 1994; Esteban y col.,1998).

La ecuación de regresión para el grado de esterificación global esta dada por la expresión 28. Según el resultado del análisis estadístico, este modelo puede estimar los valores del grado de esterificación (*GE*) con una $P(F)=0.0022$, y una $R^2 = 0.9841$ lo cual sugiere un buen ajuste de los datos experimentales por el modelo ($P<0.05$).

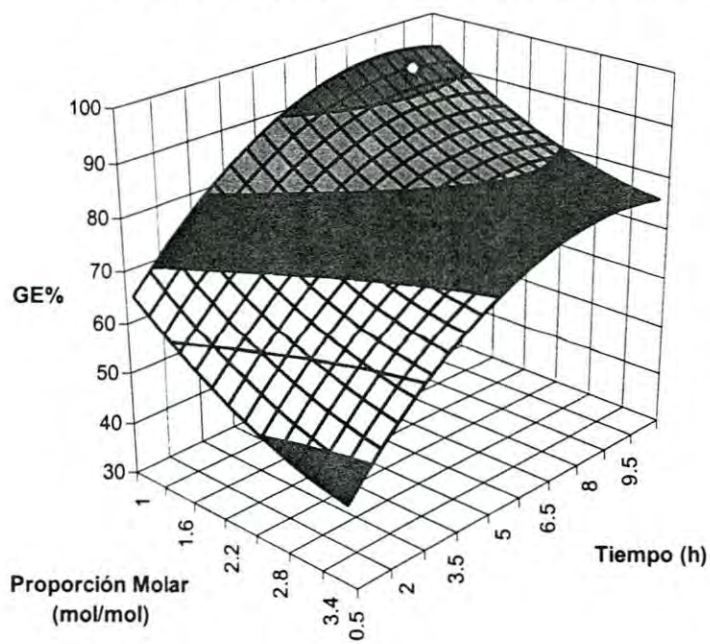
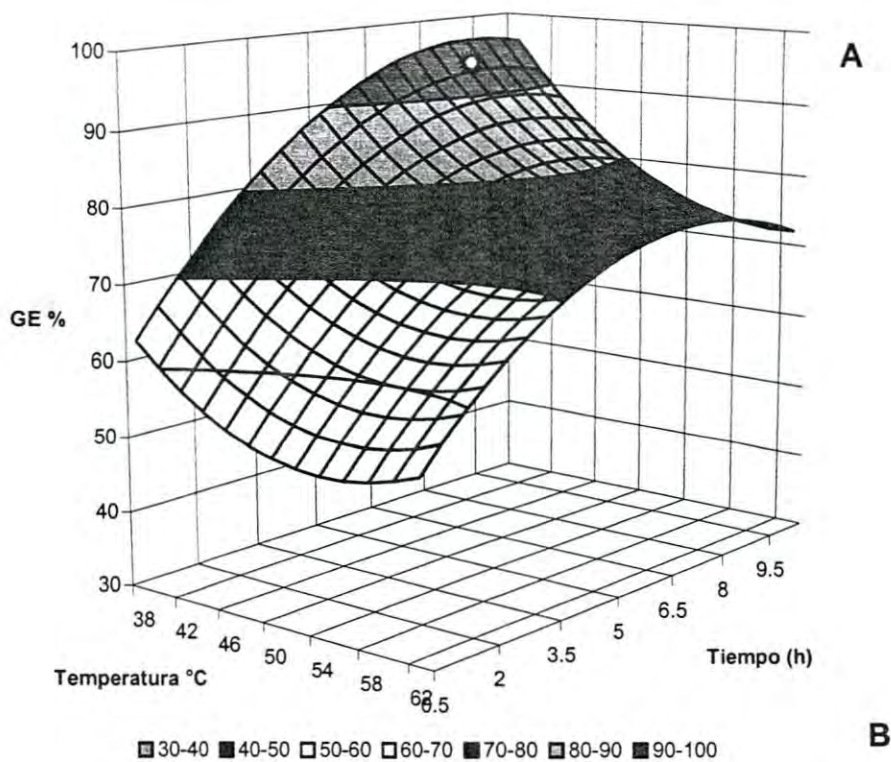
$$GE (\%) = 205.75 - 16.297 X_1 + 10.441 X_2 - 4.918 X_3 + 1.957 X_1^2 + 0.098 X_1 X_2 - 0.459 X_2^2 - 0.019 X_1 X_3 - 0.060 X_2 X_3 + 0.045 X_3^2 \quad (28)$$

Donde: X_1 = proporción molar, mol AGL/mol glicerol

X_2 = tiempo, h.

X_3 = temperatura, °C.

Utilizando esta expresión (28) se graficaron los datos de *GE* (Figura 8), donde se pueden distinguir la regiones mínima y máxima para el nivel de esterificación global.



☼ Condiciones óptimas: proporción molar, 1.32 mol/mol; tiempo, 8.32 h; temperatura 38°C.

Figura 8. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la esterificación global.

En la Figura 8A se grafica el *GE* para el intervalo de temperatura de 38 a 62°C y tiempos de 0.5 a 10.5 h, para una proporción molar de 2.0 mol AGL/mol glicerol. El valor estimado máximo (99.55%) se obtiene a una temperatura de 38°C a un tiempo de reacción de 8.32 h.

En la Figura 8B se grafica el *GE* para el intervalo de proporción molar de 1.0 a 3.6 mol AGL/mol glicerol y tiempos de 0.5 a 10.5 h, para una temperatura de 45°C. En esta Figura el valor estimado máximo (99.55%) se obtiene para una proporción molar de 1.3 mol AGL/mol glicerol y un tiempo de 8.32 h.

Grado de incorporación del AEP

De la misma manera que el *GE* global, se obtuvieron niveles de incorporación del AEP al glicerol altos en forma experimental, alcanzando porcentajes de 87.48 bajo las condiciones siguientes: proporción molar, 4.5 mol AGL/mol glicerol; tiempo, 8.75 h; y temperatura, 45°C. Haraldsson (1995) reportó 97% de incorporación del AEP en 24 h de reacción para una relación molar estequiométrica de 3.0 mol AEP/mol glicerol.

No se encontró un efecto significativo ($P < 0.05$) de las variables estudiadas sobre la incorporación de AEP al glicerol. Sin embargo, en la Figura 9 se puede observar que el nivel de incorporación del AEP es mayor al aumentar el tiempo de reacción, y es menor al aumentar la temperatura.

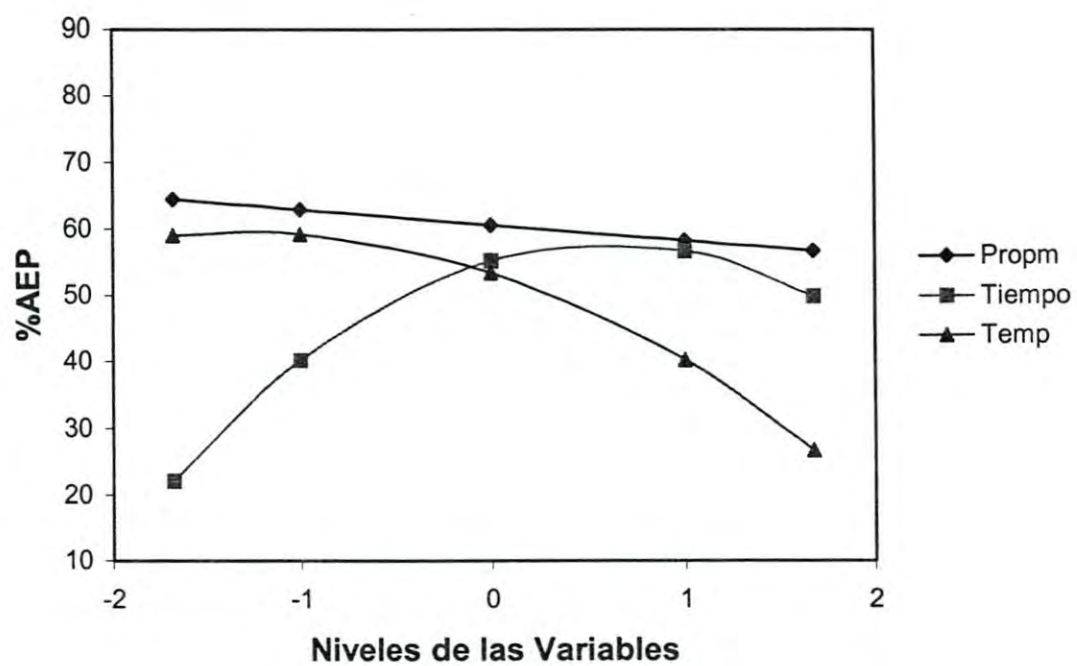


Figura 9. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre el porcentaje de incorporación del AEP.

El modelo que predice la incorporación de AEP (%) al glicerol está dado por la Ecuación 29.

$$AEP (\%) = - 50.540 + 3.796 X_1 + 14.010 X_2 + 3.091 X_3 + 0.009 X_1^2 - 0.561 X_1 X_2 - 0.756 X_2^2 - 0.007 X_1 X_3 + 0.008 X_2 X_3 - 0.036 X_3^2 \quad (29)$$

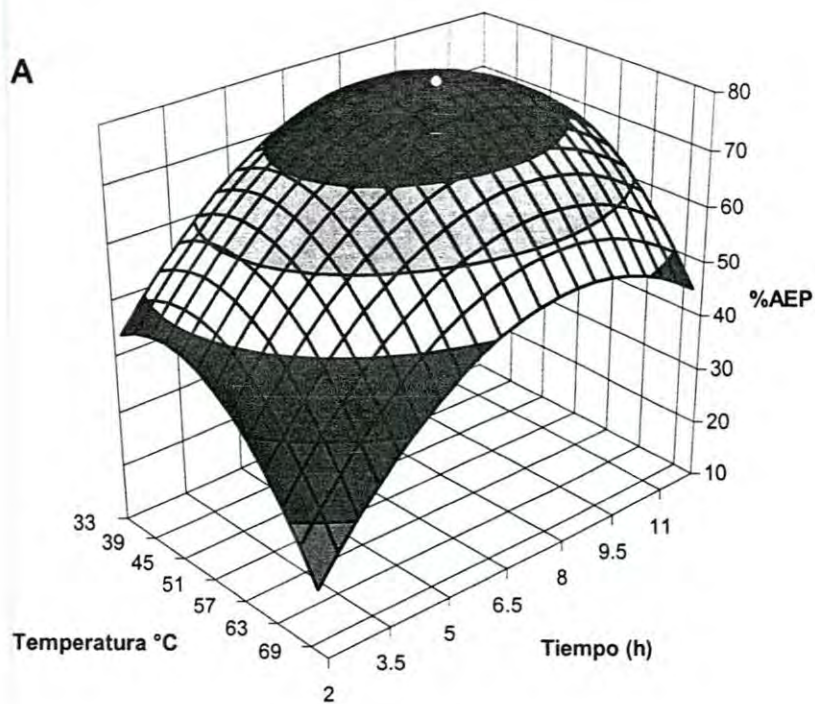
Donde: X_1 = proporción molar, mol AGL/mol glicerol

X_2 = tiempo, h.

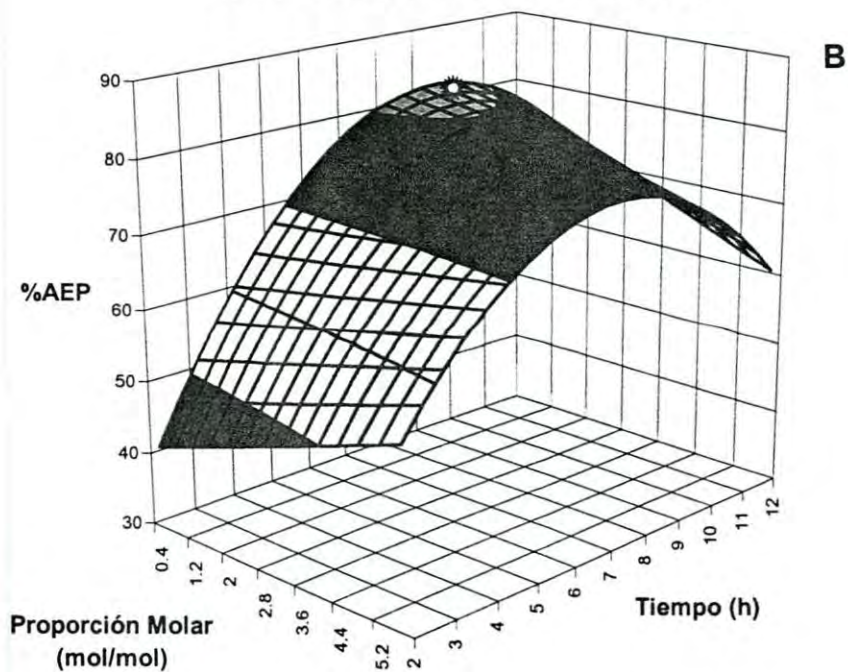
X_3 = temperatura, °C.

Con esta expresión, se graficaron los datos para el intervalo de temperatura de 33 a 69°C y tiempos de 2 a 12 h, para una proporción molar de 3.0 mol AGL/mol glicerol (Figura 10A). Se puede observar que el valor óptimo de incorporación del AEP (78.43%) corresponde a un tiempo de 8.5 h y una temperatura de 43°C.

En la Figura 10B se grafica el nivel de incorporación del AEP para un intervalo de proporción molar de 0.4 a 5.6 y tiempos de 2 a 12 h, para la temperatura de 43°C. Con estos valores se observa que el nivel de incorporación de AEP al glicerol máximo es de 82.09% y corresponde a una proporción molar de 1.20 mol AGL/mol glicerol y un tiempo de 9.35 h.



■ 30-40 ■ 40-50 □ 50-60 □ 60-70 ■ 70-80 ■ 80-90



☼ Condiciones óptimas: proporción molar, 1.2 mol/mol; tiempo, 9.5 h; temperatura 43°C.

Figura 10. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la esterificación enzimática del AEP.

Grado de incorporación del ADH.

El grado de incorporación del ADH presenta un patrón muy similar al del AEP. Experimentalmente el grado de incorporación del ADH al glicerol mayor fue de 89.15% y se obtuvo bajo las mismas condiciones que el AEP (proporción molar, 4.5 mol AGL/mol glicerol; tiempo, 8.75 h; temperatura, 45°C). Estos resultados concuerdan con los de Haraldsson y col. (1995) quienes encontraron un comportamiento similar para la incorporación de AEP y ADH al glicerol al utilizar la enzima de *Candida antarctica* alcanzando niveles del 97% en 24 h de reacción.

Según el análisis de varianza ninguna de las variables presentó efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el nivel de incorporación del ADH. Sin embargo, al observar la Figura 11 se aprecia que, al igual que el AEP, la incorporación de ADH aumenta si se incrementa el tiempo, pero disminuye al aumentar la temperatura.

Por lo tanto, para alcanzar altos niveles de esterificación del AEP y del ADH se recomienda utilizar bajas temperaturas por largos períodos de reacción. Esto concuerda con lo reportado por Li y Ward (1993a) quienes concluyeron que el grado de esterificación de los AGPI n-3 es óptimo a temperaturas bajas (30°C).

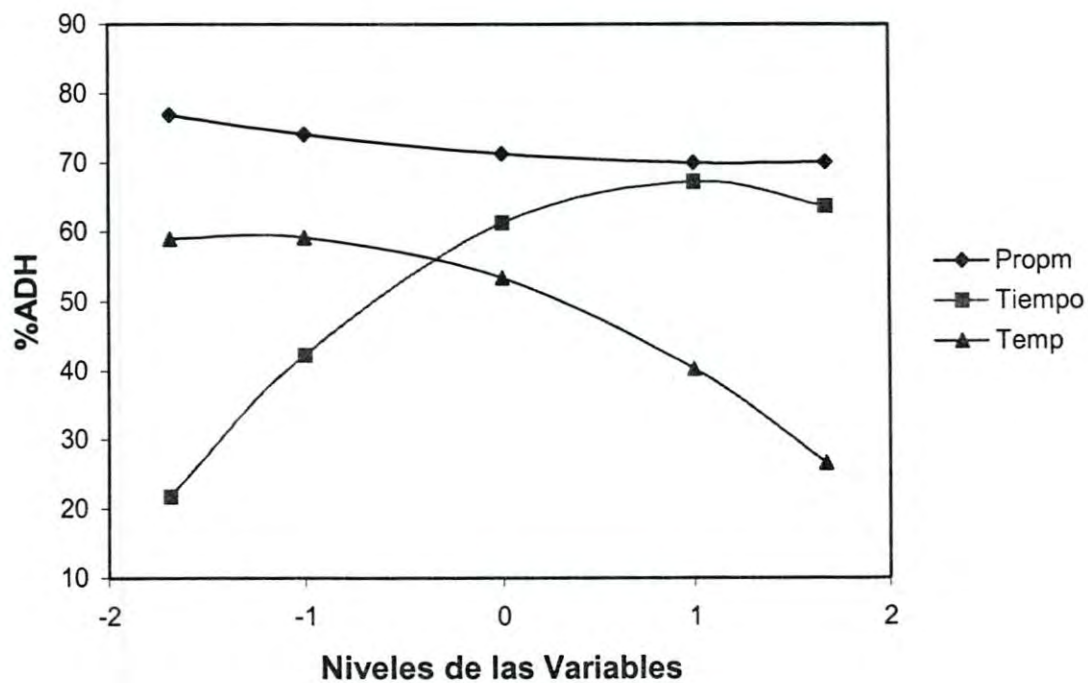


Figura 11. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre el porcentaje de incorporación del ADH.

El modelo que predice la incorporación del ADH (%) al glicerol esta dado por la Ecuación 30.

$$ADH (\%) = 41.473 - 8.664 X_1 + 12.919 X_2 + 0.283 X_3 + 0.348 X_1^2 - 0.020 X_1 X_2 - 0.727 X_2^2 + 0.118 X_1 X_3 - 0.004 X_2 X_3 - 0.012 X_3^2 \quad (30)$$

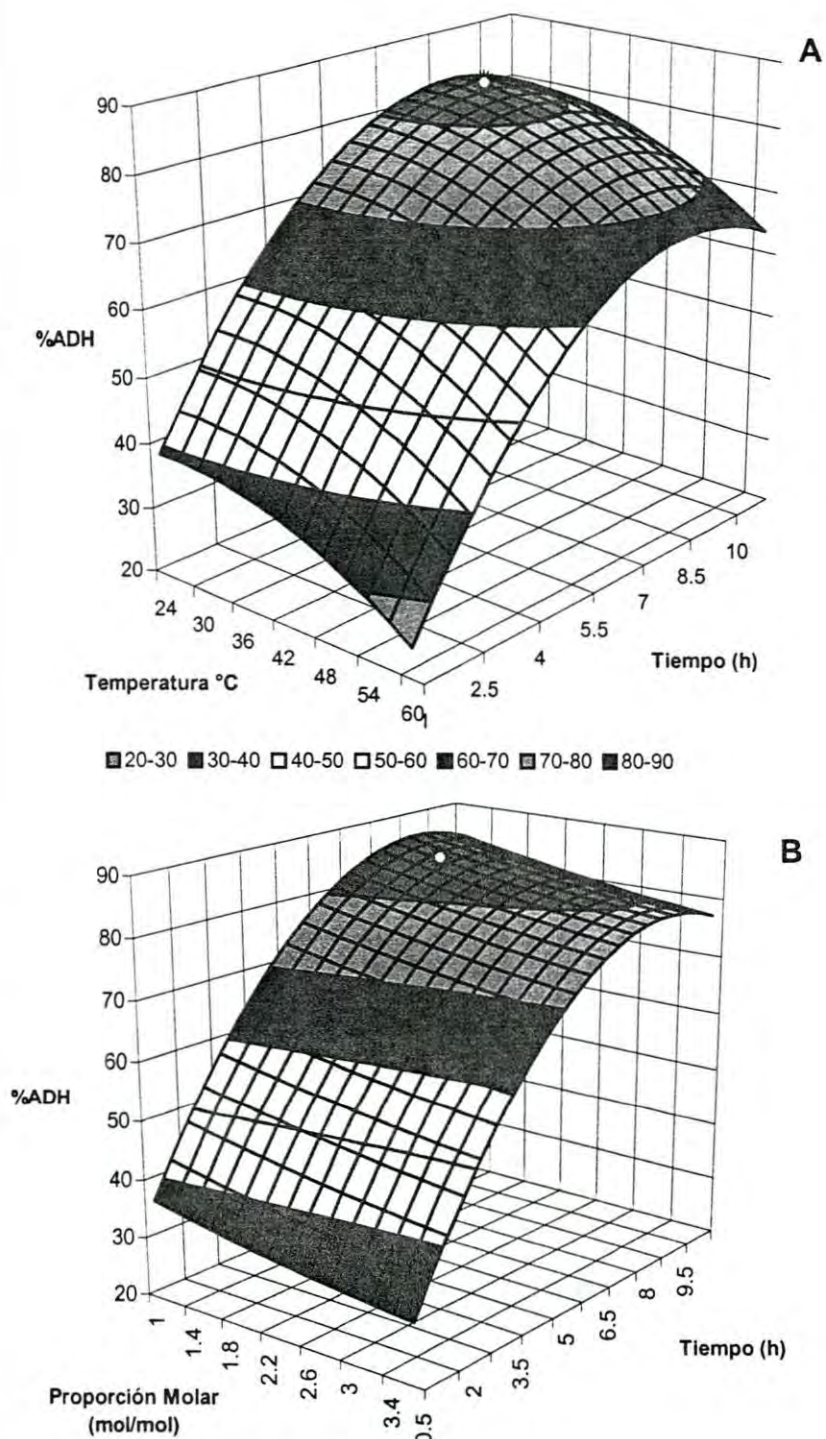
Donde: X_1 = proporción molar, mol AGL/mol glicerol

X_2 = tiempo, h.

X_3 = temperatura, °C.

Con esta expresión se graficaron los datos para el intervalo de temperatura de 24 a 60°C y tiempos de 1.0 a 11.0 h, (Figura 12A). El valor de incorporación del ADH máximo (80.54%), se encuentra a un tiempo de 8.7 h, una temperatura de 38°C y una proporción molar de 3.0 mol AGL/mol glicerol. Al graficar el intervalo de proporción molar de 1.0 a 3.6 y tiempo de 0.5 a 10.5 h (Figura 12B) se establece el valor de incorporación del AEP al glicerol máximo (88.41%) a una temperatura de 38°C, una proporción molar de 1.4 mol AGL/mol glicerol y un tiempo de 8.8 h.

La Tabla 8, resume las condiciones óptimas de proporción molar, tiempo y temperatura para obtener el nivel de esterificación global máximo y los niveles de incorporación del AEP y ADH máximos. Como puede observarse, estas condiciones de proporción molar, tiempo y temperatura para las distintas respuestas y los niveles de incorporación alcanzados son muy elevados.



☼ Condiciones óptimas: proporción molar, 1.4 mol/mol; tiempo, 8.8 h; temperatura 38°C.

Figura 12. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la esterificación enzimática del ADH.

Tabla 8. Condiciones Adecuadas para Obtener los Máximos Niveles de Esterificación de los Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina al Glicerol con lipasa NV-435.

Variable	GE (99.55%)	AEP (82.09%)	ADH (88.41%)
Proporción Molar (mol AGL/mol glicerol)	1.32	1.2	1.4
Tiempo (h)	8.32	9.5	8.8
Temperatura (°C)	38	43	38

GE, Grado de Esterificación; *AEP*, ácido eicosapentaenoico; *ADH*, ácido docosahexaenoico

Formación de triacilglicéridos

Aún cuando experimentalmente el grado de esterificación global fue alto, los niveles de TAG formados solamente alcanzaron el 39%. Esto podría deberse a que el tiempo requerido para obtener TAG debe ser mayor a 72 h (Haraldsson y col., 1995). Esteban y col. (1998) reportan que el rendimiento en la formación de TAG de 26.4% puede incrementarse a 59.4% al usar hexano como solvente, sin embargo, en este trabajo se observó que cuando las corridas experimentales fueron llevadas hasta las 24 h se registraron mayores niveles de formación de TAG (55%). Mc. Neill y col. (1996), obtuvieron una producción de TAG mayor al 90% después de 150 h de reacción.

En el análisis estadístico se encontró que tanto la proporción molar como la interacción tiempo*proporción molar presentaron un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la formación de TAG. Esteban y col. (1998) concluyeron que las variables más importantes en la formación TAG incluyen a la temperatura y a la relación molar. En la Figura 13, se puede observar que al aumentar la proporción molar, el tiempo y la temperatura, los niveles de TAG aumentan. Algunos autores (Esteban y col., 1998; Haraldsson 1995) sugieren que la relación estequiométrica (3.0 mol AGL/mol glicerol) es la condición óptima para la formación de TAG. Sin embargo, Robles y col. (1999) encontraron que aumentando hasta en un 50% la cantidad de glicerol, los rendimientos de la formación de TAG aumentan.

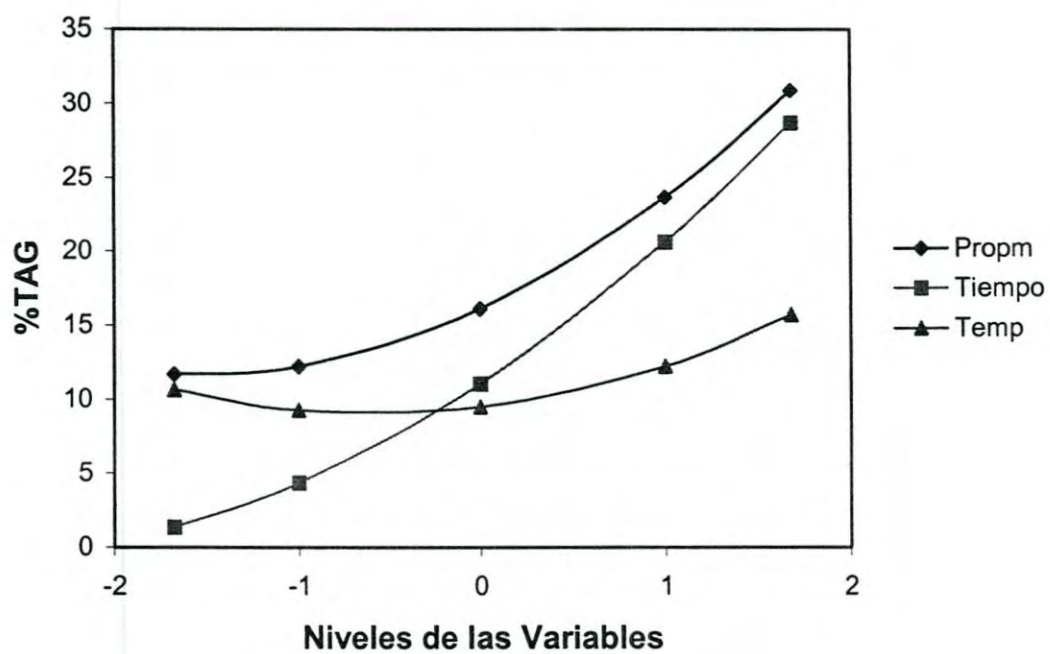


Figura 13. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre la formación de TAG.

Los parámetros estimados por el modelo de regresión se muestran en la Tabla 9. Según el resultado del análisis estadístico, este modelo puede estimar los valores con un $P(F)=0.0044$, y una $R^2=0.8954$ lo que sugiere un buen ajuste del modelo a los datos experimentales ($P<0.05$). Utilizando los valores estimados para los parámetros del modelo de regresión, se graficaron la superficie de respuesta para el %TAG producidos como se muestra en la Figura 14.

En la Figura 14A se graficó la formación de TAG para el intervalo de temperatura de 42 a 66°C y tiempos de 2 a 10 h y una proporción molar de 5.52 mol AGL/mol glicerol. En la Figura 14B se graficó la formación de TAG para el intervalo de tiempo 2 a 11 h, proporción molar de 1.2 a 4.8 y una temperatura de 72°C. En esta Figura se pueden distinguir las regiones de mínimo y máximo grado de formación de TAG. Según el modelo de regresión, se pueden obtener niveles de hasta 55% de TAG con una proporción molar de 5.52 y un tiempo de al menos 10.8 h a una temperatura de 58°C. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 72 °C, los niveles pueden aumentar hasta 68%. Selmi y col. (1998), sugieren que se puede obtener mayor formación de TAG a temperaturas alrededor de 80°C, debido a que se favorece la eliminación del agua formada por las altas temperaturas. No obstante, pueden ocurrir problemas de isomerización al intentar la esterificación de AGPI de más de 18 carbonos a estas temperaturas (Selmi y col., 1998).

Tabla 9. Parámetros Estimados por Regresión Polinomial para cada Producto Formado Durante la Esterificación

Término	GE%	TAG	DAG	MAG
Intercepción	205.753	64.878	-11.784	152.995
PROPM	-16.297	-16.465	-0.027	0.151
TIEMPO	10.441	-2.674	9.637	3.456
TEMP	-4.918	-1.564	0.589	-3.951
PROPM*PROPM	1.957	0.818	-0.309	1.445
TIEMPO*PROPM	0.098	0.934	-0.069	-0.773
TIEMPO*TIEMPO	-0.459	0.156	-0.462	-0.153
TEMP*PROPM	-0.019	0.153	-0.055	-0.114
TEMP*TIEMPO	-0.060	0.0142	-0.074	0.001
TEMP*TEMP	0.045	0.0127	-0.000	0.033
R ²	0.9841	0.8954	0.8972	0.7642

GE, Grado de Esterificación; AEP, ácido eicosapentaenoico; ADH, ácido docosahexaenoico; TAG, triacilglicéridos; DAG, diacilglicéridos; MAG, monoacilglicéridos; PROPM, proporción molar; TEMP; temperatura.

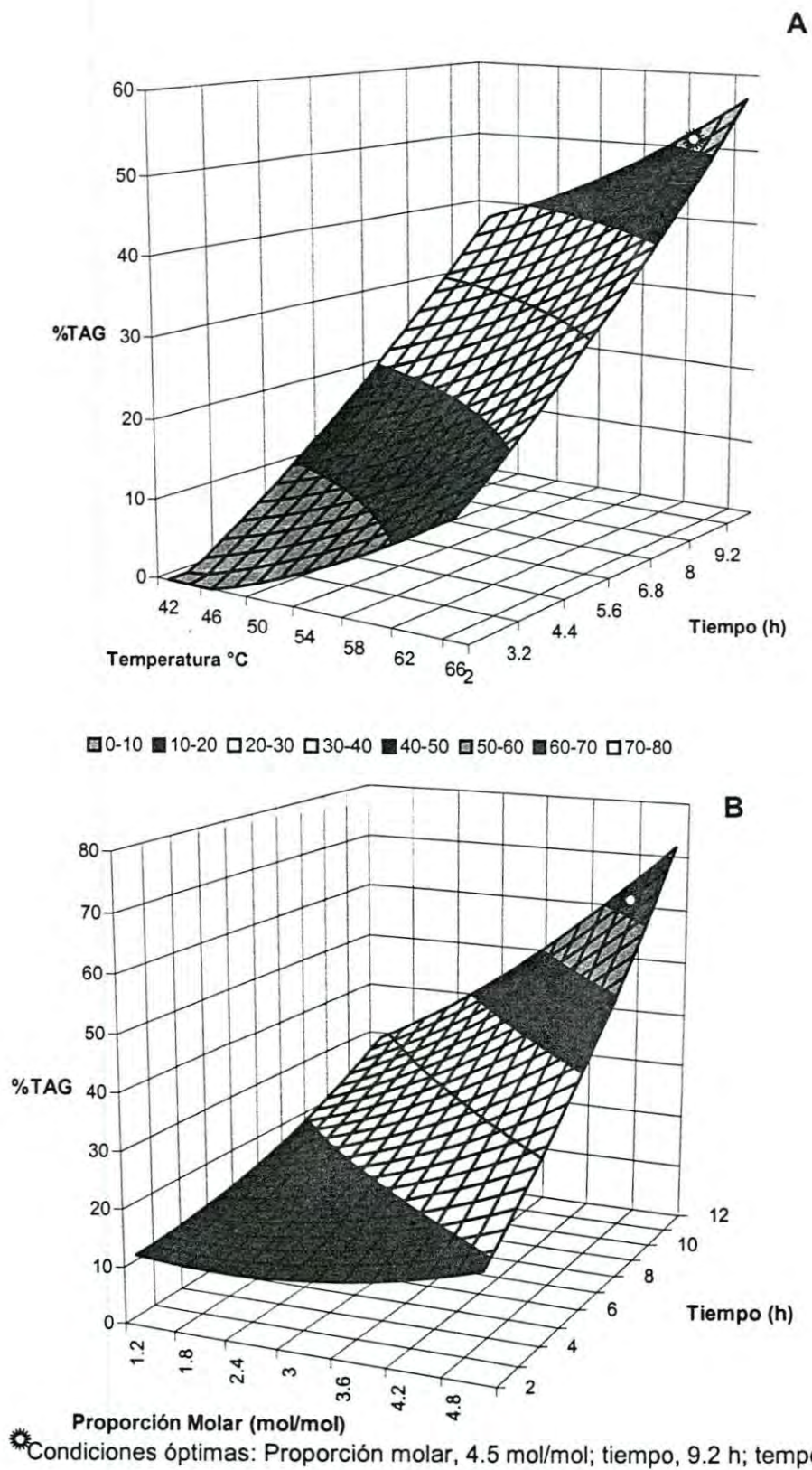


Figura 14. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la formación de TAG.

Formación de diacilglicéridos

En la presente investigación el nivel experimental máximo alcanzado para la formación de DAG fue de 35.25% a una proporción molar de 0.48 mol AGL/mol glicerol, un tiempo de 5.75 h y una temperatura de 55 °C. Según el análisis estadístico el tiempo tiene un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la formación de DAG.

En la Figura 15 se puede observar que para tiempos alrededor de los niveles centrales (según la región experimental utilizada) se puede obtener la formación máxima de DAG. De esta Figura también se puede decir que para proporción molares bajas se obtienen niveles altos de formación DAG y para altas proporciones molares la formación de DAG es baja. Los resultados de varias investigaciones (Haraldsson, 1995; Kosuki y Azuma, 1994) muestran que en las primeras horas de reacción los niveles de DAG son altos (30-35%).

Los parámetros estimados por el modelo de regresión se muestran en la Tabla 9. Según el resultado en el análisis de varianza, se obtiene una relación $P(F) = 0.0042$, y una $R^2 = 0.8972$, lo cual sugiere un buen ajuste del modelo a los datos experimentales ($P < 0.05$). Utilizando los parámetros estimados por el modelo de regresión se graficó la superficie de respuesta para el %DAG (Figura 16), con la cual se puede distinguir la región del máximo grado de formación de DAG.

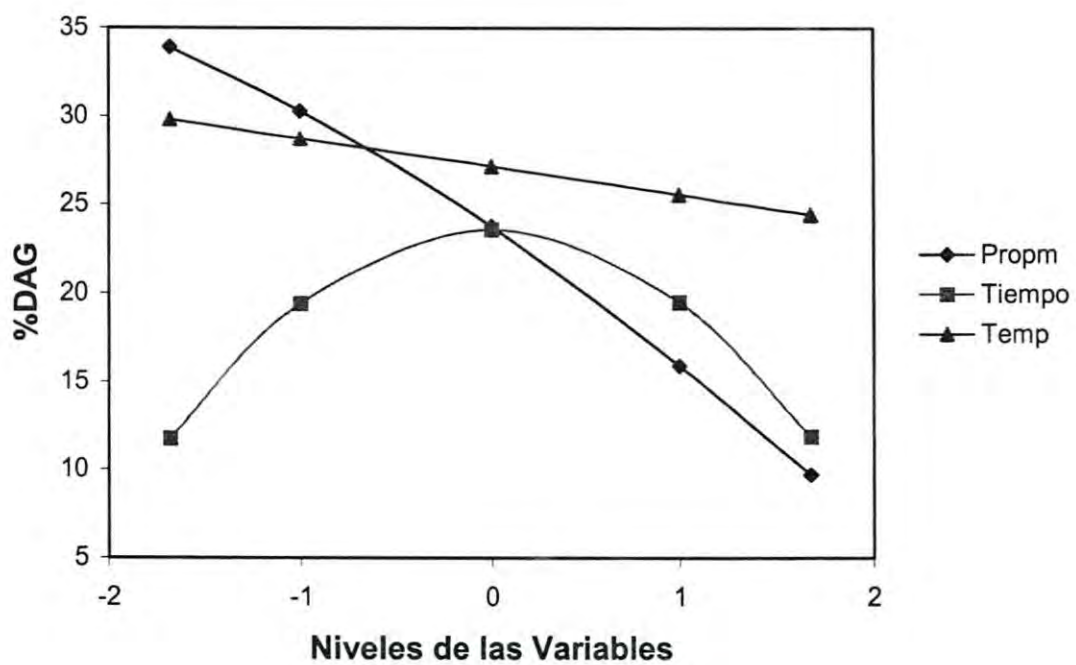
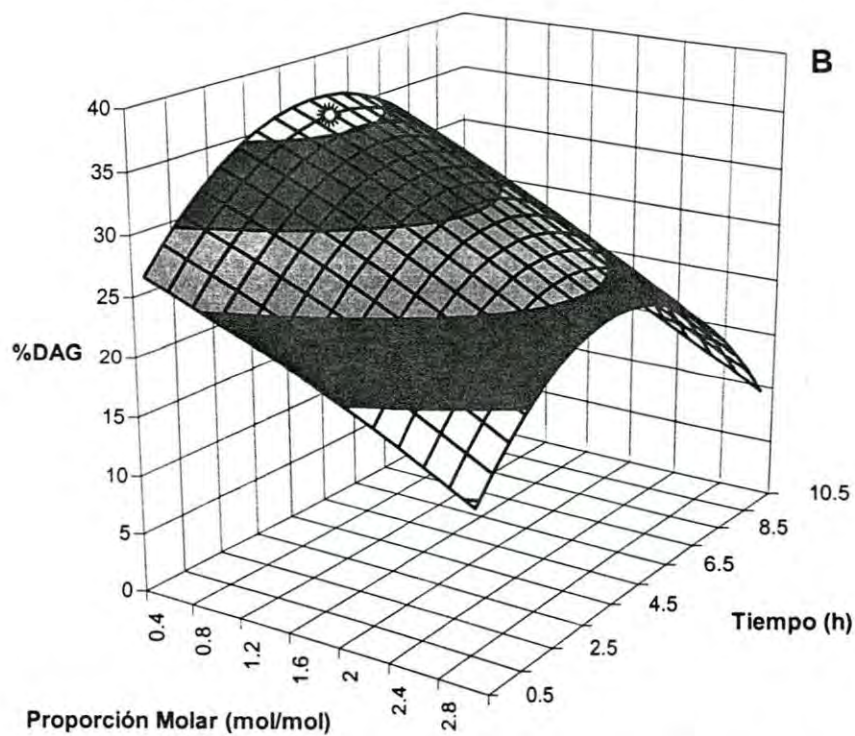
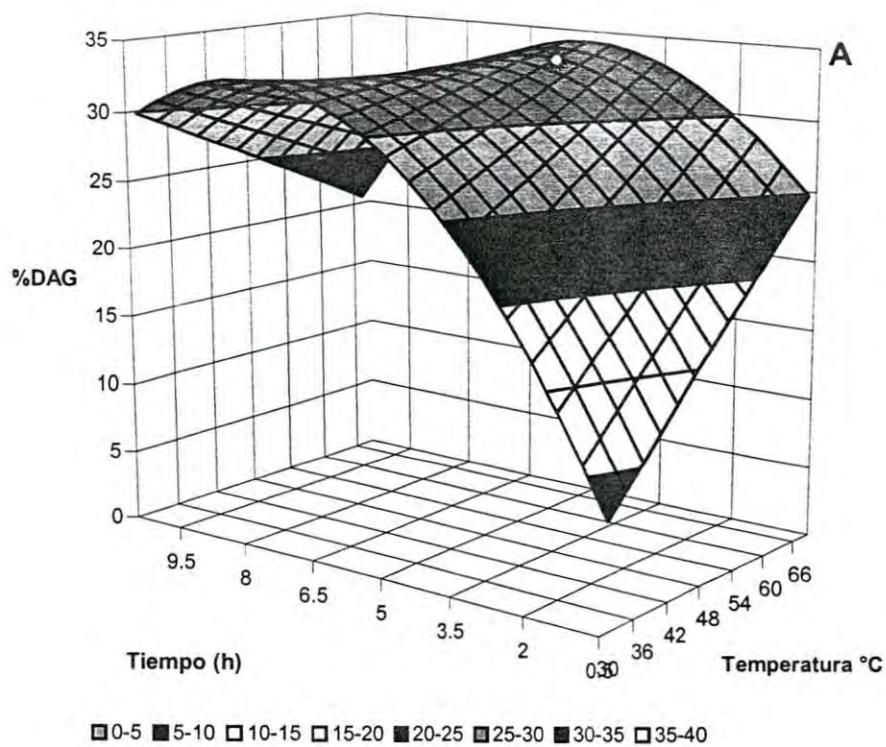


Figura 15. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre la formación de DAG.



☼ Condiciones óptimas: Proporción molar, 0.48 mol/mol; tiempo, 5.5 h; temperatura 55°C.

Figura 16. Superficie de respuesta para el efecto de la temperatura (A) y la proporción molar (B) sobre la formación de DAG.

Los máximos niveles de formación de DAG estimados son del orden de 35% para temperaturas de 55-65°C; proporciones molares de 0.4-0.8; y tiempos de 5.5 h. Obviamente, si se desea una alta formación de DAG con la mínima cantidad de recursos se utilizarían las condiciones que impliquen menor costo y energía, por lo que, podrían escogerse las condiciones de temperatura de 55 °C, proporción molar de 0.6 y tiempo de 5 h. Con un exceso de glicerol, el equilibrio se desplaza hacia la esterificación incrementando el *GE* pero disminuyendo la formación de TAG debido a que se favorece la formación de MAG y DAG (Esteban y col., 1998).

Formación de monoacilglicéridos

El máximo nivel experimental de formación de MAG obtenido en esta investigación fue de 58.19% para una proporción molar de 4.5 mol AGL/mol glicerol, un tiempo de 2.75 h y una temperatura de 45°C. Sin embargo, se pudo observar que la formación de MAG es rápida al inicio de la reacción y a medida que transcurre el tiempo de la reacción la composición va disminuyendo debido a la formación de DAG y TAG.

No se encontró un efecto significativo ($P < 0.05$) de ninguna de las variables ni sus interacciones sobre la formación de MAG. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 17, para tiempos de reacción cortos y temperaturas bajas se obtendrá la mayor formación de MAG.

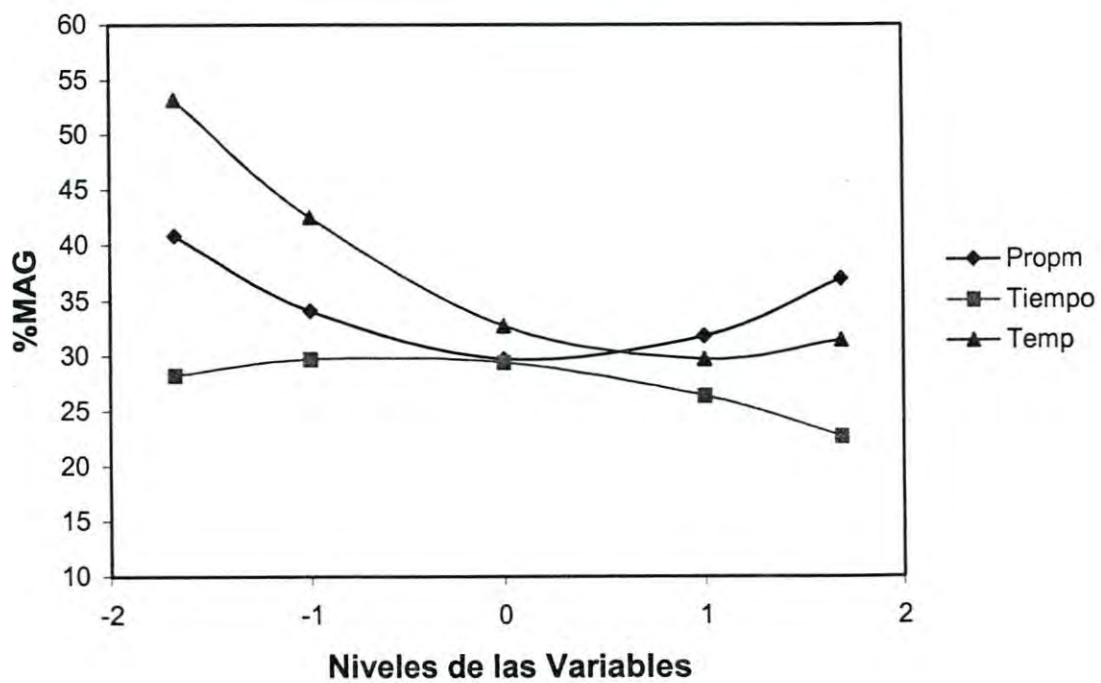
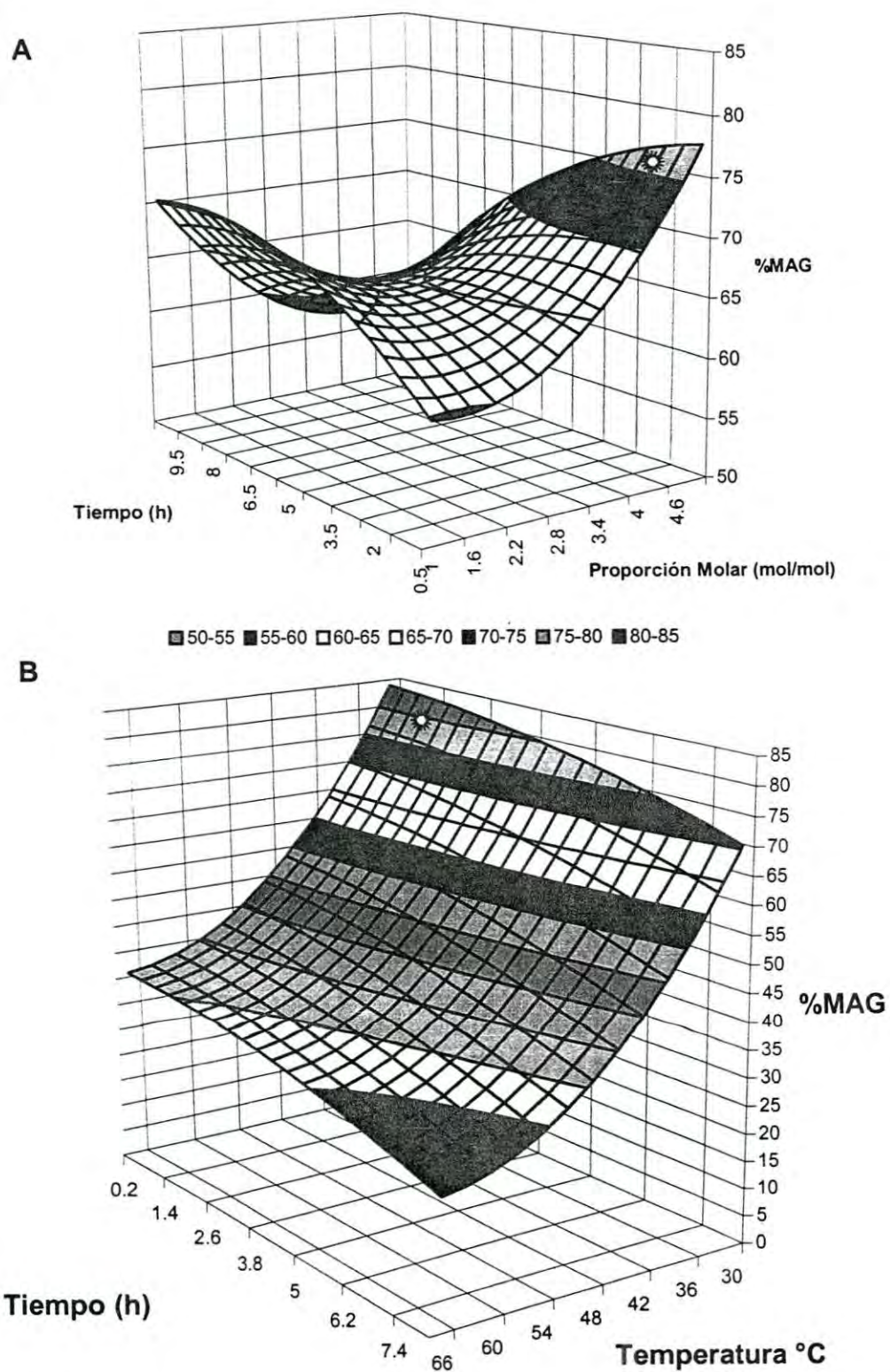


Figura 17. Efecto de las variables: proporción molar, tiempo y temperatura, sobre la formación de MAG.

En cuanto a la proporción molar se observa que pueden utilizarse tanto valores bajos o elevados de esta variable, pero no cercanos al valor central (dentro de la región experimental) que es donde se obtiene los mínimos valores de formación de MAG. Li y Ward (1993b) reportan que los niveles altos de formación de MAG y DAG son atribuidos a la especificidad posicional de la enzima que utilizaron (*Pseudomonas sp.* y *Mucor miehei*). Esto implica que los niveles de formación de MAG y DAG no solamente puede ser influenciada por las variables estudiadas en este trabajo, sino también por la especificidad que la enzima posea.

En la Figura 18A se muestran los niveles de MAG para un intervalo de proporción molar de 1.0-4.9 y los tiempos de 0.5-9.5 h. Como se observa en esta Figura, si se utilizan bajas proporciones molares (<2.0 mol AGL/mol glicerol) se requerirán de mayores tiempos de reacción (>5 h) para alcanzar niveles de 65-70% de MAG. Mientras que utilizando proporciones molares altas (>4.0 mol AGL/mol glicerol) y tiempos de reacción muy bajos (<2.0 h) se obtiene mayor formación de MAG (75-80%).

En la Figura 18B, se muestra la formación de MAG para un intervalo de temperatura de 30-66 °C, y tiempos de 0.2-8.2 h para una proporción molar alta de 5.0 mol AGL/mol glicerol. Puede observarse que a bajas temperaturas los niveles de formación de MAG son más elevados (80-85%), que cuando se utilizan altas proporciones molares y cortos tiempos de reacción.



⚙️ Condiciones óptimas: proporción molar, 4.2 mol/mol; tiempo, 2 h; temperatura 30°C.

Figura 18. Superficie de respuesta para el efecto de la proporción molar (A) y la temperatura (B) sobre la formación de MAG.

Condiciones óptimas de reacción

La importancia de estudiar la cinética de reacción radica en que se pueden determinar las condiciones que favorecen la formación de uno o varios de los productos. La Tabla 10 resume las condiciones más adecuadas para la formación de los distintos productos en la esterificación enzimática de los AGPI n-3 al glicerol con la enzima NV-435. Se puede notar que para cada una las condiciones establecidas el nivel de esterificación global es alto, esto asegura que el producto obtenido estará conformado, en la mayoría de los casos, por el tipo de glicéridos deseado a las condiciones establecidas. Además, debido a que se parte de un concentrado de AGPI n-3, el producto obtenido estará formado en su mayoría por AGPI n-3.

Cinética de Esterificación Enzimática

Para realizar el estudio cinético, las reacciones de esterificación fueron monitoreadas en los intervalos de tiempo establecidos desde 0 hasta las 24 h. Se determinó el valor de la velocidad de esterificación global (k_0) y la constante de desactivación de la lipasa (k_d) a partir de los datos experimentales y el modelo de primer-orden dependiente del tiempo (Dicks y Lee, 1999), usando el programa SIGMA-PLOT™ 2000.

Tabla 10. Condiciones Adecuadas para la Formación de MAG, DAG Y TAG en la Esterificación Enzimática de los Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina con Lipasa NV-435.

Variable	MAG (80-85%)	DAG (35%)	TAG (>68%)
Proporción Molar (mol AGL/mol glicerol)	>4.2	0.4-1.0	3.0-5.0
Tiempo (h)	<2.0	5.0-7.0	>12
Temperatura (°C)	30-40	50-60	60-70
GE %	60-70	85-95	60-65

La Figura 19 muestra que este modelo puede describir adecuadamente el curso de la producción de glicéridos. La línea continua representa el ajuste del modelo (Ecuación 27) a los puntos experimentales (4 repeticiones). En la Figura 6, también se muestran las cinéticas de esterificación global para las 7 enzimas evaluadas en este trabajo. En estas curvas se pueden distinguir dos regiones, la inicial y la región asintótica. En la región inicial la esterificación es rápida y la cantidad esterificada es proporcional al tiempo, esta ocurre en las primeras dos horas de reacción. En cuanto a la región asintótica, se conoce que la fase de formación de triacilglicéridos es muy lenta por lo que en esta etapa la velocidad de esterificación disminuye.

El mecanismo por el cual ocurre la inhibición de la velocidad de esterificación ha sido propuesto por varios autores (Lortie y col. 1993; Haraldsson y col., 1995), quienes afirman que esta desaceleración se debe principalmente a un paso intermedio de la isomerización de la posición del *sn*-1 monoacilglicérido a la posición *sn*-2. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre la esterificación y la concentración de sustrato fue de más de 6 h de reacción. Se han reportado tiempos de equilibrio mayor a 24 h (Haraldsson, 1989; Lortie y col., 1993). Por lo tanto la velocidad de la reacción de esterificación puede ser afectada tanto por la disponibilidad de sustrato para reaccionar con el glicerol, como con la presencia de productos en el medio de reacción.

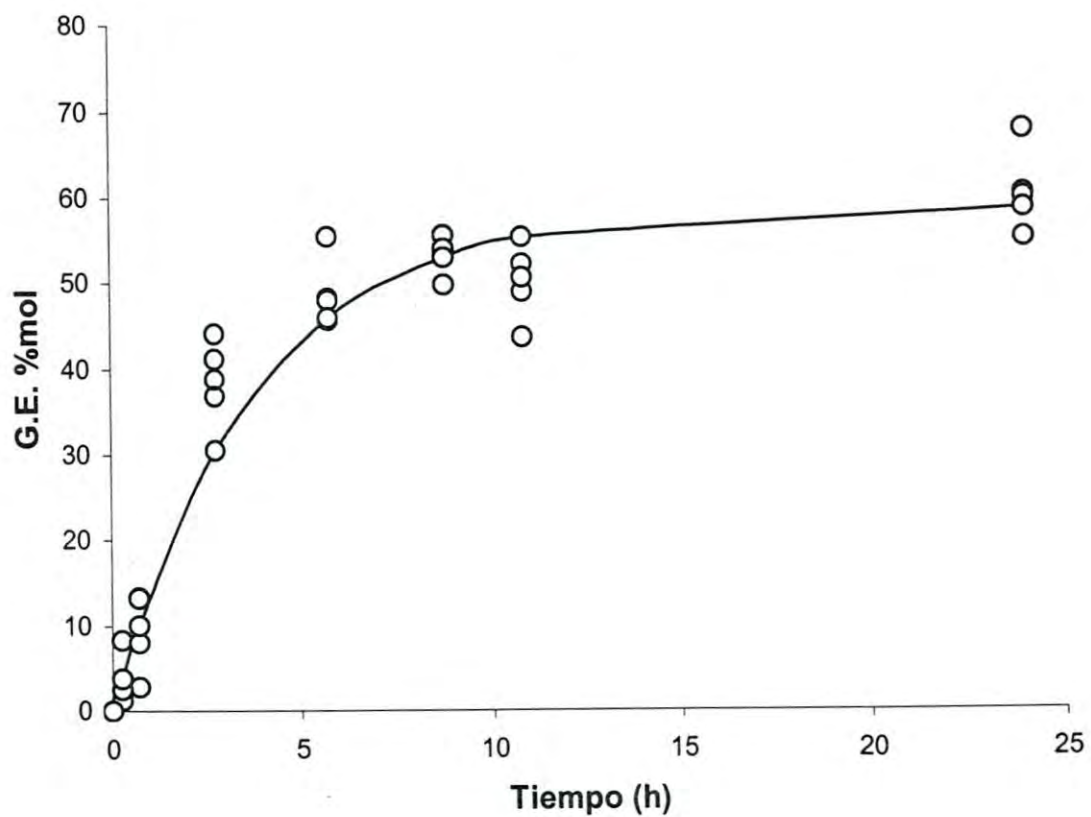


Figura 19. Cinética de la esterificación enzimática de los concentrados de AGPI n-3 al glicerol por la enzima NV-435. Relación molar, 3.0 mol AGL/mol glicerol; temperatura 55°C; enzima 5% (p/p reactantes).

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación

La Figura 20 muestra las cinéticas de esterificación global de los concentrados de AGPI n-3 al glicerol para las distintas concentraciones de sustrato inicial estudiadas. Puede observarse como el modelo de primer-orden (lineas) ajusta satisfactoriamente los datos experimentales (símbolos).

Con este modelo (Ecuación 27) se obtuvieron los parámetros de velocidad inicial (k_0) y la constante de disociación (k_d) para la reacción de esterificación global. Puede observarse como la velocidad de esterificación inicial (k_0) aumenta conforme aumenta la concentración de sustrato (expresada como moles de glicerol/mol AGL).

En la Figura 21 se graficaron los valores de la velocidad inicial de las reacciones respecto a la concentración de sustrato. La Figura 21A se muestra como al aumentar la relación glicerol/AGL la velocidad de esterificación inicial aumenta hasta alcanzar la saturación como afirma el modelo de Michaelis-Menten (Ecuación 9). La constante de Michaelis-Menten K_m y la velocidad máxima (V_{max}) fueron determinadas para la enzima de estudio considerando a la relación glicerol/AGL como la concentración de sustrato (Tabla 11).

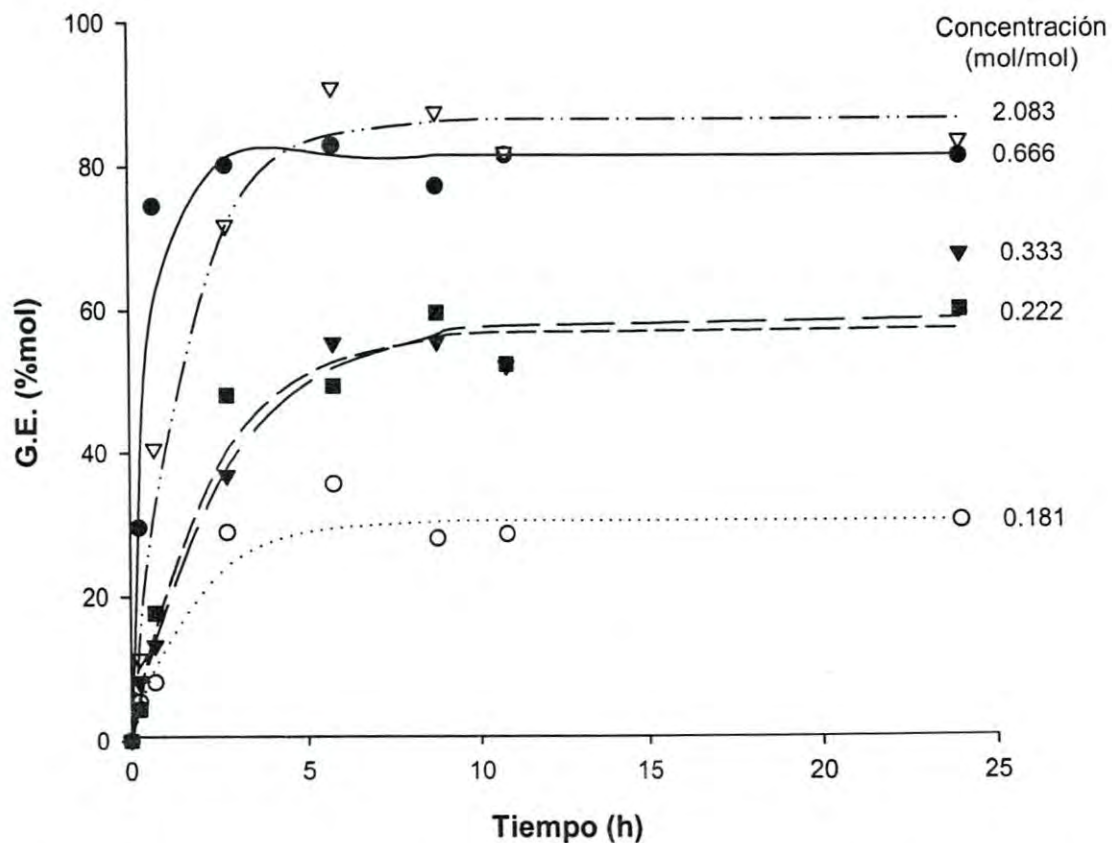


Figura 20. Cinéticas de la esterificación enzimática de los concentrados de AGPI n-3 al glicerol por la enzima *NV-435* para distintas concentraciones de sustrato. Temperatura 55°C; enzima 5% (p/p reactantes).

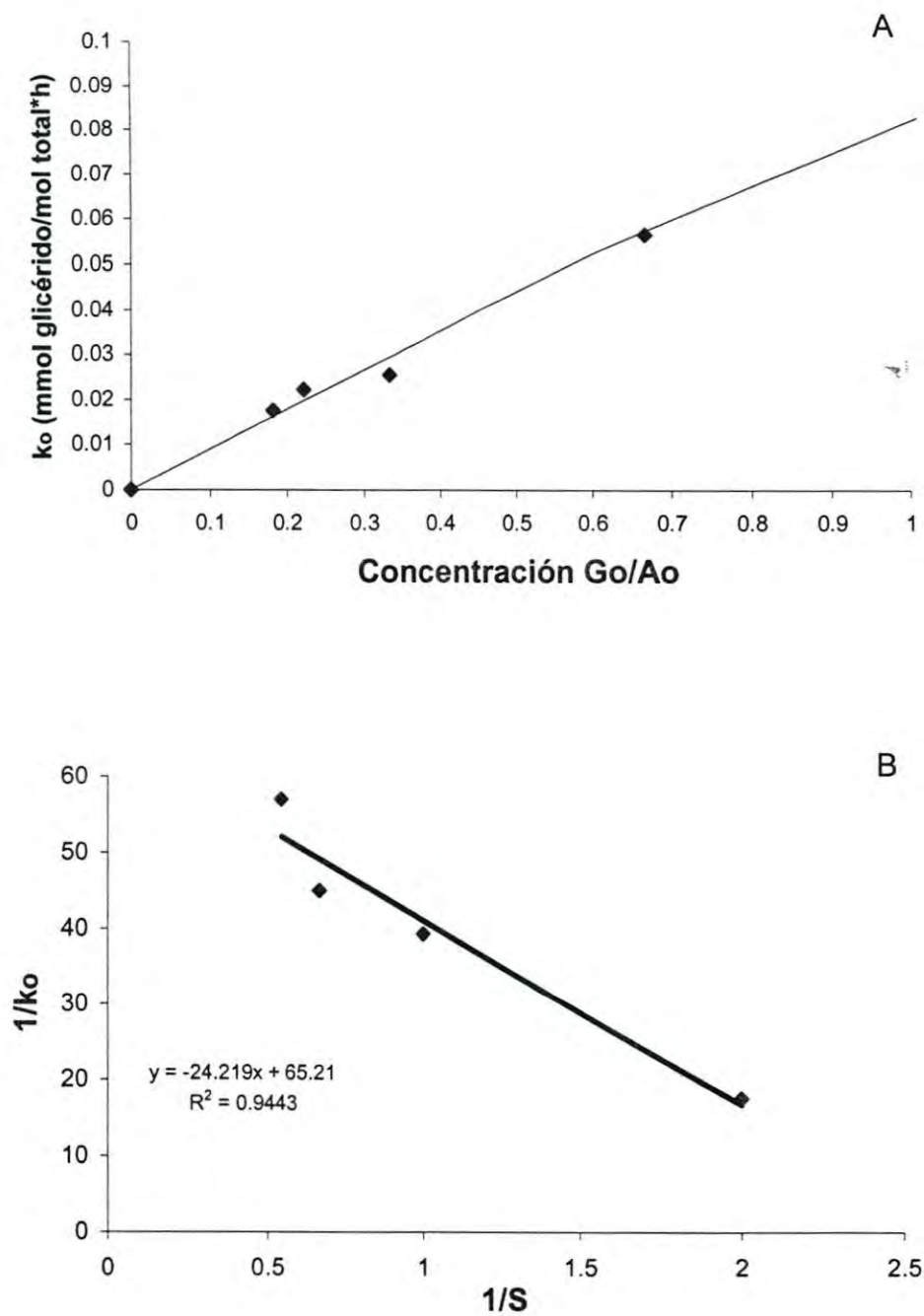


Figura 21. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación de los AGPI n-3 al glicerol. A. Michaelis Menten; B. Lineweaver-Burk.

Tabla 11. Parámetros Cinéticos para la Esterificación de Concentrados de AGPI n-3 del Aceite de Sardina al Glicerol por la Enzima NV-435.

Grado de Esterificación	V_{max}	K_m	E_a
Global	0.0153	0.3714	25.91
AEP	0.0350	0.0724	-
ADH	0.0717	0.1177	-

V_{max} = velocidad de esterificación máxima, mmol/(mol total*h); K_m = constante de Michaelis-Menten (mol glicerol/mol AGL); E_a = energía de activación; KJ/mol.

Los parámetros cinéticos (Tabla 11) fueron estimados por regresión no-lineal por ajuste del modelo de Michaelis-Menten (Ecuación 9) a los datos experimentales en una gráfica tipo Lineweaver-Burk (Figura 21B) usando el programa SIGMAPLOT™ 2000. El coeficiente de regresión para el ajuste fue de $R^2 = 0.944$, lo cual sugiere un buen ajuste a los datos experimentales. La línea continua muestra el ajuste del modelo a los datos estimados de k_0 en el intervalo de las concentraciones estudiadas. A la fecha no existen estudios cinéticos extensivos de la esterificación enzimática de los AGPI al glicerol (Stamatis y col. 1993). Por tal motivo, no fue posible comparar los valores de los parámetros encontrados en este trabajo con la literatura.

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación del AEP y ADH.

La Figura 22 muestra las cinéticas de esterificación del AEP y ADH por la enzima NV-435. Puede observarse que el modelo de Dicks y Lee (1999) describe adecuadamente la esterificación del AEP y ADH, en función del tiempo. Se puede establecer que el tiempo de equilibrio ocurre después de transcurrir 5 h de reacción. Sin embargo en algunos casos 2 h fue suficiente para alcanzar el equilibrio. El grado de esterificación del AEP y del ADH son muy similares, sin embargo, existe diferencia en la velocidad con la que estos ácidos son incorporados al glicerol.

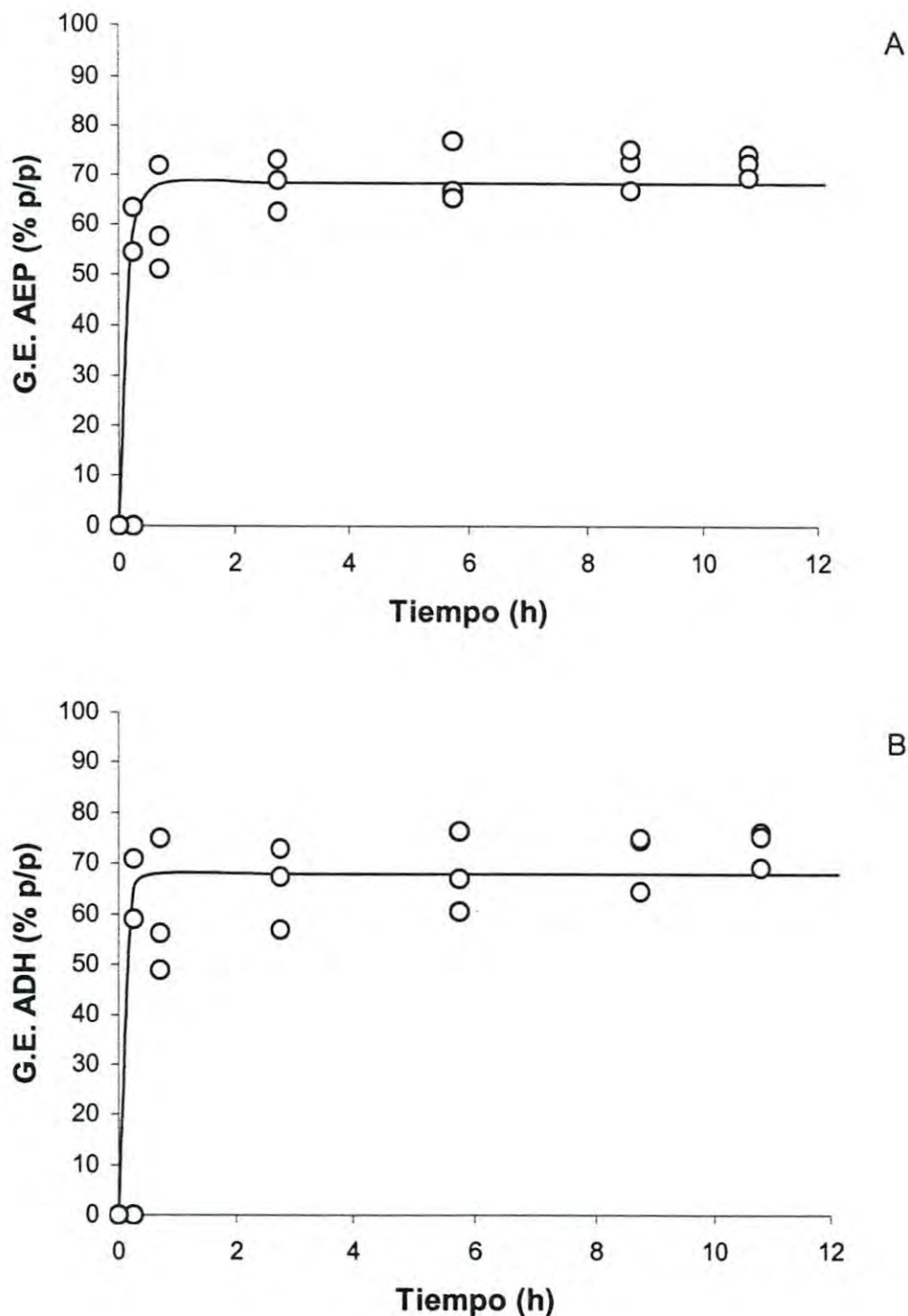


Figura 22. Cinética de la esterificación enzimática del ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH) al glicerol por la enzima NV-435. Relación molar, 3.0 mol AGL/mol glicerol; temperatura, 55°C; enzima, 5% (p/p reactantes).

La Figura 23 muestra el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de incorporación del AEP y del ADH al glicerol. De la misma manera puede observarse como el modelo (línea continua) es útil para predecir los valores de K_m y V_{max} en el intervalo de concentración estudiada. Los valores de los parámetros V_{max} y K_m estimados por el modelo se encuentran en la Tabla 11.

Puede observarse un valor de V_{max} mayor para la esterificación del ADH. Según Haraldsson y col. (1993) la enzima NV-435 exhibe diferente velocidad para la esterificación de ADH al glicerol que el AEP, sin embargo sus valores no fueron calculados. En cuanto al valor de K_m puede observarse que este valor es menor para la esterificación de ADH, lo cual implica mayor selectividad hacia este ácido que para el AEP.

Efecto de la temperatura

En la Figura 24, se observa la magnitud de la velocidad inicial de esterificación en función de la temperatura. Puede observarse un aumento en la velocidad de esterificación al aumentar la temperatura, esto implica que para el rango de temperaturas utilizadas en este trabajo, la enzima no sufre daños en su estructura tridimensional (Malcata y col., 1992). Sin embargo, se deben evaluar los posibles problemas de isomerización que ocurren al usar altas temperaturas en la esterificación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Selmi y col., 1998).

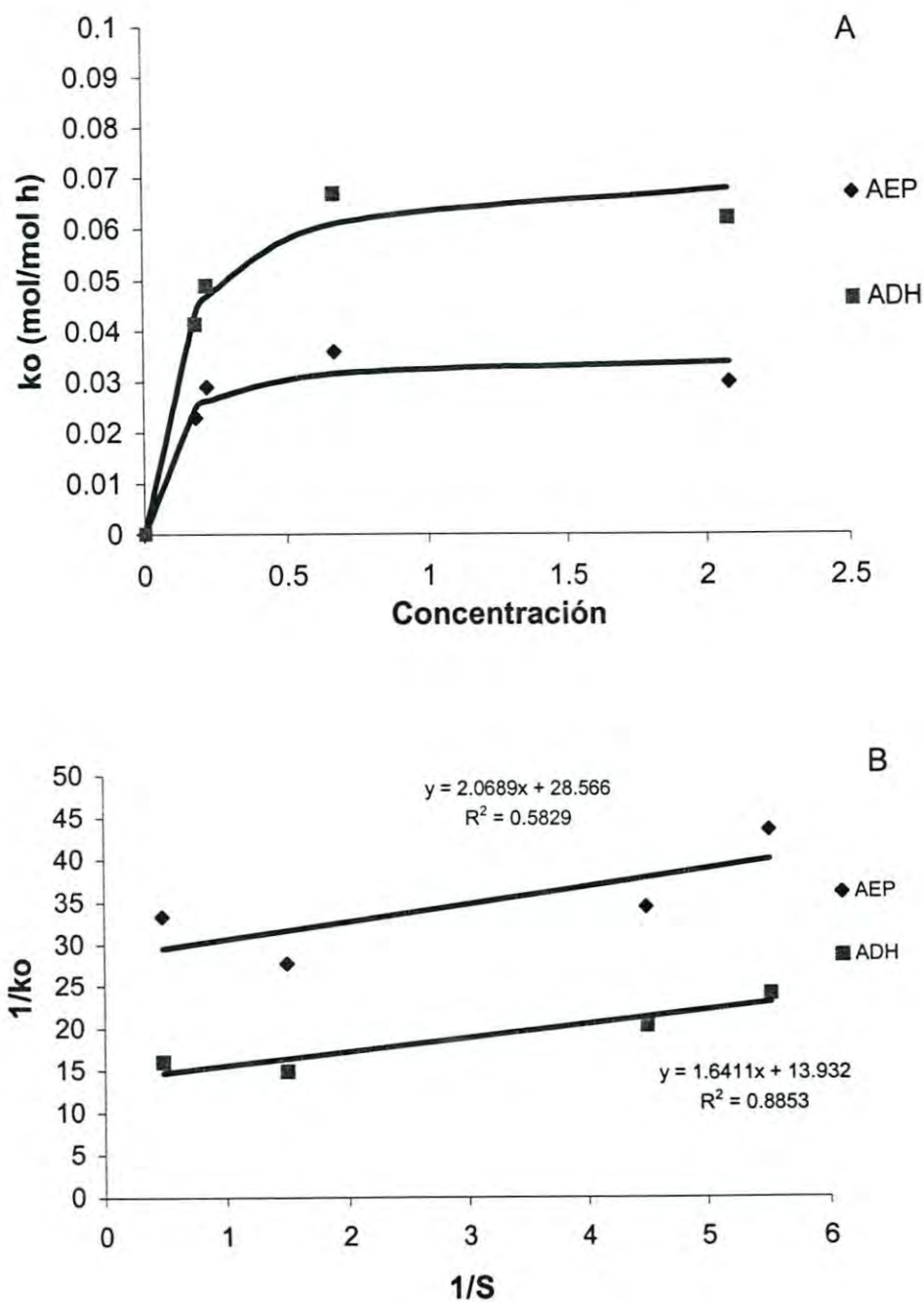


Figura 23. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de esterificación del ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexenoico (ADH). A, tipo Michaelis-Menten; B, tipo Lineweaver-Burk.

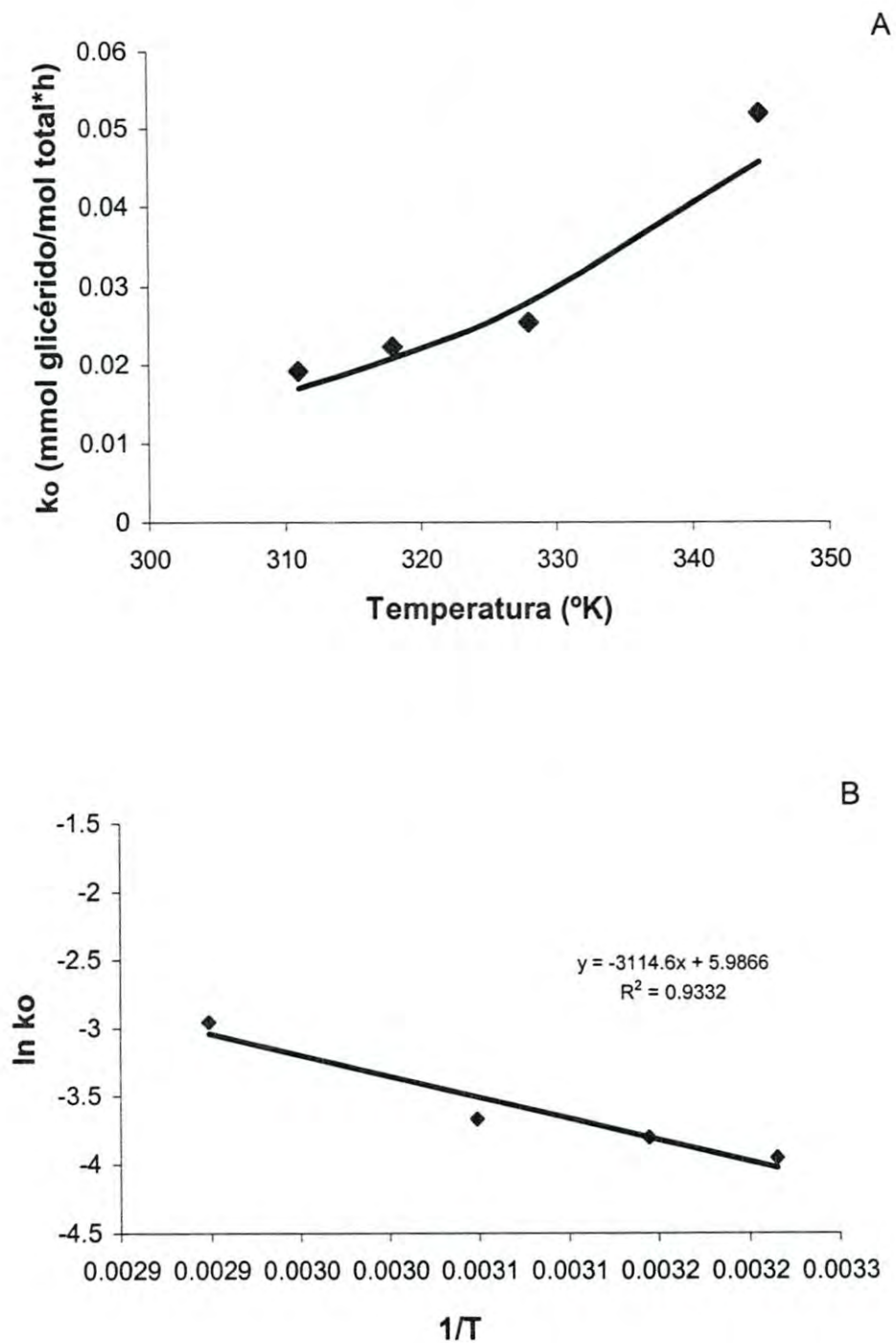


Figura 24. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de esterificación global.

Energía de activación. Los resultados indican que la velocidad de esterificación de la lipasa NV-435 sigue una proyección exponencial para el intervalo de temperaturas estudiado (Figura 24A). La energía de activación para la reacción de esterificación global (25.91 kJ/mol) fue estimada por la ecuación de Arrhenius (Ecuación 23) y calculada por medio de regresión lineal simple al graficar el logaritmo de k_0 (constante de la velocidad) contra el recíproco de la temperatura (Figura 24 B). Esta relación representa una línea recta con pendiente $-E_a$ dependiente de la constante de los gases. El coeficiente de regresión para el ajuste fue de 0.93, lo cual indica un ajuste adecuado del modelo a los datos experimentales.

CONCLUSIONES

1. Todas las enzimas comerciales probadas en este trabajo fueron capaces de esterificar el AEP y ADH al glicerol, sin embargo la mejor actividad ($67 \mu\text{mol/g enzima}\cdot\text{min}$) y grado de esterificación (90.8%) la presentó la enzima de *Candida antarctica* (NV-435 de Novo Nordisk).
2. Los mayores niveles de esterificación global (99.55%), porcentaje de incorporación de AEP (82.09%) y ADH (88.41%) al glicerol se obtienen bajo las condiciones óptimas de concentraciones de sustrato (1.2 mol AGL/mol glicéridos), tiempo (8 h) y temperatura (40°C).
3. El tiempo de reacción es la variable que presentó un efecto mayor sobre la esterificación enzimática del AEP y ADH, y en la formación de glicéridos (mono-, di-, y triacilglicéridos).
4. La esterificación enzimática ocurre principalmente en las primeras 6 h de reacción, sin embargo, para lograr la máxima formación de TAG se requiere de tiempos mayores a las 12 h.
5. Los valores de los parámetros cinéticos V_{max} ($0.0153 \text{ mmol/mol total}\cdot\text{h}$), K_m ($0.3714 \text{ mol glicerol/mol AGL}$) y E_a (25.91 kJ/mol) estimados para la reacción de esterificación muestran que la enzima NV-435 puede ser utilizada eficientemente en la obtención de glicéridos ricos con AGPI n-3.

RECOMENDACIONES

1. Determinar los parámetros de la cinética de formación de mono-, di, y triacilglicéridos.
2. Realizar un estudio de la posición del glicerol donde ocurre la esterificación de los AGPI n-3.
3. Desarrollar un estudio comparativo de la esterificación selectiva que pueden presentar las enzimas probadas en este estudio.
4. Iniciar estudios en reactores continuos, utilizando los resultados de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Akoh, C., y L. Mutua. 1994. Synthesis of Alkyl Glycoside Fatty Acid Esters: Effect of Reaction Parameters and the Incorporation of n-3 polyunsaturated Fatty Acids. *Enzyme Microb. Technol.* 16:115-119.
- Akoh, C.C., B.H. Jennings y D.A. Lillard. 1996. Enzymatic Modification of Evening Primrose Oil: Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1059-1062.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. 1994. Official and Recommended Practices of the Amer. Oil Chem. Soc. Champaign, IL.
- Arcos, J.A. y Ch, Hill. 2000. Rapid Solvent-Free Esterification of Conjugated Linoleic Acid and Glycerol in a Packed Bed Reactor Containing an Immobilized Lipase. En Studies in surface Science and Catalysis. Corma, A., Melo, F.V. Mendioroz, S. y Fierro, J.L.B. Ed. Elsevier Science B.V.
- Bajpai, P. K., P. Bajpai y O. P. Ward. 1991. Optimization of Production of Docosahexaenoic Acid by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68:509-514.
- Bandarra M. N., I. Batista, M. L. Nuñez, J. M. Empis y W. W. Christie. 1997. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J. of Food Sci.* 62:40-43.
- Bang, H. O., J. Dyerberg y H. M. Sinclair. 1980. The composition of the Eskimo Food in North Western Greenland. *Am J. Clin. Nutr.* 33:2657-2661.
- Bimbo, A.P. 1997. Menhaden oil: the GRAS petition from hell. *Inform*, 8:1069-1074.
- British Nutrition Foundation, 1992. Task Force on Unsaturated Fatty Acids: Nutritional and Physiological Significance. Editado por N. Ashwell, Chapman and Hall, London.
- Cisneros-Mata, M. A., M. O. Nevárez-Martínez y M. G. Hammann. 1995. The rise and Fall of the Pacific Sardine, *Sardinops sagax caeruleus* Girard in the Gulf of California, Mexico. *CalCOFI Rep.*, 36:136-142.
- Department of Health, UK. 1991. Report on Health and Social Subjects No. 41, HMSO, London.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Diks, R.M. y M.J. Lee. 1999. Production of a Very Low Saturated Oil Based on the Specificity of *Geotrichum candidum* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:455-462.
- Dyerberg, J. y H. O. Bang. 1979. Homeostatic Function and Platelet Polyunsaturated Fatty Acids in Eskimos. *Lancet*, 2:433-435.
- Eaton, S.B., y M Konner. 1985. Paleolithic Nutrition. A Consideration of its Nature and Current Implications. *N. Engl. J. Med.* 312:283-289.
- Esteban, C. L., M. A. Robles, G. A. Jiménez, , G. M. Ibáñez y G. E. Molina. 1998. Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Tryglicerides by Lipase-Catalyzed Esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (10):1329-1337.
- Gamez-Meza, N., I. Higuera, A.M Calderon, L. Vázquez, J. Noriega-Rodríguez y O. Angulo. 1999. Seasonal Variation in the Fatty Acid Composition and Quality of Sardine Oil from *Sardinops sagax caeruleus* of the Gulf of California. *Lipids*, 34:639-642.
- Ganga, A., S. Nieto, J. Sanhuez, C. Romo, H. Speiski y A. Valenzuela. 1998. Concentration and Stabilization of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Sardine Oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* 75:733-736.
- García, H.S., F.X. Malcata, C.G. Hill Jr., y C.H. Amundson. 1992. Use of *Candida rugosa* Lipase Immobilized in a Spiral Wound Membrane Reactor for the Hydrolysis of Milkfat. *Enzyme Microb. Technol.* 14:535-545.
- García, H.S., J.A. Arcos, D.J. Ward y C.G. Hill Jr. 2000. Synthesis of Glicerides Containing Linoleic Acid by Solvent-free Acidolysis of Fish Oil. *Biotechnology and Bioengineering.* 70:587-591.
- Gerster, H. 1995. N-3 Fish Oil Polyunsaturated Fatty acid and Bleeding. *J. Nutr. Environ. Med.* 5:281-296.
- Gunstone, F. D. 1999. Enzymes as Biocatalysts in the Modification of Natural Lipids. *J. Sci. Food Agric.* 79:1535-1549.
- Haagsma, N., C. M. Van Gent, J. B. Luten, R. W. Jong y E. V. Doorn. 1982. Preparation of and w3 Fatty Acid Concentrate from Cod Liver Oil. *J. Amer Oil Chem. Soc.* 59:117-118.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Haraldsson, G.G y P.A. Hoskuldsson. 1989. The Preparation of Triglycerides Highly enriched with *w*-3 Polyunsaturated Fatty Acids Via Lipase Catalized Interesterification. *Tetrahedron Letters*. 30:1671-1674.
- Haraldsson, G.G., B.O. Gudmundson y O. Almarsson. 1995. The Synthesis of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase. *Tetrahedron*. 51:941-952. 36.
- Haraldsson, G. G., B. Kristinsson, R. Sigurdardottir, G. G. Gudmundsson y H. Breivik. 1997. The Preparation of Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase-Catalyzed Transesterification of Fish Oil with Ethanol. *J. Am.Oil Chem. Soc.* 74:1419-1424.
- He, Y. y F. Shahidi, 1997. Enzymatic Esterification of *w*-3 Fatty Acid Concentrates from Seal Blubber Oil with Glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1133-1136.
- Hoshino, T., y T. Yamane, 1990. Selective Hydrolysis of Fish Oil by Lipase to Concentrate *n*-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Agric. Biol. Chem.* 54:1459-1467.
- Howe, P. R. C., 1995. Can We Recommend Fish Oil for Hypertension?. *Clin. Exper. Pharm. Physio.* 22:199-203.
- Hughes, D. E. 1995. Fish Oil and the Immune System. *Nut. Food Sci.* 2:12-16.
- Hwang, D. 1992. Dietary Fatty Acids and Eicosanoids. Fatty Acids en: Foods and their Health Implications. Ed. Chow C.K. New York, Marcel Dekker Inc. 545-557.
- Ikemoto, M., y Y. Ota. 1996. Production of Two Types of Non-specific Lipases by *Geotrichum* sp. FO 274^a: A Fish Oil-Assimilating Strain. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42: 371-379.
- Janssen A.E.M., B.J. Sjusnes, A.V. Vakurov, y P.J. Halling. 1999. Kinetics of Lipase-Catalyzed Esterification in Organic Media: Corredt Model and Solvent Effects on Parameters. *Enzyme Microbiol. Tehcnol.* 24:463-470.
- Kadota, Y., I. Tanaka y Y. Ohtsu. 1996. Industrial-Scale Separation of Docosahexaenoic Acid by Supercritical Fluid Chromatography with Silver-Loaded Spherical Clay Material. *Chromatography.* 17:298-299.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Kissil, W. G. y M. W. Koven. 1990. Preparation of Oils, Enhanced in Highly Unsaturated Fatty Acid (HUFA) Content, by Low Temperature Crystallization Separation, for Rotifer (*Brachionus plicatilis*) Enrichment. *Aquaculture*. 88:69-74.
- Knezevic, Z., L. Mojovic y B. Adnadjevic. 1998. Palm Oil Hydrolysis by Lipase from *Candida cylindracea* Immobilized on Zeolite Type Y. *Enzyme and Microbial Technology*. 22:275-280.
- Kosugi, A. y N. Azuma. 1994. Synthesis of Triacylglycerol from polyunsaturated Fatty Acid by Immobilized Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:1397-1403.
- Kyle, D. J., V. J. Socotte, J. J. Singer y S. E. Reeb. 1992. Bioproduction of Docosahexaenoic Acid by Microalgae. En: Industrial Applications of Single Cell Oils. Editado por D.J. Kyle and C. Ratledge, American Oil Chemists' Society, Champaign. p. 287-300.
- Krishna, S.H. B. Manohar, S. Divakar, y N.G. Karanth. 1999. Lipase Catalyzed Synthesis of Isoamyl Butyrate: Optimization by Response Surface Methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:1483-1488.
- Lawson, L. y B. Hughes. 1988. Human Absorption of Fish Oil Fatty Acids as Triacylglycerols, Free Acids, or Ethyl Esters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152:328-335.
- Li, Z., y O.P. Ward. 1993a. Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate in Organic Solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 745-748.
- Li, Z., L y O. P. Ward. 1993b. Enzyme Catalyzed Production of Vegetable Oils Containing Omega-3 polyunsaturated Fatty Acid. *Biotechnology Letters*. 15 : 185-188.
- Li, Z, L y O. P. Ward. 1994a. Synthesis of Monoglyceride Containing Omega-3 Fatty Acids by Microbial Lipase in Organic Solvent. *J. Indust. Microb.* 13:49-52.
- Li, Z, L y O. P. Ward. 1994b. Production of Docosahexaenoic Acid by *Thraustochytrium roseum*. *J. Indust. Microb.* 13:238-241.
- Lie, O. Y G. Lambertsen. 1985. Digestive Lipolytic Enzymes in Cod (*Godus mornua*): Fatty Acid Specificity. *Comp. Biochem. Physiol.* 80: 447-450.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Lie, E. y G. Molin. 1992. Esterification of Polyunsaturated Fatty Acids with Lipases from Different Sources. *International Journal of Food Science and Technology*. 27: 73-76.
- Liu, J., T. Lee, Bobik, Jr., M. Guzman-Harty, y C. Hastilow. 1993. Quantitative Determination of Monoglycerides and Diglycerides by High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light-Scattering Detection. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:343-347.
- Lortie, R., M. Trani, y F. Ergan. 1993. Kinetic of the Lipase-Catalyzed Synthesis of Triolein. *Biotech and Bioeng.* 41:1021-1026.
- Malcata, F.X., R.H. Reyes, H.S. Garcia, C.G. Hill, Jr. Y C.H. Amundson. 1992. Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalysed by Immobilized Lipases. *Enz. Microb. Technol.* 14(6): 426-446.
- Mc Neill, G.P., Ackman, R.G. y Moore, S.R. 1996. Lipase-Catalyzed Enrichment of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1403-1407.
- Miller, D.A., Prausnitz, J.M., y H.W. Blanch. 1991. Kinetics of Lipase-catalysed interesterification of triglycerides in cyclohexane. *Enzyme Microb. Technol.* 13:98-103.
- Moore, S.R. y G.P. McNeill. 1996. Production of Triglycerides Enriched in Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1409-1414.
- Morgado, N., A. Galleguillos, J. Sanhueza, A. Garrido, S. Nieto, y A. Valenzuela. 1998. Effect of the Degree of Hydrogenation of Dietary Fish Oil on the *trans* Fatty Acid Content and Enzymatic Activity of Rat Hepatic Microsomes. *Lipids*. 33:669-673.
- Myers, H. R. y Montgomery D.C. 1995. Response Surface Methodology. En: Process and Product Optimization Using Design Experiments. Ed. John & Sons Inc. NY. Pp 435-436.
- Nilsson, W. B., E. J. Gauglitz Jr. y J. K. Hudson. 1989. Supercritical Fluid Fractionation of Fish Oil Esters Using Incremental Pressure Programming and a Temperature Gradient. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66:109-117.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Ogata, J., Y. Hagiwara, H. Hagiwara, y T. Shibamoto. 1996. Inhibition of Malonaldehyde Formation by Antioxidants from w_3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:653-656.
- Osada, K., K. Takahashi, y M. Hatano. 1990. Polyunsaturated Fatty Glyceride Síntesis by Microbial Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67:921-922.
- Quinlan, P. y S. Moore. 1993. Modification of Triglycerides by Lipases: Process Technology and Its Application to the Production Of Nutritionally Improved Fats. *Inform.* 4:580-585.
- Robles, M.A., C.L. Esteban, G.A. Giménez, P.B. Camacho, M.J. Ibáñez, y G.E. Molina. 1999. Lipase-catalyzed Esterification of Glycerol and Polyunsaturated Fatty Acids from Fish and Microalgae Oils. *J. Biotech.* 70:379-391.
- SEMARNAP. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Anuario Estadístico de Pesca 1998-1999.
- Selmi, B., Gontier, E., Ergan, F., y Thomas, D. 1998. Effects of Fatty Acid Chain Length and Unsaturation Number on Triglycerides Síntesis Catalyzed by Immobilized Lipase in Solvent Free Medium. *Enzyme and Microbial Technology.* 23:182-186.
- Senanayake, N. y F. Shahidi. 1999. Enzymatic Incorporation of Docosahexaenoic Acid into Borage Oil. *J. Am. Oil Chem Soc.* 76:1009-1015.
- Shimada, Y., K. Maruyama, S. Okazaki, M. Nakayama, A. Sugihara y Y. Tominaga. 1994. Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids with *Geotrichum candidum* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:951-954.
- Shimada, Y., A. Sugihara, H. Nakano, T. Yokota, T. Nagao, S. Komemushi y Y. Tominaga. 1996. Production of Structured Lipids Containing Essential Fatty Acids by Immobilized *Rhizopus delemar* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73:1415-1420.
- Shimada, Y., A. Sugihara, H. Nakano, T. Kuramoto, T. Nagao, M. Gemba y Y. Tominaga. 1997a. Purification of Docosahexaenoic Acid by Selective Esterification of Fatty Acids from Tuna Oil with *Rhizopus delemar* Lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:97-101.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Shimada, Y., K. Maruyaka, A. Sugihara, S. Moriyama y Y. Tominaga. 1997b. Purification of Docosahexaenoic Acid from Tuna Oil by a Two-Step Enzymatic Method: Hydrolysis and Selective Esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74:1441-1446.
- Shuler, M.L. y F. Kargi. 1992. Bioprocess Engineering. Basic Concepts. Cap. 3. Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. pp. 58-67.
- Singer P., I. Berger, W. Godicke, W. Jaeger, y S. Voigh. 1986. Slow Desaturation and Elongation of Linoleic and alfa-linolenic Acids as a Rationale of Eicosapentaenoic Acid-Rich diet to Lower Blood Pressure and Serum Lipids in Normal, Hypertensive and Hyperlipemic Subjects Prostaglandins Leukot. *Med.* 24:173-193.
- Stirton, J.A. Fractionation of Fats and Fatty Acids. 1962. Cap. 21 en: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Editado por Swern D. Interscience Publisher John Wiley & Sons. N.York. p. 1005-1037.
- Stout, V.F., W.B. Nilsson, J. Krzynowek, y H. Schlenk. 1990. Fractionation of Fish Oil and Their Fatty Acid. En: Fish Oils In Nutrition. Satanby, M.E., ed. Van Nostrand Reinhold. New York, NY, USA. pp. 73-119.
- Sugiura, M. e Isobe, M. 1976. Studies on the Mechanism of Lipase Reaction. IV. Action of the Lipase from *Chomobacterium* on monomeric p-titriphenil acetate. *Chem. Pharm. Bull.* 24:1822-1828.
- Tanaka, Y., J. Hirano, y T. Funada. 1992. Concentration of Docosahexaenoic Acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 69:12.
- Tocher, D.R., A. Webster y J.R. Sargent. 1986. Utilization of Porcine Pancreatic Phospholipase A₂ for the Preparation of Marine Fish Oil Enriched in w₃-polyunsaturated Fatty Acids. *Biotechnol. Appli. Biochem.* 8: 675-679.
- Valenzuela, A. 1997. Efectos Biológicos y Nutricionales de los Ácidos Grasos trans ¿Cuanto es mito y cuanto es realidad?. *Aceites y Grasas.* 263-270.
- Vazhappilly, R. y F. Chen 1998. Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 75:393-397.

BIBLIOGRAFÍA (continuación)

- Wanasundara N.U. y F. Shahidi, 1998b. Concentration of w-3 Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Oils Using *Candida cylindracea* Lipase: Optimization of Reaction Conditions. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 75:1767-1774.
- Wang, C.S. 1981. Human Milk Bile Salt-Activated Lipase. Further Characterization and Kinetic Studies. *J. Biol. Chem.* 256:10198-10202.
- Wilson, R., R. J. Henderson, I. C. Burkow y J. R. Sargent. 1993. The Enrichment of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Using Aminopropyl Solid Phase Extraction Columns. *Lipids.* 28:51-54.
- Xu, X. L. Fomuso, y C. Ago, 2000. Modification of Menhaden Oil by Enzymatic Acidolysis to Produce Lipids: Optimization by Response Surface Design in a Packed Bed Reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 171-176.
- Yaguchi, T., S. Tanaka, T. Yokochi, T. Nakahara y T. Higashihara. 1997. Production of High Yields of Docosahexaenoic Acid by *Schizochytrium sp.* Strain SR21. *J. Amer. Oil Chem.Soc.* 74: 1431-1434.
- Yamamura, R. y Y. Shimonura. 1997. Industrial High-Performance Liquid Chromatography Purification of Docosahexaenoic Acid Ethyl Ester and Docosapentaenoic Acid Ethyl Ester from Single-Cell Oil. *J. Amer. Oil Chem.Soc.* 74: 1435-1440.
- Yamane, T., T. Suzuki, Y. Sahashi, L. Vikersveen y T. Hoshino. 1992. Production of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Fish Oil by Lipase-Catalyzed Acidolysis Without Solvent. *J. Amer. Oil Chem.Soc.* 69: 1104-1107.