



PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA
DE VALPARAISO



**UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA**

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE SISTEMAS DE REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE
PESCADO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE
CADENA LARGA EPA Y DHA MEDIANTE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE
INMOVILIZACIÓN DE LIPASAS**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900198755

U.T.F.S.M. .
BIBLIOTECA CENTRAL

Alumna: **Carolina Pizarro Torres**
Prof. Guía: **Dr. Rolando Chamy**
Dra. Lorena Wilson

MARZO, 2011

A mi familia:

Carlos,

mi Mamita Rosa María,

mi Papá Francisco,

mi hermanito Francisco

y mi Abuelita Raquel

RESUMEN

La modificación de triacilglicerolos (TAG) de aceite de pescado mediante tecnología enzimática ha sido propuesta como alternativa frente a hidrólisis química para la concentración de EPA y DHA; ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 asociados a múltiples beneficios para la salud. La hidrólisis de TAG presenta la ventaja de utilizar una simple reacción con un único sustrato, a diferencia de la reacción de esterificación en la cual se requieren los dadores de acilo como etil-ésteres o alcoholes. La selectividad de hidrólisis de ciertas lipasas permite obtener Omega-3 en forma de glicéridos, los cuales son preferibles a los etil-ésteres pues presentan una mayor biodisponibilidad en el organismo. La inmovilización de lipasas además de aumentar su estabilidad, modifica el microentorno de ésta, lo que permitiría modular su selectividad frente a un determinado sustrato. Basado en esto, el presente estudio tuvo como objetivo establecer un sistema de hidrólisis enzimática de aceite de pescado utilizando lipasas inmovilizadas, con el fin de concentrar EPA+DHA en glicéridos en un valor superior al obtenido con la enzima soluble. Bajo esta perspectiva, se evaluó el potencial de hidrólisis de aceite de pescado de diferentes lipasas mediante el propuesto parámetro de índice de selectividad (IS). La lipasa de *Candida cylindracea* (CCL) presentó el mayor porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado correspondiente a 69,1% a las 48 horas de reacción y un IS de 3,8. Diferentes soportes y estrategias de inmovilización fueron aplicadas a CCL: inmovilización por adsorción mediante interacciones hidrofóbicas, inmovilización por adsorción mediante interacciones hidrofóbicas combinada con entrecruzamiento con polímeros funcionales, inmovilización por adsorción mediante interacciones iónicas, e inmovilización por enlace covalente. Se obtuvo que la inmovilización modula negativamente la selectividad de CCL para efectos del objetivo planteado; los IS disminuyeron respecto al obtenido con la lipasa soluble, donde el derivado de CCL inmovilizada en octil-agarosa (O-CCL) presentó el mayor IS (2,7). Sin embargo la estabilidad de la lipasa inmovilizada aumenta considerablemente; el tiempo de vida media de O-CCL es de 275 a 40°C mientras que para CCL es de 2 horas a igual temperatura. En otro aspecto, la presencia de solventes/co-solventes en el medio de reacción (SR III) permitió lograr un 90,8% de hidrólisis de aceite de pescado a las 48 horas de reacción, sin embargo se disminuyó la capacidad de reutilización del derivado en lotes sucesivos tras ciclos de reuso del soporte. Finalmente el sistema de reacción SR II, correspondiente al derivado O-CCL en ausencia de solventes/co-solventes en el medio de reacción, se consideró el más apropiado para la aplicación estudiada. Con este sistema de reacción se obtuvo la mayor productividad específica acumulada (144,1 g aceite hidrolizado/g CCL*h), y presenta mejor capacidad de reuso de soporte, además en términos económicos, a partir del segundo ciclo utilizando el soporte reciclado, los costos del aceite hidrolizado no sólo se igualan a los del sistema SR I (lipasa soluble) sino que son inferiores a éstos.

ABSTRACT

The modification of triacylglycerols (TAG) of fish oil by enzyme technology has been proposed as an alternative to chemical hydrolysis for concentration of EPA and DHA, Omega-3 polyunsaturated fatty acids associated to multiple health benefits. TAG enzymatic hydrolysis has the advantage of being a simple reaction where a single substrate is used. In contrast, esterification reactions require acyl donors such as ethyl esters or alcohols. The selectivity of some lipases produces Omega-3 as glycerides, which are preferred to ethyl esters because of its better bioavailability within the body. The immobilization of lipases, in addition to increasing its stability, modifies its microenvironment, a condition that might change its selectivity towards a particular substrate. Therefore, the aim of the present study was to establish a system of enzymatic hydrolysis of fish oil using immobilized lipases in order to concentrate EPA+DHA in the glyceride form with a higher value than that obtained with soluble enzymes. From this perspective, the potential for fish oil hydrolysis by different lipases was evaluated by the proposed parameter: index of selectivity (IS). *Candida cylindracea* lipase (CCL) had the highest percentage of hydrolysis of fish oil corresponding to 69.1% after 48 hours of reaction time and a IS of 3.8. Different supports and immobilization strategies were applied to CCL: immobilization by adsorption through hydrophobic interactions, immobilization by adsorption through hydrophobic interactions combined with functional polymer crosslinking, immobilization by adsorption by ionic interactions, and covalent immobilization. It was found that immobilization negatively modulates the selective of CCL for purposes of the proposed objective, the IS decreased compared to that obtained with the soluble lipase, where the derivative of CCL immobilized on octyl-agarose (O-CCL) had the highest IS (2.7). However, the stability of the immobilized lipase increased significantly, the half-life of O-CCL is 275 at 40°C while for CCL is 2 hours at the same temperature. In another context, the presence of solvents / co-solvents in the reaction medium (SR III) allowed a 90.8% hydrolysis of fish oil after 48 hours of reaction time, but derivative reuse was decreased with successive batches after recycling the support. Finally, the reaction system SR II, corresponding to the O-CCL derivative in the absence of solvent / co-solvents in the reaction medium was considered the most appropriate for the application studied. With this reaction system, the highest specific productivity (144.1 g hydrolyzed oil/g CCL*h), as well as the best capacity for support reuse was obtained. Finally, from an economical point of view, after the second cycle of support reuse, costs for hydrolyzed oil are not only equal but even lower than those of the SR I system (soluble lipase).

Mis agradecimientos a

Beca MECESUP UCV-0206

Beca PBCT-CONICYT "Tesis en Industria TPI-12"

Beca de término de tesis entregada por Naturalis S.A.

Beca de pasantía entregada por la Dirección de Estudios Avanzados PUCV

Beca de pasantía MECESUP

que hicieron posible la realización de esta tesis

Agradecer sinceramente a

Alejandro Markovits y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Härting S.A., Santiago, Chile.

Dr. José Manuel Guisán, Dra. Gloria Fernández-Lorente y al equipo de trabajo del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica pertenecientes al CSIC, Madrid, España.

Los integrantes del Laboratorio de Biocatálisis Enzimática EIB-PUCV, Valparaíso, Chile.

por el apoyo en la realización de esta tesis

Dar las gracias también a

Mis profesores guías Lorena y Rolando

A Raúl Conejeros y a Cecilia Brañes por su amistad, efectivos consejos y constructivas críticas

A Mónica Videla por su valiosa colaboración

Finalmente hacer un reconocimiento al cariño, a la paciencia y al incondicional apoyo que recibí de mi Madre y de mi Carlos, a ellos siempre y totalmente GRACIAS



Índices

Índice General

Índice General	i
Índice Tablas	ii
Índice Figuras	iii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes generales	2
1.2.1 Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3	2
1.2.2 Aceite de pescado como fuente de AGPICL- ω 3	3
1.3 Modificación de triacilglicéridos mediante el uso de lipasas	5
1.3.1 Aspectos generales de lipasas como biocatalizadores	5
1.3.2 Modificación de triacilglicéridos mediante esterificación y transesterificación enzimática	9
1.3.3 Modificación de triacilglicéridos mediante hidrólisis enzimática	11
1.4 Uso de lipasas inmovilizadas para la modificación de triacilglicéridos	14
1.4.1 Aspectos generales del uso de enzimas inmovilizadas	14
1.4.2 Modificación del microentorno de las lipasas por inmovilización	15
1.4.3 Tipos de inmovilización aplicados a lipasas	16
1.4.4 Lipasas inmovilizadas aplicadas a la modificación de triacilglicéridos	25
1.5 Uso de solventes en reacciones catalizadas por lipasas	28
1.6 Estrategias de reutilización de biocatalizadores	30
1.7 Resumen de los antecedentes bibliográficos	32
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
2.1 Hipótesis	34
2.2 Objetivo general	34
2.3 Objetivos específicos	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
3.1 Metodología analítica.....	36
3.1.1. Obtención de ácidos grasos libres del aceite de pescado para la determinación de su perfil de composición	36
3.1.2. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa	37
3.1.3. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante HPLC	40
3.1.4. Determinación de la actividad enzimática	41
3.1.5. Determinación del contenido de proteínas.....	42
3.1.6. Identificación de CCL mediante Electroforesis SDS-PAGE	42
3.2. Metodología experimental.....	44
3.2.1. Sistemas de reacción enzimática de hidrólisis de aceite de pescado.....	45
3.2.2. <i>Screening</i> de lipasas para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3	46
3.2.3. Determinación de las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis enzimática de aceite de pescado.....	46
3.2.4. Diferentes tipos de inmovilización aplicados a la lipasa de <i>Candida cylindracea</i>	48
3.2.5. Estudio de estabilidad térmica de CCL y sus diferentes derivados.....	52
3.2.6. Estudio de estabilidad en solventes y co-solventes del medio de reacción de CCL y sus diferentes derivados.....	53
3.2.7. Estudio de estabilidad operacional de los diferentes derivados de CCL.....	54
3.2.8. Determinación de la capacidad de reutilización del soporte de inmovilización de CCL.....	55
3.2.9. Simulación de lotes sucesivos de hidrólisis de aceite de pescado con inactivación térmica del biocatalizador para la comparación de costos de los sistemas de reacción	56

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1.	<i>Screening</i> de lipasas para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3.....	58
4.1.1.	Actividad específica de las diferentes lipasas evaluadas.....	58
4.1.2.	Hidrólisis de aceite de pescado con las diferentes lipasas evaluadas.....	58
4.1.3.	Caracterización del preparado enzimático seleccionado.....	61
4.2.	Determinación de las condiciones óptimas de reacción enzimática de hidrólisis de aceite de pescado.....	63
4.3.	Diferentes tipos de inmovilización de CCL aplicados a la hidrólisis de aceite de pescado ...	67
4.3.1.	Cinética de inmovilización de los diferentes derivados de CCL.....	67
4.3.2.	Actividad específica y rendimientos de inmovilización de derivados de CCL.....	69
4.3.3.	Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con derivados de CCL.....	71
4.4.	Estabilidad térmica de CCL y sus diferentes derivados.....	76
4.5.	Estabilidad de CCL y sus derivados en solventes y co-solventes.....	79
4.6.	Estabilidad operacional de los derivados de CCL.....	82
4.7.	Comparación de sistemas de reacción enzimática para la hidrólisis de aceite de pescado... 86	86
4.8.	Determinación de la capacidad de reutilización del soporte de inmovilización de CCL.....	92
4.8.1.	Capacidad de carga del soporte con CCL.....	92
4.8.2.	Capacidad de desorción de CCL del soporte.....	93
4.8.3.	Capacidad de reutilización de octil-agarosa como soporte de inmovilización para CCL.....	94
4.9.	Análisis de costos para los diferentes sistemas de reacción a partir de la simulación de lotes sucesivos de hidrólisis de aceite de pescado.....	99
4.9.1.	Simulación de lotes sucesivos de hidrólisis de aceite de pescado con inactivación térmica del biocatalizador.....	99
4.9.2.	Productividades de los sistemas de reacción evaluados.....	100
4.9.3.	Análisis comparativo de costos los sistemas de reacción evaluados.....	102
5.	CONCLUSIÓN.....	105
6.	RECOMENDACIONES.....	107
	NOMENCLATURA.....	108
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
	ANEXOS.....	119

Índice de Tablas

Tabla 1.1.	Ejemplos de concentrados de Omega-3 ofrecidos en el mercado.....	4
Tabla 1.2.	Clasificación de lipasas respecto a su especificidad de hidrólisis.....	8
Tabla 1.3.	Modificación de triacilgliceroles utilizando lipasas inmovilizadas.....	26
Tabla 3.1.	Sistemas de reacción evaluados para la hidrólisis de aceite de pescado.....	45
Tabla 3.2.	Lipasas evaluadas para la hidrólisis de aceite de pescado.....	46
Tabla 3.3.	Parámetros a optimizar para la reacción de hidrólisis de aceite de pescado.....	47
Tabla 3.4.	Tabla de análisis de varianza para el diseño factorial 2 ⁴ no replicado.....	48
Tabla 3.5.	Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante adsorción hidrofóbica.....	49
Tabla 3.6.	Polímeros funcionales utilizados en el entrecruzamiento de los derivados O-CCL.....	50
Tabla 3.7.	Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante adsorción iónica.....	51
Tabla 3.8.	Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante enlace covalente.....	52

Tabla 3.9. Mecanismos de inactivación térmica utilizados en el análisis de estabilidad térmica de CCL y sus derivados.....	53
Tabla 4.1. Actividad específica medida en p-NPB, de las lipasas evaluadas	58
Tabla 4.2. Velocidad específica de hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado e índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA de las lipasas evaluadas	60
Tabla 4.3. Condiciones preliminares evaluadas para la hidrólisis de aceite de pescado	63
Tabla 4.4. Velocidades de hidrólisis de aceite de pescado obtenidas en ensayos preliminares.....	64
Tabla 4.5. Valores de los niveles de las distintas variables del diseño factorial al maximizar las funciones de respuesta para la hidrólisis de aceite de pescado	65
Tabla 4.6. Valores de los niveles de las distintas variables del diseño factorial al maximizar las funciones de respuesta para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos	66
Tabla 4.7. Rendimientos de inmovilización y actividad específica de los derivados de CCL	69
Tabla 4.8. Velocidad específica de hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado e índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA mediante diferentes derivados de CCL.....	75
Tabla 4.9. Parámetros cinéticos de inactivación de CCL y sus diferentes derivados	76
Tabla 4.10. Porcentaje de desorción de CCL del derivado después de cada lote de reacción.....	83
Tabla 4.11. Pendientes de disminución de actividad residual para cada ciclo de reacción	96
Tabla 4.12. Constante cinética del modelo M-M para los sistemas de reacción en estudio	99
Tabla 4.13. Parámetros cinéticos y operacionales utilizados en el modelo cinético (M-M) con mecanismo de inactivación térmica en serie bifásico.....	99
Tabla 4.14. Productividades de los sistemas de reacción evaluados	101
Tabla 4.15. Costos de los insumos para la reacción de hidrólisis de aceite de pescado	102
Tabla 4.16. Análisis del costo del aceite hidrolizado mediante los sistemas de reacción SR II, SR III y SR III b en relación al costo del aceite hidrolizado mediante SR I.....	104

Índice de Figuras

Figura 1.1. Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3	2
Figura 1.2. Esquema del mecanismo de activación interfacial de lipasas	6
Figura 1.3. Reacciones catalizadas por lipasas.....	7
Figura 1.4. Esquema de la adsorción de lipasas sobre soportes hidrofóbicos	17
Figura 1.5. Grupos de intercambio iónico.....	19
Figura 1.6. Esquema de inmovilización de lipasas en soportes iónicos obtenidos a partir de matrices recubiertas con polímeros poliónicos	20
Figura 1.7. Inmovilización unipuntual de lipasas a CNBr-agarosa.....	21
Figura 1.8. Inmovilización covalente de lipasas a glioxil-agarosa.....	21
Figura 1.9. Reacción de aminación química de la superficie de enzimas	22
Figura 1.10. Inmovilización multipuntual de lipasas a glioxil-agarosa.....	22
Figura 1.11. Esquema de la preparación de CLEAs.....	23
Figura 1.12. Esquema de la inmovilización de lipasas mediante confinamiento	24
Figura 1.13. Relación entre los componentes involucrados en un sistema bifásico de reacción con enzima inmovilizada.....	28
Figura 3.1. Procedimiento para la obtención de ácidos grasos libres del aceite de pescado	36
Figura 3.2. Sistema para la determinación del porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado.....	38
Figura 3.3. Reacción de hidrólisis de ésteres de p-nitrofenil utilizada para la determinación de actividad enzimática	41
Figura 3.4. Esquema de la reacción del ácido bicinconínico del kit de determinación de proteínas BCA.....	42
Figura 3.5. Esquema de la metodología experimental	44
Figura 3.6. Inmovilización de lipasas en soporte hidrofóbico y entrecruzamiento con polímeros polifuncionales.....	50
Figura 3.7. Procedimiento experimental para la hidrólisis enzimática de aceite de pescado por lotes sucesivos	54
Figura 3.8. Procedimiento para el estudio de reutilización del soporte de inmovilización	55
Figura 4.1. Hidrólisis de aceite de pescado a 37°C utilizando diferentes lipasas con 35 U/g de aceite	59

Figura 4.2. Electroforesis de la lipasa de <i>Candida cylindracea</i> (Lipolyve CC).....	61
Figura 4.3. Actividad específica de Lipolyve CC a distintas concentraciones de solución del preparado enzimático	62
Figura 4.4. Ensayos preliminares de hidrólisis de aceite de pescado	64
Figura 4.5. Cinéticas de inmovilización de CCL	67
Figura 4.6. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados hidrofóbicos de CCL	72
Figura 4.7. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados covalentes de CCL.....	73
Figura 4.8. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados iónicos de CCL.....	74
Figura 4.9. Estabilidad térmica de CCL y sus derivados	77
Figura 4.10. Estabilidad de CCL y sus derivados en solventes	79
Figura 4.11. Estabilidad de CCL y sus derivados en co-solventes.....	81
Figura 4.12. Hidrólisis de aceite de pescado con los derivados de CCL y EPA +DHA en forma de glicéridos en el aceite hidrolizado.....	82
Figura 4.13. Actividad residual de los diferentes derivados de CCL al término de la hidrólisis de aceite de pescado.....	84
Figura 4.14. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido a diferentes concentraciones de enzima mediante los distintos sistemas de reacción.....	87
Figura 4.15. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido tras la hidrólisis mediante los distintos sistemas de reacción a diferentes temperaturas	88
Figura 4.16. Hidrólisis de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido tras la hidrólisis mediante los distintos sistemas de reacción.....	90
Figura 4.17. Actividad residual de los biocatalizadores tras la hidrólisis de aceite de pescado mediante los distintos sistemas de reacción	91
Figura 4.18. Capacidad de carga de octil-agarosa y rendimientos de inmovilización de distintas concentraciones de preparado enzimático	92
Figura 4.19. Capacidad de desorción de CCL del soporte de octil-agarosa	93
Figura 4.20. Actividad residual de O-CCL para cada lote de estudio de reutilización de octil-agarosa	95
Figura 4.21. Rendimiento de inmovilización y porcentaje de activación de O-CCL para cada ciclo de reuso de octil-agarosa en medios de reacción a 37°C.....	96
Figura 4.22. Desorción y porcentaje de proteína (CCL) remante en el soporte para cada ciclo de reuso de octil-agarosa en medios de reacción a 37°C	97
Figura 4.23. Porcentaje de hidrólisis y EPA+DHA en forma de glicéridos, alcanzados en cada lote de reacción	98
Figura 4.24. Correlación de hidrólisis de aceite de pescado con cinética M-M.....	100
Figura 4.25. Costos del aceite hidrolizado mediante los sistemas de reacción	103

Capítulo 1
Revisión Bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUCCIÓN

El mercado de los denominados alimentos funcionales y nutraceuticos, se ha visto incrementado de manera importante. Dentro de la amplia gama de estos productos están los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3 (AGPICL- ω 3). Asociado a los AGPICL- ω 3 se encuentran una serie de beneficios ampliamente conocidos, como el correcto desarrollo del sistema nervioso y visual, reducción del riesgo de enfermedades cardiacas y Alzheimer, disminución de la prevalencia de enfermedades alérgicas, atenuación de cuadros depresivos y esquizofrenia. Además se han reportado efectos benéficos sobre diabetes tipo 2, algunos tipos de cáncer, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, obstrucción pulmonar crónica, soriasis y artritis reumatoide (Leaf y Kang, 1996; Masuev 1997; Carlson y Neuringer, 1999; Castro-González, 2002; Ruxton *et al.*, 2005).

Los AGPICL- ω 3 son característicos de los lípidos marinos, se encuentran principalmente en forma de triacilglicéridos (TAG) y fosfolípidos, siendo el aceite de pescado una rica fuente de éstos. Chile produce alrededor de 120 mil toneladas anuales de aceite de pescado, de las cuales se exportan cerca de 7 mil a Europa, donde son utilizadas para consumo humano precisamente por alto contenido de Omega-3 que posee. El aceite de pescado se comercializa a nivel mundial en alrededor de USD 800/ton, mientras que el precio de los concentrados de Omega-3 fluctúa entre los USD 50/kg a USD 200/kg, por lo que resulta muy interesante obtener un producto de mayor valor agregado con una calidad que los haga competitivos en aquel mercado.

La modificación de TAG de aceite de pescado mediante tecnología enzimática ha sido propuesta como una interesante alternativa a la hidrólisis y/o síntesis química para la obtención de concentrados Omega-3. La hidrólisis de TAG de aceite de pescado presenta la ventaja de utilizar una simple reacción con un único sustrato, a diferencia de la reacción de esterificación en la cual se requieren dadores de acilo como etil-ésteres o alcoholes. Sin embargo, mediante esta vía no se alcanzan concentraciones de Omega-3 como las obtenidas por esterificación, siendo éste un campo para optimizar, tanto en lo relativo a las condiciones de operación como en el tipo de enzima utilizada.

1.2 ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1 Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3

Los principales AGPICL- ω 3 utilizados como componentes activos en alimentos funcionales y nutracéuticos son el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3), mostrados en la Figura 1.1. El EPA está asociado a la disminución del riesgo de Alzheimer, de depresión y de otros trastornos del comportamiento. El DHA desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función saludable del cerebro, los ojos y el sistema nervioso; y en conjunto EPA+DHA han sido principalmente aplicados para la prevención de cardiopatías.

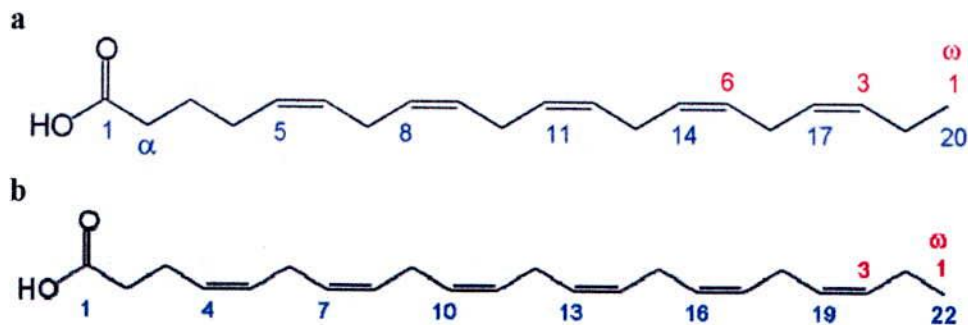


Figura 1.1. Ácidos grasos poliinsaturados Omega-3, a) ácido eicosapentaenoico (EPA), b) ácido docosahexaenoico (DHA)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son un tipo de ácido graso que se caracterizan por poseer varias insaturaciones (dobles enlaces entre átomos de carbono). El ácido linoleico (LA, C18:2 n-6) y el ácido α -linolénico (α -LNA, C18:3 n-3) son considerados esenciales ya que no pueden ser sintetizados por los humanos. Estos ácidos grasos tienen 18 átomos de carbono con dos y tres insaturaciones respectivamente, y están situados en el sexto (ω -6) y el tercer carbono (ω -3) contando a partir del extremo más alejado del grupo funcional ácido (grupo carboxilo u omega). Dichos ácidos grasos son los precursores de las familias Omega-6 y Omega-3, respectivamente. Metabólicamente los ácidos grasos de familia Omega-6 no pueden convertirse en ácidos grasos de familia Omega-3; por lo tanto, la síntesis de los diferentes AGPICL- ω 3 depende directamente de la concentración de sus respectivos precursores. Los ácidos grasos LA y LNA son elongados y desaturados por un sistema enzimático ubicado en el retículo endoplasmático liso, donde la enzima Δ -6 desaturasa juega un importante rol de regulación del proceso. Esta enzima es activada por insulina e inhibida por los productos finales del proceso (AGPI de 20 y 22 carbonos), y su afinidad

por el LNA es mucho mayor que por el LA, sin embargo, cuando la ingesta de LA es muy alta comparada con la de LNA, como suele ocurrir en la nutrición occidental, la transformación del LNA en DHA es marginal (Valenzuela *et al.*, 2008). Dada la competencia por las mismas enzimas utilizadas en la elongación y desaturación de las cadenas de átomos de carbono, la relación óptima de LA/LNA en la dieta debe estar en torno a 5:1 o 10:1 como máximo.

1.2.2 Aceite de pescado como fuente de AGPICL- ω 3

Los AGPICL- ω 3 son característicos de los lípidos marinos los cuales se encuentran en la forma de TAG y fosfolípidos (Bornscheuer, 2000). Dichos AGPICL- ω 3 se forman en el cloroplasto de las microalgas marinas que forman parte del fitoplancton o macroalgas, que a su vez son consumidas por los peces. Los peces concentran los AGPICL- ω 3 en TAG, principalmente en el tejido adiposo, en la grasa del músculo y vísceras (Uauy y Valenzuela, 1992). La composición de los ácidos grasos de especies que habitan en agua de mar presenta cantidades considerables de EPA y DHA, mientras que los ácidos grasos de la especie de agua dulce poseen una longitud de cadena de menos de 20 carbonos (Safy *et al.*, 2003). En especial los peces de carne roja u oscura son muy buenas fuentes de EPA y DHA.

Los TAG del aceite de pescado presentan más de 50 ácidos grasos distintos, con un rango de largo de cadena que va desde 14 a 24 carbonos, variando también el grado de insaturación. Cabe mencionar además que en un estudio realizado por Saify *et al.*, (2003), se reportó que entre un 91 y 99% de los AGPICL- ω 3 contenidos en especies marinas de latitudes nórdicas, se encuentra en la posición β o sn-2 del TAG. El contenido de EPA y DHA dependerá de la especie de pescado, el lugar y época de captura, así como del proceso industrial al que se someta. Mientras menor es la temperatura del agua, mayor puede ser el grado de insaturación de los ácidos grasos en los tejidos con el fin de compensar la reducción de la fluidez de las membranas. Lo contrario ocurre en las regiones templadas, donde la temperatura del agua es mayor a 12°C, y el aceite obtenido después de procesar el pescado puede presentar un contenido significativamente menor de Omega-3 (Castro-González, 2002).

De manera general se puede afirmar que los hábitos alimenticios han cambiado y el consumo de pescado ha disminuido desde los años 50; por ende el consumo de AGPICL- ω 3 ha disminuido. Esto podría no ser importante dado que los humanos tienen la capacidad de convertir el LNA de vegetales en EPA y DHA, pero tal como se mencionó, este proceso está sujeto a inhibición

competitiva por los ácidos grasos ω -6 (Castro-González, 2002). Esta es la razón por la cual se ha fomentado la suplementación de ácidos grasos Omega-3 en fórmulas concentradas.

La mayoría de los aceites comerciales de origen marino presentan un porcentaje en peso de EPA+DHA de entre 7% (aceite de arenque del Pacífico) a 28% (aceite de calamar del Pacífico); no obstante, la fuente más común de EPA y DHA es el aceite de sardina que contiene un 25% de EPA+DHA. Otras fuentes importantes de estos AGPICL- ω 3 son el aceite de salmón con 19% de EPA+DHA, el aceite de lacha y de hígado de bacalao con 24% de EPA+DHA y el aceite de caballa con 15% de EPA+DHA. Por lo general la razón de EPA:DHA es de 2:1, salvo en el aceite de atún que contiene alrededor de 5% de EPA y 18% de DHA y en el aceite de jurel con alrededor de 4% de EPA y 10% de DHA. Dado que el aceite de pescado es buena fuente de EPA+DHA y es una materia prima de bajo costo, se ha usado ampliamente para la fabricación de concentrados de Omega-3 comercializados como nutracéuticos. En la Tabla 1.1 se muestran algunos ejemplos de estos concentrados de Omega-3 reconocidos a nivel mundial.

Tabla 1.1. Ejemplos de concentrados de Omega-3 ofrecidos en el mercado

Producto	Contenido	Forma	Fabricante	Aplicación
E-EPA 650 mg	90% de EPA	éster etílico de EPA	Oy Bio-Vita Ab, Finlandia	Suplemento alimenticio
MEG-3®	65 a 75% de EPA y DHA	éster etílico y TAG de EPA+DHA	Ocean Nutrition Canada Limited	Ingrediente en fabricación de alimentos
EPAX 6015	58 % EPA 10 % DHA	éster etílico de EPA+DHA	EPAX AS, Norway	Ingrediente en fabricación de alimentos y suplementos alimenticios
EPAX 6000	34% EPA 24% DHA	TAG de EPA+DHA	EPAX AS, Norway	Ingrediente en fabricación de alimentos y suplementos alimenticios

Recientemente se han investigado fuentes alternativas de EPA y DHA, como las microalgas marinas *Monodus subterraneus* UTEX 151, con 34,2% de EPA, *Chlorella minutissima* UTEX 2341 con 31.3% EPA, *Crypthecodinium cohnii* UTEX L1649 con 19,9% de DHA y *Amphidinium carterae* UTEX LB 1002 con 17% de DHA. También se ha estudiado la obtención de AGPICL- ω 3 a partir de cultivos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas genéticamente que codifican para toda la ruta biosintética de los Omega 3 (Chemler *et al.*, 2006).

1.3 MODIFICACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS MEDIANTE EL USO DE LIPASAS

En el mercado de los alimentos funcionales y nutraceuticos, la aplicación de lipasas con el objetivo de obtener concentrados de AGPICL- ω 3 está directamente relacionada a la absorción de éstos ácidos grasos por el organismo que los consuma.

Los AGPICL- ω 3 pueden administrarse como ácidos grasos libres, como ésteres etílicos o como TAG. La administración de AGPICL- ω 3 como ácidos grasos libres parece ser la mejor forma farmacéutica absorbible para la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Leaf y Kang, 1996), mientras que los ésteres etílicos se utilizan para el tratamiento del cáncer de páncreas (Wigmore *et al.*, 1996). Sin embargo, ha sido ampliamente discutido el hecho de que los ésteres de AGPICL- ω 3 presentan una absorción prácticamente nula (Nieto *et al.*, 2005; Lawson, 1988) he incluso pueden resultar metabolitos tóxicos (Carvalho *et al.*, 2003). Por otro lado, si bien los AGPICL- ω 3 en su forma libre presentan una mayor absorción, son extremadamente susceptibles a sufrir degradaciones oxidativas. Por esta razón la forma más adecuada de suministro sería la más natural: AGPICL- ω 3 en forma de acilglicéridos, es decir esterificados con glicerol, idealmente en la posición sn-2, ya que son mejor absorbidos y sufren menos degradaciones (Wijesundera *et al.*, 2008; Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010). Ejemplo de ello son las formulaciones de leche para bebés (Boswell *et al.*, 1996) en las cuales el DHA es administrado formando TAG emulando la leche materna y el triecosapentanoil glicerol (tri-EPA) que se utiliza como infusión para humanos con trastornos trombóticos (Hamazaki *et al.*, 1988).

Según lo anterior, la concentración enzimática de AGPICL- ω 3 se ha enfocado principalmente en dos líneas: la hidrólisis de TAG para la obtención de MAG o DAG ricos en Omega-3; y la reacción de esterificación de ácidos grasos Omega-3 a glicerol para la formación de lípidos estructurados con alto contenido de AGPICL- ω 3.

1.3.1 Aspectos generales de lipasas como biocatalizadores

Las lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, EC 3.1.1.3) pertenecen al grupo de las enzimas hidrolíticas, cuya función biológica es catalizar la hidrólisis parcial o total de TAG dando lugar a la formación de diacilgliceroles (DAG), monoacilgliceroles (MAG), glicerol y ácidos grasos libres. Presentan un peso molecular de entre 40-50 kDa con cerca de 300 residuos aminoacídicos. Molecularmente se describen como glicoproteínas en las cuales una sección hidrofóbica glicosilada

circunda el sitio activo. El sitio activo de estas enzimas es similar al de las serin proteasas, compuesto por: Ser-His-Asp o Ser-His-Glu (Yahya *et al.*, 1998).

A diferencia de las esterasas, cuya actividad se tiene solamente sobre sustratos solubles en soluciones acuosas, los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles y cuando la enzima actúa en la interfase orgánico-acuosa se habla de actividad lipolítica. La actividad lipolítica implica un fenómeno de adsorción inicial sobre la fase orgánica a lo que le sigue la reacción propiamente tal en la interfase (formación de complejo enzima-sustrato), y posterior liberación de los productos a la fase acuosa (Jaeger *et al.*, 1994). El mecanismo de reacción de hidrólisis, ha sido descrito por el modelo propuesto por Verger *et al.*, (1990) que incluye los fenómenos de adsorción en la interfase lipídica-acuosa. La mayoría de las lipasas presentan también actividad esterásica cuya cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten (Sharma *et al.*, 2001).

Uno de los rasgos característicos de las lipasas es su activación en interfases hidrofóbicas. Las lipasas presentan un elemento de su estructura secundaria denominado *lid* o tapa, el cual está plegado sobre su sitio activo haciéndolo inaccesible para los sustratos. Sin embargo, cuando las lipasas están en presencia de una interfase hidrofóbica, sufren un cambio conformacional hacia una estructura abierta que le confiere funcionalidad (Derewenda *et al.*, 1992). La Figura 1.2 muestra las diferentes conformaciones e interacciones hidrofóbicas que establecen las lipasas.

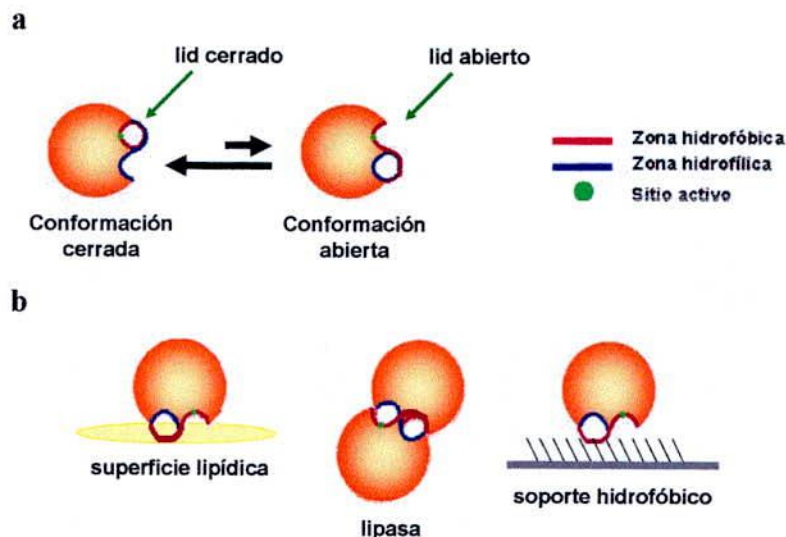


Figura 1.2. Esquema del mecanismo de activación interfacial de lipasas, a) equilibrio entre conformación abierta y cerrada de su estructura, b) adsorción de lipasas sobre diferentes interfases hidrofóbicas

En forma libre, la lipasa se encuentra en un equilibrio entre su conformación abierta y su conformación cerrada según la hidrofobicidad del medio (Brzozowski *et al.*, 1991), y dada esta propiedad es que se ha utilizado la inmovilización de este tipo de enzimas en soportes hidrofóbicos (aspecto que se analizará en la sección 1.4.2). Además, según lo reportado por Palomo *et al.*, (2003a), las lipasas en soluciones concentradas pueden formar dímeros a través de interacción de sus zonas hidrofóbicas que circundan el sitio activo, con la consecuente merma en su potencial catalítico.

Las lipasas no sólo catalizan reacciones de hidrólisis (ruptura de un enlace éster en presencia de agua); se ha establecido que controlando las condiciones del medio, específicamente minimizando el contenido agua en la reacción, es posible revertir la hidrólisis en el sentido de reacción de esterificación (formación de un enlace éster entre un alcohol y un ácido carboxílico) y de la reacción de transesterificación (intercambio de residuos de alcohol o ácido entre un éster y un dador de acilo o alcoxilo). Dependiendo del dador, las reacciones de transesterificación se pueden clasificar en acidólisis donde el dador es un ácido, alcoholólisis donde el dador es un alcohol o interesterificación en la cual el dador es otro éster (Lortie, 1997), tal como se representa en la Figura 1.3.

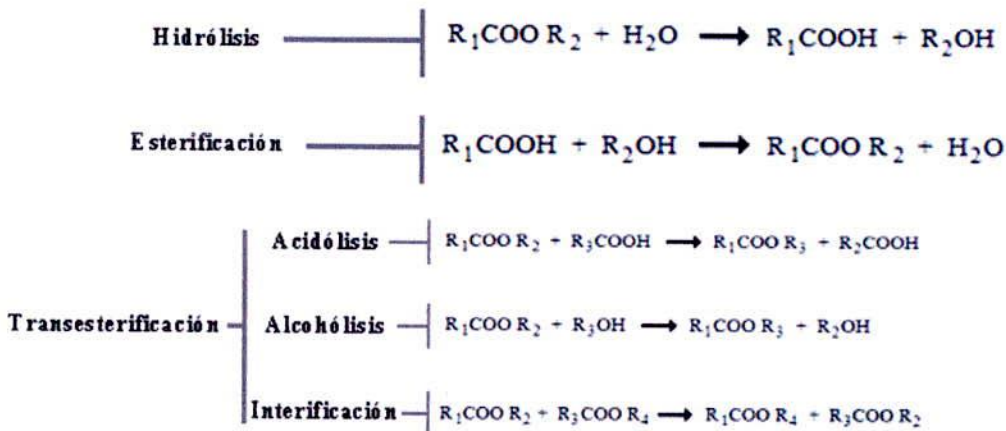


Figura 1.3. Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas son ampliamente utilizadas en el procesamiento de grasas y aceites, detergentes y formulaciones desengrasantes, la elaboración de alimentos, especialmente en la industria de la leche y quesos, y panificación para mejoramiento de sabores, la síntesis de productos de química fina, de

cosméticos y farmacéuticos, la fabricación de papel. En el ámbito de tratamiento medioambiental, las lipasas se pueden utilizar para acelerar la degradación de residuos grasos y de poliuretano; así como también he ha investigado promisoriamente la utilización de lipasas para la producción de biodiesel (Sharma *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2006).

Las lipasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Si bien la primera fuente de obtención de las lipasas fue a partir de extracción de vísceras animales, en la actualidad se obtienen vía fermentativa utilizando una amplia variedad de microorganismos (Sharma *et al.*, 2001). En particular, las lipasas obtenidas a partir de bacterias (*Pseudomonas*), las producidas por hongos (*Penicillium*, *Rhizopus* y *Geotrichum*), y las lipasas de levaduras (diversas especies de *Candida*), son las de mayor preponderancia en cuanto a su producción industrial. Esto es debido principalmente a que son enzimas extracelulares, son por lo general más estables y de propiedades diferenciadas, como su especificidad en relación al sustrato.

La especificidad de hidrólisis de las enzimas lipasas frente a un sustrato determinado está directamente relacionada con su fuente de origen. De acuerdo con esto, dichas enzimas pueden clasificarse en cuatro grupos, tal como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Clasificación de lipasas respecto a su especificidad de hidrólisis

Especificidad de lipasa	Reacción catalizada	Microorganismo productor
1,3 específicas	<ul style="list-style-type: none"> Catalizan la liberación de ácidos grasos específicamente en las posiciones sn-1 y sn-3 de los TAG. 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Aspergillus Niger</i> <i>Mucor miehei</i>
Ácido graso específicas	<ul style="list-style-type: none"> Catalizan la hidrólisis de ácidos grasos específicos en las moléculas de TAG (ácidos grasos con un doble enlace cis en la posición 9) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Geotrichum candidum</i>
Glicérido específicas	<ul style="list-style-type: none"> Catalizan la hidrólisis de MAG y DAG pero no los TAG 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Penicillium cyclopium</i>
No específicas	<ul style="list-style-type: none"> Catalizan la hidrólisis de los ácidos grasos del TAG de forma aleatoria, no mostrando especificidad con relación a la naturaleza del grupo acil o a su posición. 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Pseudomonas Fluorescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida cylindracea</i>

Fuente: Shimada *et al.*, (1994), Chahinian *et al.*, (2000); Mladenoska *et al.*, (2000)

Cabe señalar la hidrólisis total del TAG también puede ocurrir con las lipasas específicas de posición sn-1 y sn-3, cuando la reacción se extiende por un tiempo prolongado. Esto se debe a que los productos formados (MAG y DAG) son químicamente inestables y pueden ser isomerizados espontáneamente a sn-1 o sn-3, quedando aptos para la acción de la enzima (Carvalho *et al.*, 2003).

Así mismo es importante mencionar que pese a que se ha clasificado como una enzima no específica, la lipasa de *Candida cylindracea* (también denominada *Candida rugosa*) presenta una mayor velocidad de hidrólisis de ácidos grasos saturados, mientras que la velocidad de hidrólisis de AGPICL- ω 3 es significativamente menor. Precisamente por esta propiedad, esta lipasa ha sido utilizada con buenos resultados para la concentración de AGPICL- ω 3. Tanaka *et al.*, (1992) compararon el comportamiento de esta lipasa con otras lipasas inespecíficas de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas sp.* Así mismo, Shimada *et al.*, (1994, 1995) la compararon con lipasas de *G. candidum* (ácido graso específica) y de *Rhizopus delemar* (sn 1,3 específica). En ambos estudios se obtuvo que la lipasa de *Candida cylindracea* fue la más eficiente en el enriquecimiento de DHA.

En la evaluación de Tanaka *et al.*, (1992) se propone el concepto de valor de resistencia a hidrólisis (HRV, sigla en inglés), como medida de la especificidad para no hidrolizar enlaces éster de AGPI. El HRV es definido como la razón entre el contenido de DHA en glicéridos del aceite hidrolizado y el contenido de DHA en el aceite original.

1.3.2 Modificación de triacilglicéridos mediante esterificación y transesterificación enzimática

Considerando las implicancias de la absorción y degradación de los AGPICL- ω 3 discutida con anterioridad, en la última década, se han realizado numerosos estudios con el propósito de concentrar éstos ácidos grasos en una molécula de acilglicérido, mediante las reacciones de esterificación y de transesterificación, utilizando la capacidad de las lipasas de catalizar la reacción inversa a la hidrólisis cuando se tiene un mínimo contenido de agua y solventes orgánicos en el medio de reacción.

Osada *et al.*, (1990), lograron un elevado grado de incorporación de AGPICL- ω 3 a una molécula de glicerol, utilizando la lipasa de *Chromobacterium viscosum* y lipasa de *Candida cylindracea*. De igual forma Lie *et al.*, (1992), reportaron resultados similares de incorporación de AGPICL- ω 3 mediante una lipasa obtenida de *Mucor miehei*, mientras que Li y Ward (1993) obtuvieron un 70% de EPA+DHA en forma de glicéridos.

Se ha demostrado que mediante transesterificación es posible aumentar significativamente el porcentaje de AGPICL- ω 3 en los glicéridos resultantes; alcanzando hasta un 70% de éstos con un contenido de DHA de 40% y de EPA de 25%, tal como reporta Yamane *et al.*, (1992) quienes

utilizaron la lipasa de *Mucor miehei* para la acidólisis, en ausencia de disolvente, entre aceite de sardina y ácidos grasos libres. Huang *et al.*, (1994) reportaron la incorporación de AGPICL- ω 3 en aceite de soya mediante transesterificación catalizada por lipasa de *Candida cylindracea*, obteniendo TAG con 34,7% de EPA y 32,9% de DHA.

La obtención de lípidos estructurados con fines nutricionales y dietéticos mediante esterificación ha sido reportada en la patente europea EP 1 642 959 A1, presentada por Negishi *et al.*, (2006). En esta patente se propone un proceso para la fabricación de un TAG simétrico de bajo aporte calórico compuesto por ácido octanoico (caprílico) en las posiciones sn-1 y sn-3, y DHA en la posición sn-2. Dicho proceso utiliza la lipasa QL, (Meito Sangyo) en el cual se hace reaccionar tricaprilina (triglicérido de ácido caprílico), con éster etílico de DHA como sustrato para la transesterificación.

Adachi *et al.*, (1993) realizaron una evaluación de lipasas microbianas utilizadas para aumentar la concentración de AGPICL- ω 3 en aceite de sardina mediante reacciones de acidólisis, en la cual la lipasa de *Pseudomonas sp.* presentó una mayor capacidad de transesterificación entregando un contenido final de estos ácidos grasos de 44% en forma de glicéridos, comparado con un 29% de AGPICL- ω 3 en el aceite original.

Moore y McNeill (1996), proponen un proceso en el que combinan las técnicas enzimáticas de hidrólisis y esterificación para producir concentrados de Omega-3 a partir de aceite de pescado. En primera instancia, utilizaron la lipasa de *Candida rugosa* en reacciones de hidrólisis para concentrar EPA y DHA en la fracción de glicéridos. La fracción de glicéridos fue recuperada por evaporación y la fracción de ácidos grasos libres, pobre en DHA, pero con un porcentaje importante de EPA, fue fraccionada de modo de recuperar dicho Omega-3 y re-esterificado en triglicéridos por la reacción de la lipasa *Rhizomucor miehei*.

En la patente US 5,945,318 (Breivik *et al.*, 1999) se presenta un proceso, para concentrar los AGPICL- ω 3 de aceites de origen marino mediante transesterificación de los triglicéridos con etanol anhidro, utilizando las lipasas de *Pseudomonas sp.* y de *Pseudomonas fluorescens*, con las cuales fue posible obtener concentrados de Omega-3 de 70% de EPA+DHA en forma de glicéridos.

Le Goffic *et al.*, (2000), patentaron un método que combina la transesterificación química y enzimática de aceite de pescado, que junto a una destilación *short path*, se logra obtener por un lado una fracción rica en DHA de más del 90% y pobre en EPA (menos del 5%), y por otro una fracción rica en EPA con más del 50% y pobres en DHA (menos del 2%). Los métodos de destilación molecular han sido últimamente aplicados para el enriquecimiento de Omega-3 como procesos de concentración y purificación del producto; sin embargo, el principal inconveniente es el uso de altas

temperaturas (por encima de 100° C) durante las etapas de destilación, que pueden provocar la oxidación de estos ácidos grasos.

1.3.3 Modificación de triacilglicéridos mediante hidrólisis enzimática

La modificación de TAG mediante hidrólisis enzimática también ha sido utilizada como estrategia para la concentración de AGPICL- ω 3, con la ventaja de realizar una simple reacción con un único sustrato, los TAG del aceite, a diferencia de la reacción inversa de esterificación (o de interesterificación) en la cual se requieren dadores de acilo como etil-ésteres o alcoholes. No obstante, pareciera ser que mediante la hidrólisis de TAG no se alcanzan niveles de concentración final de AGPICL- ω 3 como los obtenidos por los procesos de esterificación y transesterificación, siendo éste un campo para optimizar tanto en lo relativo a las condiciones de operación como en el tipo de enzima utilizada.

Los primeros trabajos de hidrólisis de TAG se basaron en el hecho de que en su mayoría, los AGPICL- ω 3 de aceites de pescado y otros aceites vegetales se encuentran localizados en la posición sn-2 del TAG. Estos aceites sometidos a hidrólisis catalizadas por lipasas con especificidad posicional sn-1 y sn-3, pierden los ácidos grasos saturados y monoinsaturados que normalmente están presentes en estas posiciones, aumentando la concentración relativa de AGPICL- ω 3. Como ejemplo de lo anterior se pueden citar los estudios realizados por Bottino *et al.*, (1967) con lipasas pancreáticas, y también los de Nieto *et al.*, (1999), quienes utilizaron la lipasa de *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20).

La utilización de lipasas no específicas presenta dos alcances; uno es que, si bien estas enzimas no son ácido graso o posición específicas, presentan una menor velocidad de hidrólisis frente a AGPICL- ω 3. El otro alcance guarda relación con el hecho de lograr la hidrólisis de la mayor cantidad de ácidos grasos incluidos los AGPICL- ω 3, los cuales pueden ser concentrados, por ejemplo mediante esterificación selectiva, como segunda etapa de proceso.

Evidenciando la menor velocidad de hidrólisis de ciertas lipasas frente a AGPICL- ω 3, se encuentran entre otros, los trabajos realizados por Wanasundara y Shahidi (1998a) quienes estudiaron la concentración de AGPICL- ω 3 en TAG a partir de aceite de foca y de aceite de lacha, mediante hidrólisis enzimática con lipasas comerciales de *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus*

oryzae, *Rhizopus niveus*. Los autores reportaron que pese a que con todas las lipasas evaluadas se logró aumentar el contenido de AGPICL- ω 3 en el aceite respecto a su composición original, el mayor porcentaje de Omega-3 en TAG se obtuvo con la lipasa de *Candida cylindracea*. En 40 horas de reacción con esta enzima se logró un 43,5% de AGPICL- ω 3 en el aceite de foca hidrolizado, correspondiente a 9,8% de EPA, 8,6% de DPA y 24,0% de DHA; y un 44,1% de AGPICL- ω 3 en el aceite de lacha hidrolizado, correspondiente a 18,5% de EPA, 3,6% de DPA y 17,3% de DHA.

Por su parte, Okada y Morrissey (2007), evaluaron la hidrólisis de aceite de sardina del Pacífico, catalizada por lipasas comerciales de *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* y *Aspergillus niger*. Como resultado se obtuvo que la lipasa de *Candida rugosa* fue la más efectiva en la concentración de AGPICL- ω 3, con 26,86% de EPA y 13,62% de DHA en forma de glicéridos. Se estudió la hidrólisis a 37°C, por 1,5, 3, 6, y 9 horas de reacción a diferentes concentraciones de lipasa. Con 250 U de lipasa la concentración de EPA aumentó a un nivel relativamente constante de 34% después de 1,5 horas de reacción y con 500 U los niveles de DHA también fueron significativamente aumentados de 14% a 30%, después de las 9 horas de reacción.

Este comportamiento de hidrólisis preferencial de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados en desmedro de los poliinsaturados como el DHA, puede deberse a un impedimento estérico de la enzima para llegar al enlace éster del ácido graso con la molécula de glicerol. A su vez, este impedimento para acceder al enlace éster se explicaría por la conformación de la molécula del AGPI, molécula espacialmente más plegada debido al mayor número de instauraciones.

Se podría postular entonces que existe cierta correlación entre el largo de la cadena carbonada y grado de instauraciones de la molécula de ácido graso con su velocidad de hidrólisis. Sin embargo, Tanaka *et al.*, (1993) proponen que la especificidad que posee la lipasa de *Candida cylindracea* es una “especificidad de no hidrólisis de triglicérido” dada por su estructura en forma global, donde la hidrólisis de esta molécula se favorece cuando su contenido de DHA es menor. Los autores evaluaron la hidrólisis de aceite de atún con lipasa de *Candida cylindracea*, en la cual con un 70% de hidrólisis, obtuvieron en la mezcla reaccionada TAG y DAG ricos en DHA, mientras que no detectaron MAG con dicho ácido graso. De modo de corroborar la hipótesis los investigadores sintetizaron moléculas de TAG de ácido oleico y DHA en diferentes proporciones, las cuales fueron sometidas a hidrólisis con la lipasa. Como resultado de esta prueba se obtuvo que los TAG compuestos solamente de ácido oleico fueron hidrolizados rápidamente, mientras que en aquellos TAG con mayor contenido de DHA, el grado de hidrólisis fue menor. Frente a esto, los autores sugieren que la lipasa *Candida cylindracea* presenta resistencia de hidrólisis para toda la estructura

del TAG y no sólo a los enlaces éster, puesto que el ácido oleico contenido en el TAG con DHA no fue hidrolizado.

Tal como se ha expuesto hasta este punto, la lipasa de *Candida cylindracea* ha sido ampliamente reportada como la más eficaz para la concentración de AGPICL- ω 3 y específicamente de DHA. No obstante algunos estudios realizados por Shimada *et al.*, (1994) discrepan de tal aseveración. Esos autores compararon la hidrólisis y la concentración de DHA y EPA en glicéridos, de la lipasa de *Candida cylindracea* con tres lipasas previamente aisladas en sus laboratorios, cada una con diferentes especificidades tanto posicional como de ácidos grasos. La lipasa de *Geotrichum candidum* resultó ser la más eficiente para la concentración de DHA y EPA en forma de glicéridos, a partir de la hidrólisis de aceite de atún a 30°C durante 16 horas. Bajo estas condiciones se obtuvo un 33,5% de hidrólisis y glicéridos con un contenido de 48,7% de EPA+DHA. Los investigadores reportan también que el porcentaje de hidrólisis no aumentó a pesar de añadir más lipasa.

Con respecto a los trabajos de hidrólisis total de ácidos grasos incluidos los AGPICL- ω 3 y posterior reesterificación de éstos, se puede mencionar la patente japonesa JP 138073 (Yoshinori y Masami 2003), en la cual se presenta la hidrólisis de aceite de pescado utilizando una lipasa de *Pseudomonas sp.* El producto de la hidrólisis fue sometido a fraccionamiento por bajas temperaturas (winterización) obteniéndose un concentrado rico en ácidos grasos poliinsaturados, posteriormente reesterificado con glicerol con una lipasa de *Candida sp.*

Shimada *et al.*, (1997) propusieron un método de concentración de DHA basado en la hidrólisis de aceite de atún y posterior esterificación selectiva de los ácidos grasos libres. Para ello realizaron una primera reacción de hidrólisis del aceite, usando la lipasa AK y llevada a cabo a 40°C por 48 horas. En esas condiciones obtuvieron un rendimiento de 79% de hidrólisis. La fracción de ácidos grasos libres presentó un 83% del contenido inicial de DHA, la cual fue posteriormente esterificada selectivamente en una mezcla de reacción 1:2 molar con lauril alcohol y agua. La reacción de esterificación se realizó a 30°C durante 20 horas y utilizando la lipasa *Rhizopus delemar*. Como resultado se obtuvo un 83% de rendimiento de esterificación de DHA. Los ácidos grasos libres de la mezcla reaccionada se extrajeron con n-hexano y fueron nuevamente esterificados bajo las mismas condiciones. El contenido de DHA se elevó a un 91% en peso con un rendimiento total de esterificación de 88%.

1.4 USO DE LIPASAS INMOVILIZADAS PARA LA MODIFICACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS

1.4.1 Aspectos generales del uso de enzimas inmovilizadas.

Es ampliamente sabido que en ciertos casos, la utilización a escala industrial de enzimas en su forma soluble resulta poco rentable por el constante consumo del catalizador que eleva los costos del proceso. En consecuencia y de forma de aumentar la estabilidad del catalizador, nace la estrategia de inmovilización enzimática.

Se entiende por inmovilización enzimática al procedimiento en el que la enzima se confina a una región definida para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica (Illanes, 1994). Esto provoca una estabilización conformacional de la enzima, dónde su estructura adquiere mayor rigidez haciéndose más resistente a la desactivación térmica o química; lo que conlleva a la posibilidad de reutilización del biocatalizador aumentando la productividad del proceso.

Sin embargo, la inmovilización de enzimas también presenta inconvenientes que es necesario tomar en cuenta si quiere pensar en una real aplicación industrial.

Generalmente, el principal factor en contra es el precio que supone el soporte y el proceso de inmovilización, sumado claro está, al costo de la enzima. Se debe considerar además la posible pérdida de actividad de la enzima durante la inmovilización y a las restricciones difusionales dadas por el impedimento de la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima (Bornscheuer, 2000).

El diseño de un derivado enzimático (enzima + soporte) debe realizarse teniendo en cuenta los parámetros que permitan obtener una elevada actividad catalítica por unidad de peso o volumen, y por ende una elevada eficiencia catalítica. Se entiende por eficiencia catalítica la relación entre la actividad enzimática y la carga enzimática en términos de cantidad de proteína inmovilizada. Por lo tanto, por un lado se deben buscar las condiciones de inmovilización en las cuales las pérdidas de actividad sean mínimas, y por otro se debe utilizar soportes que presenten valores altos de superficie específica capaces de albergar una gran cantidad de moléculas de enzima, de modo de lograr cargas enzimáticas altas (Blanco *et al.*, 2004).

1.4.2 Modificación del microentorno de las lipasas por inmovilización

La modificación del microentorno de la proteína por efecto de la inmovilización, puede llegar a cambiar el potencial catalítico de la enzima, la resistencia frente a inhibidores y más aun, se puede modular su selectividad frente a sus sustratos (Cao, 2005; Mateo *et al.*, 2007).

Por ejemplo, se ha reportado que un microambiente hidrofílico, creado por la introducción de macromoléculas hidrofílicas en la proximidad de la enzima o bien por un espaciador hidrófilo, puede promover la estabilización de ésta. Tal es el caso de la inmovilización covalente de la lipasa de *Bacillus stearothermophilus* en sílica activada con glutaraldehído y revestida con polietilenimina (PEI). La lipasa inmovilizada de esta manera, presentó una mayor estabilidad operacional y térmica, en comparación con la inmovilizada en una matriz silanizada y activada con glutaraldehído, evidenciando que la presencia de PEI crea un microambiente favorable en términos de estabilidad para la enzima (Hwang *et al.*, 2004).

La modificación del microambiente también se ha estudiado en la creación de *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs), dónde los agregados enzimáticos fueron mezclados y entrecruzados con polímeros polifuncionales preparados a partir de la mezcla de glutaraldehído con otros compuestos diamino. La actividad enzimática y la estabilidad de las lipasas de *Candida rugosa*, la lipasa de *Candida antarctica*, la lipasa de páncreas porcino y la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, pudieron ser moduladas por la variación en la concentración de los compuestos diamino seleccionados, así como también por las propiedades de la cadena lateral y por la longitud de ésta; lográndose una elevada actividad volumétrica y estabilidad térmica, no sólo en medios acuosos sino que también en medios con solventes orgánicos. (Cao y Elzinga, 2003).

Otro aspecto muy interesante de la alteración del microentorno de las lipasas, es que en algunos casos se produce un drástico cambio en su selectividad hacia un determinado sustrato. Como ejemplo se puede citar lo reportado por Palomo *et al.*, (2002a) dónde la lipasa de *Candida rugosa* (S)-selectiva, se convirtió en una lipasa (R)-selectiva solamente producto de ser inmovilizada mediante enlace covalente. De igual modo, se ha reportado la modificación de la enantioselectividad de varias lipasas según la estrategia de inmovilización; como la lipasa de *Candida rugosa* al ser inmovilizada por inclusión en gel (Chen *et al.*, 2002); y las lipasas de *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas fluorescens* y *Candida antarctica* B inmovilizadas mediante enlace covalente, adsorción por interacciones hidrofóbicas y adsorción por interacciones iónicas (Palomo *et al.*, 2004; Fernández-Lorente *et al.*, 2001a; Fernández-Lorente *et al.*, 2001b). Así mismo, Cabrera

et al., (2008), demostraron que el derivado comercial Novozym 435, correspondiente a la lipasa de *Candida antarctica* B inmovilizada en la resina Lewatit, presentaba muy distintas selectividades de hidrólisis de diferentes ésteres comparado a la misma lipasa inmovilizada en soportes hidrofóbicos. Bastida *et al.*, (1998) reportan el aumento en la enantioselectividad de hidrólisis de etil- α -hidroxifenil butirato cuando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* es inmovilizada en un soporte hidrofóbico.

Sumado a lo anterior, se ha demostrado que la zona por dónde se realiza la inmovilización también es relevante en la modificación de la selectividad de la lipasa, tal como reporta Palomo *et al.*, (2003b) con la lipasa de *Mucor miehei* inmovilizada en resinas epóxidas heterofuncionales. La inmovilización de esta lipasa a través de los residuos de lisina localizados lejos del centro activo, no altera su selectividad, mientras que la inmovilización vía residuos de histidina próximos al *lid*, puede influir en el cambio conformacional de la lipasa modulando su actividad y su selectividad. La presencia de metales de Cu (II) quelantes inmovilizados cerca de un anillo de epóxico orienta los residuos de histidina hacia el soporte, lo que resulta en el cambio conformacional (apertura del *lid*) y la activación de la lipasa en la superficie hidrofóbica.

1.4.3 Tipos de inmovilización aplicados a lipasas

Conforme a lo analizado anteriormente se han desarrollado un gran número de sistemas de inmovilización de enzimas. Existe abundante información sobre los distintos métodos de inmovilización como la adsorción, la unión covalente, el entrecruzamiento, la inclusión en geles y la retención por membranas (Illanes, 1994; Buchholz, 2005), los cuales serán analizados en función de su aplicación a lipasas en las secciones siguientes.

Inmovilización de lipasas mediante adsorción

La práctica más usada de inmovilización de lipasas para diferentes aplicaciones es la adsorción, probablemente debido a que es la técnica de más fácil realización (ocurre en un solo paso), es de bajo costo y se tiene una menor pérdida de actividad inmovilizada, por ejemplo, en comparación a la unión covalente. Un aspecto importante es que mediante esta técnica de inmovilización es posible recuperar el soporte. Como desventaja presenta la desorción de la enzima en ciclos repetidos de reacción; sin embargo, para sistemas no acuosos, la desorción de la enzima por lo general es menor, pudiéndose utilizar este tipo de inmovilización a escala industrial (Malcata *et al.*, 1990).

La unión de la enzima al soporte se realiza por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, dependiendo del tipo de soporte utilizado como matriz de inmovilización. En la actualidad se reportan una gran diversidad de soportes para la inmovilización de lipasas por adsorción; soportes sintéticos o naturales, de distintas formas y tamaños, de estructuras porosas y no porosas, y de diferentes hidrofobicidades. Ejemplo de éstos son: alúmina, sílice, celita, cerámica, óxidos metálicos, vidrio poroso, agarosa, celulosa, zeolitas, polietileno, polipropileno, poliestireno y nylon por nombrar algunos.

La adsorción de lipasas en los distintos soportes depende de factores como el pH, fuerza iónica, punto isoeléctrico de la lipasa, y principalmente la hidrofobicidad del soporte. Normalmente, la afinidad de las lipasas frente a un soporte aumenta con la hidrofobicidad de su superficie y su desorción ocurre con mayor facilidad desde las superficies hidrofílicas que desde las hidrofóbicas.

Comúnmente se pueden obtener derivados con una carga enzimática de 2 a 50 mg de proteína por gramo de soporte. No obstante, Villeneuve *et al.*, (2000) reportan la inmovilización de lipasas a una alta carga de 170 mg de proteína por gramo de soporte, pero según lo estudiado por Palomo *et al.*, (2003a) a tales condiciones de alta carga proteica pueden aparecer limitaciones de tipo estérico y de pérdida de actividad enzimática por efectos de dimerización de las lipasas.

Inmovilización de lipasas mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas

Guisán *et al.*, (1999) en la patente europea WO/1999/051726 presentan un nuevo tipo de soportes hidrofóbicos para la inmovilización de lipasas con una gran actividad y estabilidad incluso en medios acuosos o en mezclas acuosas con solventes. Estos soportes de materiales hidrofílicos, están recubiertos químicamente con una capa muy densa y bien definida de grupos hidrofóbicos, donde la lipasa puede reconocer estas superficies hidrofóbicas de un modo similar a como se reconocen las interfases hidrofóbicas líquidas de sus sustratos naturales, consiguiéndose la activación interfacial de la lipasa, tal como se muestra en la Figura 1.4.

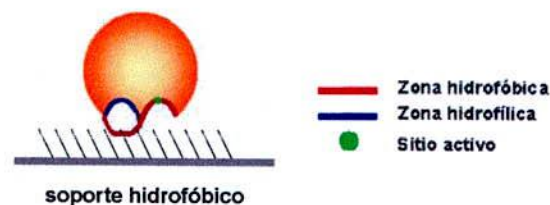


Figura 1.4. Esquema de la adsorción de lipasas sobre soportes hidrofóbicos

La interacción entre la enzima y el soporte se efectúa a través del gran bolsillo hidrofóbico que se encuentra en los alrededores del centro activo, con lo que se consigue la activación interfacial de la lipasa. Los soportes poseen gran superficie interna dada por poros de diámetro superior a 100 Å que permiten la activación de la lipasa sin bloquear el centro activo. Las matrices hidrofílicas utilizadas en la fabricación de estos soportes, como la agarosa o polímeros sintéticos, contienen una gran cantidad de grupos hidroxilo activos, a través de los cuales se realiza la unión covalente con los grupos hidrofóbicos destinados a recubrirlas. Tales grupos que confieren la característica hidrofobicidad al soporte, formados a partir los glicidil éteres de hidrocarburos alifáticos o aromáticos de diferentes tamaños de cadena (de C4 a C18), son: butil, hexil, fenil, octil, decil, dodecil, decabutyl, decahexil o decaoctil, preferentemente octil o decaoctil.

Por otro lado, los autores reportan que la adsorción de las lipasas al soporte resulta fuerte y estable, siendo resistentes a prolongados lavados en continuo. Adicionalmente, la enzima puede desorberse del soporte, mediante incubación de los derivados en agentes tensoactivos, lo que produce la liberación completa de la enzima, permitiendo recuperar el soporte.

Sumado a lo anterior, los autores proponen que la inmovilización en estos soportes hidrofóbicos está asociada a la purificación de lipasas, ya que a baja fuerza iónica la mayoría de las proteínas no se adsorben en soportes hidrofóbicos; a diferencias de las lipasas que se adsorben muy rápidamente en dichas condiciones. De este modo, cuando se contacta un extracto impuro de lipasas con estos soportes hidrofóbicos a baja fuerza iónica, se logra que todas las proteínas con actividad lipásica se adsorban muy rápidamente mientras el resto de las proteínas permanecen sin inmovilizar.

Finalmente, los autores reportan que con estos soportes hidrofóbicos se pueden obtener derivados con una carga de hasta 30 mg de una proteína de tamaño medio (60 kDa) por mL de soporte.

Fernández-Lafuente *et al.*, (1998) y Bastida *et al.*, (1998), estudiaron el fenómeno de hiperactivación de las lipasas, que consiste en el gran aumento de su actividad catalítica en comparación a la actividad que presentan en su forma soluble y que se produce en la mayoría de las lipasas cuando son adsorbidas en soportes hidrofóbicos. Se ha demostrado que esta característica está asociada con los cambios conformacionales de la enzima hacia una estructura abierta del *lid* dejando el sitio activo más accesible al sustrato. De igual modo, Palomo *et al.*, (2002b), evaluaron los soportes hidrofóbicos octil-agarosa y octadecil-sepabeads para la inmovilización de lipasas de *Candida antarctica* (fracción B), *Mucor miehei* y *Candida rugosa*, donde evidenciaron un aumento de la actividad de hasta 20 veces en las lipasas inmovilizadas en comparación a las lipasas en forma soluble.

Como contraparte a la inmovilización por interacción hidrofóbica, la adsorción de lipasas en superficies más hidrofílicas puede dar lugar a deformaciones estructurales de la molécula, imposibilitando la apertura de la *lid* con la consiguiente disminución de actividad catalítica, que según lo reportado por Malcata *et al.*, (1991) puede llegar hasta un 30%.

Inmovilización mediante adsorción por interacciones iónicas

En este tipo de inmovilización el principio de unión entre la lipasa y el soporte es la adsorción por intercambio iónico de grupos de la superficie de la enzima con grupos iónicos de una matriz funcionalizada, que suele ser agarosa, celulosa, sílice u otros. Este intercambio iónico puede ser de tipo aniónico o catiónico y de interacciones débiles o fuertes. Un ejemplo de intercambio aniónico fuerte es el caso de la adsorción en soportes como Q-sepharose y DEAE-agarosa en los cuales la agarosa se encuentra altamente entrecruzada y funcionalizada con grupos amino cuaternario y con grupos dietilaminoetil como grupos de intercambio respectivamente, mostrados en la Figura 1.5.

También se han desarrollado soportes de intercambio aniónico débil como MANAE-agarosa donde la agarosa está funcionalizada con grupos monoaminoetil-N-aminoetil (Pessela *et al.*, 2004)

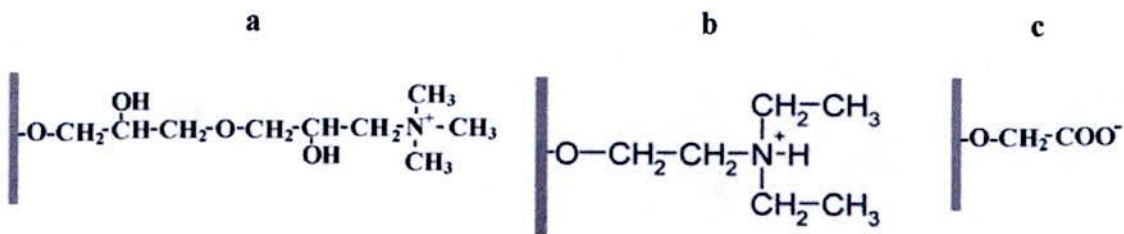


Figura 1.5. Grupos de intercambio iónico, a) Q-Sepharose (aniónico fuerte), b) DEAE-agarosa (aniónico fuerte), c) CM-Agarosa (catiónico)

Así mismo, como ejemplo de intercambio catiónico se tiene la adsorción en agarosa funcionalizada con el grupo carboximetil para el intercambio iónico, representado en la Figura 1.5 c.

El grado de adsorción de la lipasa puede mejorarse mediante el uso de soportes recubiertos con polímeros poliiónicos. El uso de polímeros permite aumentar la carga del soporte, generándose además un lecho flexible que puede adaptarse a la enzima involucrando un gran porcentaje de la superficie de ésta (Mateo *et al.*, 2000; Fuentes *et al.*, 2004). Un ejemplo de estos soportes son glioxil-agarosa con PEI, en el cual el intercambio es de tipo aniónico; y agarosa recubierta con dextrano-sulfato, donde el intercambio es de tipo catiónico, tal como se representa en la Figura 1.6 glioxil-agarosa-PEI se construye recubriendo la matriz, en este caso glioxil-agarosa 4BCL, con un

polímero poliónico como la polietilenimina (PEI), mientras que agarosa-DxSO₄, la matriz, en este caso agarosa 4BCL, es recubierta con polímeros poliónicos como el dextrano sulfato (Dx-SO₄)

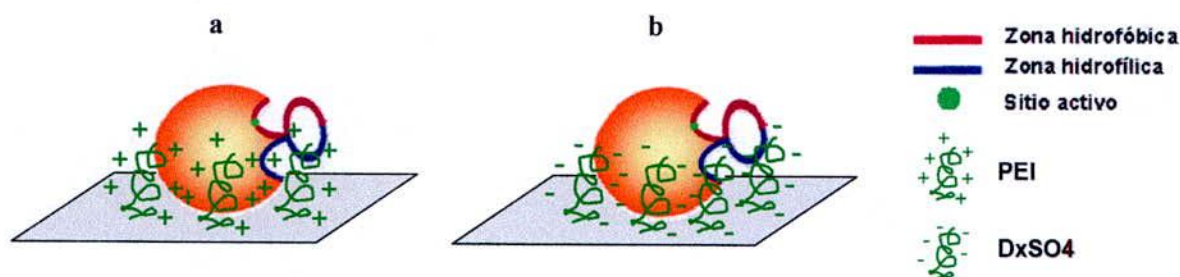


Figura 1.6. Esquema de inmovilización de lipasas en soportes iónicos obtenidos a partir de matrices recubiertas con polímeros poliónicos, a) glioxil-agarosa-PEI, b) agarosa-DxSO₄

Inmovilización de lipasas mediante unión covalente

Este tipo de inmovilización se basa en la unión covalente de los grupos reactivos de la superficie de la lipasa a grupos funcionales de un soporte químicamente activado. Tiene como principales ventajas que impide la desorción de la enzima y aumenta la estabilidad de ésta, sin embargo este método de inmovilización conlleva generalmente pérdidas de actividad de la enzima. Otra limitación no menos importante es que es de alto costo de implementación y su proceso de preparación complejo. Si bien está establecido que no es posible recuperar el soporte (como tal), recientemente se han estudiado estrategias de reactivación de derivados, analizadas en la sección 1.6, que tienen como objetivo la reutilización de éstos biocatalizadores.

Entre los soportes más utilizados en este tipo de inmovilización están agarosa, celulosa, almidón, quitina, polímeros sintéticos y varios soportes inorgánicos. Sin embargo, dichos soportes, no poseen grupos reactivos para el enlace directo de la enzima (grupos hidroxilo, amino, amida, y carboxilo). El enlace covalente por lo general es formado por moléculas activas que actúan como puente, tales como bromocianógeno (CNBr) y entrecruzantes bi-o polifuncionales como el glutaraldehído.

Inmovilización de lipasas mediante unión covalente a agarosa activada con bromocianógeno

La inmovilización de lipasas a este soporte ocurre por la unión de un amino reactivo de la superficie de la enzima, que normalmente es el amino-terminal, con el éster de cianato formado tras la activación de la agarosa con CNBr, como se ilustra en la Figura 1.7.

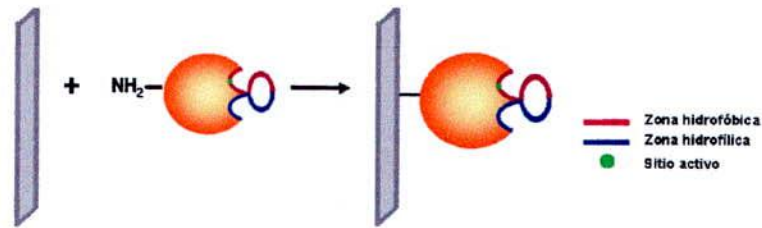


Figura 1.7. Inmovilización unipuntual de lipasas a CNBr-agarosa

El procedimiento se realiza a pH neutro y a tiempos cortos para evitar que se produzca un mayor número de uniones, por lo que se estima que esta unión es unipuntual y no provoca modificaciones en la estructura de la lipasa (Mateo *et al.*, 2005; Fernández-Lorente *et al.*, 2007). De modo de bloquear los grupos reactivos remanentes del soporte, y con ello no alterar el microentorno deseado para la lipasa, el proceso de inmovilización se termina con una incubación con etanolamina.

Inmovilización de lipasas mediante unión covalente a glioxil-agarosa

Este soporte se obtiene a partir de la activación de la agarosa con grupos glioxil como se ha descrito por Mateo *et al.*, (2005). En condiciones alcalinas, el soporte activado permite inmovilizar proteínas provocando una orientación de éstas, debido a que los grupos aldehídos del soporte se unen con los grupos aminos reactivos (lisinas, amino terminal) de la superficie de la enzima con mayor densidad de éstos. Las uniones formadas por bases de *Schiff* entre los aldehídos y los aminos son débiles, razón por la cual el procedimiento se termina con una reducción del derivado con borohidruro de sodio. Con ello se consigue que la enzima quede inmovilizada muy establemente por medio de varias uniones covalentes de los aminos secundarios y los grupos aldehídos remanentes del soporte son convertidos en grupos hidroxilos inertes (Mateo *et al.*, 2006), como se muestra en la Figura 1.8.

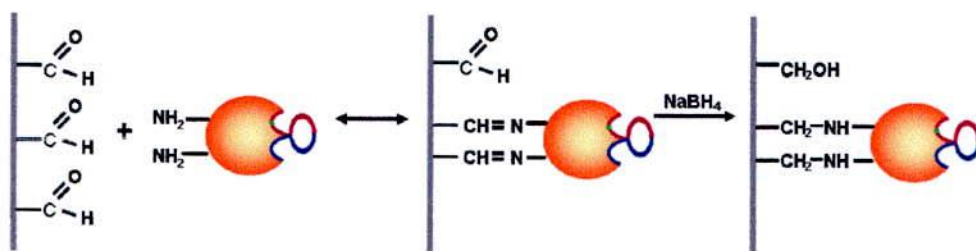


Figura 1.8. Inmovilización covalente de lipasas a glioxil-agarosa

De modo de incrementar el número de aminas reactivas que interaccionen con el soporte, la lipasa puede ser sometida a una aminación química de su superficie, técnica propuesta por López-Gallego *et al.*, (2005), mediante la cual los grupos carboxilos libres de la superficie de la enzima (por ejemplo carboxilo terminal, aspártico y glutámico) forman enlaces con los grupos aminos primarios de la etilendiamina (EDA). Esta reacción es catalizada por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), y se representa en la Figura 1.9.



Figura 1.9. Reacción de aminación química de la superficie de enzimas

Para evitar una posible interferencia de la aminación sobre la activación interfacial y exposición del sitio activo de la lipasa, el proceso de aminación se realiza sobre la enzima previamente inmovilizada en el soporte hidrofóbico octil-agarosa, tal como ilustra la Figura 1.10. Posteriormente la lipasa se desorbe en una solución de tensoactivo y la solución con la enzima desorbida se somete a la inmovilización en glioxil agarosa.

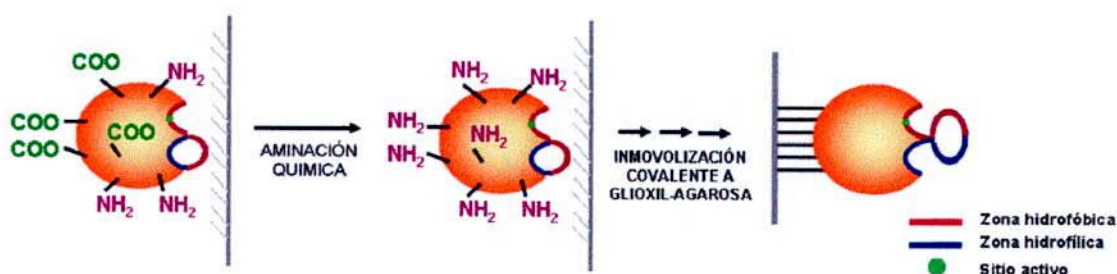


Figura 1.10. Inmovilización multipuntual de lipasas a glioxil-agarosa

Inmovilización de lipasas mediante entrecruzamiento molecular

La inmovilización por entrecruzamiento se basa en la unión de la enzima mediante agentes entrecruzantes bi o polifuncionales, lo que en general permite aumentar la estabilidad de la enzima, pero, dado el complejo proceso de preparación posee hasta ahora poca aplicabilidad industrial.

Dentro de este tipo de inmobilizados se encuentran los CLEAs, producidos por la agregación física de enzimas precipitadas en condiciones no denaturantes y por el entrecruzamiento químico de los agregados, tal como se muestra en la Figura 1.11.

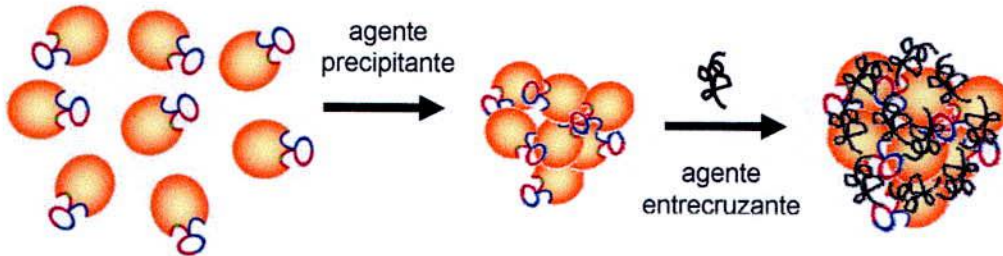


Figura 1.11. Esquema de la preparación de CLEAs

La precipitación se puede realizar con sulfato de amonio, polímeros no iónicos como el polietilenglicol (PEG) y solventes orgánicos como el terbutanol (Cao *et al.*, 2003; Sheldon *et al.*, 2007). Para el entrecruzamiento químico, que da lugar a la formación de un agregado insoluble, se utiliza comúnmente glutaraldehído. A pH neutro o ligeramente alcalino (pH del proceso de entrecruzamiento) se forman polímeros de glutaraldehído insaturados que interaccionan con los grupos amino de las proteínas (Wong, 1993).

López-Serrano *et al.*, (2002), utilizaron siete enzimas comerciales para inmobilizarlas en forma de CLEA. Para la formación de CLEA de las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* y *Rhizomucor miehei*, los autores realizaron la precipitación con sulfato de amonio en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS) y el entrecruzamiento con glutaraldehído, logrando un aumento en la actividad de hidrólisis de tres y dos veces respectivamente, con respecto a las enzimas en su forma soluble.

En otro aspecto, Wilson *et al.*, (2006), proponen que la preparación de CLEA de las lipasas comerciales de *Alcaligenes sp.* y *Candida antarctica* B, no es del todo efectiva debido a que puede ocurrir cierto desprendimiento de los agregados probablemente a que no todas las enzimas se ligan de manera correcta. De modo de evitar este tipo de limitaciones, los investigadores proponen la coprecipitación de las lipasas con polímeros poliiónicos, como PEI o PEI-dextrano sulfato. Uno de los resultados observados fue que tanto las condiciones de precipitación como la naturaleza de los polímeros, incide significativamente en la actividad catalítica, la enantioselectividad y en la especificidad de las lipasas.

Inmovilización de lipasas mediante confinamiento

Otro método empleado en la inmovilización de lipasas es el confinamiento de éstas ya sea por la inclusión en geles o por retención en membranas, como se representa en la Figura 1.12.

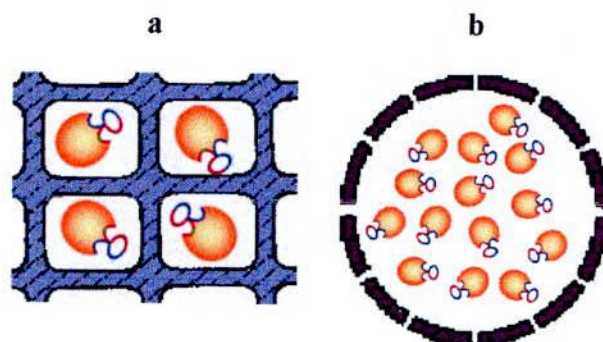


Figura 1.12. Esquema de la inmovilización de lipasas mediante confinamiento a) inclusión en geles, b) retención por membranas

En la inmovilización por inclusión en geles, la enzima se sitúa en una matriz polimérica que permite la difusión de sustrato y productos. Este método supone una menor pérdida de actividad del biocatalizador pero una de las mayores limitaciones es la ocurrencia de mayores restricciones difusionales. Algunas de las matrices usadas son polímeros naturales como alginato, gelatina, carragenina y agarosa, quitina y quitosano (Knežević *et al.*, 2002; Betigeri y Neau, 2002; Stamatidis y Xenakis, 1999; Chiou y Wu, 2004). Knežević *et al.*, (2002) mediante la técnica de extrusión electrostática produjeron soportes de alginato de diámetro pequeño de menos de 1 mm, de modo de minimizar las restricciones difusionales. Los investigadores lograron obtener derivados de *Candida rugosa* con un 75% de la actividad referida a la actividad de la enzima soluble, los cuales fueron utilizados en la hidrólisis de aceite de palma en un sistema microacuoso.

Otro tipo de matrices utilizadas para la inmovilización por inclusión son aquellas hechas a partir de polímeros sintéticos como resinas fotoreticulables, prepolímeros de poliuretano y polímeros acrílicos como poliacrilamida. Kimura *et al.*, (1983), estudiaron la inmovilización de la lipasa de *Candida cylindracea* mediante inclusión en resinas prepoliméricas fotoreticulables y prepolímeros de uretano. Como resultado obtuvieron que el derivado formado con la resina prepolimérica fotoreticulable fue el que obtuvo la mayor actividad. Sin embargo dicha actividad catalítica correspondió a sólo un 30% de la actividad de la enzima soluble.

En la inmovilización mediante retención por membranas, las lipasas que se encuentran en forma soluble, son separadas del medio de reacción por una membrana. Las membranas utilizadas comúnmente son orgánicas de origen sintético, en configuraciones de reactor de fibra hueca o plana. Esta estrategia presenta evidentes ventajas tales como la separación simultánea de sustratos y productos, y la disminución de restricciones difusionales. Sin embargo, aun se presenta como una alternativa de alto costo de implementación y de operación compleja; no obstante, cada vez son más las investigaciones que apuntan a la optimización de estos sistemas.

El uso de reactores de membrana aplicados a sistemas bifásicos, puede evitar dificultades técnicas y económicas, tales como la inactivación de la enzima por la intensa agitación para formar emulsiones y la contaminación de los productos por el uso de tensoactivos. Además el uso de esta modalidad de inmovilización de lipasas permite la operación continua del proceso con gran estabilidad de funcionamiento (Giorno y Drioli, 2000). Una de las aplicaciones más frecuentes en este tipo de inmovilización ha sido el estudio de hidrólisis de grasas y aceites (Rice *et al.*, 1999).

Hoq *et al.*, (1985) y Pronk *et al.*, (1988) reportaron sistemas para la hidrólisis de grasas mediante reactores de fibra hueca de carácter hidrofóbico, donde la lipasa fue inmovilizada en la membrana por el lado de contacto agua-glicerol. Por otra parte, van der Padt *et al.*, (1990) reportan la utilización de estos sistemas con membranas hidrofílicas para la síntesis de acilgliceroles y la hidrólisis de triglicéridos.

Ambos sistemas de membrana (hidrofóbicos e hidrofílicos) tienen ventajas y limitaciones según la aplicación específica en sistemas de hidrólisis o síntesis, dado principalmente por las características del sustrato y de los productos, no estando del todo claro cual de las modalidades se presenta como la más adecuada para una aplicación industrial.

1.4.4 Lipasas inmovilizadas aplicadas a la modificación de triacilglicéridos

Desde hace ya un par de décadas que la utilización de lipasas inmovilizadas, mediante las distintas técnicas y diversos soportes, ha sido estudiada con el fin de optimizar la modificación de TAG.

En la Tabla 1.3 se resumen algunas de las publicaciones con las aplicaciones más relevantes en el área.

Tabla 1.3. Modificación de triacilgliceroles utilizando lipasas inmovilizadas

Lipasa	Método de inmovilización	Soporte*	Aplicación	Referencia
ASL	entrecruzamiento	fibras de seda / glutaraldehído	hidrólisis de aceite de girasol	Chatterjee <i>et al.</i> , (2009)
BCL	entrecruzamiento	CLEA	hidrólisis/transesterificación de β -citronelol	Majumder <i>et al.</i> , (2008)
CALB (Novozym 435)	adsorción	lewatit	esterificación de AGPICL- ω -3	Kosugi y Azuma (1994)
CALB (Novozym 435)	adsorción	lewatit	transesterificación de aceite de microalgas	Robles-Medina <i>et al.</i> , (1999)
CCL	adsorción	carbón activado	hidrólisis de grasa láctea	Park <i>et al.</i> , (1985)
CCL	adsorción	celita / amberlita IRA-938	hidrólisis aceite de oliva	Sagiroglu <i>et al.</i> , (2004)
CCL	adsorción	nylon	hidrólisis de aceite de babassu	Merçon <i>et al.</i> , (2000)
CCL	inclusión en gel	poliacrilamida / agarosa	hidrólisis de TAG	Tahoun <i>et al.</i> , (1986)
CCL	unión covalente	CPG-glutaraldehído	hidrólisis aceite de oliva	Kimura <i>et al.</i> , (1983)
CCL	unión covalente	microesferas magnéticas	hidrólisis de aceite de oliva	Liu <i>et al.</i> , (2005)
CRL	adsorción	duolita A568	esterificación de colesterol con DHA	Jonzo <i>et al.</i> , (2000)
CRL	adsorción	kaolin	esterificación de aceite de oliva y butanol	Abdul Rahman <i>et al.</i> , (2005)
CRL	adsorción	sephadex	hidrólisis de aceite de oliva	Kang <i>et al.</i> , (1989)
CRL	Inclusión en gel	hypol FHP 2002	hidrólisis de aceite de oliva	Ferreira-Dias <i>et al.</i> , (1999)
CRL	unión covalente entrecruzamiento	quitosano-EDC	hidrólisis de aceite de soya	Ting <i>et al.</i> , (2006)
CVL	adsorción	celita	esterificación de TAG ricos en DHA	Tanaka, <i>et al.</i> , (1994)
CVL	unión covalente	eudragit S-100	esterificación de alcoholes y ácidos grasos	Rodrigues <i>et al.</i> , (2002)
GCL	adsorción	sílica gel	esterificación de aceite de borraja con GLA	Foglia y Sonnet, (1995)

Tabla 1.3 (continuación). Modificación de triacilgliceroles utilizando lipasas inmovilizadas

Lipasa	Método de inmovilización	SopORTE*	Aplicación	Referencia
GSL	adsorción	DEAE-celulosa	acidólisis de ácido oleico y tripalmitina	Guncheva <i>et al.</i> , (2009)
MJL	retención en membrana	membrana hidrofóbica	interesterificación de aceite de oliva y grasa de manteca	Balção <i>et al.</i> , (1998)
MML (Lipozyme IM)	adsorción	resina aniónica	esterificación selectiva de AGPI de desechos de conservas de sardina	Schmitt-Rozieres <i>et al.</i> , (2000)
MML (Lipozyme IM)	adsorción	resina aniónica	transesterificación de AGPICL- ω 3 de aceite de hígado de bacalao y de microalga	Cerdán <i>et al.</i> , (1998)
MML (Lipozyme IM)	adsorción	resina aniónica	hidrólisis de aceite de pescado para obtención de MAG sn-2 de AGPICL	Nieto <i>et al.</i> , (1999)
PCL y CRL	retención en membrana	membrana hidrofílica	hidrólisis de aceite de oliva	Giorno <i>et al.</i> , (1997)
PFL	adsorción	dowex MWA-1	hidrólisis, esterificación y transesterificación de AGPICL- ω 3	Rakshit <i>et al.</i> , (2000)
RML	adsorción	duolita	esterificación de AGPICL- ω 3	Loders Crokiaan <i>et al.</i> , (1996a) y (1996b)
TLL (Lipozyme TL IM)	adsorción	silíce granulada	formulación de alimento infantiles (BETAPOL)	Chew <i>et al.</i> , (2008)
TLL	Inclusión en gel	matriz sol-gel de silicato	hidrólisis de aceite de palma	Hsu <i>et al.</i> , (2004)
			alcoholisis de TAG	

*SopORTE sólido salvo el caso de CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*), ASL: lipasa de *Aspergillus sp.*, BCL: lipasa de *Burkholderia cepacia*, CALB: lipasa de *Candida Antarctica* fracción B, CCL: lipasa de *Candida cylindracea*, CRL: lipasa de *Candida rugosa*, CVL: lipasa de *Chromobacterium viscosum*, GCL: lipasa de *Geotrichum candidum*, GSL: lipasa de *Geobacillus stearothermophilus*, MJL: lipasa de *Mucor javanicus*, MML: lipasa de *Mucor miehei*, PCL: lipasa de *Pseudomonas cepacia*, PFL: lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, RML: lipasa de *Rhizomucor miehei*, TLL: lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, CPG: *controlled pore glass*, DEAE: dietilaminoetil, EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidroclicridato, PEG: polietilenglicol, AGPICL- ω 3: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3, TAG: triacilglicéridos, DHA: ácido docosahexaenóico, GLA: ácido gama-linolénico, MAG: monoacilglicéridos.

1.5 USO DE SOLVENTES EN REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS

En los sistemas bifásicos de biocatálisis, existe una relevante relación entre los diferentes componentes del sistema que inciden directamente en el microentorno de la lipasa, tal como se ilustra en la Figura 1.13.

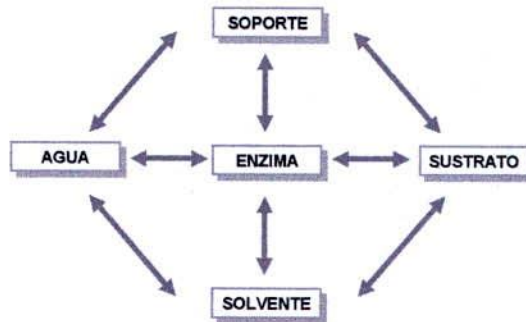


Figura 1.13. Relación entre los componentes involucrados en un sistema bifásico de reacción con enzima inmovilizada

La interacción entre solventes y la monocapa de agua ligada a la superficie de la enzima controlaría su actividad, puesto que se ha demostrado que las enzimas necesitan una pequeña cantidad de agua para mantener su conformación activa, independientemente si se encuentran inmovilizadas o no. En ausencia total de agua la enzima presenta una estructura rigidizada que no le permite efectuar los cambios conformacionales indispensables para la catálisis. Por ende, a mayor contenido de agua mayor libertad de movimiento pero también mayor probabilidad de desnaturizarse (Carta *et al.*, 1991; Basheer *et al.*, 1995; Klivanov, 2001). El fenómeno denominado *water stripping* o secuestro de agua, provocaría la inactivación de las enzimas ya que se produce la ruptura del enlace entre el agua ligada y la proteína (Zaks y Klivanov, 1988). La monocapa de agua ligada contribuye a la integridad estructural, como se mencionó, además de la modulación de la polaridad del sitio activo, y también puede limitar la solubilidad de sustratos hidrofóbicos en torno enzima, como el caso de las lipasas (Triantafyllou *et al.*, 1995).

El efecto de la actividad de agua en las reacciones catalizadas por las lipasas ha sido estudiado por Halling (1989), Gorman y Dordick, (1992) y Gulati *et al.*, (2003). Por ejemplo, Dudal *et al.*, (1995) demostraron que la actividad catalítica de la lipasa de *Mucor miehei* en disolventes orgánicos disminuía para ciertos valores de actividad termodinámica de agua (*aw*). Así también los trabajos realizados por Nurok *et al.*, (1999), Tejo *et al.*, (2004) y James *et al.*, (2007) apuntan a que los cambios estructurales que sufren las lipasas por el tipo de inmovilización y por la

presencia de solventes en la reacción, podrían influir en su capacidad catalítica y/o modular su selectividad dado el cambio en su microentorno.

En otro aspecto, se ha propuesto que la naturaleza del solvente puede influir en el cambio de la rigidez de la enzima y en la variación en las interacciones iónicas que establece la proteína (Affleck *et al.*, 1992a; Affleck *et al.*, 1992b). Por ejemplo, el solvente puede estabilizar las cargas en el estado de transición cambiando la polaridad del sitio activo, así como también puede modificar la variación de la energía libre total, la cual se asocia con las diferentes energías de solvatación del solvente (Gupta, 1992; Lang *et al.*, 1996). En la literatura, no hay un consenso claro sobre la elección del parámetro para describir cuantitativamente el efecto del solvente en reacciones catalizadas por enzimas. No obstante, Laane *et al.*, (1987), establecieron un criterio comúnmente utilizado, basado en el parámetro $\log P_{\text{oct}}$, que se define como el logaritmo del coeficiente de reparto de disolvente en un sistema octanol/agua. Según los investigadores, los solventes con $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ son hidrofílicos y no son adecuados debido a que perturban fuertemente la interacción de la monocapa esencial de agua con la proteína, inactivándola por la distorsión de su estructura. Solventes con $\log P_{\text{oct}}$ de entre 2 y 4 son menos hidrofílicos y la perturbación de la interacción de la monocapa de agua con la enzima es menor, afectando su estructura de manera impredecible. Finalmente aquellos solventes con un $\log P_{\text{oct}}$ de más de 4, considerados hidrofóbicos, no interaccionan con la monocapa de agua, permitiendo que el biocatalizador permanezca activo. Así también, parámetros como la constante dieléctrica (ϵ) (Gupta, 1992; Affleck *et al.*, 1992b), la polaridad (Valivety *et al.*, 1991), el parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ) (Brink y Tramper, 1985) y la solubilidad tridimensional (Schneider, 1991), han sido propuestos para evaluar la influencia del solvente en reacciones catalizadas tanto por enzimas inmovilizadas como en forma soluble.

En otro punto, Costa *et al.*, (1999) estudiaron los principales aspectos relacionados con el hecho de que el solvente puede alterar la especificidad, quimioselectividad, regioselectividad, la selectividad proquiral y la enantioselectividad de las lipasas. Varios modelos han sido propuestos para explicar este fenómeno, los cuales se basan principalmente en el cambio de la flexibilidad conformacional del sitio activo y a la partición del sustrato o de los grupos funcionales de la molécula del solvente dentro o fuera de las cavidades del sitio activo. Es así como Jesus *et al.*, (1997), Ottosson *et al.*, (2002), Yadav y Latthi, (2003) reportan diferentes comportamientos en la selectividad de las lipasas en reacciones en presencia de solventes.

1.6 ESTRATEGIAS DE REUTILIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES

El desarrollo de técnicas de inmovilización ha sido importante para procurar la reutilización de las enzimas, de modo de obtener un biocatalizador con una actividad y estabilidad que no sean afectadas durante el proceso, en comparación a su forma libre; esperando por ende, factores económicos favorables. Sin embargo, en ciertas ocasiones la utilización de enzimas inmovilizadas implica un aumento de los costos que no se compensa con el aumento de su estabilidad que permite su uso en lotes seriados.

Por esta razón, es que se han planteado algunas estrategias para la reactivación de derivados, especialmente aquellos formados por uniones covalentes, que han sido inactivados o parcialmente inactivados luego de su uso como biocatalizadores.

Ejemplos de aquello es lo que reporta Soler *et al.*, (1997). Los autores postulan que la inactivación de derivados enzimáticos en presencia de medios orgánicos a pH neutro y temperaturas moderadas, se debe principalmente a los cambios conformacionales en su estructura. Sin embargo, cuando estos derivados parcial o totalmente inactivados, son reincubados en medios acuosos, presentan una lenta e incompleta reactivación debido al replegamiento incorrecto de su estructura, causado probablemente por una barrera cinética que impide el replegado espontáneo a la conformación inicial. Por esta razón los autores propusieron la estrategia de desplegar las formaciones incorrectas de las enzimas mediante agentes denaturantes como la urea o guanidina, para posteriormente promover el correcto replegado mediante una reincubación en medio acuoso. Para ello utilizaron derivados covalentes de quimotripsina inmovilizada multipuntualmente y parcialmente inactivados por solventes, los que fueron sometidos a la estrategia de reactivación vía desdoblamiento y replegamiento de la proteína. Los derivados recuperaron hasta el 100% de su actividad inicial en 10 minutos, comprobándose también que en ciclos sucesivos de despliegue y repliegue de la estructura proteica, estos resultados podían ser reproducidos.

Bolívar *et al.*, (2010), estudiaron la reactivación de la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima multimérica, cuya inactivación esta directamente relacionada con la disociación de sus subunidades. Los investigadores reportan que, tras la aplicación de la estrategia de reactivación consistente en la inactivación total de GDH (por incubación en solución de guanidina saturada) y posterior resuspensión en condiciones de pH y temperatura adecuadas, de todos los derivados evaluados, con GDH inmovilizada multipuntualmente en glioxil-agarosa, se obtuvo una reactivación que permitió recuperar el 100% de la actividad enzimática inicial.

Las estrategias de reactivación han sido también evaluadas en lipasas tal como lo reportado por Rodrigues *et al.*, (2009). En este estudio se demostró que la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada covalentemente en bromocianógeno-agarosa, puede ser totalmente inactivada cuando se incuba en soluciones saturadas de guanidina, y luego cuando esta enzima inactivada es re-incubada en medio acuoso, el 20% de su actividad puede ser recuperada por varios ciclos. Sin embargo, cuando la actividad se determina en presencia de un detergente (CTAB, un activador de esta enzima), se recupera el 100% de la actividad inicial. Los autores comprobaron también que al inactivar la lipasa en disolventes orgánicos y a altas temperaturas, la inactivación fue más rápida cuando la actividad se determinó en ausencia de detergente. Con estos resultados los autores postulan que el estado de la configuración abierta de la estructura de la lipasa constituye un aspecto clave en la estabilización de ésta.

En otro aspecto, se ha mencionado anteriormente que dentro de las técnicas de inmovilización, la adsorción es la de mayor potencial comercial ya que los soportes utilizados, en su mayoría son mecánicamente resistentes y pueden ser reutilizados haciendo más competitivo el proceso frente a la utilización de la enzima en forma libre. No obstante, en la actualidad no se encuentran reportes directamente relacionados al uso de soportes reciclados tras ciclos de operación, ni de su eventual reuso tras ciclos de regeneración; siendo entonces interesante generar información sobre el potencial de reutilización de las matrices usadas en este tipo de inmovilización enzimática.

De lo que sí se tiene amplia información es acerca de los métodos de regeneración de matrices de inmovilización usadas en cromatografía como octyl-sepharose, soporte hidrofóbico usado en la inmovilización de lipasas. En el manual¹ de procedimiento y preparación de dicho soporte se indica que se produce la elución de las proteínas adsorbidas al reducir la interacción hidrofóbica, lo cual se puede lograr mediante la disminución de la concentración de iones con un buffer en gradiente, eluyendo con un solvente orgánico no-polar (por ejemplo etilenglicol o isopropanol) e incluir detergentes en el eluyente. La regeneración de la matriz cuando se tienen proteínas desnaturalizadas o lípidos se produce utilizando una disolución de detergentes no iónicos (por ejemplo Triton X-100) en lavados sucesivos, para finalizar con lavados de disoluciones de etanol, de modo de eliminar restos de detergente.

¹ GE Healthcare Instructions 71-7081-00 AD. Octyl Sepharose CL-4B, hydrophobic interaction chromatography

1.7 RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A partir de los antecedentes expuestos se resume lo siguiente:

- Tras la evidencia de los múltiples beneficios a la salud de la suplementación de ácidos grasos EPA y DHA en la dieta, se ha buscado la forma de obtener concentrados de estos ácidos grasos Omega 3 para ser comercializados como nutracéuticos o componentes en alimentos funcionales.
- También ha sido ampliamente discutido el hecho de que los ésteres de AGPICL- ω 3 presentan una absorción prácticamente nula y que los AGPICL- ω 3 en su forma libre son más susceptibles a sufrir degradaciones oxidativas. Por esta razón se postula que la forma más adecuada de suministro corresponde a AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos, es decir esterificados con glicerol, idealmente en la posición sn-2, ya que son mejor absorbidos y sufren menos degradaciones.
- La modificación enzimática de TAG de aceite de pescado, aceite considerado una excelente fuente de EPA y DHA, ha sido propuesta como alternativa a la hidrólisis y/o síntesis química para la obtención de concentrados de Omega-3. La hidrólisis de TAG de aceite de pescado presenta la ventaja de utilizar una simple reacción con un único sustrato, a diferencia de la reacción de esterificación en la cual se requieren dadores de acilo como etil-ésteres o alcoholes. Sin embargo, mediante esta vía no se alcanzan concentraciones de Omega-3 como las obtenidas por esterificación, siendo éste un campo para optimizar, tanto en lo relativo a las condiciones de operación como en el tipo de enzima utilizada.
- Se ha demostrado que las lipasas no específicas utilizadas en la modificación de TAG de aceite de pescado, presentan una menor velocidad de hidrólisis de AGPICL- ω 3. Este comportamiento de hidrólisis preferencial de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados en desmedro de la hidrólisis de los poliinsaturados, puede deberse a un impedimento estérico de la enzima para llegar al enlace éster del ácido graso, lo que se explicaría a su vez por la conformación de la molécula del AGPI que, por el mayor número de instauraciones, es espacialmente más plegada.
- En sistemas bifásicos de biocatálisis, existe una relevante relación entre los componentes del sistema que inciden directamente en el microentorno de la lipasa. Es así como se ha establecido que la inmovilización de lipasas, lograda mediante numerosas estrategias y

soportes, además de aumentar su estabilidad conlleva una posible modulación de su selectividad. De igual modo, la presencia de solventes en el medio de reacción puede alterar la especificidad, quimioselectividad, regioselectividad, la selectividad proquiral y la enantioselectividad de las lipasas. Hasta la fecha, no se reportan investigaciones que hagan referencia explícita a la modificación del microentorno de la lipasa para modular la selectividad de hidrólisis de TAG de aceite de pescado y concentrar AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos.

- El reuso del biocatalizador es un aspecto clave para la aplicación industrial de estas tecnologías. En virtud de ello, se han propuesto estrategias para la reactivación de derivados formados por uniones covalentes, tipo de inmovilización en la cual el soporte no puede ser reutilizado; y por otra parte, cuando la inmovilización de la enzima se realiza por adsorción, se plantea la reutilización del soporte de modo de hacer más competitivo el proceso en términos de costos. No obstante, en la actualidad no se encuentran reportes relacionados al uso de soportes reciclados tras ciclos de reacción, haciéndose interesante generar información sobre el real potencial de reutilización de las matrices usadas en este tipo de inmovilización enzimática.

U.T.F.S.M. •
BIBLIOTECA CENTRAL

Capítulo 2
Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Para la realización de la presente tesis doctoral que lleva por título se plantea la siguiente hipótesis y objetivos:

2.1. HIPÓTESIS

La modificación del microentorno de lipasa causada por su inmovilización y por el uso de solventes en el medio de reacción, modula la selectividad de ésta, permitiendo obtener a partir de la hidrólisis de triglicéridos de aceite de pescado, perfiles de concentración de EPA y DHA en glicéridos distintos a los obtenidos con la lipasa en forma soluble.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Establecer un proceso biotecnológico de hidrólisis enzimática de aceite de pescado que contemple la reutilización del biocatalizador, implementando estrategias de inmovilización y de ingeniería del medio que conlleven a la obtención un mayor contenido de EPA y DHA en glicéridos en comparación a lo obtenido con la lipasa en forma soluble.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar a partir de diferentes lipasas aquella con el mayor potencial de hidrólisis sobre triacilglicéridos de aceite de pescado mediante parámetros como velocidad específica de hidrólisis de ácidos grasos y porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos.
2. Definir las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis de triacilglicéridos de aceite de pescado y concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos con la lipasa seleccionada.

- 3 Evaluar diferentes soportes y estrategias de inmovilización de lipasas para la hidrólisis de triacilglicéridos de aceite de pescado y concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos, en función de parámetros como la selectividad de hidrólisis y actividad específica del derivado formado, así como también su estabilidad térmica, en solventes y operacional.
- 4 Evaluar el uso de solventes y co-solventes en el medio de reacción para la hidrólisis de triacilglicéridos de aceite de pescado y concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos, en función de la selectividad de hidrólisis, estabilidad térmica y estabilidad operacional del biocatalizador.
- 5 Determinar la capacidad de reutilización del soporte de inmovilización tras ciclos de lotes de reacción en función de la estabilidad del biocatalizador y la capacidad de carga del soporte reciclado.
- 6 Determinar el sistema de reacción apropiado (tipo de inmovilización y modificación del medio de reacción) para la reacción de hidrólisis enzimática de triacilglicéridos de aceite de pescado en varios lotes y ciclos de operación en función de la comparación de sus costos.



Capítulo 3
Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. METODOLOGÍA ANALÍTICA

3.1.1. Obtención de ácidos grasos libres del aceite de pescado para la determinación de su perfil de composición

La determinación del perfil de ácidos grasos contenidos en el aceite de pescado, cuya composición se detalla en el Anexo 2, se realizó mediante su saponificación y posterior extracción basándose en los métodos 994.10 AOAC y 972.28 AOAC (AOAC, 2000). En la Figura 3.1 se muestran las etapas que contempla este procedimiento.

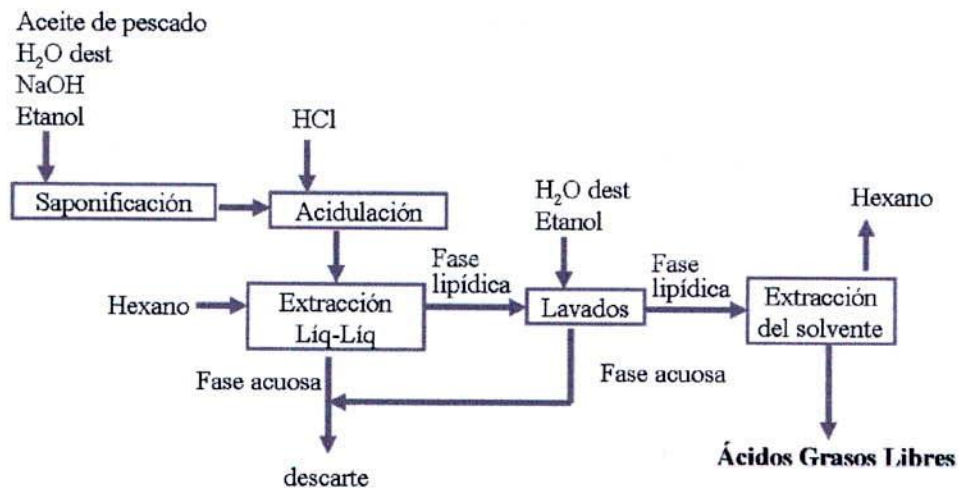


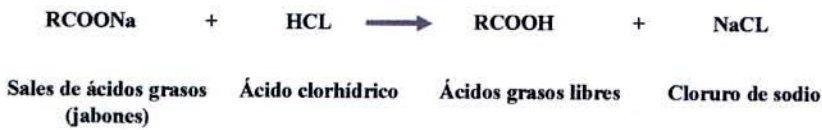
Figura 3.1. Procedimiento para la obtención de ácidos grasos libres del aceite de pescado

La Ecuación 3.1 muestra la reacción de saponificación, la cual se realiza a alta temperatura con reflujo por un período de dos horas. La cantidad de hidróxido de sodio adicionada corresponde a la estequiométrica para saponificar la masa de aceite de pescado con un exceso del 25%, la proporción de agua aceite es por lo general 1:1 y la cantidad de etanol adicionado es la requerida para formar una solución etanólica de NaOH 0,5 N, que es lo recomendado en el método 920.160 AOAC para la determinación del índice de saponificación (AOAC, 2000).



Ecuación 3.1

El aceite saponificado es acidulado (Ecuación 3.2) con ácido clorhídrico en la cantidad estequiométrica a la soda adicionada, contemplando un exceso del 25%, de modo de obtener la totalidad de las sales de ácidos grasos obtenidos en la saponificación, en su forma libre.



Ecuación 3.2

Posterior a la acidulación se realiza una extracción líquido-líquido con algún solvente como hexano. La extracción se puede repetir las veces necesarias para asegurar el total contenido de ácidos grasos libres en la fase lipídica. El solvente se extrae de la fase lipídica con un rotavapor, donde la masa obtenida corresponde a los ácidos grasos libres.

3.1.2. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa²

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases HP6890 Series II (Hewlett-Packard, USA), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un inyector split/splitless. Las temperaturas del inyector y detector fueron 300 y 320°C respectivamente, el volumen de inyección fue de 0,5 µL a una razón de split de 1:30. Se utilizó una columna de metilfenilpolisiloxano HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) y helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. Los ácidos grasos, previa derivatización con N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida, fueron cuantificados utilizando como patrón interno β-sitosterol al 64%.

² Las muestras analizadas por medio de esta técnica corresponden a aquellas obtenidas en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Härtling S.A., cuyo procedimiento de análisis de datos fue desarrollado en esta investigación.

Para la determinación del porcentaje de hidrólisis a partir del análisis cromatográfico GC, se planteó el balance de masa mostrado en la Figura 3.2 y definido por las ecuaciones presentadas a continuación.

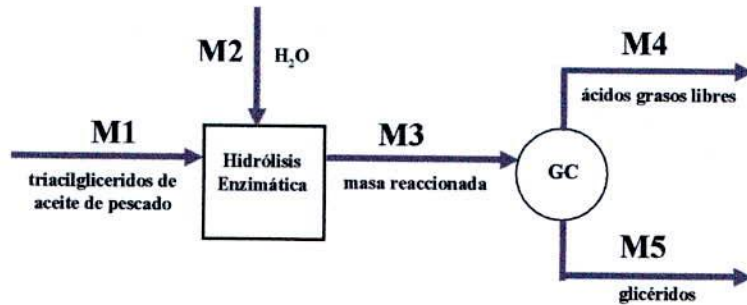


Figura 3.2. Sistema para la determinación del porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado

Balance de masa

$$M1 + M2 = M3 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

$$M4 = M3 * X \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$M5 = M3 * (1 - X) \quad \text{Ecuación 3.5}$$

Balance de masa por componente

$$M1 * x_i^1 = M4 * x_i^4 + M5 * x_i^5 \quad \text{Ecuación 3.6}$$

$$M1 * x_i^1 * X_i = M4 * x_i^4 \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$M1 * x_i^1 * X_i = M3 * x_i^3 \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Relaciones entre variables

$$X = \frac{\sum x_i^3}{\sum x_i^1} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

$$k = 1 + \frac{18}{PM} \quad \text{Ecuación 3.10}$$

$$M3 = M1 * k_h \quad \text{Ecuación 3.11}$$

$$\overline{PM} = \frac{\sum (x_i^3 * PM_i)}{X} \quad \text{Ecuación 3.12}$$

Donde M_j , con j de 1 a 5, representa la masa de la corriente respectiva, X corresponde al porcentaje de hidrólisis, x_i^j corresponde al contenido expresado como porcentaje de un determinado ácido graso libre (i) en la corriente M_j y X_i es el porcentaje de hidrólisis de un ácido graso. El peso molecular de cada ácido graso se representa por PM_i mientras que el peso molecular promedio se representa por \overline{PM} . El factor k representa la ganancia en masa dada por la hidratación en la reacción de hidrólisis la cual se plantea en las Ecuaciones 3.13 y 3.14.

$$M2 = M1 * X * \frac{18}{PM} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

$$M3 = M1 * \left(1 + X * \frac{18}{PM} \right) \quad \text{Ecuación 3.14}$$

Si $X = 0$, es decir si no hay conversión, obviamente $M3$ es igual a $M1$. Si $X = 1$, la Ecuación 3.14 queda expresada por la Ecuación 3.11. Para efectos de resolución del sistema de ecuaciones se consideró el valor de k_h independiente del grado de conversión (con $X = 1$), según se describe en la Ecuación 3.10.

De las áreas entregadas por el cromatograma, se puede obtener x_i^j mediante el cálculo mostrado en la Ecuación 3.15.

$$x_i^j = \frac{A_i * f_i * S_{int} * P}{A_s * m_{TAG}} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

Dónde A_i corresponde al área de un determinado ácido graso cuantificado, f_i factor de respuesta cromatográfico del ácido graso i , S_{int} a la masa de estándar interno, p a la pureza del estándar interno, A_s al área del estándar interno y m_{TAG} a la masa de muestra inyectada. Cabe señalar que la masa de muestra está en base a la molécula de triacilglicérido. Por tanto, cuando se analiza directamente ácidos grasos libres, como es el caso de la determinación del perfil inicial de ácidos grasos que componen el aceite de pescado (x_i^j , cuya obtención se detalla en la sección 3.1 del presente capítulo), debe realizarse la corrección que contempla la dilución por la molécula de glicerol, según se muestra en al Ecuación 3.16.

$$m_{TAG} = \frac{m_{AGL}}{0,96} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

Dónde m_{AGL} es la masa de muestra en base ácido graso libre y 0,96 corresponde a la fracción másica de ácidos grasos de la molécula de triacilglicérido.

De los balances de masa se obtiene:

i. Porcentaje de hidrólisis de un ácido graso

$$X_i = k_h * \frac{x_i^3}{x_i^1} \quad \text{Ecuación 3.17}$$

ii. Porcentaje de un ácido graso en forma libre después de la reacción enzimática

$$x_i^4 = \frac{x_i^1 * X_i}{k_h * X} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

iii. Porcentaje de un ácido graso en forma de glicérido después de la reacción enzimática

$$x_i^5 = \frac{x_i^1 * (1 - X_i)}{k_h * (1 - X)} \quad \text{Ecuación 3.19}$$

3.1.3. Determinación del perfil de ácidos grasos mediante HPLC³

Las muestras fueron analizadas en un HPLC (Thermo Separation Products) con detector de dispersión de partículas, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) Sedex 75, operado a 30°C, 3 bar de presión de inyección de nitrógeno para nebulización y ganancia de 8. Cabe destacar que este detector no había sido usado para esta aplicación con anterioridad puesto que fue necesario instaurar el protocolo de puesta a punto para toda la metodología analítica. Para la separación de los ácidos grasos se utilizó una columna Ultrabase C18 (250 mm) termostatada a 40°C. La fase móvil utilizada se componía de dos soluciones; A: 98% de acetonitrilo en agua miliQ y B: 95% de acetonitrilo en propanol, operada secuencialmente según se detalla en el Anexo 2.

El cálculo del porcentaje de hidrólisis de ácidos grasos a partir de la cuantificación por HPLC-ELSD se realizó determinando la concentración de cada ácido graso disponible a reaccionar

³ Las muestras analizadas por medio de esta técnica corresponden a aquellas obtenidas en el Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC, en el marco de la pasantía doctoral, cuyo procedimiento de análisis de datos fue desarrollado en esta investigación.

(C_i^{TAG}) y la concentración de ácidos grasos liberados tras la reacción de hidrólisis (C_i^{AGL}), según lo muestra la Ecuación 3.20.

$$X_i = \frac{C_i^{TAG}}{C_i^{AGL}} * 100 \quad \text{Ecuación 3.20}$$

3.1.4. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de actividad enzimática se realizó mediante el método descrito por Gilham y Lehner (2005), el cual correlaciona la liberación de p-nitrofenol (Figura 3.3) con la actividad enzimática de hidrólisis del enlace éster de ésteres de p-nitrofenil. El aumento de absorbancia, producto de la liberación de p-nitrofenol en la hidrólisis de una solución de p-nitrofenil butirato, se midió a 348 nm utilizando un espectrofotómetro termostataado a 30°C con agitación magnética.

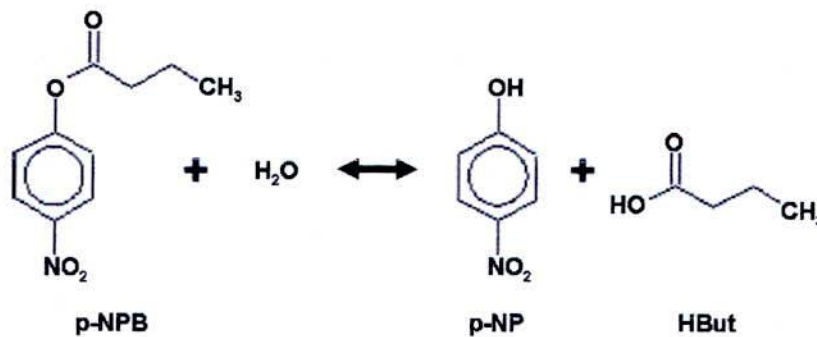


Figura 3.3. Reacción de hidrólisis de ésteres de p-nitrofenil utilizada para la determinación de actividad enzimática

Una unidad de actividad (U) sobre p-NPB se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de p-NPB/min en las condiciones descritas. El protocolo de procedimiento y curva de calibración de este análisis se encuentra en el Anexo 3.

Todas las mediciones de actividad se realizaron al menos en duplicado, y los valores de actividad reportados corresponden al promedio de éstos cuando la desviación estándar fuese menor a 10%.

3.1.5. Determinación del contenido de proteínas

La determinación del contenido de proteína total se realizó utilizando el *kit* de determinación de proteínas BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Thermo Fisher Scientific, USA).

El método que es compatible con formulaciones con detergentes, se basa en la combinación de la reacción de Biuret, en la cual se produce reducción de Cu^{2+} a Cu^{+1} en medio alcalino, con la detección colorimétrica del catión cuproso mediada por el ácido bicinconínico, como se muestra en la Figura 3.4.

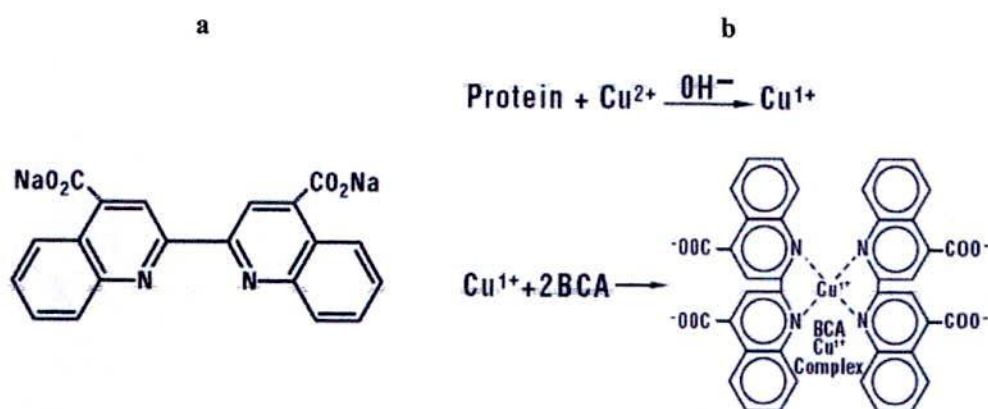


Figura 3.4. Esquema de la reacción del ácido bicinconínico del kit de determinación de proteínas BCA™, a) ácido bicinconínico, b) pasos de la reacción

El complejo formado por la quelación de dos moléculas de BCA con el ion cuproso es de color púrpura y absorbe a 562 nm linealmente a la concentración de proteína en un rango de 20 a 2.000 mg/mL.

El protocolo de procedimiento de este análisis y la curva de calibración realizada con albúmina de suero bovino (BSA) se detalla en el Anexo 4.

Todas las mediciones se realizaron al menos en duplicado, y los valores reportados corresponden al promedio de éstos cuando la desviación estándar fuese menor a 10%.

3.1.6. Identificación de CCL mediante Electroforesis SDS-PAGE

Se identificó CCL mediante una electroforesis de proteína desnaturalizada en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior tinción Coomassie. La poliacrilamida se forma por

copolimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formando una red de porosidad uniforme, que puede ser regulada. Este sistema electroforético es discontinuo, formado por dos geles de distinta porosidad y pH.

El gel superior o compactador, donde se depositan las muestras, primero las compacta y luego en el gel inferior o separador, estas son separadas. En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros de acrilamida del gel. Para separar componentes de alto peso molecular, se utilizan geles al 5% o 7,5%, mientras que los geles de poro menor (15-20%) son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) son adecuados para la separación de proteínas de 10 a 90 kDa, como es el caso de la lipasa en el presente estudio

En la técnica de SDS-PAGE, las proteínas se mezclan con el detergente aniónico SDS de modo de formar complejos desnaturalizados cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño; utilizando una proporción aproximada de 1,4 g SDS/g proteína. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas, anulándose su carga intrínseca, estas van a ser separadas en el gel poroso únicamente en base a sus diferencias de peso molecular, donde a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína.

Para evidenciar la migración de las proteínas en el gel se realiza una tinción con azul de Coomassie. El reactivo azul de Coomassie tiene la capacidad de complejarse con ciertos aminoácidos básicos como arginina, tirosina, lisina e histidina proporcionando una sensibilidad de detección proteica y además posee la ventaja de su fácil distinción del gel utilizando agua miliQ.

El protocolo de procedimiento de preparación y tinción de geles se detalla en el Anexo 5.

3.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La Figura 3.5 muestra un esquema de la experimentación realizada en el presente estudio, la cual se basa en la comparación y evaluación de la hidrólisis de aceite de pescado mediante diferentes sistemas de reacción utilizando la lipasa en forma soluble e inmovilizada bajo diferentes estrategias que modifican su microentorno, con el fin de disponer de un proceso con aplicabilidad industrial para la obtención de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga.

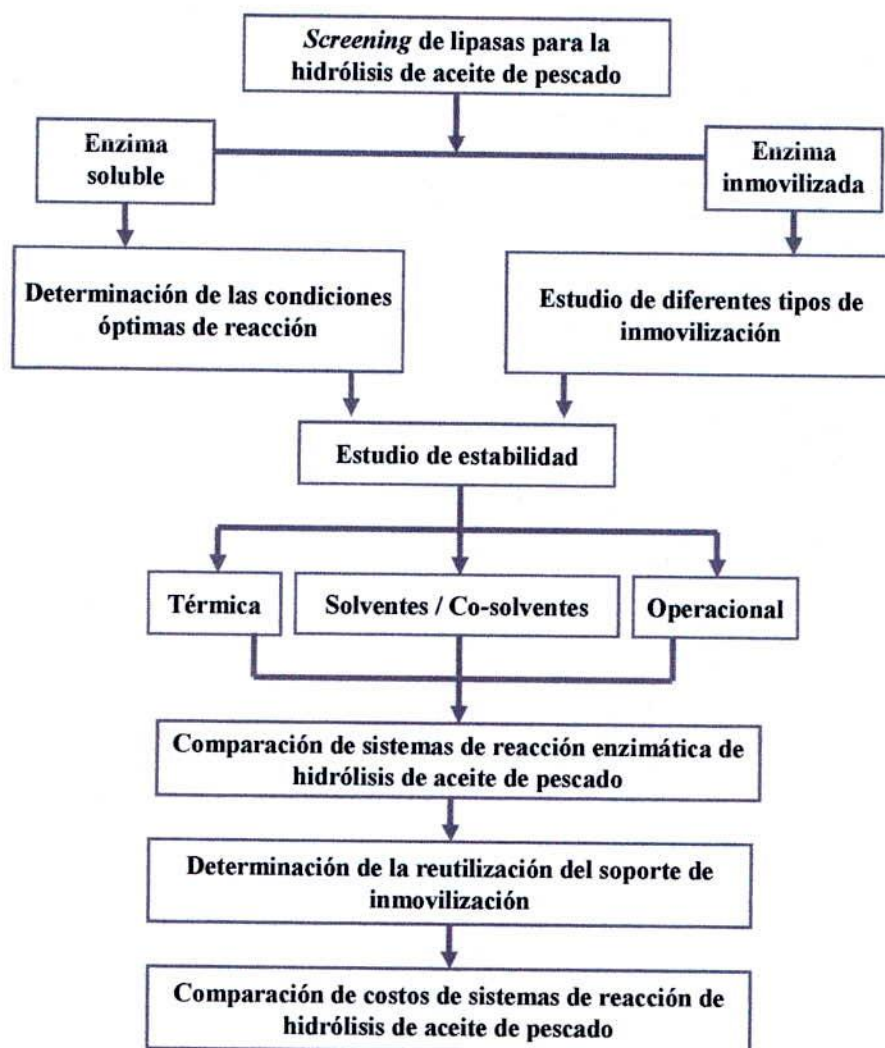


Figura 3.5. Esquema de la metodología experimental

3.2.1. Sistemas de reacción enzimática de hidrólisis de aceite de pescado

Todas las reacciones de hidrólisis de aceite de pescado, salvo en las que se evaluaron diferentes temperaturas y concentraciones de enzima, se realizaron a 37°C y con una concentración de lipasa tal para alcanzar 35 U de actividad enzimática por gramo de aceite a hidrolizar. Los sistemas de reacción bifásicos evaluados correspondieron a SR I, SR II y SR III; en los cuales se mantuvo una razón fase acuosa / fase lipídica de 1:1. La composición de las fases acuosas y lipídicas para los diferentes sistemas de reacción evaluados se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Sistemas de reacción evaluados para la hidrólisis de aceite de pescado

Sistema de reacción	Lipasa	Fase acuosa	Fase lipídica
SR I	Soluble	Tampón fosfato sódico 200 mM, pH 7	Aceite de pescado
SR II	Inmovilizada		
SR III	Inmovilizada	Solución pH 7 ❖ 40% PEG en tampón fosfato sódico 200 mM	Solución 1:4 AP / hexano

❖ Para muestras analizadas mediante HPLC-ELSD se utilizó tampón TRIS 100 mM pH 7, de modo de evitar la interferencia que produce el fosfato en el detector ELSD. AP: aceite de pescado, PEG: polietilenglicol

El aceite de pescado utilizado fue provisto por South Pacific Korp (SPK) correspondiente a aceite de jurel, mientras que el aceite de pescado usado en los ensayos realizados con derivados iónicos correspondió a aceite de sardina provisto por el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. La composición de ácidos grasos de ambos aceites se detalla en el Anexo 1.

La reacción de hidrólisis se mantuvo bajo agitación constante de modo de tener una dispersión de fases homogénea. Las muestras de la dispersión fueron tomadas periódicamente y la fase lipídica fue analizada previa separación por centrifugación.

La velocidad específica de hidrólisis (ve_i) de los ácidos grasos se obtuvo calculando la pendiente de la zona lineal generada al graficar el porcentaje de hidrólisis del ácido graso (X_i) por gramo de enzima soluble o de derivado (M_{cat}) según corresponda, en el tiempo, a tiempos iniciales de reacción (cinco primeras horas de reacción), tal como se muestra en la Ecuación 3.21.

$$ve_i = \frac{\left. \frac{X_i}{M_{cat}} \right|_{t_f} - \left. \frac{X_i}{M_{cat}} \right|_{t_0}}{t_f - t_0}$$

Ecuación 3.21

El índice de selectividad (IS) corresponde al cociente entre la velocidad específica de hidrólisis de los ácidos grasos que componen el aceite de pescado exceptuando EPA+DHA y la velocidad específica de hidrólisis de EPA+DHA, según se muestra en la Ecuación 3.22.

$$IS = \frac{ve_{no(EPA + DHA)}}{ve_{EPA + DHA}} \quad \text{Ecuación 3.22}$$

3.2.2. Screening de lipasas para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3

En la Tabla 3.2 se describen las diferentes lipasas evaluadas según su selectividad frente a los AGPICL- ω 3, ya sea mediante una hidrólisis preferencial de éstos o mediante su concentración en forma de glicéridos. Para ello se realizaron reacciones de hidrólisis bajo la modalidad de SR I.

Tabla 3.2. Lipasas evaluadas para la hidrólisis de aceite de pescado

Lipasa	Origen	Estereoespecificidad de corte	Proveedor
Lipozyme TL-100	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	sn-1 y sn-3	
Novozym 388	<i>Rhizomucor miehei</i>	sn-1 y sn-3	Novozyme
Novozym 735	<i>Candida antarctica (lipasa A)</i>	no específica	
Lipozym CALB	<i>Candida Antarctica (lipasa B)</i>	no específica	
AY	<i>Candida rugosa</i>	no específica	
F-AP-15	<i>Rhizopus javanicus</i>	sn-1 y sn-3	Amano
PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	sn-1 y sn-3	
Lipomod 338P	<i>Penicillium roqueforti</i>	sn-1 y sn-3	
Lipomod 34P	<i>Candida cylindracea</i>	no específica	Biocatalyst
Lipomod 691P	<i>Candida sp. / Rhizopus sp.</i>	no específica / sn-1 y sn-3	
Lipolyve AN	<i>Aspergillus niger</i>	sn-1 y sn-3	Liven
Lipolyve CC	<i>Candida cylindracea</i>	no específica	
TL	<i>Pseudomona stutzeri</i>	sn-1 y sn-3	Meito Sangyo

3.2.3. Determinación de las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis enzimática de aceite de pescado

La determinación de las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis enzimática de aceite de pescado, se realizó a partir de un diseño experimental factorial 2^4 no replicado para estudiar cuatro factores con dos niveles cada uno (alto y bajo), los cuales fueron fijados por medio de

experimentos previos de carácter exploratorio y datos bibliográficos (Osorio *et al.*, 2001). Los diseños factoriales permiten estudiar de manera simultánea el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas; lo que resulta más exacto y eficiente que la experimentación tradicional de variar un efecto a la vez, la cual no permite evidenciar efectos de interacción entre los factores en estudio (Gutiérrez y de la Vara, 2003).

Los factores evaluados fueron temperatura, pH, concentración de enzima en base aceite de pescado y razón fase acuosa (w) / fase lipídica (o), tal como se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Parámetros a optimizar para la reacción de hidrólisis de aceite de pescado

Factores	Niveles	
	Bajo (-)	Alto (+)
A (x ₁) pH	6,5	7,5
B (x ₂) W:O	1:1	1:10
C (x ₃) [E] (U/g AP)	3,5	35
D (x ₄) T (°C)	25	37

W: fase acuosa, O: fase lipídica, [E] concentración de enzima en términos de actividad, T: temperatura

En el Anexo 6 se detalla, la matriz de experimentación derivada del diseño experimental factorial 2⁴ con dos niveles para cada factor.

Como respuesta a maximizar se consideró el porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado y la concentración de EPA+DHA en glicéridos, las cuales fueron descritas por los polinomios de respuesta como lo muestra la Ecuación 3.23.

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_5 + a_6x_6 + a_7x_7 + a_8x_8 + a_9x_9 + a_{10}x_{10} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

Donde a_{0,j} corresponden los coeficientes de efectos de los factores y sus interacciones los cuales se calculan según la Ecuación 3.24.

$$a_j = \frac{\sum_{i=1}^{n2^k} Y_i * x_j}{n2^k} \quad \text{Ecuación 3.24}$$

Las interacciones de tres factores en adelante, se incluyeron en el error ya que éstos resultan muy pequeños, lo cual permite generar 5 grados de libertad para el error. La significancia de los efectos se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) usando la distribución de probabilidad *F*. La información para calcular el estadístico *F*₀ se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tabla de análisis de varianza para el diseño factorial 2^k no replicado

FV	SC	GL	CM	F0	p-value
Tratamientos	$SC_{TRAT} = \frac{\sum_{i=1}^{n2^k} Y_i^2}{n2^k}$	$GL_{TRAT} = n$	$CM_{TRAT} = \frac{SC_{TRAT}}{GL_{TRAT}}$	$\frac{CM_{TRAT}}{CM_E}$	$P(F > F_0)$
Error	$SC_E = SC_T - SC_{TRAT}$	$GL_E = n_e$	$CM_E = \frac{SC_E}{GL_E}$		
Total	$SC_T = \sum_{i=1}^{n2^k} Y_i^2 - \frac{Y^2}{n2^k}$	$GL_T = n2^k - 1$			

FV: fuentes de variabilidad (efectos), **SC:** suma de cuadrados, **GL:** grados de libertad, **CM:** cuadrados medios, **F0:** estadístico de prueba, **p-value:** significancia observada, **Y:** respuesta observada, **k:** número de efectos estudiados, **n:** número de experimentos.

Los ANOVA para cada respuesta se realizaron a 3 tiempos de reacción de hidrólisis: 3,5 h, 7 h y 22 h, de modo de evaluar si la influencia de los factores cambiaba en el tiempo

3.2.4. Diferentes tipos de inmovilización aplicados a la lipasa de *Candida cylindracea*

CCL fue inmovilizada utilizando diversos protocolos de acuerdo al principio de inmovilización aplicado: inmovilización por adsorción mediante interacciones hidrofóbicas, inmovilización por adsorción mediante interacciones iónicas e inmovilización por enlace covalente.

El rendimiento de inmovilización para todos los soportes evaluados en términos de actividad enzimática (RI) fue determinado como se describe en la Ecuación 3.25.

$$RI = \frac{ABI - ASN}{ABI} * 100 \quad \text{Ecuación 3.25}$$

Dónde ABI corresponde a la actividad del blanco de inmovilización (U/mL) el cual consiste en la solución de enzima en previa la inmovilización; ASN corresponde a la actividad medida en el sobrenadante de la suspensión de inmovilización (U/mL).

A su vez, el rendimiento en términos de proteína inmovilizada (RIP) fue determinado como se describe en la Ecuación 3.26.

$$RIP = \frac{PSE - PSN}{PSE} * 100 \quad \text{Ecuación 3.26}$$

Dónde PSE corresponde a la concentración de proteína medida en la solución de enzima ofrecida a la inmovilización (mg/L); PSN corresponde a la concentración de proteína medida en el sobrenadante de la suspensión de inmovilización (mg/L).

La actividad específica (a_s) de cada derivado se determinó según la Ecuación 3.27.

$$a_s = \frac{AS * V_{IM}}{M_{cat}} \quad \text{Ecuación 3.27}$$

Dónde AS corresponde a la actividad de la suspensión de derivado (U/mL) en tampón fosfato sódico 25 mM pH 7 (en relación de 1 g de derivado por 10 mL de tampón), V_{IM} al volumen de inmovilización y M_{cat} a la masa de derivado en la suspensión (g).

Inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas

El protocolo de inmovilización de CCL por adsorción hidrofóbica se detalla en el Anexo 7. Los soportes usados y la denominación del derivado formado, se describen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas

Soporte	Descripción	Derivado
Octil-agarosa (Octyl Sepharose™ CL-4B)	Soporte usado en cromatografía de interacción hidrofóbica. El grupo octil está covalentemente unido por enlace éter a la matriz de agarosa 4% entrecruzada, confiriéndole hidrofobicidad a su superficie, sin propiedades iónicas	O-CCL
Butil-sepabeads (SEPABEADS® EC-BU)	Soporte esférico altamente poroso constituido por una matriz entrecruzada de polímero metacrílico. El grupo butilo está unido covalentemente a la matriz, confiriéndole una superficie hidrofóbica	B-CCL
Octadecil-sepabeads (SEPABEADS® EC-OD)	Soporte esférico altamente poroso constituido por una matriz entrecruzada de polímero metacrílico. El grupo octadecil está unido covalentemente a la matriz, confiriéndole una superficie hidrofóbica	OD-CCL
Lewatit (Lewatit VP OC 1600)	Resina esférica macroporosa cuya matriz de metacrilato se encuentra entrecruzada con divinilbenceno	L-CCL
Celita	Soporte conocido también como tierra de diatomeas (restos fósiles) está constituido por rocas silíceas sedimentarias de alta porosidad que presentan una estructura superficial hidrofóbica	C-CCL

De modo de evaluar la influencia del cambio en el microentorno de la lipasa sobre su actividad, se estudió la adsorción hidrofóbica combinada con entrecruzamiento con polímeros funcionales. La estrategia de entrecruzamiento apunta también a evitar una posible desorción de la lipasa desde el soporte. Los polímeros polifuncionales utilizados para el entrecruzamiento y la denominación de los derivados formados, se describen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Polímeros funcionales utilizados en el entrecruzamiento de los derivados O-CCL

Polímero	Descripción	Derivado
Dextrano sulfato (DxSO4 100.000 Da)	La unión entre el polímero de DxSO4 y la superficie de la enzima químicamente aminada se logra mediante una interacción iónica de carácter catiónico	O-CCL-NH2-DxSO4
Dextrano aldehído (DxCHO 100.000 Da)	Los grupos aldehídos del polímero de DxCHO reaccionan covalentemente con los grupos aminos de la superficie de la enzima	O-CCL-NH2-DxCHO

La modificación de la superficie de la enzima mediante aminación química permite incrementar los puntos de unión de la lipasa con el polímero polifuncional que genera una especie de red sobre la enzima inmovilizada, tal como ilustra la Figura 3.6.

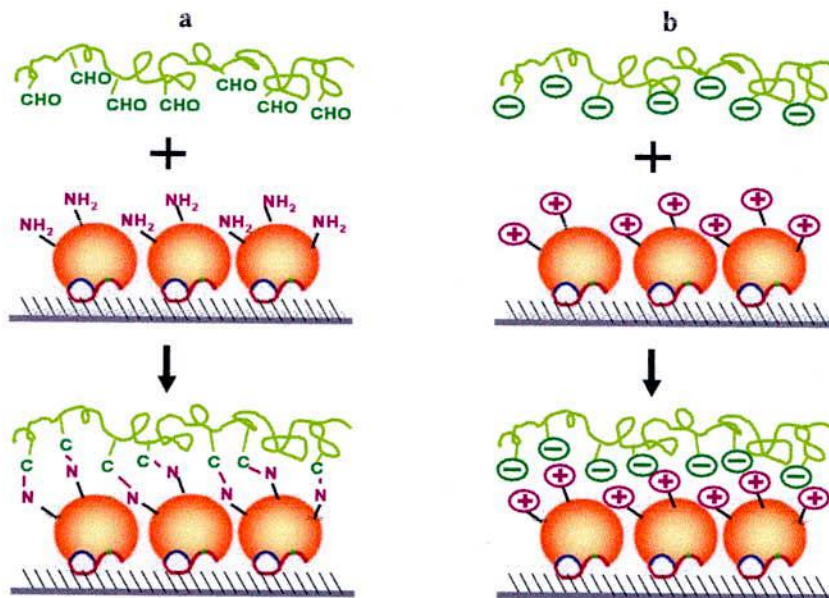


Figura 3.6. Inmovilización de lipasas en soporte hidrofóbico y entrecruzamiento con polímeros polifuncionales, a) con dextrano aldehído b) con dextrano sulfato

El protocolo de activación del polímero de dextrano aldehído, descrito previamente por Betancor *et al.*, (2004), la estrategia de aminación química de la superficie enzima propuesta por López-Gallego *et al.*, (2005) y el entrecruzamiento con polímeros funcionales de los derivados de octil-agarosa se detallan en el Anexo 7.

Inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones iónicas

Los soportes utilizados para la inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones iónicas y la denominación del derivado formado, se describen en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones iónicas

Soporte	Descripción	Derivado
Q-Sepharose	Intercambiador aniónico fuerte, cuya matriz de agarosa se encuentra altamente entrecruzada y funcionalizada con un grupo amino cuaternario	Q-CCL
MANAE-Agarosa	Intercambiador aniónico débil, cuya matriz de agarosa se encuentra funcionalizada con grupos monoaminoetil-N-aminoetil	M-CCL
CM-Agarosa	Intercambiador catiónico débil, cuya matriz de agarosa se encuentra funcionalizada con grupos carboximetil	CM-CCL
Glioxil-agarosa-PEI	Soporte iónico formado por una matriz de glioxil-agarosa 4BCL recubierta con el polímero poliiónico polietilenimina (PEI), generando un intercambiador iónico de tipo aniónico	Gx-PEI-CCL
Agarosa-DxSO4	Soporte iónico formado por una matriz de agarosa 4BCL recubierta con el polímero poliiónico dextrano sulfato (Dx-SO4), generando un intercambiador iónico de tipo catiónico	C-CCL

Según el tipo de adsorción iónica (aniónica o catiónica), la lipasa podría orientarse de maneras diversas durante la inmovilización, afectando su reactividad y su mecanismo de activación interfacial. De modo de evaluar dicho efecto, se realizó la inmovilización de la lipasa en MANAE-Agarosa y Q-Sepharose en presencia de lauril-sucrosa (0,3% en tampón fosfato 5 mM pH 7). Este éster de ácido graso de cadena corta otorga un mayor grado de hidrofobicidad en el medio de inmovilización, lo que podría llevar a la inmovilización de tipo iónica pero con la conformación abierta y reactiva de la lipasa, producto del fenómeno de activación interfacial.

El protocolo de activación de soportes con polímeros funcionales e inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones iónicas se detalla en el Anexo 7.

Inmovilización de CCL mediante unión covalente

Los soportes utilizados para la inmovilización de CCL mediante unión covalente y la denominación del derivado formado, se describen en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Soportes utilizados en la inmovilización de CCL mediante enlace covalente

Soporte	Descripción	Derivado
Bromocianógeno-agarosa	Soporte esférico cuya matriz de agarosa altamente entrecruzada está activada con bromocianógeno (CNBr). La unión covalente se establece entre el amino reactivo de la superficie de la enzima, que normalmente es el amino-terminal, con el éster de cianato formado tras la activación de la con CNBr	CNBr-CCL
Glioxil-agarosa	Soporte constituido por fibras de agarosa activada con grupos glioxil como se ha descrito anteriormente (Mateo <i>et al.</i> , 2005). La unión covalente se establece entre los grupos aldehídos del soporte con los grupos aminos reactivos (lisinas, amino terminal)	Gx-CCL

El protocolo de inmovilización de CCL mediante enlace covalente se detalla en el Anexo 7.

3.2.5. Estudio de estabilidad térmica de CCL y sus diferentes derivados

La estabilidad térmica se evaluó incubando CCL y sus diferentes derivados en una solución de fosfato de sodio 25 mM pH 7, a 30°C, 40°C, 50°C y 60°C. Las muestras fueron tomadas periódicamente y su actividad se midió como se describe en la sección 3.1.4. La fracción de actividad residual se calculó como el cociente entre la actividad medida en un momento dado y la actividad al inicio de la incubación. El factor de estabilización (FE) se calculó como el cociente entre el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la enzima inmovilizada (EI) y el tiempo de vida media de la enzima soluble (ES), a la temperatura dada (T) según la Ecuación 3.28.

$$FE = \frac{t_{v/2}^{EI} |_T}{t_{v/2}^{ES} |_T} \quad \text{Ecuación 3.28}$$

El tiempo de vida media y los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de la correlación de los datos experimentales con las expresiones de mecanismos de inactivación térmica propuestos por Henley y Sadana (1985), mediante ajuste no lineal (algoritmo Levenberg-Marquardt) utilizando el software estadístico SPSS (IBM). Los mecanismos utilizados se describen en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Mecanismos de inactivación térmica utilizados en el análisis de estabilidad térmica de CCL y sus derivados

Mecanismo de Inactivación	Descripción	Expresión cinética
en serie en dos etapas	$E \xrightarrow{k_1} E' \xrightarrow{k_2} I$ describe el paso de la enzima por tres estados conformacionales distintos, siendo el último estado inactivo	$A = \left(1 + a * \frac{k_1}{k_2 - k_1}\right) * e^{-k_1 * t} - \left(a * \frac{k_1}{k_2 - k_1}\right) * e^{-k_2 * t}$
de primer orden en una etapa	$E \xrightarrow{k_1} I$ describe la pérdida de actividad en un solo paso	$A = e^{-k_1 * t}$
de primer orden en una etapa con actividad residual	$E \xrightarrow{k_1} E''$ describe la pérdida de actividad en un solo paso, donde el último estado de la enzima presenta una fracción de actividad residual	$A = (1 - b) * e^{-k_1 * t} + b$

E: estado inicial de la enzima, E': estado intermedio de la enzima, E'': estado final de la enzima, I: estado final inactivo de la enzima, k_1 : constante de inactivación térmica de la primera etapa (h^{-1}), k_2 : constante de inactivación térmica de la segunda etapa (h^{-1}), A: fracción de actividad residual de la enzima, t: tiempo de incubación (h), a: fracción de actividad residual de E', b: fracción de actividad residual de E''

3.2.6. Estudio de estabilidad en solventes y co-solventes del medio de reacción de CCL y sus diferentes derivados

Se evaluó la estabilidad de CCL y sus diferentes derivados en los solventes hexano y ciclohexano; y en los co-solventes propanol, etilenglicol y polietilenglicol; mediante incubación a 37°C. La incubación en solventes se realizó en una proporción 1:1 del solvente con una solución de fosfato de sodio 25 mM pH 7. La incubación en co-solventes se realizó adicionando a una solución de fosfato de sodio 25 mM pH 7 la cantidad adecuada de co-solvente de modo de igualar la polaridad de una solución 50% de propanol usada como referencia (calculada mediante de la constante dieléctrica de la disolución, $\epsilon_m = 46$). Las muestras fueron tomadas periódicamente y su actividad se midió como se describe en la sección 3.1.4. La fracción de actividad residual se calculó como el cuociente entre la actividad medida en un momento dado y la actividad al inicio de la incubación.

3.2.7. Estudio de estabilidad operacional de los diferentes derivados de CCL

Se evaluó la estabilidad operacional de CCL y sus diferentes derivados mediante la reacción de hidrólisis de aceite de pescado en lotes sucesivos, contemplando la reutilización de la enzima inmovilizada, tal como se esquematiza en la Figura 3.7.

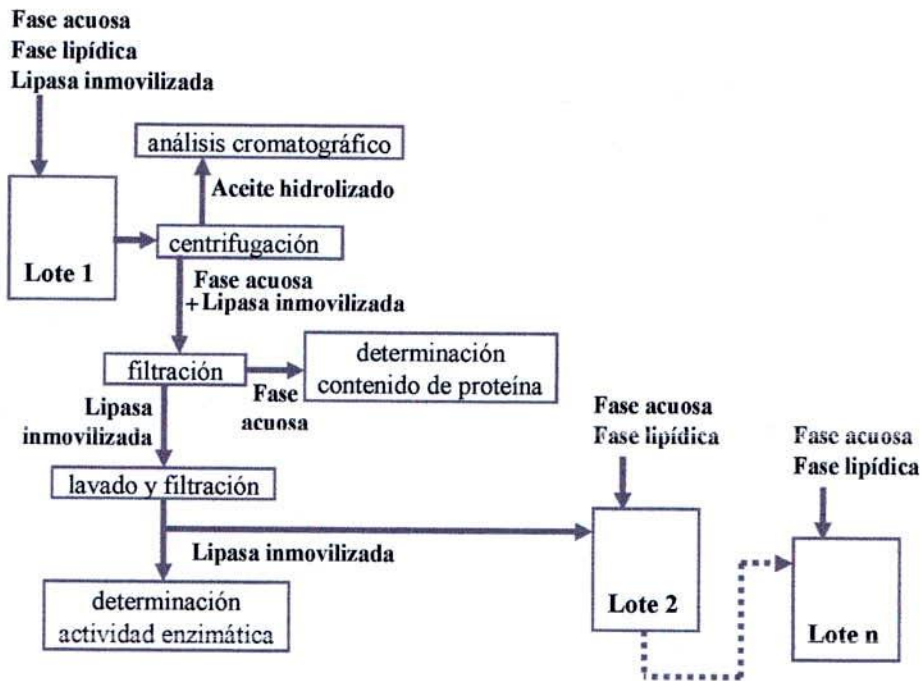


Figura 3.7. Procedimiento experimental para la hidrólisis enzimática de aceite de pescado por lotes sucesivos. La línea discontinua indica que el procedimiento realizado en el lote 1 se repite en los lotes consecutivos

La fracción de actividad residual de los derivados se calculó como el cociente entre la actividad de éstos medida al finalizar el lote de reacción y su actividad al inicio del primer lote de reacción. El porcentaje de desorción (D) de la enzima del soporte tras cada lote de reacción se determinó según la Ecuación 3.29.

$$D = 1 - \left(\frac{P * M}{PFA} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.29}$$

Dónde P es el contenido de proteína (mg) por gramo de soporte, M masa de soporte (g) y PFA es el contenido de proteína (mg) de la fase acuosa de la reacción.

3.2.8. Determinación de la capacidad de reutilización del soporte de inmovilización de CCL

Se estudió la reutilización del soporte seleccionado en virtud de su capacidad de carga tras ciclos de *reacción (en lotes sucesivos) – desorción - inmovilización - reacción (en lotes sucesivos)*.

El estudio de reutilización de soporte se realizó para los sistemas de reacción que contemplaban la lipasa inmovilizada, esto es para SR II y SR III evaluados a 37°C y a 50°C. El procedimiento se llevó a cabo realizando lotes sucesivos de reacción hasta que el derivado presentara un 25% de actividad residual respecto a su actividad al iniciar el primer lote de reacción. Posteriormente la enzima se desorbió mediante la incubación con un agente tensoactivo (Tritón x-100 al 1% en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7) y el soporte se lavó seriadamente con hexano, acetona diluida al 50% con agua destilada y finalmente con tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7. De esta manera el soporte es reciclado y listo para ser utilizado en la inmovilización de lipasa fresca. En la Figura 3.8 se muestra un esquema del procedimiento.

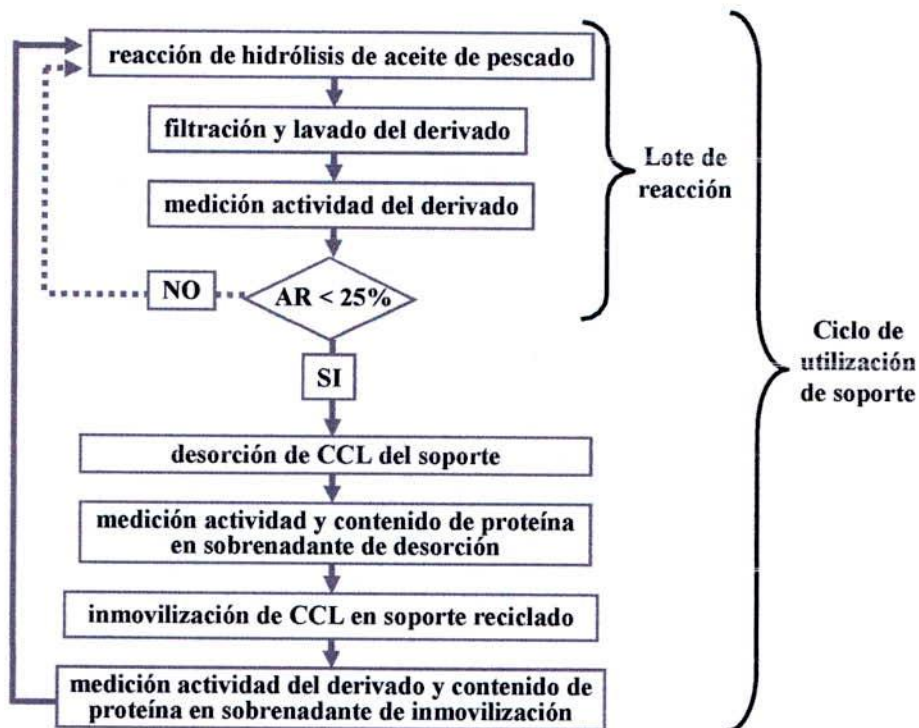


Figura 3.8. Procedimiento para el estudio de reutilización del soporte de inmovilización

El procedimiento descrito se realizó por 5 ciclos de reutilización de soporte, en donde para todos los lotes de cada ciclo se determinó la de actividad específica del derivado (U/g de soporte), el porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado y contenido de EPA+DHA en forma de glicéridos. Además, al inicio de cada ciclo de reutilización de soporte se determinó el rendimiento de inmovilización de CCL en términos de actividad y de proteína, y el porcentaje de activación de la lipasa por efecto de la inmovilización. Así mismo, al finalizar cada ciclo se determinó el rendimiento de desorción de CCL en términos de actividad y de proteína, y el porcentaje de lipasa remanente en el soporte.

3.2.9. Simulación de lotes sucesivos de hidrólisis de aceite de pescado con inactivación térmica del biocatalizador para la comparación de costos de los sistemas de reacción

El mecanismo de reacción de hidrólisis de ésteres de ácidos grasos ha sido comúnmente descrito por el modelo cinético de Michaelis-Menten (Sharma *et al.*, 2001). Sin embargo, dado que los sustratos propios de las lipasas son ésteres insolubles y sólo se establece su actividad lipolítica cuando la enzima actúa en la interfase orgánico-acuosa, Verger *et al.*, (1990) propusieron un modelo que contempla el fenómeno de adsorción inicial de la lipasa sobre la fase orgánica, al que sigue la reacción propiamente dicha sobre la interfase con la formación de complejo enzima-sustrato, y posterior liberación de los productos a la fase acuosa. Este modelo es más completo, no obstante, es un modelo complejo con parámetros cinéticos difíciles de determinar en condiciones experimentales, con los que finalmente se deben hacer numerosas suposiciones. Teniendo en cuenta esto, se decidió utilizar el modelo cinético de Michaelis-Menten (M-M) contemplando inactivación térmica; de modo de tener una primera estimación de las productividades de hidrólisis de aceite de pescado de los distintos sistemas de reacción evaluados. La cinética de Michaelis-Menten, descrita en la Ecuación 3.30, contemplando inactivación térmica, queda definida por la expresión cinética de la Ecuación 3.31.

$$v = \frac{V_{\max} * S}{K + S} \quad \text{Ecuación 3.30}$$

$$\frac{s_0}{K} * X - \ln(1 - X) = \frac{M_{\text{cat}} * a_s}{K * V_r} \cdot \int_0^t A(t) \quad \text{Ecuación 3.31}$$

Donde v representa la velocidad de reacción (mM/min), S la concentración de sustrato (mM), K la constante cinética de afinidad de sustrato (mM) y V_{\max} a la velocidad máxima teórica de reacción (mM/min). S_0 corresponde a la concentración inicial de sustrato (mM), X al grado de conversión, M_{cat} a la masa de catalizador (g), a_s a la actividad específica del catalizador (U/g) y V_r al volumen de reacción (mL).

El valor de K se estimó mediante ajuste no lineal (algoritmo Levenberg-Marquardt) utilizando el software estadístico SPSS (IBM) de datos experimentales de la reacción para los distintos sistemas de reacción evaluados.

$A(t)$ representa el mecanismo de inactivación térmica en dos etapas descrito en la sección 3.2.5, dónde la resolución de la integral de $A(t)$ queda expresada según la Ecuación 3.32.

$$\int_0^t A(t)dt = (1 - e^{-k_1 \cdot t}) * \left(\frac{1}{k_1} + \frac{a}{k_2 - k_1} \right) + (e^{-k_2 \cdot t} - 1) * \left(\frac{a * k_1}{k_2 * (k_2 - k_1)} \right) \quad \text{Ecuación 3.32}$$

Donde a representa la fracción de actividad residual del estado conformacional intermedio de la enzima, k_1 corresponde a la constante de inactivación térmica de la primera etapa (h^{-1}), k_2 a la constante de inactivación térmica de la segunda etapa (h^{-1}) y t al tiempo de reacción (min).

Las productividades de lotes sucesivos de los sistemas de reacción evaluados, calculadas a partir del modelo aplicado, se describen según las siguientes ecuaciones:

$$Q_n = \frac{S_0 * X}{t} \quad \text{Ecuación 3.33}$$

$$QA_n = \sum Q_n \quad \text{Ecuación 3.34}$$

$$qA_n = \frac{S_0 * X}{m * t} \quad \text{Ecuación 3.35}$$

Dónde Q_n es la productividad volumétrica del lote n de reacción (g aceite hidrolizado/L*h), QA es la productividad volumétrica acumulada al lote n de reacción (g aceite hidrolizado/L*h) y qA es la productividad específica acumulada al lote n de reacción (g aceite hidrolizado/g de lipasa*h), S_0 corresponde a la concentración inicial de sustrato (g/L), X al grado de conversión, m a la masa de preparado enzimático utilizado (g) y t al tiempo de reacción del lote (h).

Capítulo 4
Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SCREENING DE LIPASAS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA OMEGA-3

Se realizó un *screening* de diversos preparados enzimáticos comerciales con el fin de evaluar el grado de hidrólisis de aceite de pescado y la selectividad de hidrólisis frente a los distintos ácidos grasos que lo componen.

4.1.1. Actividad específica de las diferentes lipasas evaluadas

En la Tabla 4.1 se muestra la actividad de hidrólisis de p-NPB con las diferentes lipasas evaluadas en solución de 0,5 g/L.

Tabla 4.1. Actividad específica medida en p-NPB, de las lipasas evaluadas

Lipasa	Actividad específica (p-NPB) U/g de preparado enzimático
Lipomod 34P	14.927,4
Lipolyve CC	7.777,3
Lipomod 338P	6.827,5
AY Amano	5.268,5
Lipomod 691P	1.745,4
PS Amano	1.458,7
❖Novozym 735	503,7
TL Meito	480,3
F-AP-15	268,3
❖Lipozym CALB	152,5
Lipolyve AN	63,9
❖Lipozyme TL-100	17,9
❖Novozym 388	17,0

❖U/mL de preparado enzimático

Debido a la baja actividad de las lipasas Lipolyve AN, Lipozyme TL-100 y Novozym 388, no se incluyeron en la evaluación de la hidrólisis de aceite de pescado.

4.1.2. Hidrólisis de aceite de pescado con las diferentes lipasas evaluadas

En la Figura 4.1 se presentan los resultados de la hidrólisis de aceite de pescado utilizando diferentes lipasas. Se aprecia que el mayor porcentaje de hidrólisis y EPA+DHA en forma de glicéridos se obtiene con el preparado enzimático Lipolyve CC, correspondiente a la lipasa no

específica de *Candida cylindracea*. Este comportamiento corrobora lo presentado en el capítulo de Revisión Bibliográfica que describe a dicha lipasa con una menor velocidad de hidrólisis frente a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Hoshino *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; Wanasundara y Shahidi, 1998).

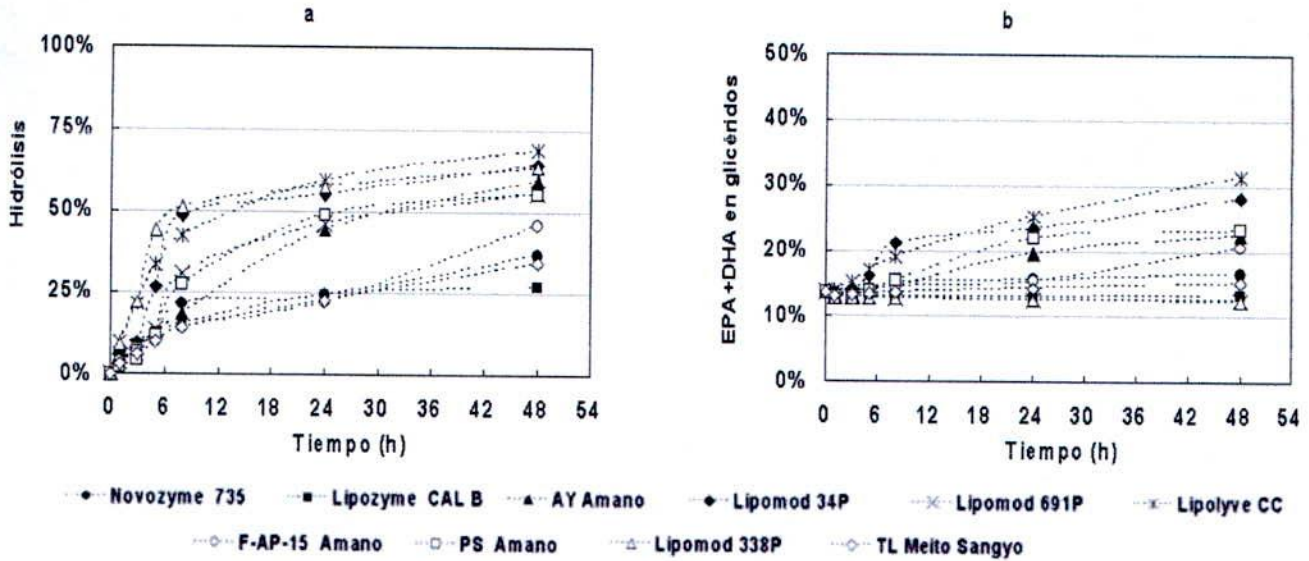


Figura 4.1. Hidrólisis de aceite de pescado a 37°C utilizando diferentes lipasas con 35 U/g de aceite, a) hidrólisis del aceite b) EPA+DHA en forma de glicéridos

Los valores levemente superiores al 30% de AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos obtenidos con el preparado de Lipolyve CC concuerdan con los reportados por Wanasundara y Shahidi (1998), quienes estudiaron la concentración de AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos a partir de aceite de foca y de lacha, mediante hidrólisis con lipasas comerciales de *Candida cylindracea*. Los autores reportaron que en 40 h de reacción se logró un 9,75% de EPA y 24,0% de DHA en el aceite de foca hidrolizado, y un 18,5% de EPA y 17,3% de DHA en el aceite de lacha hidrolizado.

En otro aspecto, se aprecia que no hubo una marcada diferencia en el grado de hidrólisis o en el porcentaje de EPA+DHA en glicéridos según la esteroespecificidad de corte de las diferentes lipasas; esto es entre las sn-1 sn-3 específicas y aquellas reportadas como no específicas. Este hecho corrobora dos aspectos discutidos anteriormente. Uno es que el 90% de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en la posición sn-2 (Saify *et al.*, 2003) y que para el caso de las lipasas específicas de posición sn-1 y sn-3, puede ocurrir la hidrólisis total del triacilglicérido si la reacción se extiende por un tiempo prolongado. Esto se debe a que los productos formados (AG o DAG) son químicamente inestables y pueden ser isomerizados espontáneamente a la posiciones 1 o 3, quedando aptos para la acción de la enzima (Carvalho *et al.*, 2003).

Sumado a esto, se evaluó la velocidad de hidrólisis de las diferentes familias de ácidos grasos y con ello el índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA. Como se aprecia en la Tabla 4.2, los preparados enzimáticos con un IS mayor a 2 resultan interesantes como catalizadores para la presente investigación ya que indican una mayor selectividad en la hidrólisis de los ácidos grasos distintos a EPA y DHA, permitiendo la concentración de éstos en forma de glicéridos.

Tabla 4.2. Velocidad específica de hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado e índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA de las lipasas evaluadas

Derivado	Velocidad específica de hidrólisis % H AG/h*g de preparado enzimático			IS
	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados	
AY Amano	24,3	21,7	7,7	3,9
Lipolyve CC	67,5	60,2	22,3	3,8
❖Novozym 735	3,5	3,1	1,1	3,7
Lipomod 34P	95,6	84,9	35,4	2,9
F-AP-15 Amano	1,2	0,9	0,5	2,7
TL Meito	1,5	1,3	1,0	1,8
❖Lipozym CALB	0,7	0,5	0,5	1,2
Lipomod 338P	89,8	86,6	83,4	1,1
PS Amano	4,8	4,6	4,8	1,0
Lipomod 691P	7,9	7,0	7,2	1,0

❖% H AG/h*mL de preparado enzimático

Si bien con el preparado AY Amano, se obtiene un mayor IS, no se logra un importante porcentaje de hidrólisis; por esta razón y concordando con lo señalado anteriormente en el análisis de la Figura 4.1, se utilizó el preparado enzimático Lipolyve CC, correspondiente a la lipasa no específica de *Candida cylindracea* para el desarrollo del estudio, denominada de aquí en adelante CCL. Las dos principales aplicaciones que se le han dado a esta lipasa, son la resolución de mezclas racémicas y la concentración de AGPI. Numerosos estudios han sido reportados relativos a su aplicación para resolución de racematos, tales como los realizados por Kirchner *et al.*, (1985), Oberhauser *et al.*, (1989), Mustranta (1992), Cipiciani *et al.*, (1997), Joly y Nair (2003) y Ramadas y Krupadanam (2004), por citar algunos. Mientras que la obtención de AGPICL ha sido estudiada por Hoshino *et al.*, (1990), Tanaka *et al.*, (1992), Shimada *et al.*, (1995), Wanasundara y Shahidi (1998), Okada y Morrissey (2007), entre otros.

Cabe señalar que con ningún preparado se obtuvo un IS inferior a 1, lo que indicaría una de hidrólisis selectiva de los ácidos grasos de interés EPA+DHA frente al resto de los ácidos grasos.

4.1.3. Caracterización del preparado enzimático seleccionado

El preparado comercial de CCL, presentó un contenido de proteína de 153,7 mg/g de polvo, lo que equivale en términos de actividad en p-NPB a 46 U/mg de proteína.

Se identificó CCL mediante una electroforesis de proteína desnaturalizada en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posterior tinción Coomassie, como se muestra en la Figura 4.2.

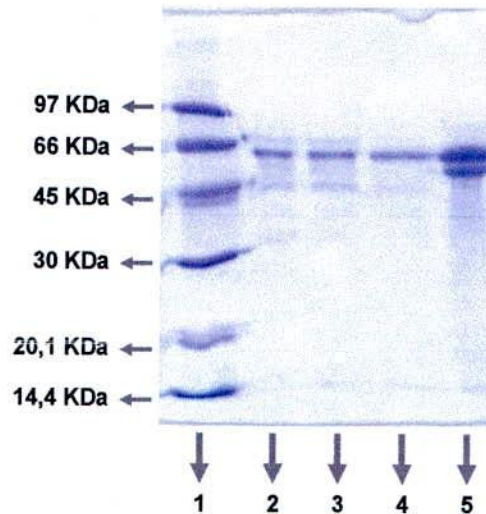


Figura 4.2. Electroforesis de la lipasa de *Candida cylindracea* (Lipolyve CC)

Al compararse con los patrones de peso molecular LMW SDS (carril 1) se observa que la lipasa posee un peso molecular cercano a los 60 kDa, concordando con lo que se reporta en literatura. También se observa la existencia de dos bandas lo que indicaría la presencia de las dos isoformas de la enzima, tal como lo reporta Rúa *et al.*, (1993), Lotti *et al.*, (1994), Alberghina *et al.*, (1997) y una de ellas con un peso de 63 kDa y la otra de 60 kDa. Las muestras analizadas correspondieron al preparado enzimático en concentración de 10 g /L (carril 3) y a la enzima inmovilizada en octil-agarosa (carril 5). Dada las características de la inmovilización por adsorción hidrofóbica, el derivado puede someterse directamente a la electroforesis, donde luego de la preparación de la muestra, la lipasa se desorbe del soporte. Esta estrategia permite una concentración de la proteína ofrecida al gel. Además se analizó el preparado enzimático sometido a dos tipos de purificación para constatar la presencia de otras proteínas: una consistente en una simple centrifugación de una solución del preparado enzimático (carril 2); y la otra se realizó contactando una solución del preparado enzimático por con octil-agarosa y posterior desorción de la enzima adsorbida mediante incubación en un tensoactivo (carril 4).

Esta técnica se basa en que sólo las lipasas poseen la capacidad de interactuar con superficies hidrofóbicas como el octil-agarosa, por tanto tras la desorción del soporte solo se obtienen lipasas entre otras proteínas.

En el carril 3 se aprecia una tercera banda alrededor de los 45 kDa, mostrando la presencia de otras proteínas en el preparado comercial. El perfil electroforético del carril 2 es prácticamente igual al del carril 3, indicando que la centrifugación no cambia el contenido proteico del preparado. Esta banda también está presente pero con mucho menor intensidad, en el carril 4, que corresponde a la solución enzimática desorbida del soporte hidrofóbico. Esto implicaría que cierta fracción de las proteínas identificadas en el carril 2 y 3 corresponde a algunas lipasas cercanas a un peso molecular de 45 kDa. En el carril 5 la aparición de las dos bandas atribuidas a las dos isoformas de CCL mencionadas anteriormente, se intensifica por la adsorción/purificación de la lipasa en el soporte hidrofóbico.

Dado el efecto de dimerización reportado para las lipasas (Palomo *et al.*, 2003a), se determinó la concentración de proteína para la cual se despliega el máximo potencial catalítico en términos de actividad específica, medida con p-NPB, tal como se muestra en la Figura 4.3.

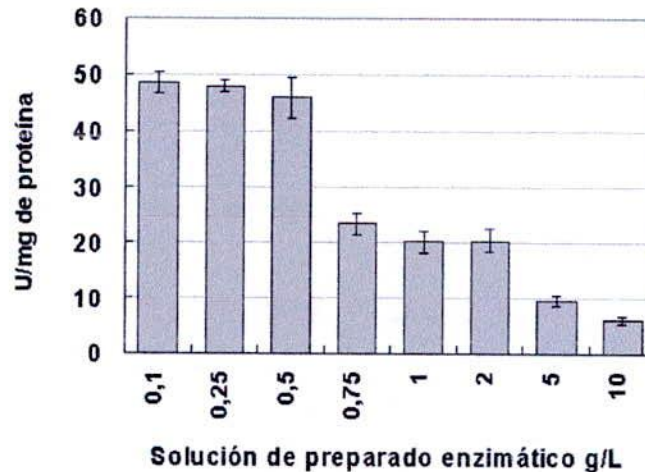


Figura 4.3. Actividad específica de Lipolyve CC a distintas concentraciones de solución del preparado enzimático

Se observa que hasta una concentración de 0,5 g de preparado /L, equivalente a 80 mg de proteína /L, se obtiene la máxima actividad de hidrólisis (50 - 40 U/mg proteína). Al aumentar la concentración de proteína, la actividad específica disminuye drásticamente, evidenciando la posible formación de dímeros de la lipasa.

4.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE PESCADO

Previo a la determinación de las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis de aceite de pescado utilizando CCL, se realizó un estudio preliminar de las condiciones de operación a optimizar. En la Tabla 4.3 se presentan los ensayos realizados a distintas temperaturas y concentraciones de enzima.

Tabla 4.3. Condiciones preliminares evaluadas para la hidrólisis de aceite de pescado

Ensayo	Temperatura (°C)	Concentración de Enzima (U/g AP)
I	25	70
II	35	0,7
III	35	3,5
IV	35	35
V	35	70
VI	35	350
VII	37	35
VIII	37	350
IX	50	35
X	50	350

AP: aceite de pescado

En los ensayos se evaluó el porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado y la concentración de EPA+DHA en glicéridos, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.4.

Los datos experimentales obtenidos del porcentaje de hidrólisis fueron correlacionados con el modelo de M-M (Ecuación 3.3) como se muestra en la Figura 4.4a. Se observa que los ensayos I, V, VI, VIII y X, que corresponden a los ensayos con mayor concentración de lipasa (70 y 350 U/g AP), presentan prácticamente el mismo perfil de hidrólisis, indicando que a 70 U/g AP es límite superior para la concentración de lipasa con la cual se obtiene la máxima velocidad de hidrólisis.

En la Figura 4.4b se aprecia que la mayor concentración de EPA+DHA en glicéridos se obtiene en el ensayo VII al finalizar la reacción; no obstante, en los ensayos VI y VIII, ambos con la mayor concentración de lipasa (350 U/ g AP), el mayor porcentaje de EPA+DHA en glicéridos se obtiene en las primeras horas de reacción para luego disminuir a partir de las 24 horas de reacción.

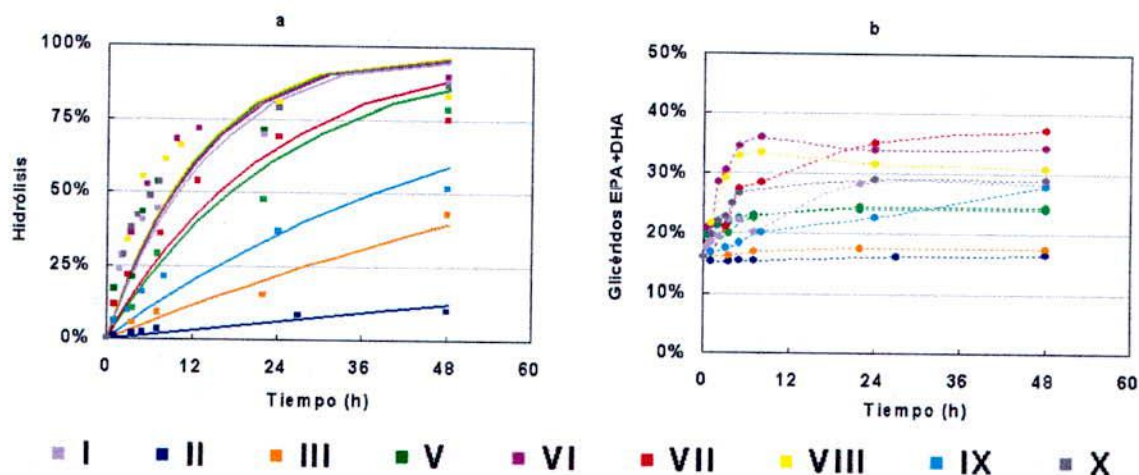


Figura 4.4. Ensayos preliminares de hidrólisis de aceite de pescado, a) hidrólisis del aceite, b) EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite hidrolizado

La velocidad de hidrólisis de aceite de pescado de cada ensayo se presenta en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Velocidades de hidrólisis de aceite de pescado obtenidas en ensayos preliminares

Ensayo	Velocidad de hidrólisis (%H de AP/h)
I	0,3
II	0,9
III	3,4
IV	6,2
V	6,0
VI	5,6
VII	3,8
VIII	6,3
IX	1,6
X	6,1

%H: porcentaje de hidrólisis, AP: aceite de pescado, h: hora

Se observa que para los ensayos II, III y IV realizados a 35°C la velocidad de hidrólisis aumenta a medida que se aumenta la concentración de enzima, no obstante este aumento no es en igual proporción al aumento de la concentración de biocatalizador; por ejemplo en el ensayo III (3,5 U/g AP) se tiene una velocidad de hidrólisis de 3,4 %H/h y al aumentar diez veces la carga enzimática en el ensayo IV (35 U/g AP) se logra tan sólo 6,2 %H/h y no 34 %H/h como se hubiera esperado. Más aun, en los ensayos V y VI, también realizados a 35°C, en los cuales se

utilizan las mayores concentraciones de lipasa, la velocidad de hidrólisis tiende a disminuir. Estos resultados podrían ser atribuidos a varios factores no necesariamente excluyentes; como la dimerización de las lipasas en soluciones concentradas y a los fenómenos de restricciones difusionales externas del sustrato que se pueden generar en sistemas de reacción bifásicos como el del presente estudio.

Otro efecto interesante observado es el de la temperatura de reacción. En los ensayos IV, VII y IX realizados a una misma concentración de enzima, se obtiene que al aumentar la temperatura de reacción de 35 a 50°C, la velocidad de hidrólisis disminuye, evidenciando claramente algún tipo de inactivación térmica.

A partir de estos resultados preliminares se realizó una experimentación bajo un diseño factorial, tal como se describe en la sección 3.2.3, para estudiar los efectos de la temperatura, concentración de enzima, pH y relación fase acuosa (W) fase lipídica (O) sobre el porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado y la concentración de EPA+DHA en glicéridos, correspondientes a las respuestas a maximizar. En el Anexo 6 se presentan los ANOVA realizados con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$, para los tres tiempos de reacción evaluados.

En la Tabla 4.5 se presentan los valores de los niveles de los efectos al maximizar las funciones de respuesta para la hidrólisis de aceite de pescado

Tabla 4.5. Valores de los niveles de las distintas variables del diseño factorial al maximizar las funciones de respuesta para la hidrólisis de aceite de pescado

Tiempo de reacción	efecto (variable)	valor al maximizar la función de respuesta	nivel	valor del nivel
3,5 h	pH (x1)	-1	bajo	6,5
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	ns	-	-
7 h	pH (x1)	ns	-	-
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	ns	-	-
22 h	pH (x1)	ns	-	-
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	1	alto	37

W: fase acuosa, O: fase lipídica, [E]: concentración de enzima en términos de actividad, T: temperatura, ns: no significativo

En la Tabla 4.6 se presentan los valores de los niveles de los efectos al maximizar las funciones de respuesta para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos

Tabla 4.6. Valores de los niveles de las distintas variables del diseño factorial al maximizar las funciones de respuesta para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos

Tiempo de reacción	efecto (variable)	valor al maximizar la función de respuesta	nivel	valor del nivel
3,5 h	pH (x1)	ns	-	-
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	-1	bajo	25
7 h	pH (x1)	ns	-	-
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	ns	-	-
22 h	pH (x1)	ns	-	-
	W/O (x2)	-1	bajo	1:1
	[E] (x3)	1	alto	0,5
	T (x4)	ns	-	-

W: fase acuosa, O: fase lipídica, [E]: concentración de enzima en términos de actividad, T: temperatura, ns: no significativo

Según se aprecia para ambas respuestas de interés y a todos los tiempos evaluados, el valor óptimo para la concentración de enzima corresponde a 35 U/g AP; así mismo el valor óptimo para la razón W/O es de 1:1.

Con respecto al pH, variable que no resultó significativa en todos los tiempos evaluados; y que sólo tuvo incidencia a las 3,5 horas en la respuesta de hidrólisis, se optó por utilizar el promedio de ambos niveles (pH 7).

Finalmente, la temperatura escogida fue 37°C, temperatura correspondiente al nivel alto que mostró incidencia a las 22 h de reacción en la respuesta de hidrólisis. Este valor de temperatura coincide con lo obtenido por Wanasundara y Shahidi (1998b) en la optimización de hidrólisis de aceite de foca realizada con la misma lipasa. Pese a que en la respuesta de concentración de EPA+DHA en glicéridos, se obtuvo una significancia para este parámetro al tiempo inicial de la reacción (25°C); no se consideró dicho efecto ya a esa temperatura de reacción evaluada en los experimentos preliminares, se obtuvo la más baja velocidad de hidrólisis y un porcentaje de concentración de EPA+DHA en glicéridos menor al 30%.

4.3. DIFERENTES TIPOS DE INMOVILIZACIÓN DE CCL APLICADOS A LA HIDRÓLISIS DE ACEITE DE PESCADO

4.3.1. Cinética de inmovilización de los diferentes derivados de CCL

Los diferentes derivados de CCL se obtuvieron mediante diversos protocolos de acuerdo al principio de inmovilización aplicado. Las cinéticas de inmovilización se resumen en el Anexo 8. A modo de ejemplo, en la Figura 4.5 se muestran las cinéticas de inmovilización de CCL en los soportes hidrofóbicos octil-agarosa y octadecil-sepabeads y en los soportes iónicos MANAE-agarosa y Q-sepharose en presencia de lauril-sucrosa.

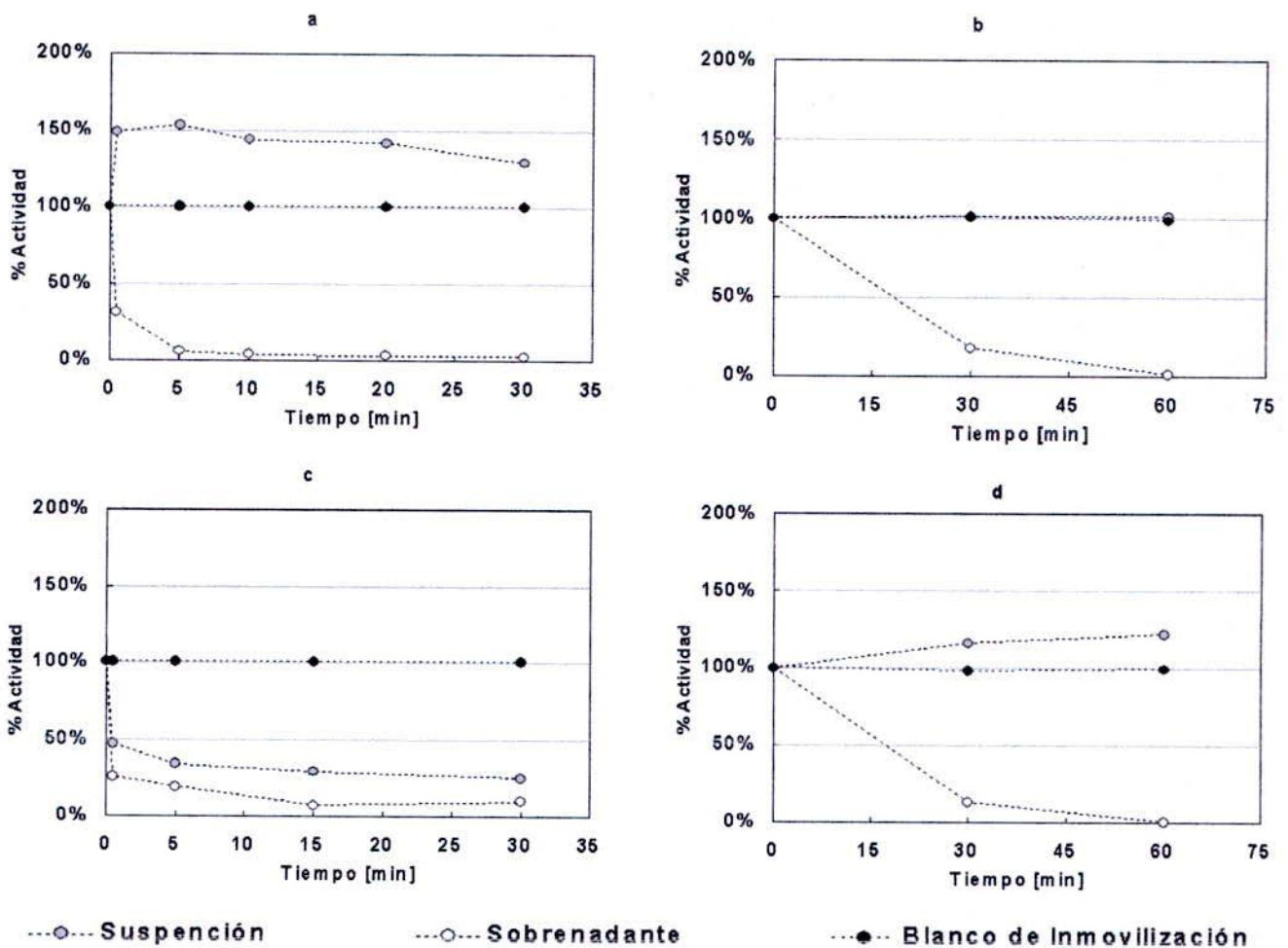


Figura 4.5. Cinéticas de inmovilización de CCL, a) octil-agarosa, b) MANAE-agarosa, c) octadecil-sepabeads, d) Q-sepharose con lauril sucrosa en el medio de inmovilización

En la Figura 4.5a, se aprecia que la inmovilización de la enzima en octil-agarosa presenta el típico perfil de inmovilización de lipasas dónde se evidencia el fenómeno de hiperactivación dado por el desplazamiento de la zona hidrofóbica de su estructura terciaria que cubre el sitio activo hacia el soporte, dando paso a su conformación activa. En los otros soportes hidrofóbicos evaluados, butil-sepabeads, lewatit y celita, este efecto no es tan marcado debido a que éstos poseen una superficie con menor hidrofobicidad en comparación a octil-agarosa.

Por el contrario, en la inmovilización de CCL en octadecil-sepabeads (Figura 4.5c), el soporte más hidrofóbico estudiado, la actividad de la enzima se ve notoriamente comprometida, observándose una rápida inactivación. La razón de este fenómeno puede explicarse según lo que ha sido reportado por otros autores al inmovilizar lipasas en algunos soportes hidrofóbicos; dónde se atribuye este comportamiento a una excesiva similitud y concordancia entre la geometría del soporte y el punto de unión con la enzima, lo que impediría el acceso de los sustratos (Mateo *et al.*, 2007).

En la Figura 4.5b se muestra la cinética de inmovilización de CCL en el soporte iónico MANAE-agarosa. Como era de esperarse con todos los soportes iónicos estudiados, MANAE-agarosa, CM-agarosa, glioxil-agarosa-PEI y agarosa-DxSO₄, no se produce el fenómeno de hiperactivación interfacial de la lipasa. La inmovilización en este tipo de soportes, que se realiza por adsorción por intercambio iónico de grupos de la superficie de la enzima con grupos iónicos de una matriz funcionalizada, deja al equilibrio del medio de reacción la apertura de la tapadera hacia su conformación más activa; o bien en el caso más desfavorable, puede provocar una inmovilización orientada al sitio activo de la proteína impidiendo el acceso de los sustratos. Esto podría explicar el hecho de que en los derivados CM-CCL y Gx-PEI-CCL la actividad medida en la suspensión es menor a la que presenta el blanco de inmovilización. Los derivados iónicos de tipo catiónico (CM-CCL y A-DxSO₄-CCL) presentan una alta actividad en el sobrenadante, indicando que una fracción no despreciable de la lipasa no se adsorbe al soporte (Anexo 8), descartándose esta estrategia de inmovilización como una alternativa efectiva. Por el contrario, con los derivados iónicos de tipo aniónico (Q-sepharose, MANAE-agarosa, glioxil-agarosa-PEI) se observa que al finalizar la inmovilización la actividad del sobrenadante es muy baja, indicando que la proteína ha sido adsorbida por el soporte (Anexo 8). Más aún, se puede inferir que la orientación de la enzima adsorbida en Q-sepharose y MANAE-agarosa no afecta su actividad puesto que se tiene un porcentaje de actividad igual al blanco de inmovilización, a diferencia de lo ocurrido con Gx-PEI-CCL.

En la Figura 4.5d se muestra la cinética de inmovilización de CCL en Q-sepharose en presencia de lauril-sucrosa, en la cual se comprueba que el cambio de hidrofobicidad del medio de inmovilización, dada por la presencia de dicho éster de ácido graso de cadena corta, influye en la cinética de adsorción al soporte. Como se aprecia, el perfil de inmovilización se asemeja más a la adsorción sobre un soporte hidrofóbico, donde el fenómeno de hiperactivación de la lipasa provoca que la actividad de la suspensión sea mayor que la del blanco de inmovilización.

4.3.2. Actividad específica y rendimientos de inmovilización de derivados de CCL

Los rendimientos de inmovilización de CCL mediante los diferentes protocolos y la actividad específica de hidrólisis de p-NPB de los derivados formados se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Rendimientos de inmovilización y actividad específica de los derivados de CCL

Derivado	RI %	Actividad específica (p-NPB) U/g derivado
O-CCL	97,7	104,5
Q-CCL + LS	99,5	94,2
M-CCL + LS	94,6	51,6
CNBr-CCL	62,7	47,8
O-CCL-NH ₂ -DxCHO	93,8	47,6
Q-CCL	97,3	45,6
Gx-CCL	33,6	45,3
Gx-PEI-CCL	86,6	44,1
O-CCL-NH ₂ -DxSO ₄	93,8	40,4
M-CCL	98,7	40,3
L-CCL	90,8	21,2
C-CCL	43,8	17,0
A-DxSO ₄ -CCL	56,8	7,6
B-CCL	45,2	5,6
OD-CCL	89,8	3,9
CM-CCL	25,2	4,7

RI: rendimiento de inmovilización

La mayor expresión de actividad enzimática por gramo de derivado se obtiene con O-CCL cuya unión se realiza mediante interacciones hidrofóbicas, lo que promueve la forma abierta y más activa de la estructura de la enzima; efecto que ha sido reportado anteriormente con otras lipasas (Fernández-Lafuente *et al.*, 1998, Volpato *et al.*, 2009). Esto no ocurre con aquellos derivados unidos covalentemente (CNBr-CCL y Gx-CCL), donde la apertura de la tapadera queda sometida al equilibrio de sus configuraciones abierta o cerrada frente a una interfase hidrofóbica

en el medio de reacción. También se podría inferir que la orientación que adquirió la proteína al inmovilizarse no fue la adecuada en términos de expresión de su actividad, pudiéndose haber bloqueado en alguna medida el sitio activo. Además, en el caso específico de la inmovilización multipuntual (Gx-CCL) el mayor número de uniones enzima soporte podría provocar una rigidización de la estructura de la lipasa en desmedro de su conformación activa. En los derivados entrecruzados (O-CCL-NH₂-DxSO₄ y O-CCL-NH₂-DxCHO) se obtuvo una expresión de actividad específica menor a su contraparte sin entrecruzar (O-CCL), probablemente debido a que el recubrimiento del lecho polimérico sobre la enzima pudo provocar un efecto de rigidización de su estructura y una menor accesibilidad del sustrato.

Los derivados con menor carga enzimática y bajo rendimiento de inmovilización, corresponden a los inmovilizados en soportes iónicos de tipo catiónico (CM-agarosa y agarosa-DxSO₄). Esto puede ser atribuido a que la superficie de la proteína está cargada mayoritariamente en forma negativa, lo que no propicia la inmovilización por interacción catiónica. También se podría inferir que la orientación que adquirió la proteína al inmovilizarse no fue la adecuada en términos de expresión de su actividad, pudiéndose haber bloqueado en alguna medida el sitio activo. Sumado a lo anterior, específicamente al utilizar el soporte agarosa-DxSO₄, en el cual la matriz de agarosa se encuentra recubierta con dextrano-sulfato, la inclusión de la enzima en el lecho polimérico pudo provocar un cambio en su estructura en desmedro de su actividad.

Cabe destacar que la carga enzimática lograda en el derivado de Q-CCL, en el cual la enzima es inmovilizada al soporte mediante una interacción aniónica fuerte, es similar a la lograda en soportes hidrofóbicos entrecruzados (alrededor de 45 U/g derivado); indicando por un lado, que la orientación adquirida por la proteína al inmovilizarse es adecuada en términos de su actividad. Por otro lado, la fuerza de la unión iónica no tendría incidencia, ya que la carga enzimática el derivado Q-CCL es muy similar a la del derivado M-CCL cuya interacción iónica es débil.

Sumado a esto, el efecto de adicionar lauril sucrosa (LS) en el medio de reacción, con el fin de propiciar la inmovilización con una estructura abierta y reactiva de la lipasas, se evidencia claramente al lograrse el doble de la actividad específica en el derivado de Q-CCL + LS, si se compara con igual derivado pero inmovilizado en ausencia de LS. Un efecto similar pero no tan marcado se logra con el derivado M-CCL.

Finalmente, con los derivados de lewatis, pese al alto rendimiento de inmovilización, no se alcanzó una alta carga enzimática. Una posible razón para ello es que se produzca una muy fuerte y estrecha interacción hidrofóbica de la lipasa con el soporte que no da lugar a la

interacción con el sustrato, efecto similar a lo que sucede al inmovilizar lipasas en soportes muy hidrofóbicos como el octadecil-sepabeads.

Según los resultados, el estudio de la hidrólisis de aceite de pescado se realizó con los derivados cuya actividad específica fuera mayor a 20 U/ g de derivado. La utilización de derivados con un valor de actividad específica menor implica que la masa requerida de dicho derivado para alcanzar las U netas de reacción, ocupara más del 20% del volumen útil de reacción.

4.3.3. Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con derivados de CCL

La reacción de hidrólisis de cada derivado fue seguida como se muestra en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8; agrupadas según las características de los soportes y método de inmovilización. El desempeño de los diferentes derivados fue evaluado según de porcentaje de hidrólisis obtenido, la velocidad inicial de hidrólisis alcanzada, así como también por el índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA frente a los distintos ácidos grasos que componen los triacilglicéridos del aceite de pescado.

En la Figura 4.6 se muestra la hidrólisis de las diferentes familias de ácidos grasos del aceite de pescado utilizando los derivados de CCL formados mediante adsorción hidrofóbica. Se aprecia que al finalizar la reacción, los mayores porcentajes de hidrólisis, tanto de los ácidos grasos saturados como los monoinsaturados, se obtienen con O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄.

Un efecto interesante de destacar es que la dinámica de reacción es diferente para cada familia de ácidos grasos. La dinámica de hidrólisis para los ácidos grasos saturados y para los monoinsaturados se asemeja a una curva de saturación, mientras que para los poliinsaturados el grado de hidrólisis aumenta proporcionalmente en el tiempo, evidenciando algún efecto de restricción catalítica. Este fenómeno ha sido reportado previamente con CCL en forma soluble (Tanaka *et al.*, 1993) donde se propone que existe una menor velocidad de hidrólisis frente a triacilglicéridos que contienen DHA. También se ha reportado una resistencia a la hidrólisis del enlace éster del DHA utilizando la lipasa de *Candida rugosa* para la hidrólisis de aceite de pescado en microemulsiones (Koike *et al.*, 2007).

Este comportamiento puede ser explicado por que la estructura molecular de los AGPICL tiene mas pliegues sobre sí misma, por las instauraciones tipo cis, provocando un impedimento estérico a la lipasa para llegar al enlace éster.

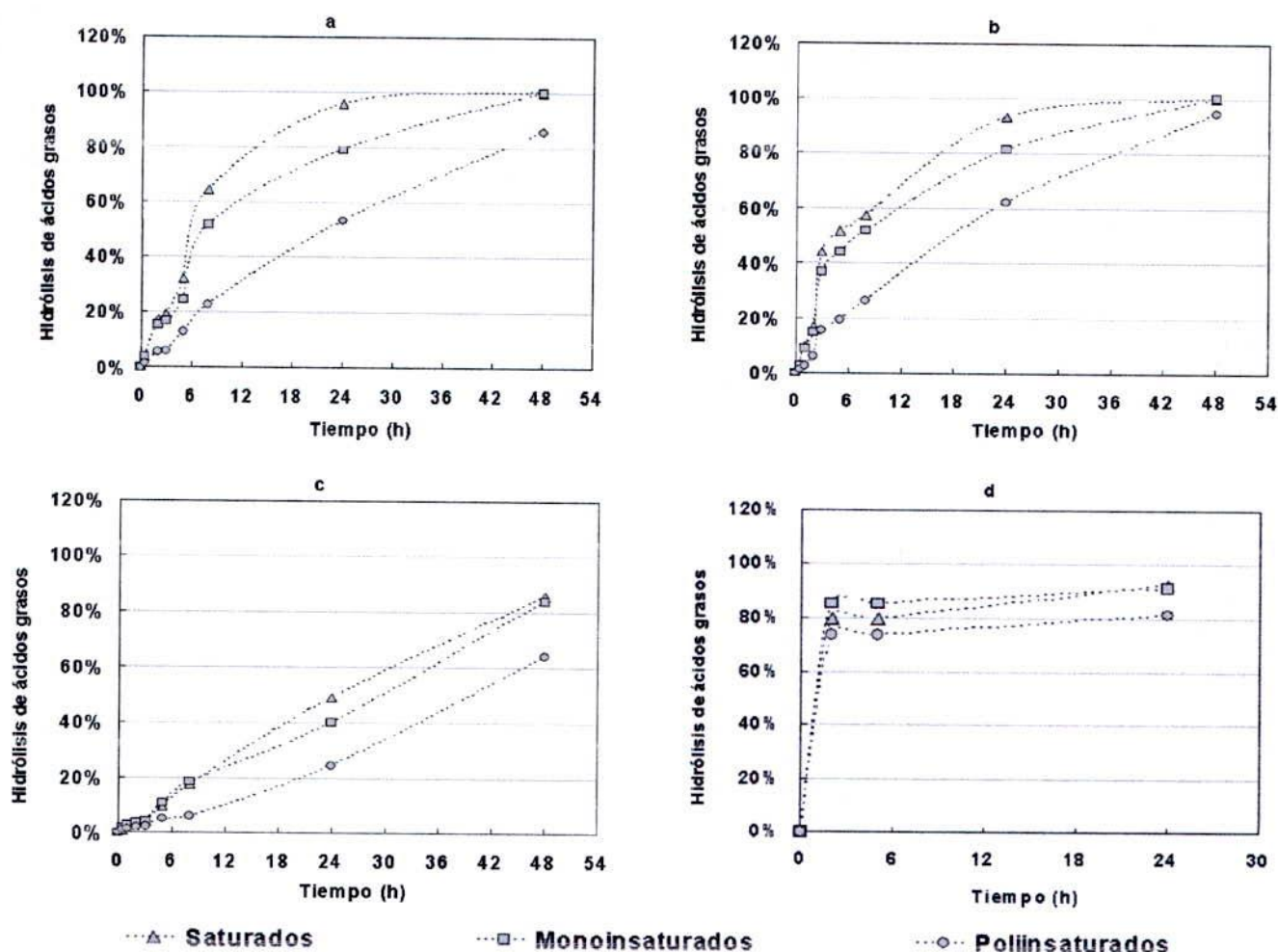


Figura 4.6. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados hidrofóbicos de CCL, a) O-CCL, b) O-CCL-NH₂-DxSO₄, c) O-CCL-NH₂-DxCHO, d) L-CCL. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1, W: solución 40% PEG en tampón fosfato sódico 200 mM, O: solución 1:4 AP/hexano

A diferencia de lo que ocurre con los derivados O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄, con el derivado L-CCL no se observa una diferenciación tan marcada en la dinámica de hidrólisis para cada familia de ácidos grasos, indicando que la interacción iónica de la lipasa con este el tipo de soporte estaría modulando su selectividad.

En otro aspecto, aparentemente la capa de polímero de dextrano sulfato del derivado O-CCL-NH₂-DxSO₄, no provoca algún efecto de adverso como disminuir la accesibilidad de la molécula a hidrolizar al sitio catalítico o el impedimento de la apertura del *lid*. Por el contrario,

la unión covalente del polímero de dextrano aldehído a la superficie de la lipasa en el derivado O-CCL-NH₂-DxCHO, le otorgaría mayor rigidez, haciéndolo menos reactivo.

En la Figura 4.7 se muestra la hidrólisis de las diferentes familias de ácidos grasos del aceite de pescado mediante los derivados de CCL formados por unión covalente. Se aprecia claramente que la hidrólisis con CNBr-CCL y Gx-CCL no se ve propiciada, siendo ésta bastante menor en comparación a la lograda con los derivados inmovilizados mediante adsorción hidrofóbica.

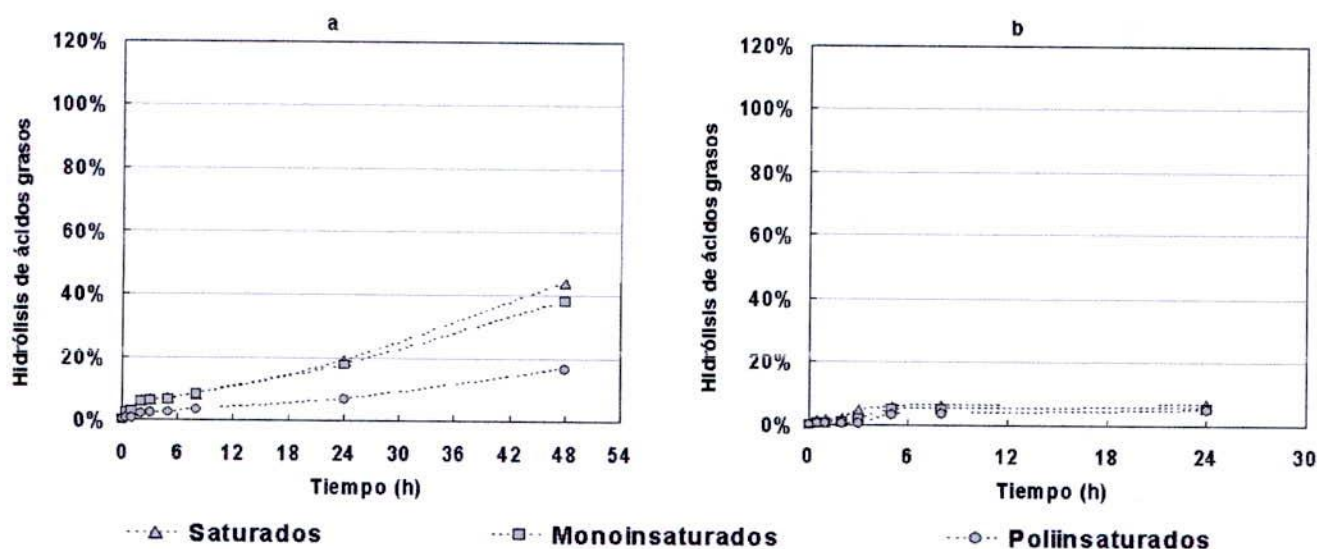


Figura 4.7. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados covalentes de CCL, a) CNBr-CCL, b) Gx-CCL. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1, W: solución 40% PEG en tampón fosfato sódico 200 mM, O: solución 1:4 AP/hexano

El menor grado de hidrólisis se obtiene con Gx-CCL, lo que puede ser atribuido al efecto de rigidización de la estructura de la lipasa, que limitaría su activación interfacial. Este fenómeno, que explica su mayor estabilidad térmica (sección 4.4), es una desventaja en términos de eficiencia de reacción. Tampoco se evidencia una marcada diferenciación de las dinámicas de hidrólisis entre las familias de ácidos grasos, pero dado el bajo grado de hidrólisis, no se puede aseverar si este efecto es debido a una modulación de su selectividad por el tipo de inmovilización. Si es interesante comparar, que con CNBr-CCL, pese a que el porcentaje de hidrólisis alcanzado es bajo, sí se observa una diferencia en la hidrólisis en desmedro de los ácidos grasos poliinsaturados, asemejándose a lo ocurrido con CCL en forma soluble e inmovilizada por adsorción hidrofóbica. En este caso, la unión covalente unipuntual no tendría algún efecto tan evidente sobre la selectividad de la lipasa.

En la Figura 4.8 se muestra la hidrólisis de las diferentes familias de ácidos grasos del aceite de pescado mediante los derivados de CCL formados por adsorción iónica.

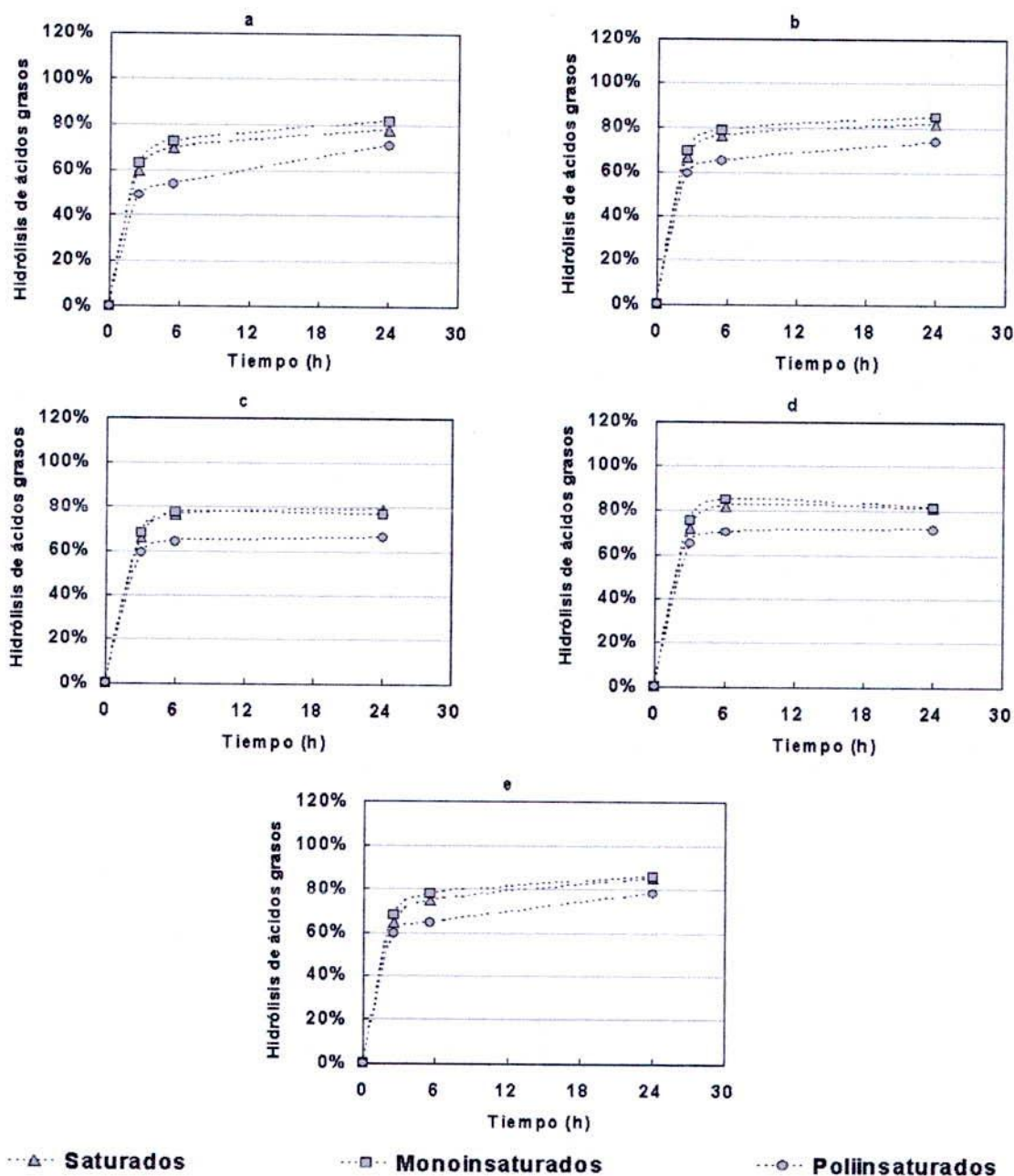


Figura 4.8. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado con derivados iónicos de CCL, a) Q-CCL, b) Q-CCL + LS, c) M-CCL, d) M-CCL + LS, e) Gx-PEI-CCL. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1, W: solución 40% PEG en tampón TRIS 100 mM, O: solución 1:4 AP/hexano

Los derivados iónicos presentaron altos niveles de hidrólisis para las distintas familias de ácidos grasos, similar al grado de hidrólisis obtenido con los derivados hidrofóbicos. Es importante destacar el mayor grado de hidrólisis de ácidos grasos poliinsaturados obtenido con estos derivados, en comparación con las reacciones catalizadas por los derivados hidrofóbicos, covalentes e inclusive utilizando la enzima soluble. La no selectividad de hidrólisis de los derivados iónicos, indica que su utilización no sería adecuada para lograr el objetivo de la tesis.

En la Tabla 4.8 se presentan las velocidades específicas de hidrólisis de las diferentes familias de ácidos grasos de aceite de pescado y el índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA, obtenidos con los diferentes derivados de CCL.

Tabla 4.8. Velocidad específica de hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado e índice de selectividad de hidrólisis de EPA+DHA mediante diferentes derivados de CCL

Derivado	Velocidad específica de hidrólisis (% H AG/h *g de derivado)			IS
	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados	
O-CCL	20,4	16,4	7,6	2,7
O-CCL-NH ₂ -D _x SO ₄	13,5	11,6	5,0	2,6
O-CCL-NH ₂ -D _x CHO	2,5	2,9	1,3	2,4
L-CCL	10,6	11,3	9,7	1,0
Q-CCL	18,9	19,8	14,9	1,1
Q-CCL + LS	43,1	44,8	37,3	1,1
M-CCL	18,5	18,8	15,8	1,0
M-CCL + LS	25,4	26,5	22,2	1,1
G _x -PEI-CCL	19,8	20,6	17,4	1,0
CNBr-CCL	4,4	4,3	1,1	2,2
G _x -CCL	1,7	1,2	0,8	2,1

% H: porcentaje de hidrólisis, AG: ácido graso, h: hora, IS: índice de selectividad

Los derivados que presentaron un IS mayor a 2, que indica que la velocidad de hidrólisis de ácidos grasos del aceite de pescado (exceptuando EPA+DHA) fue el doble que la velocidad de hidrólisis de EPA+DHA; se consideraron interesantes de evaluar en aspectos como la estabilidad térmica y operacional, y por tanto fueron incluidos en los análisis de los dichos parámetros, detallados en los siguientes capítulos. El mayor índice de selectividad se obtuvo con O-CCL, indicando que este derivado sería el más adecuado para concentrar AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos, bajo las condiciones de reacción estudiadas. El resto de los derivados no resultaron de interés para posterior análisis ya que con ellos se obtuvo IS con valores en torno a 1, indicando que la velocidad de hidrólisis de EPA+DHA es igual a la de el resto de los ácidos grasos.

4.4. ESTABILIDAD TÉRMICA DE CCL Y SUS DIFERENTES DERIVADOS

Los datos experimentales obtenidos en el estudio de la estabilidad térmica de CCL y sus derivados fueron correlacionados con los mecanismos de inactivación propuestos por Henley y Sadana (1985). La Tabla 4.9 muestra los parámetros cinéticos de inactivación obtenidos en la correlación y que describen la estabilidad térmica de la lipasa.

Tabla 4.9. Parámetros cinéticos de inactivación de CCL y sus diferentes derivados

Biocatalizador	Parámetro	Temperatura			
		30°C	40°C	50°C	60°C
CCL	k_1 (h^{-1})	0,064	1,094	1,757	nm
	k_2 (h^{-1})	0,003	0,016	0,029	nm
	a	0,540	0,449	0,125	nm
	T 1/2 (h)	52,1	2,0	0,5	nm
O-CCL	k_1 (h^{-1})	na	0,516	0,567	0,414
	k_2 (h^{-1})	na	0,001	0,005	0,092
	a	na	0,872	0,758	0,250
	T 1/2 (h)	> 90% AR a 150 h	559,0	90,2	2,5
	FE	-	275	187	-
O-CCL-NH2-DxSO4	k_1 (h^{-1})	na	0,001	0,002	0,363
	T 1/2 (h)	> 90% AR a 150 h	693,1	346,6	1,9
	FE	-	341	720	-
O-CCL-NH2-DxCHO	k_1 (h^{-1})	na	0,005	0,027	0,726
	b	na	0,480	0,470	0,050
	T 1/2 (h)	> 90% AR a 150 h	651,6	106,4	1,0
	FE	-	321	221	-
CNBr-CCL	k_1 (h^{-1})	na	0,894	2,046	0,357
	k_2 (h^{-1})	na	0,001	0,009	0,085
	a	na	0,907	0,709	0,200
	T 1/2 (h)	> 90% AR a 150 h	596,7	39,3	2,6
	FE	-	294	82	-
Gx-CCL	k_1 (h^{-1})	na	0,004	0,006	0,215
	b	na	0,490	0,480	0,086
	T 1/2 (h)	> 90% AR a 150 h	983,0	543,0	3,7
	FE	-	484	1128	-

na: no ajusta a mecanismo de inactivación, nm: no medido, AR: actividad residual, FE: factor de estabilización, k_1 : constante de inactivación térmica de la primera etapa, k_2 : constante de inactivación térmica de la segunda etapa, $T_{1/2}$: tiempo de vida media, a: fracción de actividad residual del estado conformacional intermedio de la enzima, b: fracción de actividad residual del estado conformacional final de la enzima

Gentile *et al.*, (1997) demostraron que para preparados enzimáticos comercializados en formato sólido (polvo) de CCL, la inactivación térmica que los afecta responde a dos fenómenos:

deshidratación y desdoblamiento. Por tanto, en medios acuosos el fenómeno de inactivación preponderante sería el desdoblamiento de la estructura terciaria de la proteína.

La Figura 4.9 muestra la estabilidad térmica de CCL y sus derivados a distintos tiempos de incubación, para las temperaturas evaluadas.

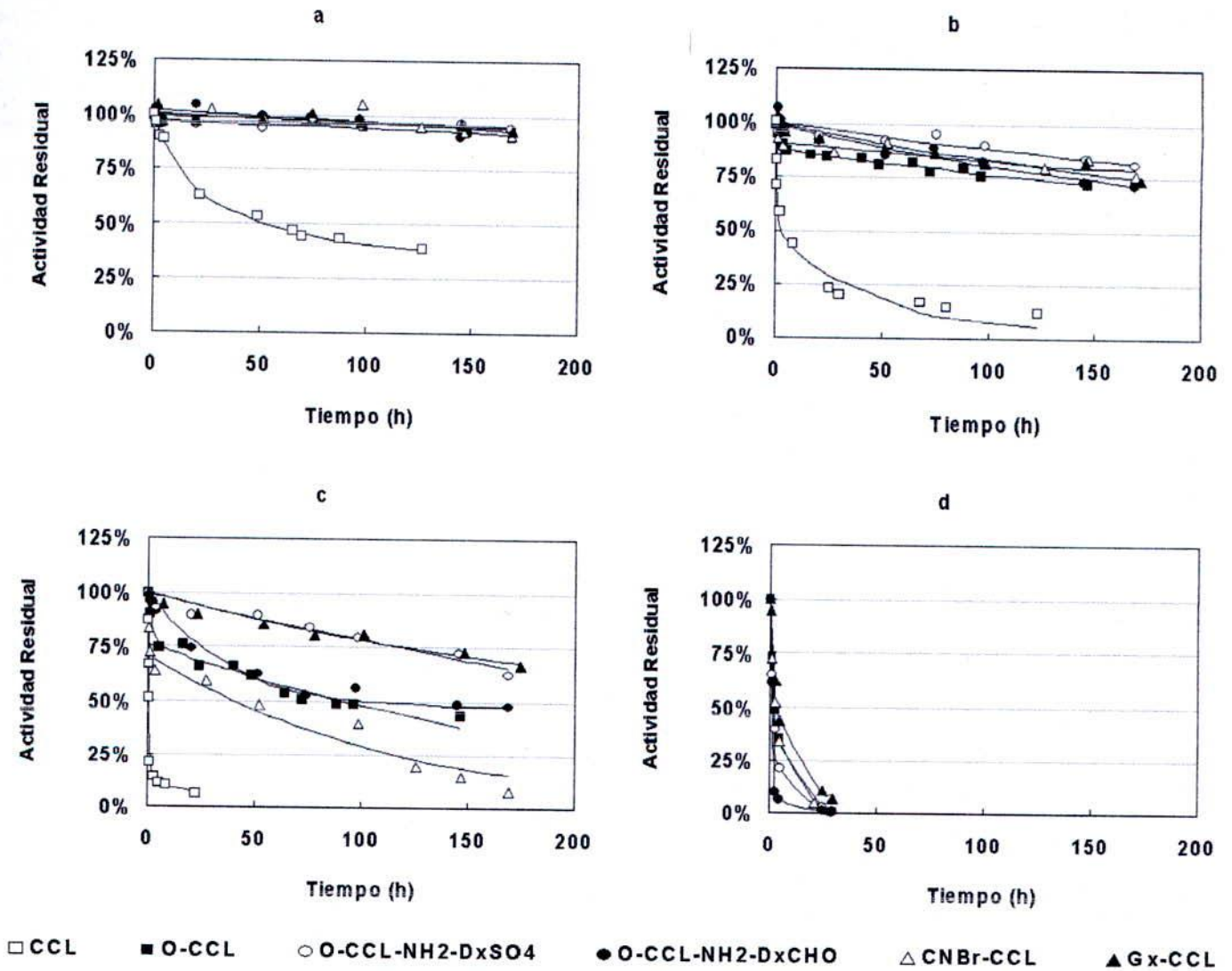


Figura 4.9. Estabilidad térmica de CCL y sus derivados, a) 30°C, b) 40°C, c) 50°C, d) 60°C

Como primer aspecto a destacar es que a 30°C y 40°C la enzima en forma soluble es afectada fuertemente por la inactivación térmica en comparación con la enzima inmovilizada en cualquiera de sus formas.

A medida que aumenta la temperatura a evaluar, se observa una diferenciación en la estabilidad de los diferentes biocatalizadores. Por ejemplo a 50°C, se aprecia como CNBr-CCL presenta una mayor inactivación en comparación a los otros derivados. Esto puede ser debido a que la inmovilización en CNBr es a través de un solo grupo reactivo de la enzima, por lo que la estructura de la enzima no sufriría una mayor rigidización de su estructura permaneciendo similar a su forma sin inmovilizar. No obstante, la estabilización de la lipasa no es despreciable al considerar los factores de estabilización respecto a la enzima soluble. Un aspecto interesante es que el derivado O-CCL presenta mayor estabilidad que el derivado de CCL-CNBr, indicando que la inmovilización a través de la superficie hidrofóbica de la lipasa le confiere mayor estabilidad que la inmovilización unipuntual.

El aumento de la estabilidad asociada a una rigidización que previene estados de desdoblamiento de la estructura de la lipasa (Iyer y Ananthanarayan, 2008), se evidencia en la menor inactivación del derivado covalente Gx-CCL, el cual se presenta en esta evaluación como el más termoestable según los factores de estabilización y valores de los tiempos de vida media para todas las temperaturas evaluadas.

La estabilidad de los derivados entrecruzados (O-CCL-NH₂-DxSO₄ y O-CCL-NH₂-DxCHO) aumenta si se compara con O-CCL, su contraparte sin entrecruzar; lo que claramente puede ser atribuido a la protección que brinda el polímetro a la estructura de la enzima. Sin embargo, se hubiese esperado que el derivado O-CCL-NH₂-DxCHO, presentara mayor estabilidad que O-CCL-NH₂-DxSO₄, dado que en el cual el polímero de dextrano aldehído se encuentra unido covalentemente a O-CCL y por tanto le entregaría mayor rigidez y con ello mayor estabilidad a la lipasa. Por el contrario O-CCL-NH₂-DxSO₄ presenta mayor estabilidad térmica, siendo una posible razón la estabilización dada por el microentorno más hidrofóbico que confiere este lecho polimérico a la enzima, fenómeno también observado por Fuentes *et al.*, (2004).

Cabe destacar que a 60°C todos los derivados se ven afectados fuertemente por la inactivación térmica, presentando en todos los casos a las 24 horas de incubación menos de un 20% de actividad residual.

4.5. ESTABILIDAD DE CCL Y SUS DERIVADOS EN SOLVENTES Y CO-SOLVENTES

La Figura 4.10 muestra la actividad residual de CCL y sus derivados a distintos tiempos de incubación en los solventes evaluados.

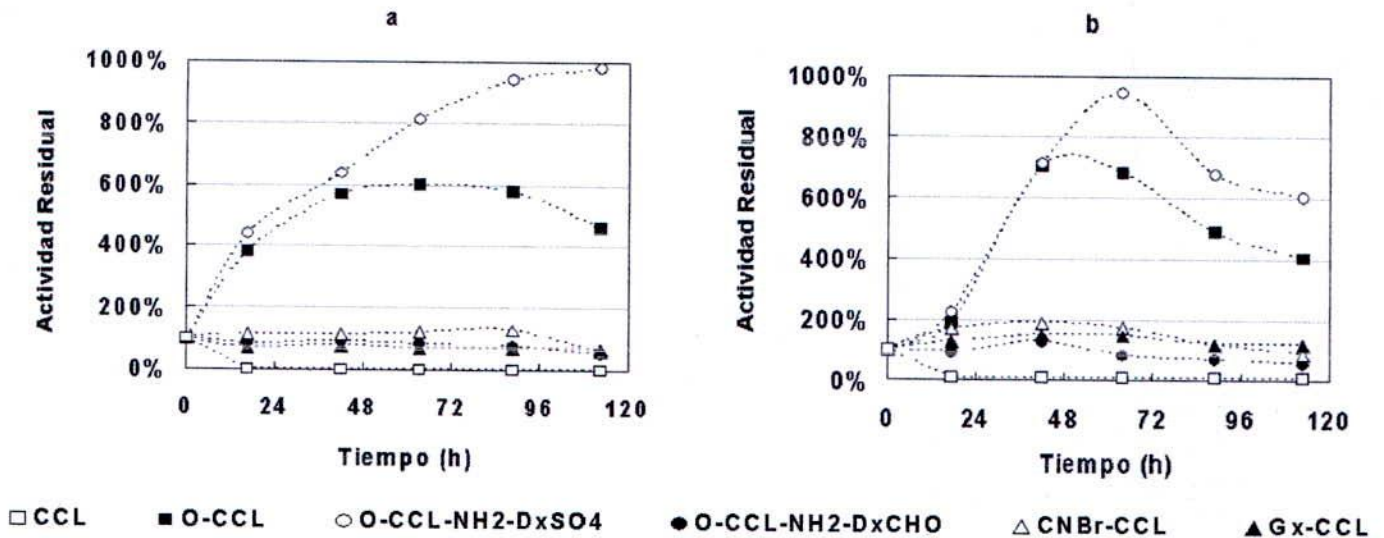


Figura 4.10. Estabilidad de CCL y sus derivados en solventes, a) ciclohexano, b) hexano

En la Figura 4.10a se observa que O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄ se activan considerablemente con respecto a su actividad inicial, a ser incubados en ciclohexano. Precisamente en estos derivados cuya unión al soporte es a través de interacciones hidrofóbicas, la presencia del solvente en el medio podría ser responsable de cambios conformacionales que incrementan la activación interfacial de las enzimas lipolíticas. Pese a que el derivado O-CCL-NH₂-DxCHO la lipasa también está unida a la agarosa mediante interacciones hidrofóbicas, probablemente la unión covalente del polímero de dextrano aldehído a la superficie de la enzima le otorga mayor rigidez haciéndolo menos susceptible al efecto de activación por el solvente.

El derivado de CNBr-CCL, formado por unión covalente a través de sólo un grupo reactivo de la lipasa y que por ende se asume que su estructura no se modifica en gran medida; también sufre una activación aunque leve en comparación a los derivados hidrofóbicos. El cambio de hidrofobicidad del medio por la presencia del solvente, pudo desplazar el equilibrio hacia la configuración abierta del *lid* provocando este efecto.

El mismo fenómeno se podría haber observado con la lipasa libre, sin embargo este solvente presenta un efecto de inactivación sobre la enzima que se hace evidente al no tener ésta la protección que le brinda la inmovilización.

Contrario al fenómeno de activación de los derivados de CCL mencionados anteriormente, con el derivado Gx-CCL se observa un leve decaimiento en su actividad residual. El hecho de que este derivado formado por unión covalente no se active como los otros derivados, se puede atribuir al efecto de rigidización de la estructura que adquiere con este tipo de unión; y la disminución en su actividad residual es la correspondiente según su estabilidad térmica, obtenida por incubación a la temperatura del ensayo.

El comportamiento de activación de los derivados en hexano, mostrado en la Figura 4.10b, es totalmente análogo a lo descrito para lo ocurrido en ciclohexano, con la diferencia que los porcentajes de activación son mayor en todos los derivados, incluso en los derivados Gx-CCL y O-CCL-NH₂-DxCHO. Abdul Rahman *et al.*, (2005), en estudios realizados con la lipasa de *Candida rugosa* adsorbida en partículas de kaolin, mostraron que el derivado no se ve activado al incubarse en hexano, y más aun, presenta un decaimiento continuo de su actividad. Lo reportado por estos investigadores es totalmente opuesto a lo obtenido en este estudio, indicando que el tipo de inmovilización modula también la interacción del solvente con la lipasa.

En la Figura 4.11 se presenta el estudio de la influencia de co-solventes sobre la actividad de CCL y sus derivados. La incubación en una solución 50% v/v propanol, produce una fuerte inactivación tanto en la enzima libre como inmovilizada (Figura 4.11a). Al contrario, utilizando una solución de 70% v/v de etilenglicol se produce una activación de los derivados O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄ (Figura 4.11b). Igual fenómeno se obtuvo con la incubación en una solución de 40% v/v de PEG (Figura 4.11c), evidenciando que la presencia del co-solvente también propicia el cambio conformacional de hiperactivación de la lipasa, mencionado anteriormente.

A diferencia de lo ocurrido con los solventes evaluados (ciclohexano y hexano), y también de lo observado con propanol, la enzima en forma soluble no se inactiva con etilenglicol ni con PEG, dónde el decaimiento de su actividad es conforme a la inactivación térmica que sufre la lipasa a la temperatura de incubación. La estabilidad de CCL en PEG fue analizada por Otero *et al.*, (2005), donde se evidenció que el efecto de activación del co-solvente afectaba solo a algunas isoformas de la enzima. En concordancia con aquello, el preparado de CCL soluble analizado en este estudio, no presentó activación tras la incubación en las condiciones descritas.

Debido a que los medios de incubación con co-solventes fueron preparados de modo de tener la misma constante dieléctrica en las soluciones, el efecto de activación de los derivados O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄ no estaría dado solamente por la polaridad del medio, si no que podría atribuirse a la interacción específica de la molécula del co-solvente con el bolsillo hidrofóbico de la enzima y su centro activo (o su entorno). La diferencia en el perfil de activación entre etilenglicol y PEG, sugiere además que la molécula polimérica de PEG interacciona con los derivados de manera distinta que la molécula monomérica de etilenglicol.

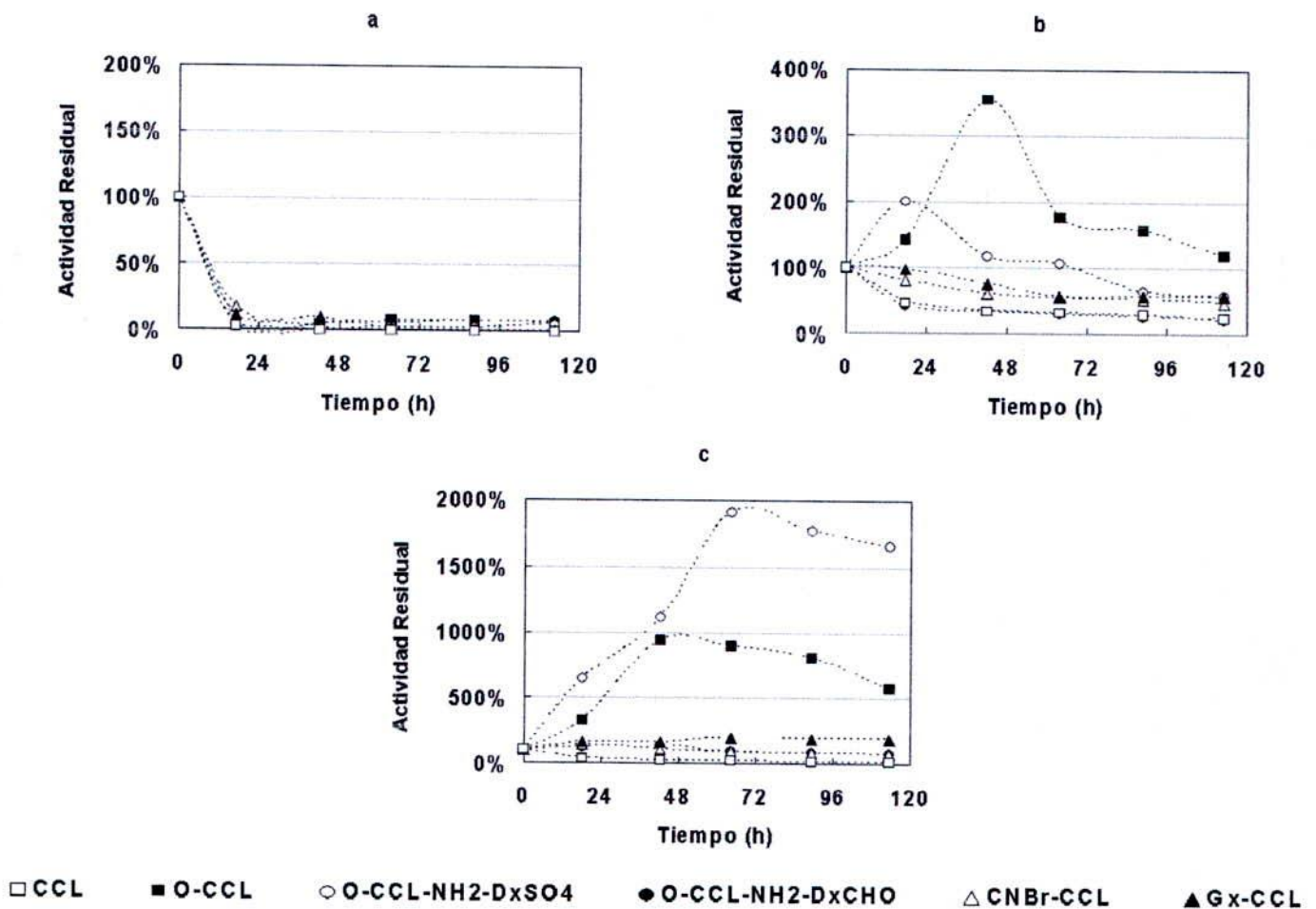


Figura 4.11. Estabilidad de CCL y sus derivados en co-solventes, a) propanol, b) etilenglicol, c) polietilenglicol

Según los resultados se determinó que el medio de reacción para la hidrólisis enzimática de aceite de pescado se compondría en la fase lipídica por hexano, en proporción 1:4 de sustrato/hexano, y por una solución 40% v/v de PEG en tampón fosfato pH 7 en la fase acuosa.

4.6. ESTABILIDAD OPERACIONAL DE LOS DERIVADOS DE CCL

En la Figura 4.12 se muestra los resultados de la hidrólisis de aceite de pescado con los derivados de CCL en tres lotes de reacción sucesivos.

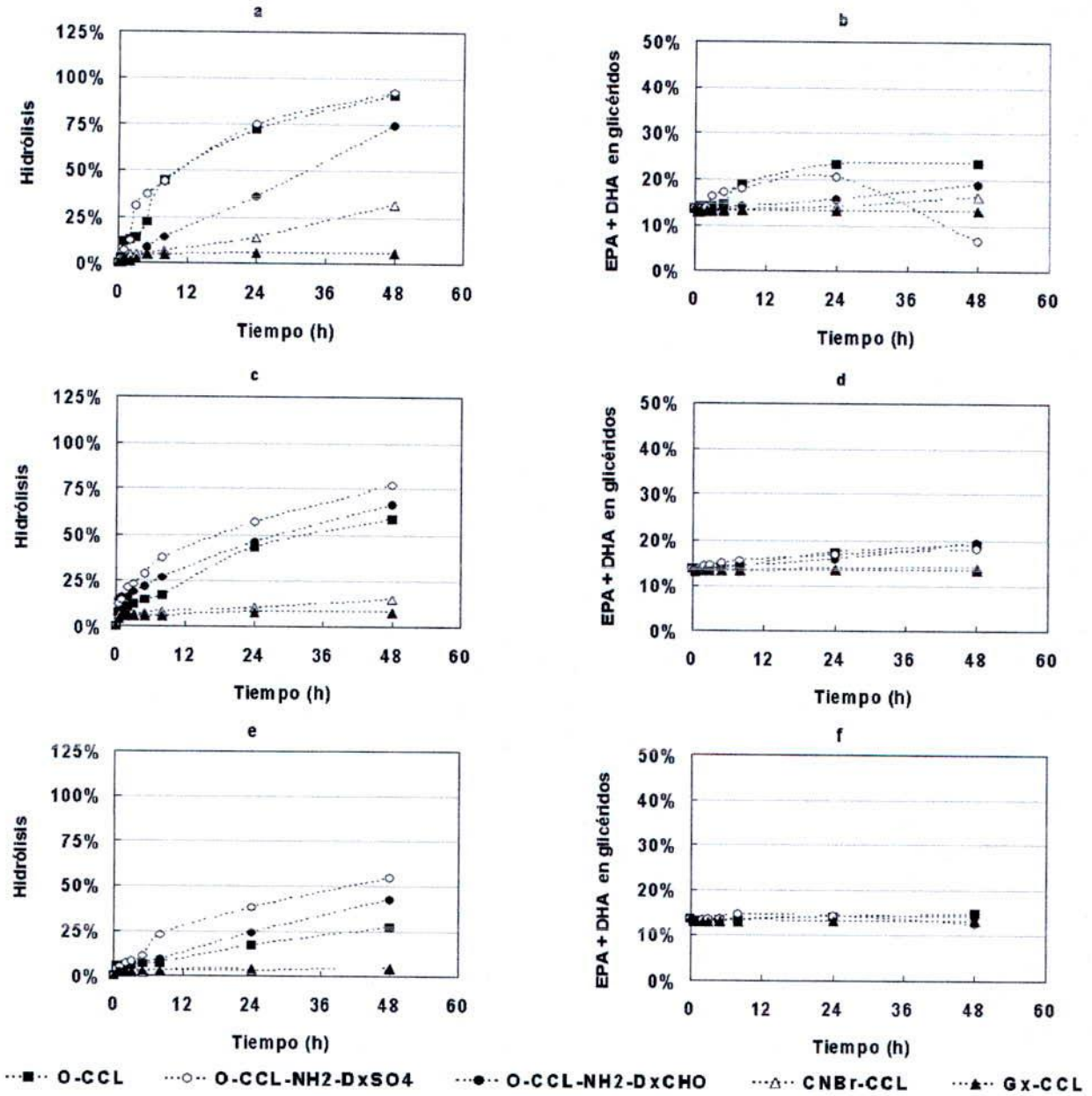


Figura 4.12. Hidrólisis de aceite de pescado con los derivados de CCL y EPA + DHA en forma de glicéridos en el aceite hidrolizado, a) y b) Lote 1, c) y d) Lote 2, e) y f) Lote 3. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1, W: solución 40% PEG en tampón fosfato sódico 200 mM, O: solución 1:4 AP/hexano

En los tres lotes sucesivos de reacción se obtuvo un bajo porcentaje de hidrólisis con los derivados covalentes, indicando que este tipo de inmovilización no resulta propicia para el sistema de reacción. Al contrario, los mayores porcentajes de hidrólisis se lograron con los derivados hidrofóbicos de CCL.

En el primer lote de reacción (Figura 4.12a), los derivados O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄ son los que presentan mayor porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado. Aparentemente la capa de dextrano sulfato del derivado O-CCL-NH₂-DxSO₄, no provoca algún efecto adverso como disminuir la accesibilidad de la molécula a hidrolizar al sitio catalítico, dado que presenta igual actividad de hidrólisis que O-CCL. El menor porcentaje de hidrólisis del derivado O-CCL-NH₂-DxCHO, en comparación a O-CCL y O-CCL-NH₂-DxSO₄ puede deberse a que en éste el polímero de dextrano se encuentra unido covalentemente (a diferencia de la unión iónica del polímero de dextrano sulfato) a la lipasa, rigidizándola y mermando su potencial catalítico.

En el segundo y tercer lote de reacción (Figura 4.12 c y e) el rendimiento de hidrólisis se ve notablemente disminuido, no obstante los derivados entrecruzados son los que logran un mayor porcentaje de hidrólisis. La acción protectora de la malla de polímeros funcionales podría explicar dos acciones concordantes a estos resultados: por una parte, el entrecruzamiento con polímeros evitaría la desorción de la enzima tal como se demuestra con los resultados expuestos en la Tabla 4.10, donde efectivamente el porcentaje de desorción es menor para los derivados entrecruzados comparado con el derivado O-CCL.

Tabla 4.10. Porcentaje de desorción de CCL del derivado después de cada lote de reacción

Derivado	Porcentaje de desorción de CCL del derivado		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
O-CCL	3,7%	6,8%	9,7%
O-CCL-NH ₂ -DxSO ₄	2,9%	4,1%	6,2%
O-CCL-NH ₂ -DxCHO	2,6%	3,4%	5,6%
CNBr-CCL	2,0%	2,6%	5,0%
Gx-CCL	2,0%	2,5%	4,6%

Por otra parte, la rigidización de la proteína dada por su unión multipuntual al polímero, previene estados de desdoblamiento de su estructura (Iyer y Ananthanarayan, 2008), lo que conlleva al aumento de su estabilidad. Sin embargo, la actividad residual de los derivados entrecruzados disminuye notablemente tras cada lote de reacción, como se aprecia en la Figura

4.13. Al respecto, cabe destacar que es el derivado O-CCL el que sufre una menor pérdida de actividad entre el lote 1 y el lote 2.

Se aprecia además que la actividad residual de los derivados tras la hidrólisis en el medio con solvente y co-solvente es menor a la obtenida en la evaluación de estabilidad en dichos solventes en condiciones no reactivas. De este comportamiento se infiere que el cambio conformacional que debe sufrir la lipasa para realizar la catálisis incide en el mantenimiento de su estabilidad como molécula activa. No obstante aquello, sí se observa el fenómeno de activación por solvente presentado anteriormente en todos los derivados tras el primer lote de reacción (salvo CNBr-CCL).

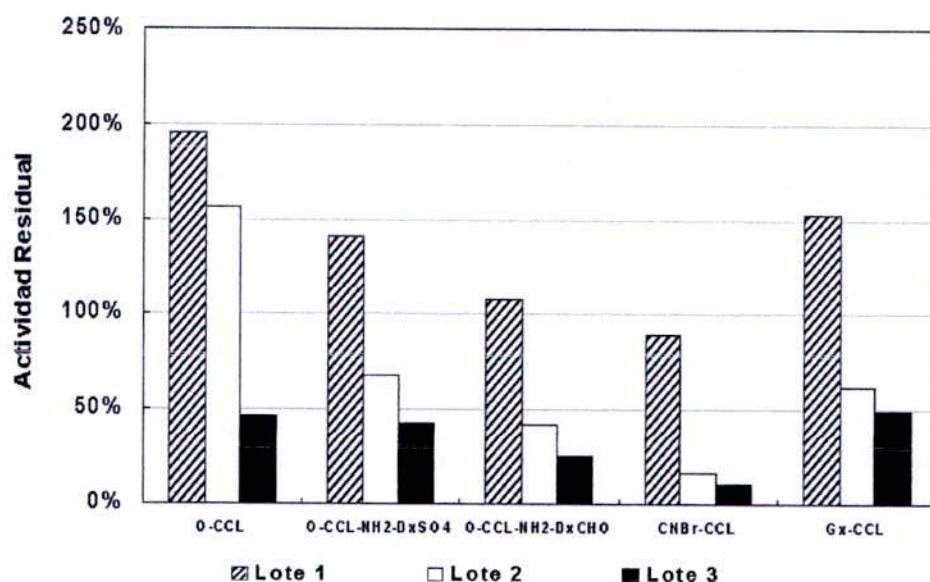


Figura 4.13. Actividad residual de los diferentes derivados de CCL al término de la hidrólisis de aceite de pescado.

Un efecto interesante de analizar en el primer lote de reacción, es la capacidad para concentrar EPA y DHA en forma de glicéridos, de los diferentes derivados de CCL (Figura 4.12b). Con el derivado O-CCL, se logra un mayor porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el producto final de hidrólisis. Esto sería indicio de una modulación de la selectividad de hidrólisis inicial frente a las distintas familias de ácidos grasos dada por el tipo de inmovilización. Una notable diferencia se presenta con el derivado de O-CCL-NH2-DxSO4 al cabo de las 48 hrs. de reacción, con el cual se obtiene el mas bajo porcentaje de EPA+DHA en glicéridos, incluso menor al inicial. Este comportamiento puede atribuirse a que el polímero de dextrano sulfato confiere un microentorno a la enzima con características menos hidrofóbicas, lo que provocaría

una mayor afinidad del derivado con los glicéridos parcialmente hidrolizados (di-o monoacilglicéridos) más hidrofílicos. El efecto del microentorno de la enzima ha sido estudiado anteriormente, postulándose que incide tanto en su capacidad catalítica en términos de actividad (Lei *et al.*, 2002) como en su especificidad (Chen *et al.*, 2003; Palomo *et al.*, 2004; Fernández-Lorente *et al.*, 2001a).

Las diferencias en los porcentajes de EPA+DHA en forma de glicéridos a lo largo de la reacción sugieren un patrón de selectividad de hidrólisis. Aparentemente en las primeras etapas de la reacción, en todos los derivados estudiados, la enzima hidroliza preferentemente triacilglicéridos compuestos con ácidos grasos saturados o monoinsaturados en sus tres posiciones, dejando inalterado el porcentaje de ácidos grasos Omega-3 presente en forma de glicéridos.

Este fenómeno ha sido reportado previamente en estudios realizados con CCL en forma soluble (Tanaka *et al.*, 1993); donde se propone que existe una menor velocidad de hidrólisis frente a triacilglicéridos que contienen DHA. A medida que transcurre la hidrólisis se van escindiendo los enlaces ésteres de los triacilglicéridos que sí contienen ácidos grasos Omega-3, lo que produce el incremento de su porcentaje relativo formando glicéridos. Es así como por ejemplo, cuando se alcanza alrededor de un 75% de hidrólisis con el derivado O-CCL-NH₂-DxSO₄ en el lote 3 de reacción, se tiene alrededor de un 20% de EPA+DHA en forma de glicéridos; valor similar al obtenido en el lote 1 de reacción cuando se alcanza dicho porcentaje de hidrólisis. Lo mismo ocurre con el porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos obtenido en el tercer lote de reacción: éste es menor al 15% cuando se logra un 50% de hidrólisis; igual valor alcanzado en el lote 1 cuando se tiene 50% de hidrólisis de aceite.

Con respecto a la concentración de EPA+DHA en el aceite hidrolizado, tanto en el segundo como en el tercer lote de reacción, con ningún derivado se logra incrementar significativamente el porcentaje de estos Omega-3.

Según estos resultados, el derivado O-CCL resulta el más apropiado para la obtención de AGPICK- ω 3 en forma de glicéridos. Sin embargo, se hace preciso entonces mejorar la estabilidad de este derivado para su uso en lotes sucesivos, debido a que en el segundo y tercer lote de reacción no se logró el aumento del porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos del aceite hidrolizado.

4.7. COMPARACIÓN DE SISTEMAS DE REACCIÓN ENZIMÁTICA PARA LA HIDRÓLISIS DE ACEITE DE PESCADO

Se evaluó la influencia de la concentración de enzima y de la temperatura en la reacción de hidrólisis utilizando O-CCL con solventes y co-solventes en el medio de reacción (SR III), lo cual fue comparado con la reacción con la enzima soluble (SR I) y con el derivado O-CCL sin solventes ni co-solventes en el medio de reacción (SR II).

En la Figura 4.14 se muestran los resultados de la hidrólisis con distintas concentración de enzima por cada gramo de aceite a hidrolizar, para cada sistema de reacción estudiado. Respecto a SR I se aprecia claramente que mientras mayor es la concentración de enzima mayor es la velocidad de hidrólisis y también es mayor el porcentaje de hidrólisis alcanzado. Además el aumento de la velocidad de hidrólisis es proporcional a la concentración de enzima, efecto esperable de un sistema de reacción enzimática en condiciones normales no afectado por inhibiciones o restricciones difusionales, o tratándose de lipasas, no afectado por la formación de dímeros que sufren estas moléculas al unirse por medio de sus zonas hidrofóbicas (Palomo *et al.*, 2003a). Por el contrario, con SR II y SR III el porcentaje de hidrólisis alcanzado cuando la reacción se lleva a cabo con la mayor concentración de enzima, 70 U/g AP, es prácticamente el mismo que el alcanzado cuando se utilizan 35 U/g AP en la reacción. Como en estos sistemas la lipasa se encuentra inmovilizada, se puede descartar el efecto de dimerización anteriormente mencionado como causa en esta pérdida de potencial catalítico. Como posible explicación se podrían esbozar dos posibilidades; una podría ser la presencia de efectos de restricciones difusionales del sustrato en el derivado, donde la velocidad aparente de reacción estaría comandada por la transferencia de masa y no por el potencial catalítico del biocatalizador. Otra opción es que al duplicar la actividad enzimática adicionada, se está duplicando la masa de derivado agregado (con una actividad específica determinada), cambiando las condiciones de mezclado del medio de reacción en desmedro del rendimiento de hidrólisis.

Con respecto a la obtención de AGPICL- ω 3 en forma de glicéridos, utilizando la lipasa en forma soluble (SR I), se logra un mayor porcentaje de EPA+DHA en glicéridos. Se observa además que el porcentaje de EPA+DHA en glicéridos llega a un valor máximo cercano al 30% pese a que se duplique la concentración de enzima. Esto indica que a mayor velocidad de reacción dada por la mayor concentración de enzima, la selectividad de no hidrólisis de AGPICL- ω 3 se pierde.

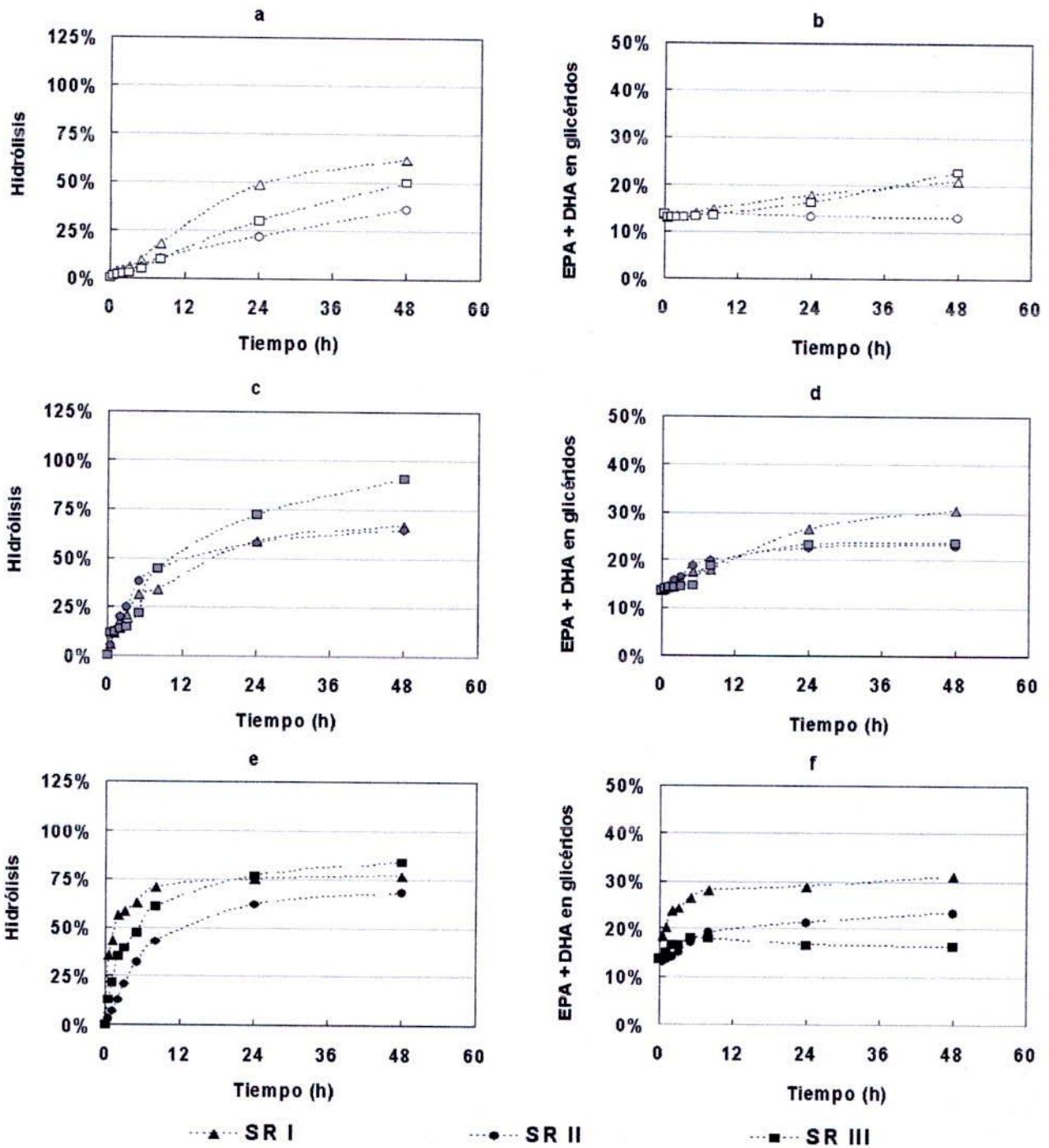


Figura 4.14. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido a diferentes concentraciones de enzima mediante los distintos sistemas de reacción a) y b) 17 U/gAP, c) y d) 35 U/gAP e) y f) 70 U/gAP. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, razón W/O 1:1.

La Figura 4.15 muestra el porcentaje de hidrólisis de aceite de pescado y el porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos obtenidos a diferentes temperaturas de reacción, utilizando CCL y O-CCL en los distintos medios de reacción.

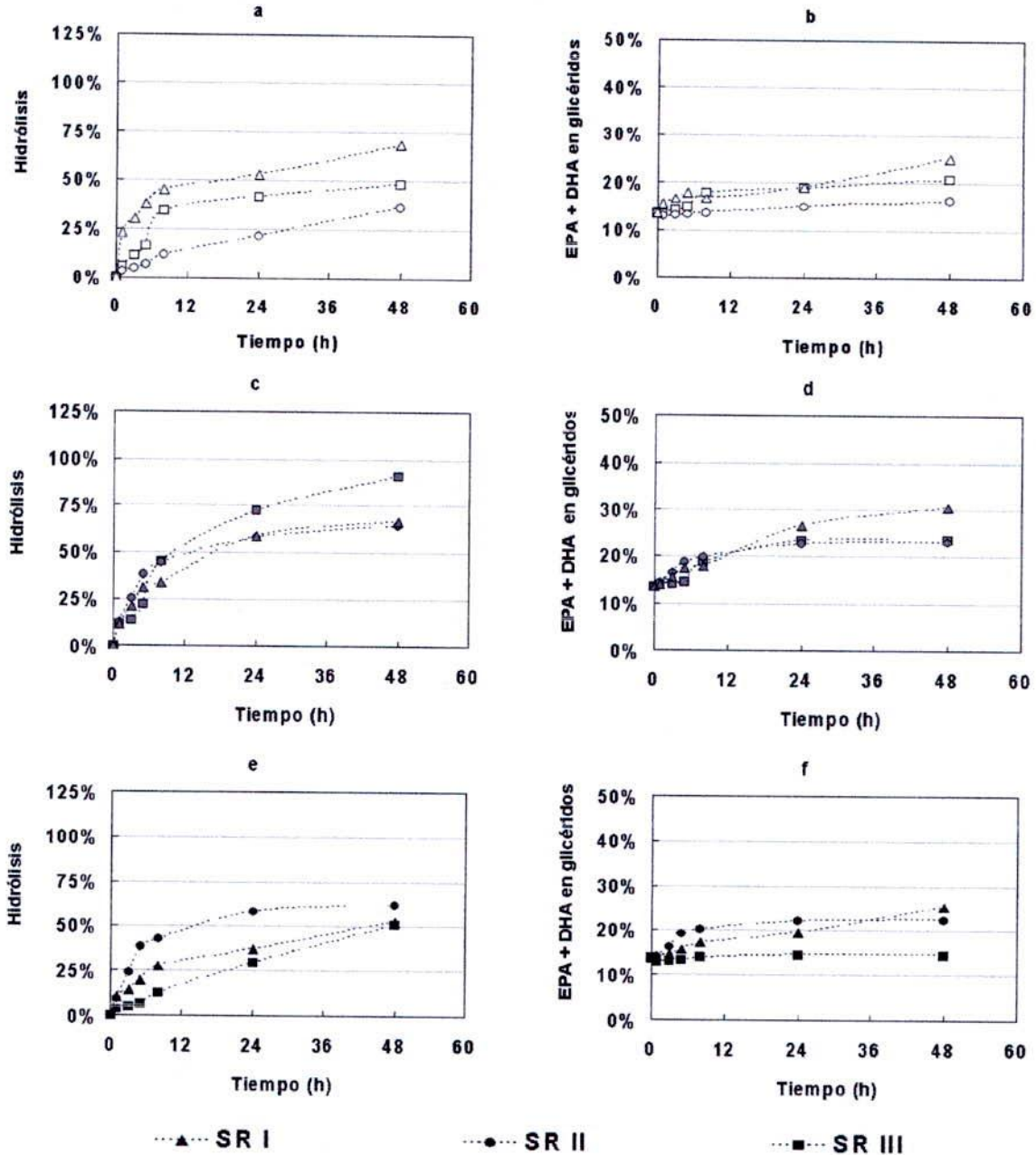


Figura 4.15. Hidrólisis de ácidos grasos de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido tras la hidrólisis mediante los distintos sistemas de reacción a diferentes temperaturas a) y b) 25°C, c) y d) 37°C, e) y f) 50°C. Condiciones de reacción: pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1

Se aprecia que a 37°C se alcanzan los mayores porcentajes de hidrólisis para todos los sistemas estudiados corroborando que esta temperatura es la adecuada para dicho propósito, tanto con la lipasa en su forma soluble como se demostró en el la sección 4.2 del presente capítulo, como en su forma inmovilizada.

Se esperaba que a 50°C se obtuviera una mayor velocidad de hidrólisis con los derivados O-CCL (SR II y SR III), pero el efecto de inactivación térmica se hace evidente. A dicha temperatura, el mayor porcentaje de hidrólisis se logra con SR II. Esto indica que el efecto de inactivación térmica se acentúa en el medio con solvente / co-solvente de SR III; en el cual el perfil de hidrólisis se hace similar al de la enzima soluble, considerada la forma más susceptible a la inactivación térmica.

A 25°C se observa que el mayor porcentaje de hidrólisis se obtiene con SR I. Una explicación para aquello es que mientras menor es la temperatura, el aceite se vuelve más viscoso y por ende menos accesible como sustrato, más aun si la lipasa se encuentra inmovilizada. El efecto de solubilización del sustrato al emplear solvente y co-solventes en el medio de reacción, se puede apreciar con SR III, el cual presenta un porcentaje de hidrólisis mayor que con SR II.

Con respecto a la obtención de AGPACL- ω 3 en glicéridos, el aumento de la temperatura no provoca un aumento significativo del porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite hidrolizado, en ninguno de los sistemas de reacción estudiados. Estos resultados concuerdan por lo reportado Hoshino *et al.*, (1990), quienes evaluaron los efectos de la temperatura en un rango de 15 a 40°C para la concentración de AGPACL- ω 3 en glicéridos a partir de aceite de hígado de bacalao y aceite refinado de sardina con CCL. Estos investigadores observaron que la disminución de la temperatura no aumentaba la concentración de AGPACL- ω 3 pero sí evitaba el desarrollo de un olor desagradable en el producto.

Es interesante destacar que con SR I, donde CCL se encuentra en forma soluble, se logra para todas las temperaturas analizadas el mayor porcentaje de EPA+DHA en glicéridos. Este hecho indica que la inmovilización en el soporte hidrofóbico que mantiene la conformación abierta de la lipasa, le resta la selectividad de no hidrólisis de AGPACL. Tal como se mencionó anteriormente, la lipasa presenta una menor velocidad de hidrólisis frente a este tipo de ácidos grasos, probablemente debido a que poseen una estructura con más pliegues sobre si misma por las instauraciones cis, lo que provoca un impedimento de tipo estérico a la lipasa para llegar al enlace éster. La mayor apertura del lid podría provocar un mejor acomodamiento de la enzima sobre este sustrato facilitando entonces la ruptura del enlace éster.

Finalmente, se evaluó la hidrólisis de aceite de pescado mediante los distintos sistemas de reacción en lotes sucesivos a 37°C, tal como lo muestra la Figura 4.16.

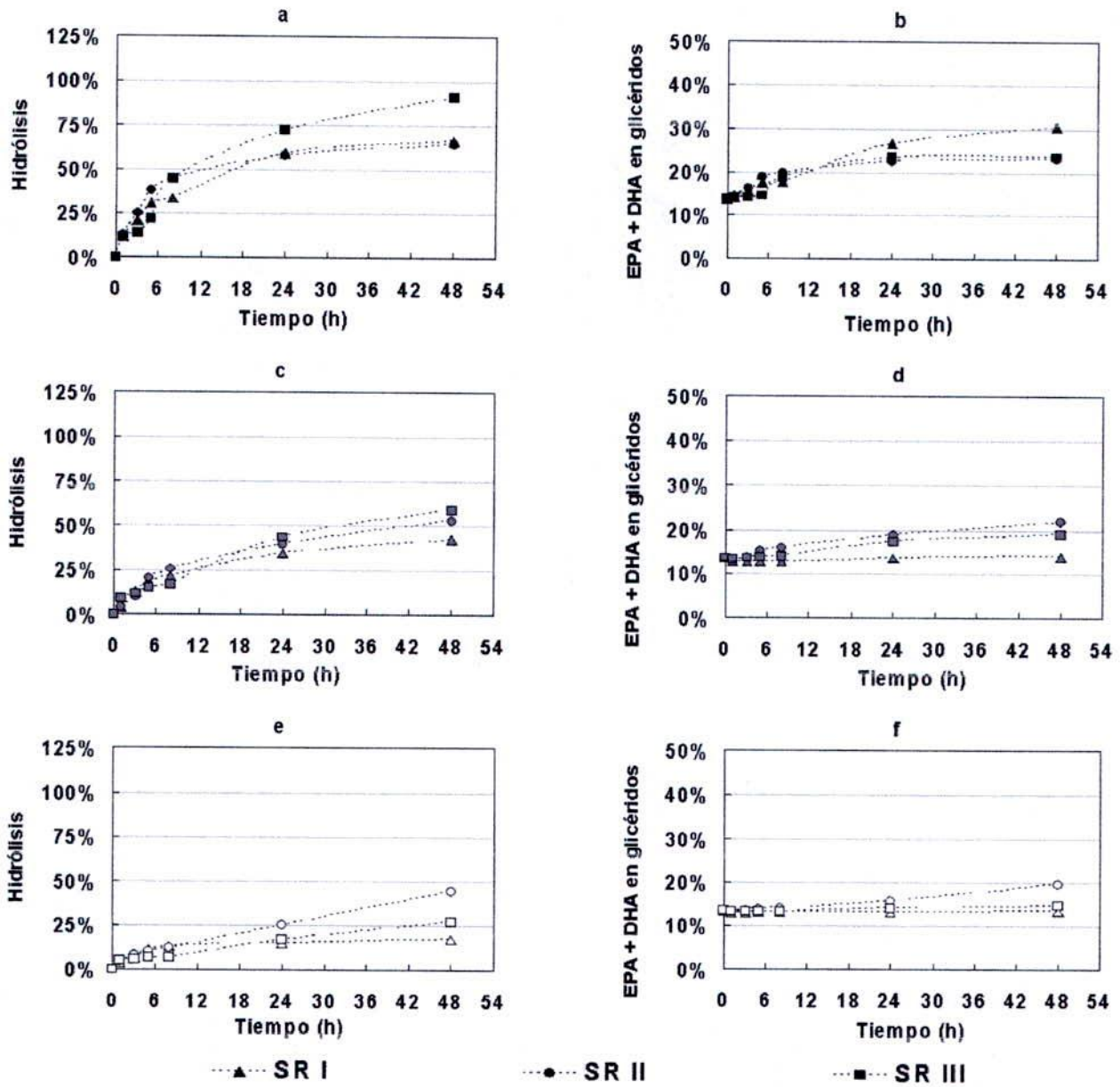


Figura 4.16. Hidrólisis de aceite de pescado y porcentaje de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite obtenido tras la hidrólisis mediante los distintos sistemas de reacción, a) y b) primer lote, c) y d) segundo lote, e) y f) tercer lote. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, razón W/O 1:1

Como era de esperarse en el segundo y tercer lote de reacción, la lipasa en SR I presenta un bajo porcentaje de hidrólisis atribuible a la poca estabilidad térmica que demostró CCL en forma

soluble. Sin embargo, se observa un posible efecto de protección por sustrato (el aceite) dado que la actividad medida al finalizar el primer lote de reacción, corresponde a un 55% de actividad inicial (Figura 4.17), valor mayor a lo obtenido en la determinación de estabilidad térmica en la sección 4.4 del presente capítulo.

Se hace interesante de analizar que con los sistemas SR II y SR III el porcentaje de hidrólisis disminuye considerablemente de un lote a otro, lo que va directamente en desmedro de la utilidad que se presupone al usar enzimas inmovilizadas. Se tiene además que con SR III, el porcentaje de hidrólisis obtenido en el tercer lote es menor al logrado por SR II, indicando que la utilización de solvente / co-solvente tendría un efecto negativo sobre la estabilidad operacional.

En la Figura 4.17 se aprecia que, si bien la actividad de los derivados en SR III va disminuyendo, el valor de ésta actividad residual en el primer y segundo lote es elevado y concuerda con el fenómeno de activación observado en el estudio de estabilidad en solventes / co-solventes en condiciones no reactivas (sección 4.5 del presente capítulo). Pero claramente el alto valor de actividad residual de los derivados en SR III, medido con el método p-NPB, no se condice con la actividad de hidrólisis. Contrario a esto, en SR II no se aprecia la activación de los derivados y la disminución de su actividad residual es concordante con la merma en el rendimiento de hidrólisis.

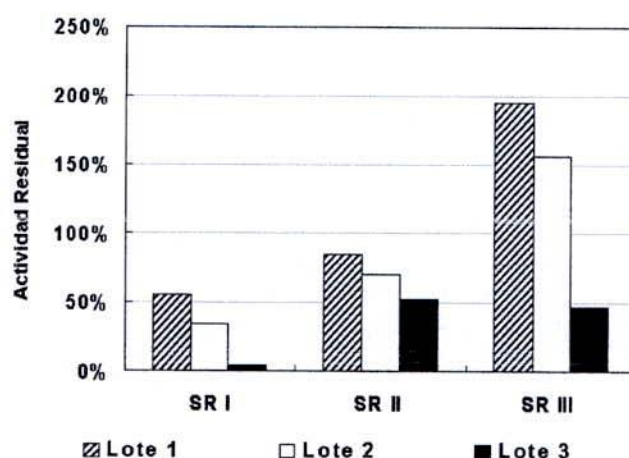


Figura 4.17. Actividad residual de los biocatalizadores tras la hidrólisis de aceite de pescado mediante los distintos sistemas de reacción

Finalmente, debido al bajo grado de hidrólisis observado en el segundo y tercer con todos los sistemas estudiados, no se obtuvo mayor concentración de EPA+DHA en glicéridos.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REUTILIZACIÓN DEL SOPORTE DE INMOVILIZACIÓN DE CCL

Dado que O-CCL es un derivado formado mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas, es posible desorber la lipasa permitiendo así la recuperación del soporte. No obstante, es importante conocer la real capacidad de reutilización del soporte puesto que la matriz del derivado O-CCL se compone de agarosa modificada y entrecruzada, que puede ser susceptible a cambios químicos y/o físicos por su uso extensivo en varios lotes de reacción. Para la evaluación de la reutilización del soporte se realizaron previamente dos estudios: la evaluación de la capacidad de carga del soporte y la capacidad de desorción de la lipasa del soporte.

4.8.1. Capacidad de carga del soporte con CCL

La capacidad de carga del soporte se evaluó ofreciendo disoluciones de lipasas a distintas concentraciones para la inmovilización. En la Figura 4.18 se muestra la cantidad de actividad inmovilizada así como también la cantidad de proteína inmovilizada por cada gramo de soporte.

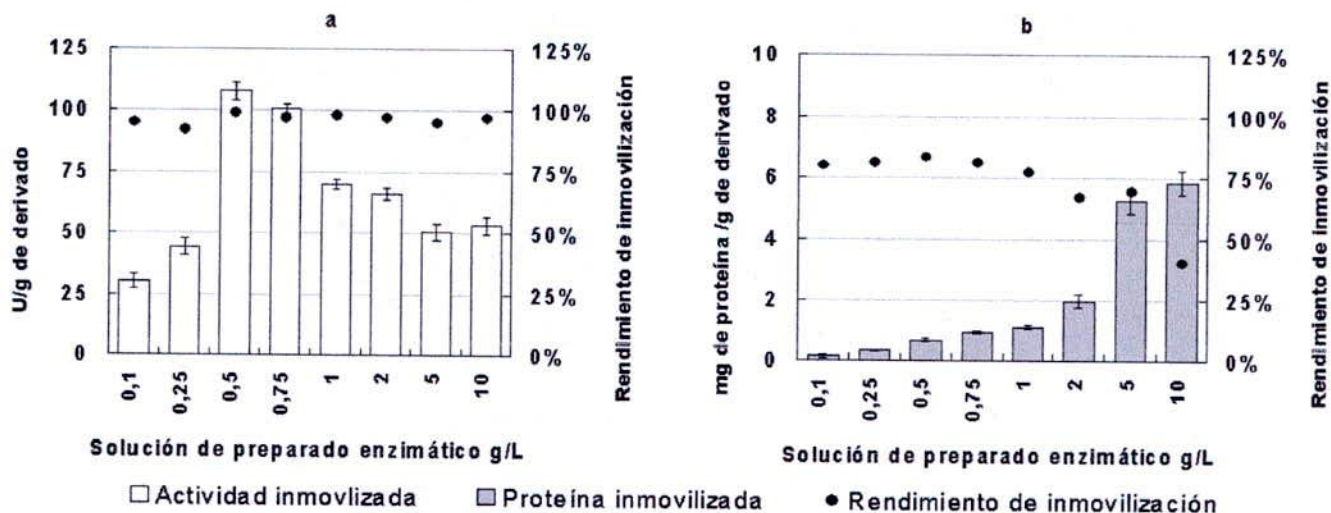


Figura 4.18. Capacidad de carga de octil-agarosa y rendimientos de inmovilización de distintas concentraciones de preparado enzimático, a) actividad, b) proteína

Se aprecia que la máxima actividad inmovilizada se obtiene al contactar el soporte con la solución a una concentración de 0,5 g de preparado enzimático /L (80 mg proteína/ L). Como se

mostró en la sección 4.1.3, igual concentración de preparado enzimático es la que despliega el máximo potencial catalítico medido en p-NPB.

Con este resultado se determina que la concentración crítica de la lipasa para la inmovilización es aquella en la que se evita la posible formación de dímeros, descartando una posible competencia favorable a la adsorción en el soporte hidrofóbico en desmedro de la formación de dímeros en las soluciones de mayor concentración de lipasa. Este efecto se corrobora ya que con el preparado enzimático de mayor concentración se obtiene el más bajo rendimiento de inmovilización de proteína, atribuible al mencionado efecto de dimerización de la lipasa.

4.8.2. Capacidad de desorción de CCL del soporte

Como se observa en la Figura 4.19 se estudió la desorción de la lipasa desde el derivado O-CCL en términos de actividad y de proteína desorvida. La desorción cuantificada para ambos parámetros fue evaluada para un derivado activo y también para un derivado sometido previamente a inactivación hasta tener un 25% de su actividad inicial.

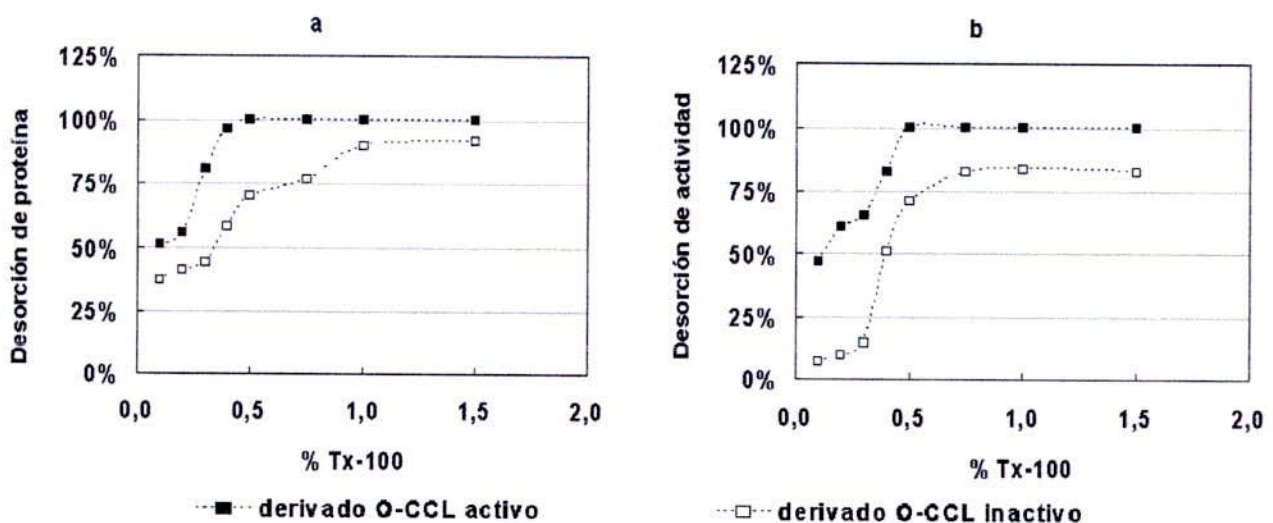


Figura 4.19. Capacidad de desorción de CCL del soporte de octil-agarosa, a) porcentaje de desorción de proteína, b) porcentaje de desorción de actividad inmovilizada

Se aprecia claramente que con el derivado activo se logra un 100% de desorción de la lipasa del soporte a partir de una concentración de 0,5% v/v de la solución de tensoactivo Tx-100, tanto en actividad como en proteína. Por el contrario, en el derivado inactivo la lipasa presenta una mayor resistencia a separarse del soporte, dónde incluso con una solución de tensoactivo Tx-100 al 1%

v/v sólo se alcanza un máximo de desorción de proteína alrededor de 90%. Esta diferencia en la respuesta de desorción puede encontrar explicación en que la inactivación de la lipasa está vinculada a un cambio conformacional de su estructura. Por ende, esto podría implicar una interacción diferente, más fuerte, con el soporte hidrofóbico, por ejemplo por medio de los otros bolsillos hidrofóbicos de la enzima, anteriormente no tan expuestos a la matriz de octil-agarosa.

Pese a que con el tensoactivo en una concentración de 1% v/v no se logra la desorción completa de la lipasa desde el derivado inactivo, se estimó como suficiente para el desarrollo de las pruebas de reutilización de soporte cuyos resultados se muestran a continuación.

4.8.3. Capacidad de reutilización de octil-agarosa como soporte de inmovilización para CCL

En la Figura 4.20 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de los ciclos de reutilización de octil-agarosa, donde se observa la actividad residual de O-CCL para de cada lote, en las cuatro condiciones de reacción estudiadas; esto es la reacción en el medio con solventes y co-solventes correspondiente a SR III a 37°C a 50 °C, y también a la reacción en el medio sin solventes, SR II a 37°C a 50 °C. Tal como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos el fin de un ciclo de utilización del derivado O-CCL se establece cuando al finalizar un lote, éste presenta un 25% o menos de su actividad respecto al inicio del primer lote. Dado este criterio, el número de lotes por cada ciclo resultó variable según el sistema de reacción y temperatura evaluado.

Los ciclos de *reacción (en lotes sucesivos) - desorción - inmovilización - reacción (en lotes sucesivos)*, implicaron una disminución lineal en el valor de la actividad residual del derivado (medida como actividad de hidrólisis de p-NPB). Por tanto, tal como se observa en la Figura 4.20, para cada ciclo de reacción se determinó una curva de tendencia lineal de disminución de actividad residual descrita por la Ecuación 4.1.

$$AR = 1 - m_{AR} * L$$

Ecuación 4.1

Donde AR corresponde a la fracción de actividad residual, m_{AR} a la pendiente de disminución de actividad residual del ciclo y L al número de lotes de reacción en el ciclo.

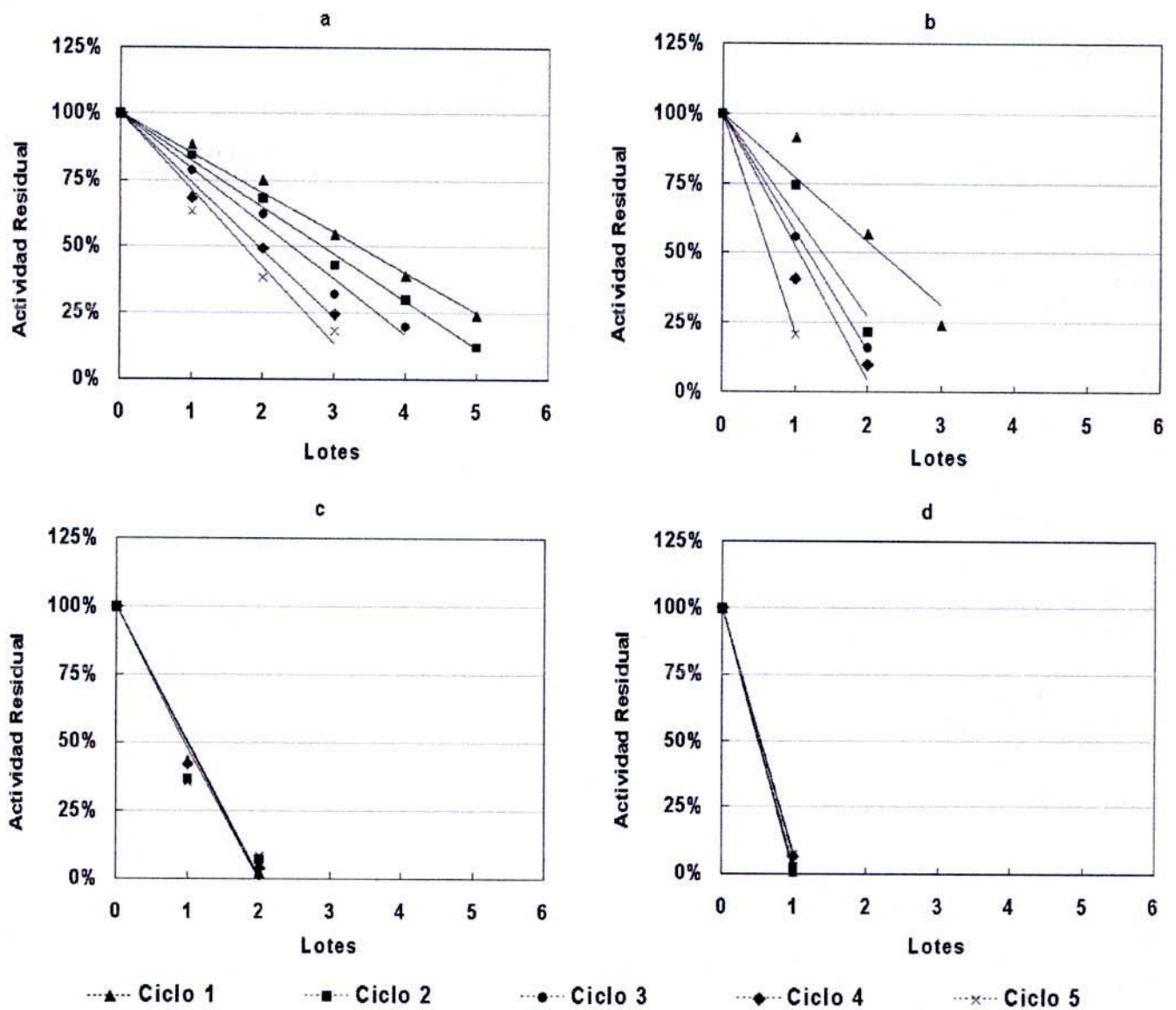


Figura 4.20. Actividad residual de O-CCL para cada lote de estudio de reutilización de octil-agarosa, a) SR II a 37°C, b) SR III a 37°C, c) SR II a 50°C, d) SR III a 50°C

En la Tabla 4.11 se presentan los valores de m_{AR} , donde se aprecia que al reutilizar el soporte por un mayor número de ciclos, la lipasa va perdiendo la interacción con éste, haciendo que el derivado se vuelva más inestable pues se pierde la estabilización que brinda la inmovilización.

Tabla 4.11. Pendientes de disminución de actividad residual para cada ciclo de reacción

Sistema de reacción	temperatura °C	Pendiente de disminución de actividad residual,				
		ciclo 1	ciclo 2	m_{AR} ciclo 3	ciclo 4	ciclo 5
SR II	37	0,15	0,18	0,21	0,26	0,29
SR III	37	0,23	0,37	0,43	0,48	0,79
SR II	50	0,50	0,50	0,52	0,50	0,49
SR III	50	0,99	0,98	0,99	0,93	0,93

Al comparar las condiciones estudiadas, con SR II a 37°C se tiene un máximo de 5 lotes en los primeros dos ciclos de de utilización, a diferencia de lo que ocurre con el sistema SR III donde sólo se alcanzan 3 lotes como máximo sólo en el primer ciclo de reutilización. Esto indica que el uso de solvente / co-solvente en el medio de reacción tiene un efecto negativo sobre la capacidad de reutilización de octil-agarosa. Dicho efecto negativo, acentuado por el incremento de la temperatura de reacción, puede deberse a la obstrucción o a la pérdida de los grupos hidrofóbicos del soporte. Esto concuerda al analizar la Figura 4.21, donde se aprecia que el porcentaje de activación de la lipasa al inmovilizarse en el soporte reutilizado del sistema SR III, disminuye fuertemente conforme se aumentan los ciclos de reuso, en comparación a SR II.

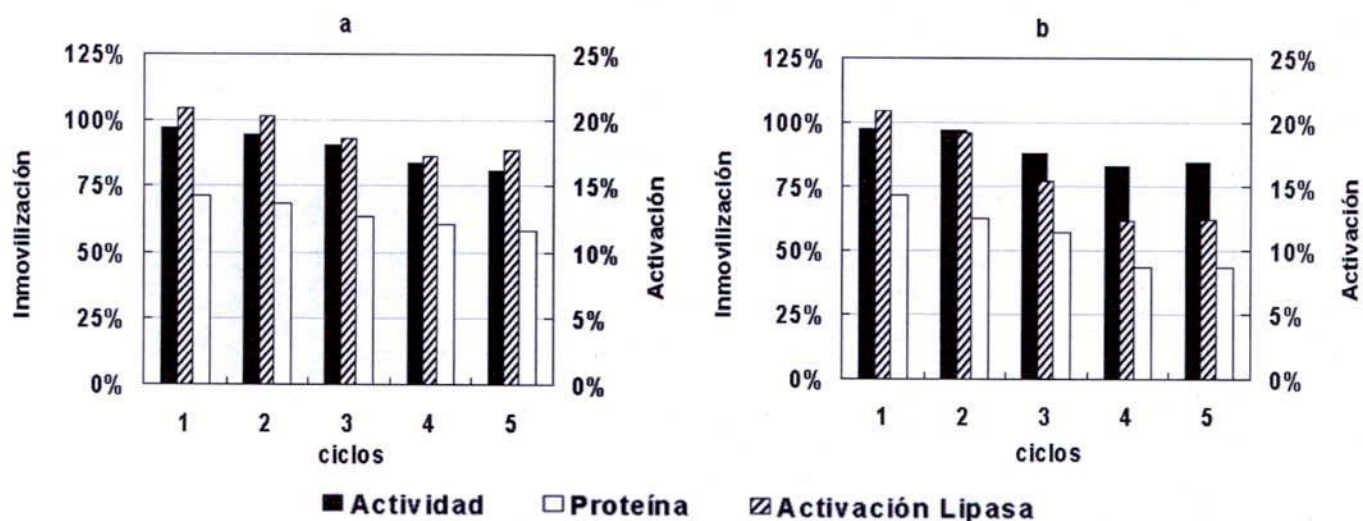


Figura 4.21. Rendimiento de inmovilización y porcentaje de activación de O-CCL para cada ciclo de reuso de octil-agarosa en medios de reacción a 37°C, a) SR II, b) SR III

El rendimiento de inmovilización en términos de proteína también disminuye más drásticamente en SR III, corroborando que el soporte ha perdido su capacidad de retención de la lipasa. A

diferencia del rendimiento de proteína inmovilizada, el rendimiento de actividad inmovilizada se mantiene relativamente constante, pero esto es debido a que, tal como se mostró anteriormente (Figura 4.18), no existe una correlación lineal entre cantidad de lipasa inmovilizada con su expresión de capacidad catalítica.

Comparativamente SR II a 37°C es la condición en estudio más favorable para contemplar la reutilización de octil-agarosa en ciclos sucesivos. Esta afirmación se basa en que con este sistema se tienen los menores valores de m_{AR} , y en que tanto los porcentajes de activación de lipasa y los rendimientos de inmovilización de la proteína, se mantienen o decrecen levemente conforme aumentan los ciclos de operación. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 4.22, con este sistema se tienen los mayores porcentajes de proteína remanente en el soporte de inmovilización tras la desorción al finalizar un ciclo de operación,

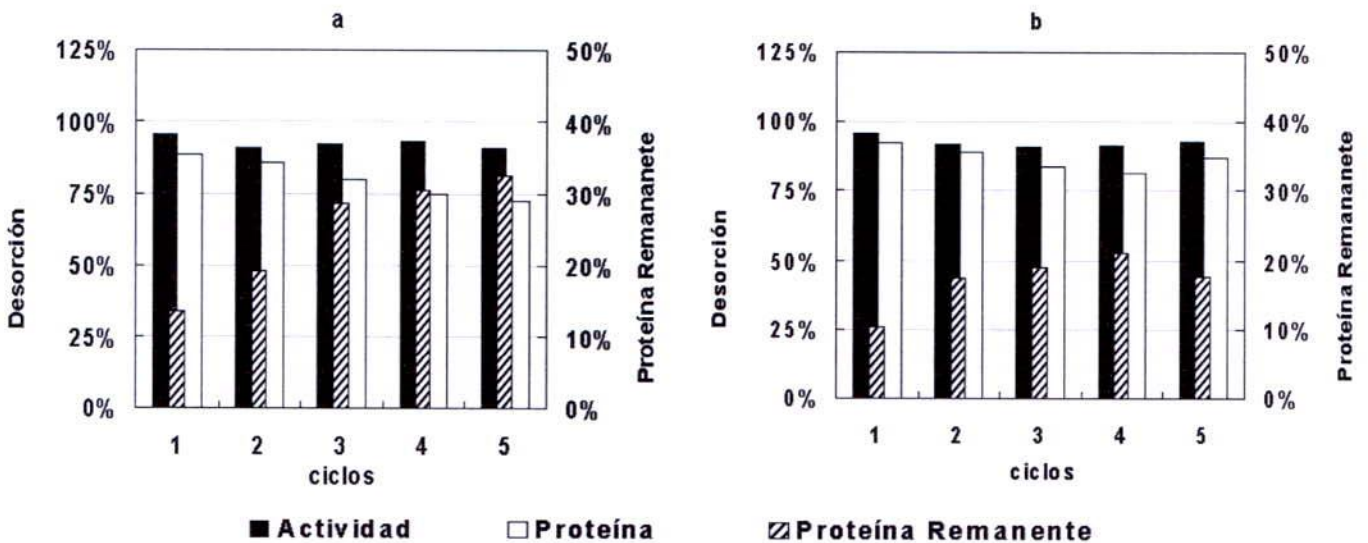


Figura 4.22. Desorción y porcentaje de proteína (CCL) remanente en el soporte para cada ciclo de reuso de octil-agarosa en medios de reacción a 37°C, a) SR II, b) SR III

Este hecho puede ser directamente atribuido a que la ausencia de solvente / co-solvente hace menos soluble la fase lipídica (aceite de pescado) y más a fin a la superficie hidrofóbica del soporte y con ello incrementa las interacciones hidrofóbicas con la lipasa. La cantidad de proteína remanente puede por cierto, ser la causante de la disminución en el rendimiento de inmovilización observado en la Figura 4.21.

Finalmente, en la Figura 4.23 se muestra el porcentaje de hidrólisis y de EPA+DHA en forma de glicéridos, alcanzados en cada lote de reacción, para cada ciclo de reuso de soporte.

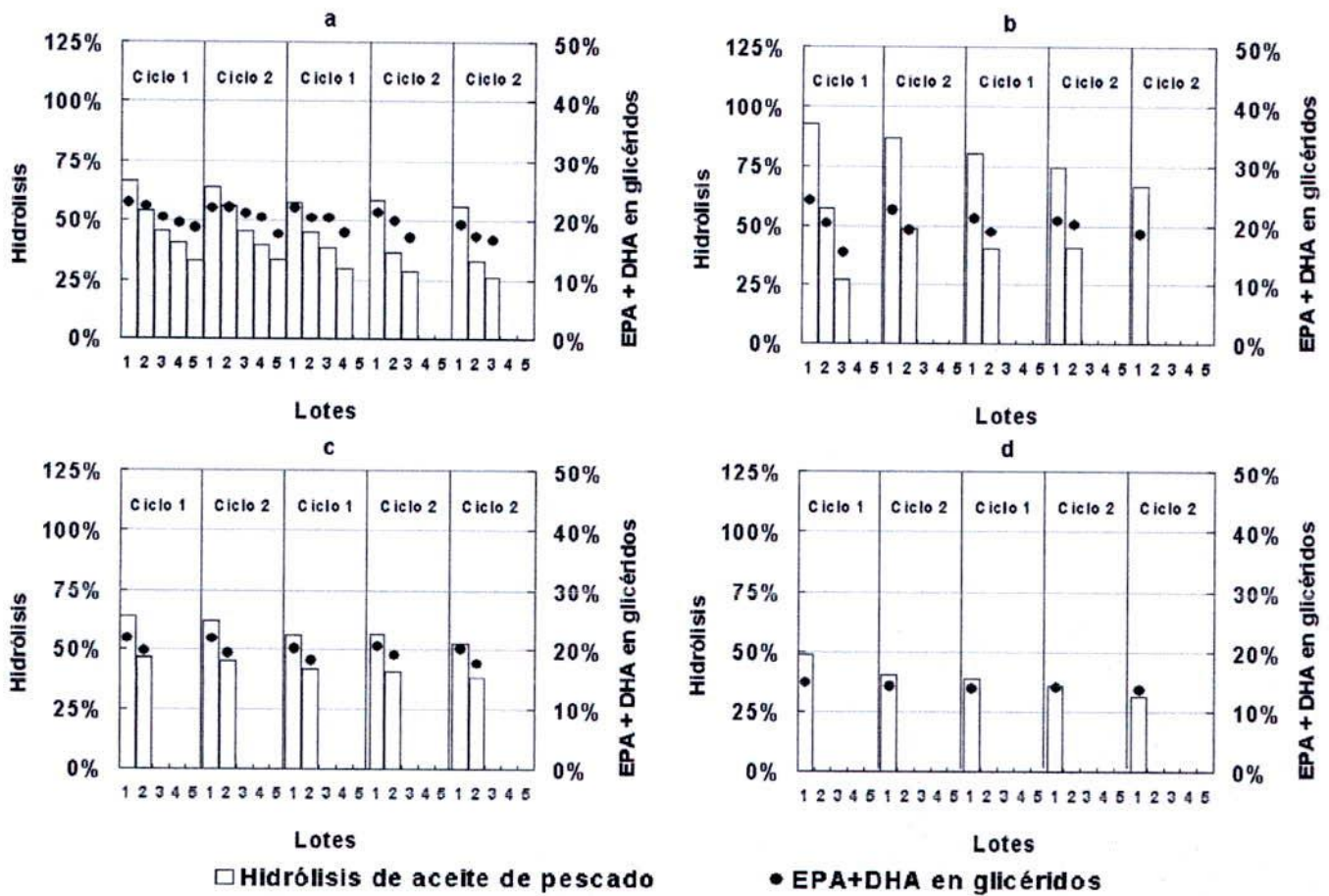


Figura 4.23. Porcentaje de hidrólisis y EPA+DHA en forma de glicéridos, alcanzados en cada lote de reacción, a) SR II a 37°C, b) SR III a 37°C, c) SR II a 50°C, d) SR III a 50°C

El bajo porcentaje de hidrólisis y de EPA+DHA en glicéridos obtenidos a partir de los segundos lotes de reacción para todos los ciclos en el sistema SR III, concuerda con lo obtenido en el estudio de estabilidad operacional (sección 4.6). No obstante aquello, en todos los primeros lotes de cada ciclo de SR III a 37°C, se tiene un rendimiento de hidrólisis mayor a todas las otras condiciones. Este comportamiento conlleva a plantear una estrategia de reutilización del soporte, no mediante lotes sucesivos de reacción si no de ciclos de *reacción (en un lote) - desorción - inmovilización - reacción (en un lote)*. Esta operación no contemplaría la reutilización de la enzima, pero sí permitiría aprovechar la ventaja el fenómeno de hiperactivación de la lipasa en el soporte hidrofóbico, además de la posibilidad de utilizar solventes en el medio de reacción que permite la solubilización del sustrato, modalidad que no se podría aplicar si se utiliza la enzima en forma soluble, dada la inhibición que sufre CCL por solventes (sección 4.5).

4.9. ANÁLISIS DE COSTOS PARA LOS DIFERENTES SISTEMAS DE REACCIÓN A PARTIR DE LA SIMULACIÓN DE LOTES SUCESIVOS DE HIDRÓLISIS DE ACEITE DE PESCADO

4.9.1. Simulación de lotes sucesivos de hidrólisis de aceite de pescado con inactivación térmica del biocatalizador

Con el fin de obtener una estimación de las productividades de hidrólisis de aceite de pescado para lotes sucesivos de los distintos sistemas de reacción en estudio, se correlacionó los datos experimentales con una cinética de Michaelis-Menten contemplando inactivación térmica, tal como se describe en la sección 3.2.9.

En la Tabla 4.12 se presentan los valores de la constante cinética de afinidad de sustrato para cada sistema de reacción evaluado.

Tabla 4.12. Constante cinética del modelo M-M para los sistemas de reacción en estudio

K (mM)	SR I	SR II	SR III
	13568	11681	3605

En la Tabla 4.13 se muestran los parámetros cinéticos y operacionales utilizados en el modelo de reacción de hidrólisis para cada sistema en estudio.

Tabla 4.13. Parámetros cinéticos y operacionales utilizados en el modelo cinético (M-M) con mecanismo de inactivación térmica en serie bifásico

Parámetro	SR I	SR II	SR III
So (mM)	561	561	115
Mcat (g)	0,041	4,4	0,9
a _s (U/g)	4230	40	40
V _r (mL)	10,32	10,32	10,32
k ₁ (h ⁻¹)	0,339	0,358	0,358
k ₂ (h ⁻¹)	0,006	0,001	0,001
a	0,490	0,914	0,914

k₁: constante de inactivación térmica de la primera etapa, k₂: constante de inactivación térmica de la segunda etapa, a: fracción de actividad residual del estado conformacional intermedio de la enzima, b: fracción de actividad residual del estado conformacional final de la enzima

En la Figura 4.24 se muestra la correlación de los datos experimentales con el modelo cinético, donde se aprecia una buena correlación de los datos experimentales con el modelo utilizado

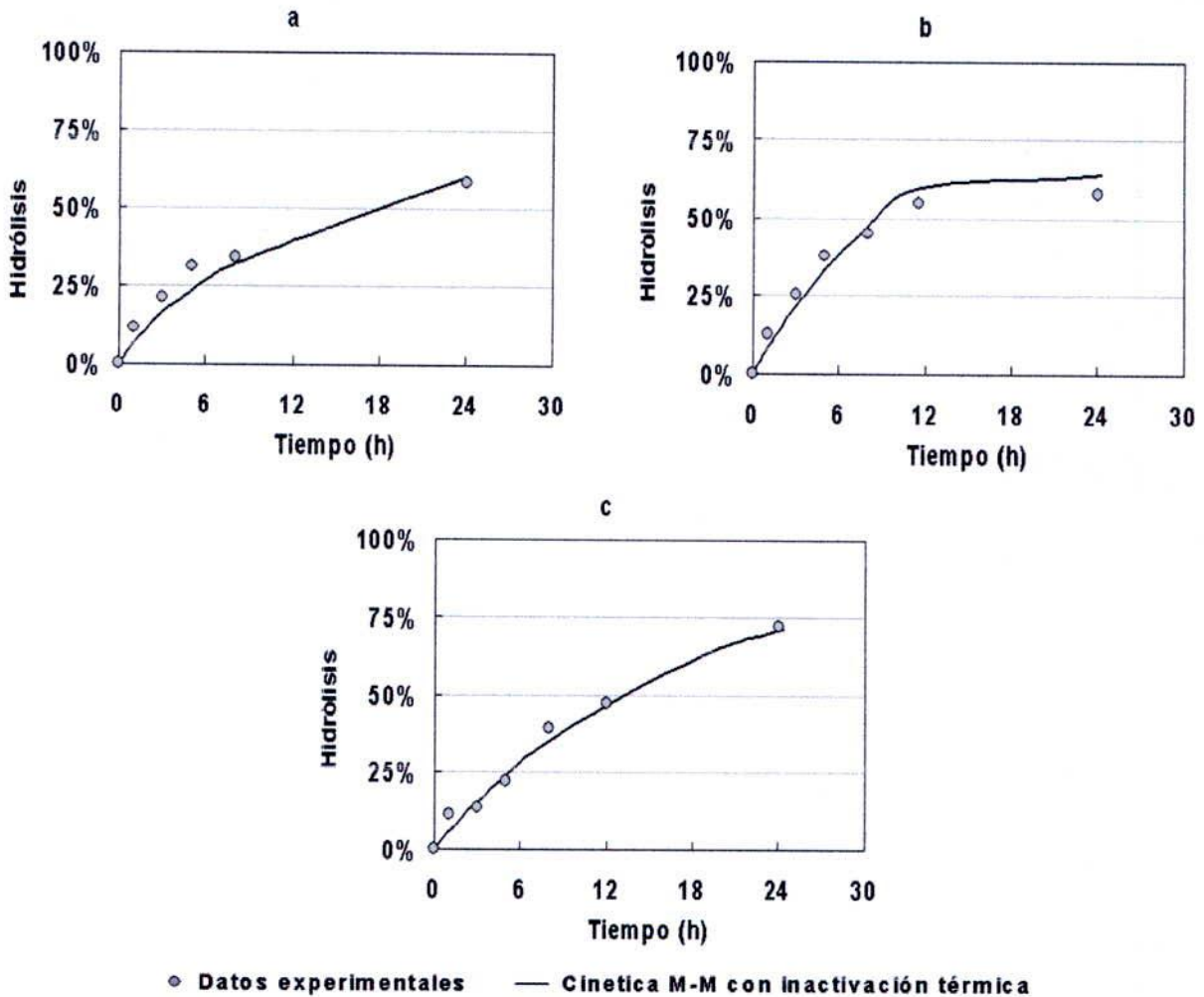


Figura 4.24. Correlación de hidrólisis de aceite de pescado con cinética M-M, a) SR I, b) SR II, c) SR III. Condiciones de reacción: 37°C, pH 7, 35 U/g AP, razón W/O 1:1

4.9.2. Productividades de los sistemas de reacción evaluados

Para la determinación de las productividades de cada sistema evaluado se estableció como criterio obtener un 60% de hidrólisis de aceite de pescado en cada lote; valor máximo alcanzado con la enzima soluble a las 24 horas de reacción, realizando lotes sucesivos hasta que la actividad residual del biocatalizador sea no menor a 43%; valor de actividad residual correspondiente al obtener un 60% de hidrólisis en un lote con la lipasa en forma soluble. Para el

cálculo de las productividades específicas se estimó un rendimiento de inmovilización de lipasa de un 70% medido como proteína.

Se debe tener en consideración que con el sistema de reacción SR III se obtuvo experimentalmente un rendimiento de hidrólisis considerablemente menor a partir del segundo lote de reacción, tal como se presenta en el estudio de reutilización del soporte (sección 4.8). Por esta razón en el análisis de costos se evaluó el sistema SR III bajo la estrategia de reutilización del soporte, mediante ciclos de *reacción (en un solo lote) - desorción - inmovilización - reacción (en un lote)*, a lo que se denominó SR III b.

Cabe mencionar que en este criterio de evaluación no se incluye un parámetro de importancia en el presente estudio: la concentración en forma de glicéridos de EPA+DHA. Esto responde únicamente a que la concentración de éstos Omega-3 no manifiesta un patrón o cinética establecida, al menos no evidenciada en esta investigación, puesto que se hace complicado predecir este efecto y solo es cuantificable empíricamente, tal como se ha tratado en las secciones anteriores.

En la Tabla 4.14 se presentan las productividades calculadas para los sistemas de reacción.

Tabla 4.14. Productividades de los sistemas de reacción evaluados

Sistema de Reacción	Q_n (g AH /L*h)	QA_n (g AH /L*h)	qA_n (g AH / g CCL*h)	Lotes	horas de reacción
SR I	12,1	12,1	3,0	1	24
SR II	11,6	809,6	144,1	45	763
SR III	1,6	75,2	65,3	30	746
SR III b	3,4	3,4	3,0	1	18

Q_n : productividad volumétrica al lote n, QA_n : productividad volumétrica acumulada al lote n, qA_n : productividad específica acumulada al lote n, AH: aceite hidrolizado

Las mayores productividades acumuladas se obtuvieron con SR II. Este resultado indica claramente que la ventaja que conlleva la solubilización de sustrato al utilizar solventes en el medio de reacción junto con la activación observada por efecto de dichos solventes, no es relevante al utilizar lotes seriados de reacción. No obstante, cabe mencionar que SR III es el único sistema con el que se alcanza un 90% de hidrólisis y mayor contenido de EPA+DHA en forma de glicéridos en el aceite hidrolizado a las 48 horas de reacción, tal como se mostró anteriormente (sección 4.7).

4.9.3. Análisis comparativo de costos los sistemas de reacción evaluados

El análisis de costos se realizó en base a las productividades obtenidas y bajo el parámetro de comparación de costo en dólares (USD) de por cada kg de aceite hidrolizado mediante los diferentes sistemas de reacción. Los costos considerados se muestran en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Costos de los insumos para la reacción de hidrólisis de aceite de pescado

ítem	Valor específico* USD/kg
Aceite de Pescado	1
Lipasa CCL	300
Octil-agarosa	3950
Solventes	2

*Información estimada, Härting S.A. Investigación y Desarrollo

La comparación de costos se realizó por ciclos de 30 lotes cada uno. La elección de 30 lotes responde a que precisamente al finalizar el décimo lote de reacción con SR II, el derivado presenta un 43% de actividad residual, valor limite considerado en el cálculo de las productividades. Al finalizar un ciclo se contempló la reutilización del soporte como se describió en la sección 4.8 y se incorporó un factor de disminución de rendimiento de inmovilización de proteína, fenómeno observado tras cada ciclo. La disminución de rendimiento de inmovilización sigue una tendencia lineal descrita por la Ecuación 4.2.

$$RIP = r - m_p * C$$

Ecuación 4.2

Donde RIP corresponde al rendimiento de inmovilización de lipasa medida como proteína y C al número del ciclo. Para SR II, $r = 0,7482$ y $m_p = 0,0346$; y para SR III $r = 0,7809$ y $m_p = 0,0749$.

La Figura 4.25 muestra la comparación del costo de obtener 1 kg de aceite hidrolizado mediante los diferentes sistemas de reacción evaluados. Se aprecia claramente que solamente utilizando la estrategia de reutilizar el soporte en ciclos de reacción, los costos para obtener 1 kg de aceite hidrolizado se pueden aproximar, al menos en orden de magnitud, al costo de usar la enzima en forma soluble (Figura 4.25a). Tal como se aprecia en la Figura 4.25b con SR III y SR III b dichos costos nunca se igualan, mientras que con el sistema de reacción SR II los costos del aceite hidrolizado no sólo se igualan sino que son inferiores a los del sistema SR I a partir del segundo lote del segundo ciclo de reacción.

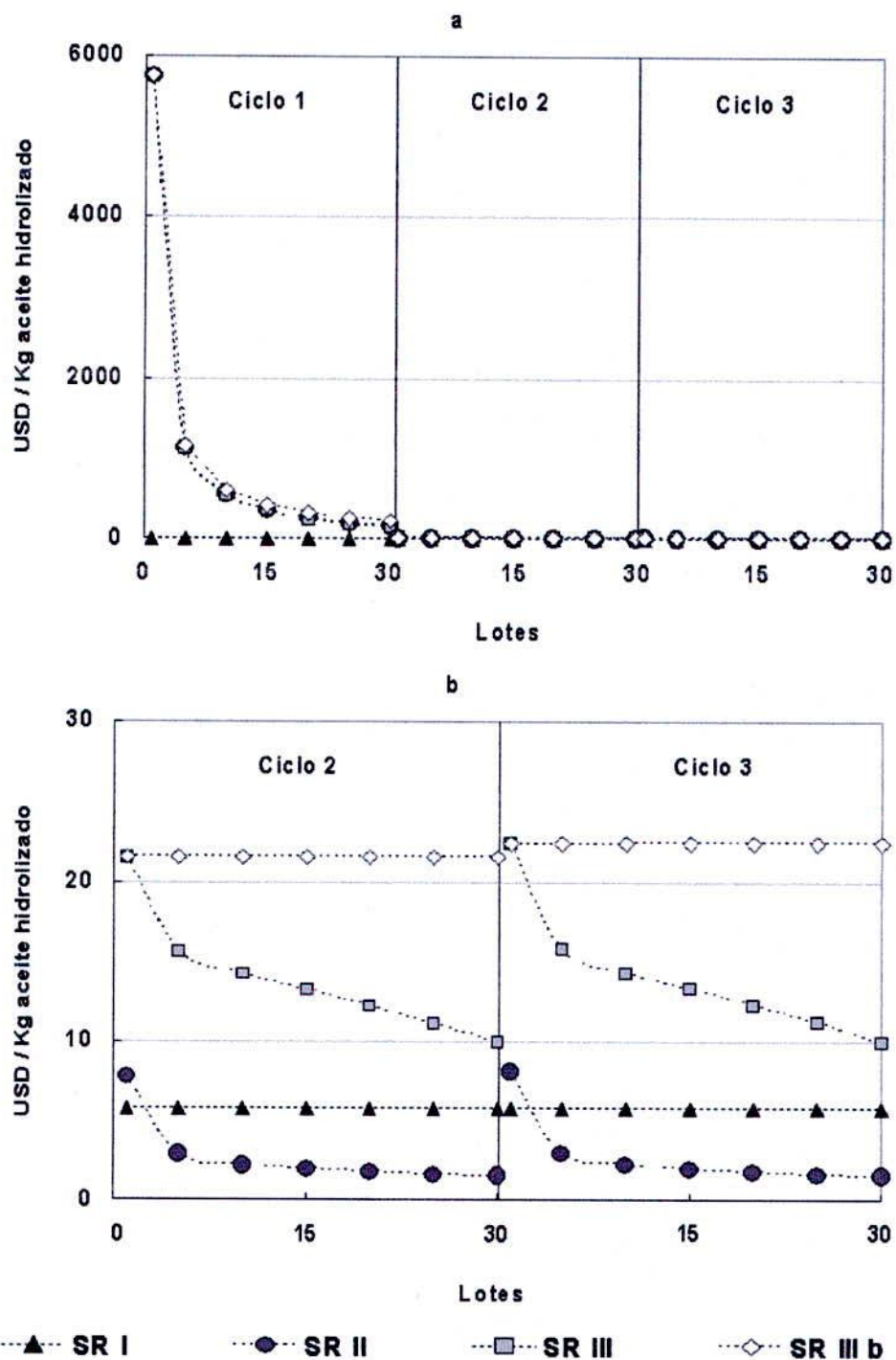


Figura 4.25. Costos del aceite hidrolizado mediante los sistemas de reacción a) estimación para tres ciclos de reacción, b) zoom de escala a partir del segundo ciclo de reacción

Queda en evidencia en el primer ciclo de reacción que el alto costo del soporte eleva el costo total. El soporte utilizado octil-agarosa, el cual posee la ventaja de su gran capacidad de interacción hidrofóbica con la lipasa, presenta un costo elevado debido a que es un insumo analítico (específicamente utilizado como relleno de columna cromatográfica). Los soportes utilizados industrialmente, también de características hidrofóbicas como el butil-sepabeads evaluado en esta investigación, no presentaron buenos resultados en términos de rendimientos de inmovilización ni de actividad específica del derivado; por tanto se hace necesaria la búsqueda o creación de un soporte con las características de hidrofobicidad del octil-agarosa y con precios acorde a una aplicación industrial.

Finalmente, en la Tabla 4.16 se presenta un análisis de cuanta veces (N) el costo del aceite hidrolizado mediante los sistemas de reacción SR II, SR III y SR III b, resulta mayor al costo del aceite hidrolizado mediante el sistema de reacción SR I.

Tabla 4.16. Análisis del costo del aceite hidrolizado mediante los sistemas de reacción SR II, SR III y SR III b en relación al costo del aceite hidrolizado mediante SR I

Sistema de reacción	N		
	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
SR II	27	0,3	0,3
SR III	23	2	2
SR III b	37	4	4

Si sólo se contemplara un ciclo de reacción, el sistema que implica un mayor costo por kg de aceite hidrolizado es SR III b, y tal como se presento en la Figura 4.25, sólo a partir de la reutilización de soporte con el sistema de reacción SR II se obtiene un valor de N menor a 1, lo cual significa que el costo de es menor al costo de obtener dicho aceite hidrolizado mediante la enzima soluble.



Capítulo 5
Conclusión

5. CONCLUSIÓN

- De las lipasa evaluadas, CCL presentó el mayor porcentaje de hidrólisis de triacilglicéridos de pescado junto con los mayores porcentajes de EPA+DHA en forma de glicéridos; corroborando lo reportado por otros autores (Hoshino *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993, Wanasundara y Shahidi 1998a); que pese a que esta lipasa se describe sin estereoespecificidad de corte, sí presenta una menor velocidad de hidrólisis frente a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
- Se determinaron las condiciones óptimas de reacción tanto para maximizar la hidrólisis de aceite como la obtención de EPA+DHA en forma de glicéridos, las cuales fueron coincidentes para ambas respuestas y corresponden a una concentración de lipasa de 35 U/g de aceite de pesado a hidrolizar, razón fase acuosa / fase lipídica de 1:1, pH 7 y 37°C de temperatura de reacción.
- Se comprobó que la inmovilización, independiente de la estrategia aplicada, sí modula la selectividad de la lipasa en términos de IS (índice de selectividad; cociente entre la velocidad específica de hidrólisis de los ácidos grasos que componen el aceite de pescado exceptuando EPA+DHA y la velocidad específica de hidrólisis de EPA+DHA). Sin embargo, dicha modulación es negativa para efectos del objetivo planteado ya que la inmovilización de CCL hace disminuir el IS respecto al obtenido en la reacción con la lipasa soluble a las condiciones óptimas de operación; no lográndose una concentración mayor EPA+DHA en forma de glicéridos. Pese a esto, mediante la inmovilización se obtiene un ostensible aumento de los tiempos de vidas media de CCL y de la estabilidad operacional del biocatalizador.
- La estrategia de entrecruzamiento de los derivados O-CCL con polímeros polifuncionales (dextrano aldehído y dextrano sulfato) aumentó la vida media de los derivados y disminuyó la desorción de la lipasa desde el soporte hidrofóbico tras cada lote de reacción, lo que insidió en que, pese a obtenerse un bajo porcentaje de hidrólisis (alrededor de 50%) en los lotes sucesivos, éste fue mayor al obtenido con el derivado sin entrecruzar. El modo de entrecruzamiento del polímero con los derivados; covalente para el dextrano aldehído y iónico para el dextrano sulfato, marcó una diferencia entre los dos tipos de derivados entrecruzados formados. El derivado O-CCL-NH₂-DxCHO resultó menos reactivo frente al sustrato a hidrolizar y también menos susceptible al fenómeno de activación por solventes en comparación a los otros derivados unidos a agarosa, debido a la mayor rigidez que sufre su

estructura. Este tipo de unión más fuerte respalda también el menor porcentaje de desorción de la lipasa tras cada lote de reacción obtenido. En otro aspecto, una notable diferencia se presenta con el derivado de O-CCL-NH₂-DxSO₄ al obtenerse el mas bajo porcentaje de EPA+DHA en glicéridos, incluso menor al inicial. Este comportamiento está directamente atribuido al cambio del microentorno a la enzima en el cual el polímero de dextrano sulfato confiere características menos hidrofóbicas al derivado provocando una mayor afinidad con los glicéridos parcialmente hidrolizados (di-o monoacilglicéridos) más hidrofílicos. Además, la capa de dextrano sulfato no provoca efectos adversos sobre la accesibilidad del sustrato al sitio catalítico, dado que el derivado presenta igual actividad de hidrólisis de aceite de pescado que O-CCL en el primer lote de reacción.

- La presencia de solventes/co-solventes en el medio de reacción, tuvo incidencia sobre varios aspectos: en primer lugar se observó una marcada inhibición de la lipasa en forma soluble en un medio en presencia de los solventes y co-solventes estudiados, lo que implicó que el uso de éstos en la reacción estuviera limitado a sistemas con CCL inmovilizada. Por otra parte, se evidenció un mayor porcentaje de hidrólisis y una notable activación de CCL en derivados hidrofóbicos. No obstante aquello, la presencia de solventes disminuyó la capacidad de reutilización del derivado hidrofóbico O-CCL, probablemente por que la lipasa va perdiendo su interacción con el soporte, perdiendo así la estabilidad que éste le confiere.
- Se comprobó que la reutilización del soporte hidrofóbico octil-agarosa tras la desorción de la lipasa agotada es factible. No obstante al reutilizar el soporte por un mayor número de ciclos, el porcentaje de activación de la lipasa y el rendimiento de inmovilización en términos de proteína disminuyen. Dicho efecto negativo, acentuado por la presencia de solventes y por el incremento de la temperatura de reacción, puede deberse a la obstrucción o a la pérdida de los grupos hidrofóbicos del soporte.
- El sistema de reacción SR II (O-CCL en ausencia de solventes/co-solventes en el medio de reacción), es el sistema seleccionado como el más apropiado para la hidrólisis de aceite de pescado. Esto es debido en primera instancia a que O-CCL es el derivado con mayor IS, sumado a ello con SR II tanto los porcentajes de activación de lipasa y los rendimientos de inmovilización de la proteína, se mantienen o decrecen levemente conforme aumentan los ciclos de operación, y en términos económicos con este sistema de reacción, a partir del segundo ciclo utilizando el soporte reciclado, los costos del aceite hidrolizado no sólo se igualan a los del sistema SR I sino que son inferiores a éstos.



Capítulo 6
Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

- Dado los resultados obtenidos una de los principales puntos a estudiar con mayor detención sería la forma de modificar aun más drásticamente el microentorno de la lipasa inmovilizada de manera tal que se procurara sólo la hidrólisis de las familias de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, dejando los AGPICL en el glicérido. Para ello, habría que cambiar por ejemplo, la hidrofobicidad del sitio activo modulando la selectividad por el sustrato; o bien modificando su estructura (sin desmedro de su actividad catalítica) de manera que se exhiba un marcado impedimento estérico por parte del biocatalizador para acceder al enlace éster del AGPICL. Todo lo anteriormente mencionado sería factible de lograr utilizando técnicas de modificación genética, ya sea mediante la producción de una lipasa recombinante con las modificaciones deseadas, o bien por la creación de lipasas modificadas en las que se inserten péptidos recombinantes inmunoreactivos en la zonas claves para la acción catalítica, vale decir en la tapadera o lid del sitio activo, en el mismo sitio activo, etc.
- Otro punto complementario, sería la búsqueda o creación de una matriz soportante que cumpliera con las siguientes características:
 - 1) Ser de un material más resistente que la agarosa entrecruzada, tal vez de un material inorgánico inerte, de modo que no se viese afectado por el uso de solventes/co-solventes en la reacción.
 - 2) Mantener la característica de hidrofobicidad dada por los grupos funcionales hidrofóbicos agregados, ya que con este tipo de soportes se tienen las ventajas de hiperactivación de lipasas y de inmovilización/purificación de las mismas.



Nomenclatura

NOMENCLATURA

α	nivel de significancia en ANOVA de diseño experimental
ϵ_m	constante dieléctrica de la disolución
a	fracción de actividad de E' en mecanismo bifásico de inactivación térmica
A(t)	expresión descrita para el modelo de inactivación térmica, min
ABI	actividad del blanco de inmovilización, U/mL
ACN	acetonitrilo
A-DxSO4-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en agarosa recubierta con dextrano sulfato
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados
AGPICL- ω 3	ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga Omega-3
AH	aceite hidrolizado
A_i	área ácido graso i cuantificada en cromatógrafo de gases
AP	aceite de pescado
AR	actividad enzimática residual, U/mL o U/g
AS	actividad de la suspensión de inmovilización, U/mL
a_s	actividad específica del catalizador, U/g
A_s	área de estándar interno cuantificada en cromatógrafo de gases
ASN	actividad medida en el sobrenadante de la suspensión de inmovilización, U/mL
b	fracción de actividad de E'' en mecanismo monofásico de inactivación térmica
B-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en butil-sepabeads
C-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en celita
CCL	lipasa de <i>Candida cylindracea</i>
C_i^{AGL}	concentración de ácido graso i liberado tras la reacción de hidrólisis
C_i^{TAG}	concentración ácido graso i disponibles a reaccionar
CLEA	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>
CM	cuadrados medios en ANOVA de diseño experimental
CM-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en carboximetilcelulosa
CNBr-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en bromocianógeno
CPG	<i>controlled pore glass</i>
D	porcentaje de desorción de enzima desde el soporte
DAG	diacilgliceroles
DHA	ácido docosahexaenoico C22:6 n-3
E	especie enzimática inicial en mecanismos de inactivación térmica
E'	especie enzimática intermedia en mecanismos de inactivación térmica
E''	especie enzimática final activa en mecanismos de inactivación térmica
EI	enzima inmovilizada
EPA	ácido eicosapentaenoico C20:5 n-3
ES	enzima soluble
F_0	estadístico de prueba en diseño experimental
FE	factor de estabilización
f_i	factor de respuesta cromatográfico del ácido graso i
FV	fuentes de variabilidad (efectos) en ANOVA de diseño experimental
GL	grados de libertad en ANOVA de diseño experimental
Gx-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en glioxil-agarosa
Gx-PEI-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en glioxil-agarosa recubierta con PEI
HRV	<i>hydrolysis resistance value</i>
I	especie enzimática inactiva en mecanismos de inactivación térmica
IS	índice de selectividad
K	constante cinética de afinidad de sustrato, mM
k	número de los efectos estudiados en diseño experimental
k_1	constante de inactivación térmica de la primera fase mecanismo bifásico, (h^{-1})
k_2	constante de inactivación térmica de la segunda fase mecanismo bifásico, (h^{-1})
L	número de lotes de reacción en un ciclo productivo
LA	ácido linoleico C18:2 n-6

L-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en lewatis
LNA	ácido α -linolénico C18:3 n-3
LS	lauril sucrosa
M	masa de soporte, g
m	masa de preparado enzimático, g
MAG	monoacilgliceroles
m_{AGL}	masa de muestra en base ácido graso libre en análisis de cromatografía gaseosa
M_{AR}	pendiente de la relación lineal de disminución de actividad residual del ciclo
M_{cat}	masa de catalizador, g
M-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en MANAE-Agarosa
M_j	masa de la corriente j
M-M	modelo cinético de Michaelis-Menten
m_p	Pendiente de la relación lineal de disminución de rendimiento de inmovilización
m_{TAG}	masa de muestra inyectada en análisis de cromatografía gaseosa
n	número de experimentos en diseño experimental
N	Nº de veces en que el costo del AH mediante EI supera al costo del AH mediante ES
O-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en octil-agarosa
O-CCL-NH2	derivado O-CCL aminado
O-CCL-NH2-DxCHO	derivado O-CCL aminado y entrecruzado con dextrano aldehído
O-CCL-NH2-DxSO4	derivado O-CCL aminado y entrecruzado con dextrano sulfato
OD-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en octadecil-sephabeads
P	contenido de proteína, mg/g soporte
p	pureza del estándar interno en análisis de cromatografía gaseosa
PEG	polietilenglicol
PEI	polietilenimina
PFA	contenido de proteína en la fase acuosa de reacción, mg
PM_i	peso molecular del ácido graso i
\overline{PM}	peso molecular promedio de ácidos grasos de aceite de pescado
QA_n	productividad volumétrica acumulada al lote n de reacción, g AG / L*h
qA_n	productividad acumulada al lote n de reacción, g AG/g enz*h
Q-CCL	derivado de lipasa de <i>Candida cylindracea</i> en Q-sepharose
Q_n	productividad volumétrica del lote n de reacción, g AG / L*h
r	intercepto de la relación lineal de disminución de rendimiento de inmovilización
RI	rendimiento de inmovilización
S	concentración de sustrato, mM
S_0	concentración inicial de sustrato, mM o g/L
SC	suma de cuadrados en ANOVA de diseño experimental
SDS	sodio dodecil sulfato
S_{int}	masa de estándar interno en análisis de cromatografía gaseosa
SR I	sistema de reacción I, lipasa soluble
SR II	sistema de reacción II, lipasa inmovilizada
SR III	sistema de reacción III, lipasa inmovilizada y solventes en medio de reacción
t	tiempo de reacción
T	temperatura, °C
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
TAG	triacilglicéridos
U	unidad de actividad enzimática, μ mol/min
v	velocidad de reacción, mM/min
ve_i	velocidad específica de hidrólisis de ácido graso i
V_{max}	velocidad máxima teórica de reacción, mM/min
V_r	volumen de reacción, L
W/O	razón fase acuosa / fase lipídica
X	porcentaje de hidrólisis
X_j	porcentaje de hidrólisis de un ácido graso
x_i^j	porcentaje del ácido graso libre i en la corriente j
Y	respuesta observada en diseño experimental



Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Rahman MB, Tajudin SM, Hussein MZ, Abdul Rahman RNZR, Salleh AB, Basri M. Application of natural kaolin as support for the immobilization of lipase from *Candida rugosa* as biocatalyst for effective esterification. *Appl Clay Sci* 2005; 29(2): 111-116.
- Adachi S, Okumura K, Ota Y, Mankura M. Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides. *J. Ferment Bioeng* 1993, 75: 259-264.
- Affleck R, Haynes CA, Clark D S. Solvent dielectric effects on protein dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992a, 89 (11): 5167-5170.
- Affleck R, Xu Z F, Suzawa V. Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992b, 89 (3): 1100-1104.
- Alberghina L and Lotti M. Cloning, sequencing, and expression of *Candida rugosa* lipases. *Method Enzymol* 1997, 284: 246-260.
- Balçao VM and Malcata FX. On the performance of a hollow-fiber bioreactor for acidolysis catalyzed by immobilized lipase. *Biotechnol Bioeng* 1998, 60(1): 114-123.
- Basheer S, Mogi K, Nakajima M. Surfactant-modified lipase for the catalysis of the interesterification of triglycerides and fatty acids. *Biotechnol Bioeng* 1995, 45: 187-195.
- Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernandez-Lafuente R, Huguet J, Guisan JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998; 58: 487-493.
- Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Fuentes M, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde. *J Biotechnol* 2004; 110(2): 201-207.
- Betigeri SS and Neau SH. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials* 2002, 23: 3627-3636.
- Blanco RM, Terreros P, Fernández-Pérez M, Otero C, Díaz-González G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalysts. *J Mol Catal B-Enzym* 2004, 30: 83-93.
- Bolivar JM, Rocha-Martin J, Godoy C, Rodrigues RC, Guisan JM. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Process Biochemistry* 2010, 45(1): 107-112.
- Bornscheuer UT. *Enzymes in Lipid Modification*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. kgaA 2000, Weinheim, Alemania.
- Boswell K, Koskelo EK, Carl L, Glaza S, Hensen DJ, Williams KD, Kyle DJ. Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Food Chem Toxicol* 1996, 34(7): 585-593.
- Bottino NR, Vandenburg GA, Reiser R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* 1967, 2: 489-493.
- Breivik H and Haraldsson G. Refining Oil Compositions. US Patent No 5,945,318, 1999.
- Brink L and Tramper J. Optimization of organic solvent in multiphase biocatalysis. *Biotechnol Bioeng* 1985, 27(8): 1258-1269.
- Brzozowski AM, Derewenda U, Derewenda ZS, Dodson GG, Lawson DM, Turkemburg JP. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 1991; 351: 491-494.

- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. Biocatalysts and Enzyme Technology. Ed. WILEY-VCH Verlag GMBH 2005, Weinheim, Alemania.
- Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J Mol Catal B-Enzym* 2009, 57: 171-176
- Cao L and Elzinga J. Crosslinked enzyme aggregates and crosslinker agents therefore. Patent No WO 03/066850, 2003.
- Cao L, Van Langen L, Sheldon R. Immobilized enzymes: Carrier-bound or carrier-free?. *Curr Opin Biotech* 2003, 14: 1-8.
- Cao L. Immobilized enzymes: science or art?. *Curr Opin Chem Biol* 2005, 9: 217-226
- Carlson S and Neuringer M. Polyunsaturated fatty acid status and neurodevelopment: A summary and critical analysis of the literature. *Lipids* 1999; 34: 171-178.
- Carta G, Gainer JL, Benton AH. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. *Biotechnol Bioeng* 1991, 37(11): 1004-1009.
- Carvalho PO, Bueno Campos PR, D'Addio Noffs M, de Oliveira JG, Tsunezi M, Martins D. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids. *Quim Nova* 2003, 26(1): 75-80.
- Castro-Gonzalez MI. Ácidos grasos Omega-3: beneficios y fuentes. *INCI* 2002, 27(3): 128-136.
- Cerdán LE, Robles-Medina A, Giménez A, Ibáñez MJ, Molina E. Synthesis of polyunsaturated fatty acid-enriched triglycerides by lipase-catalyzed esterification. *J Am Oil Chem Soc* 1998, 75(10): 1329-1337.
- Chahinian H, Nini L, Boitard E, Dubès JP, Sarda L, Comeau LC. Kinetic properties of *Penicillium cyclopium* lipases studied with vinyl esters. *Lipids* 2000, 35(8): 919-25.
- Chatterjee S, Barbora L, Cameotra SS, Mahanta P, Goswami P. Silk-fiber immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of emulsified sunflower oil. *Appl Biochem Biotechnol* 2009, 157(3): 593-600.
- Chemler J, Yan Y, Koffas M. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 2006, 5:20
- Chen JP, Lin WS, Chang MF. Synthesis of geranylacetate by esterification with lipase entrapped in hybrid sol-gel formed within non-woven fabric. *J Am Oil Chem Soc* 2002, 79: 309-314.
- Chen JP, Lin WS. Sol-gel powders and supported sol-gel polymers for immobilization of lipase in ester synthesis. *Enzym Microb Technol* 2003, 32: 801-811.
- Chew YH, Chua LS, Cheng KK, Sarmidi MR, Aziz RA, Lee CT. Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. *Biochem Eng J* 2008, 39(3): 516-520.
- Chiou SH y Wu WT. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials* 2004, 25: 197-204.
- Cipiciani A, Fringuelli F, Mancini V, Piermatti O, Scappini AM, Ruzziconi R. Enzymatic kinetic resolution of (±)-4-acetoxy[2.2]paracyclophane by *Candida cylindracea* lipase. An efficient route for the preparation of (+)-r-4-hydroxy- and (+)-s-4-acetoxy[2.2]paracyclophane. *Tetrahedron* 1997, 53(34): 11853-11858.
- Costa VE and Amorim HL. The use of lipases as agents of kinetic resolution of enantiomers in organic synthesis: general aspects of solvent's influence. *Quim Nova* 1999, 22(6): 863-873.
- Derewenda U, Byozowski AM, Lawson DM, Derewenda ZS. Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* 1992; 31: 1532-1541.

- Dudal Y and Lortie R. Influence of water activity on the synthesis of triolein catalyzed by immobilized *Mucor miehei* lipase. *Biotechnol Bioeng* 1995, 45(2): 129-134.
- Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 1998, 93: 185-197.
- Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Mateo C, Bastida A, Coca J, Haramboure T, Hernandez-Justiz O, Terreni M, Guisan JM. Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. *J Mol Catal B-Enzym* 2001a, 11(4-6): 649-656.
- Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol* 2007; 41(5): 565-569.
- Fernandez-Lorente G, Terreni M, Mateo C, Bastida A, Fernandez-Lafuente R, Dalmases P, Huguet J, Guisan JM. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilization: enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilized *Pseudomonas* lipase. *Enzyme Microb Technol* 2001b, 28(4-5): 389-396.
- Ferreira-Dias S, Correia AC, Baptista FO. Activity and batch operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in different hydrophilic polyurethane foams during hydrolysis in a biphasic medium. *Bioprocess Eng* 1999, 21: 517-524.
- Foglia TA and Sonnet PE. Fatty acid selectivity of lipases: γ -linolenic acid from borage oil. *J Am Oil Chem Soc* 1995, 72(4): 417-420.
- Fuentes M, Pessela BC, Maquiese JV, Ortiz C, Segura RL, Palomo JM, Guisán JM. Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. *Biotech Progress* 2004; 20(4): 1134-1139.
- Gentili A, Curini R, Cernia E, D'Ascenzo G. Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase. *J Mol Catal B-Enzym* 1997, 3(1-4): 43-49.
- Gilham D and Lehner R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* 2005, 36: 139-147.
- Giorno L and Drioli E. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Tibtech* 2000, 18: 339-349.
- Giorno L, Molinari R, Natoli M, Drioli E. Hydrolysis and regioselective transesterification catalyzed by immobilized lipases in membrane bioreactors. *J Membr Sci* 1997, 125: 177-187.
- Gorman LS and Dordick JS. Organic solvents strip water of enzymes. *Biotechnol Bioeng* 1992, 38: 75-81.
- Guisan JM, Armasen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, A. Bastida. Immobilized lipase biocatalysts. Patent N° WO/1999/051726, 1999.
- Gulati R, Arya P, Malhotra B, Prasad AK, Saxena RK, Kumar J, Watterson AC, Parmar VS. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6)-monostearate. *ARKIVOC* 2003, iii: 159-170.
- Guncheva M, Zhiryakova D, Radchenkova N, Kambourova M. Properties of immobilized lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. Acidolysis of triolein with caprylic acid. *World J. Microbiol Biotechnol* 2009, 25: 727-731.
- Gupta MN. Enzyme function in organic solvents. *Eur J Biochem* 1992, 203: 25-32
- Gutiérrez H and de la Vara R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. Ed McGraw-Hill Interamericana 2003, México.
- Halling PJ. Organic liquids and biocatalysis: Theory and practice. *TIBtech* 1989, 7: 50-51.

- Hamazaki T, Urakaze M, Sawazaki S, Yamazaki K, Taki H, Yano S. Comparison of pulse wave velocity of the aorta between inhabitants of fishing and farming villages in Japan. *Atherosclerosis* 1988, 73: 157-160.
- Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 2006, 39: 235-251.
- Henley JP and Sadana A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme Microb Technol* 1985; 7(2): 50-60.
- Hoq MM, Yamane T, Shimizu S, Funada T, Ishida S. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. *J. Am Oil Chem Soc* 1985, 62: 1016-1023.
- Hoshino T, Yamane T, Shimizu S. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids. *Agric Biol Chem* 1990, 54(6): 1459-67.
- Hsu A, Jones KC, Foglia TA, Marmer WN. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnol Lett* 2004, 26: 917-921.
- Huang KH and Akoh CC. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 1994, 71: 1277-1280.
- Hwang S, Lee KT, Park JW, Min BR, Haam SJ, Ahn IS, Jung JK. Stabilisation of *Bacillus stearothermophilus* lipase immobilised on surface-modified silica gels. *Biochem Eng J* 2004, 17: 85-90.
- Illanes A. *Biología de Enzimas*. Ed. Universitarias de la Universidad Católica de Valparaíso 1994, Valparaíso, Chile.
- Iyer PV and Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* 2008; 43: 1019-32.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 1994, 15(1): 29-63.
- James JJ, Lakshmi BS, Seshasayee ASN, Gautam P. Activation of *Candida rugosa* lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study. *FEBS letters* 2007; 581(23): 4377-83.
- Jesus PC, João JJ, Silva PLF, Burlin G, Nascimento MG. Organogels: a new system for lipases immobilization and its application in organic synthesis. *Quim Nova* 1997, 20(6): 664-672.
- Joly S. and Nair MS. Studies on the enzymatic kinetic resolution of β -hydroxy ketones. *J Mol Catal B-Enzym* 2003, 22(3): 151-160.
- Jonzo MD, Hiol A, Zagol I, Druet D, Comeau L. Concentrates of DHA from fish oil by selective esterification of cholesterol by immobilized isoforms of lipase from *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol* 2000, 27: 443-450.
- Kang ST and Rhee JS. Characteristics of immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. *Biotechnol Bioeng* 1989, 33: 1469-1476.
- Kimura Y, Tanaka A, Sonomoto K, Nihira T, Fukui S. Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. *Appl Microbiol Technol* 1983, 17: 107-112.
- Kirchner G, Scollar MP, Klivanov AM. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J Am Chem Soc* 1985, 107: 1012-1016.
- Klivanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001, 409: 241-246.
- Knezevic Z, Bobic S, Obradovic B, Mojovic L, Bugarski B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. *Process Biochem* 2002, 38(3): 313-318.

- Koike H, Imai M, Suzuki I. Enrichment of triglyceride docosahexanoic acid by lipase used as a hydrolysis medium in lecithin-based nano-scale molecular assemblage. *Biochem Eng J* 2007; 36(1): 38-42.
- Kosugi Y and Azuma N. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1994, 71(12): 1285-1289.
- Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 1987, 30: 81-87.
- Lang D, Hofmann B, Haalck L. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1996, 259(4): 704-717.
- Lawson L and Hughes B. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free fatty acids, or ethyl esters. *Biochim Biophys Acta* 1988, 152: 328-335.
- Le Goffic F. Concentration and purification of polyunsaturated fatty acid esters by distillation-enzymatic transesterification coupling. Patent No WO/2000/073254, 2000.
- Leaf A and Kang W. The cardiac antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acid. *Lipids* 1996, 31(1): S41-S44.
- Lei CH, Shin YS, Liu J, Ackerman EJ. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J Am Chem Soc* 2002, 124: 11242-11243.
- Li ZY and Ward OP. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. *J Am Oil Chem Soc* 1993, 70(8): 745-751.
- Lie E and Molin G. Esterification of polyunsaturated fatty acids with lipases from different sources. *Int J Food Sci Technol* 1992, 27: 73-76.
- Liu X, Guana Y, Shen R, Liu H. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *J Chromatogr B* 2005, 822: 91-97.
- Loders Croklaan BV, Cain F, Harris JW, Moore B, Mcneill R, Patrick G. Production method for fats with long chain polyunsaturated fatty acids. Patent No WO 1996/037586, 1996.
- Loders Croklaan BV, Cain F, Harris JW, Moore B, Mcneill R, Patrick G. Production of materials high in long chain polyunsaturated fatty acids. Patent No WO 1996/037587, 1996.
- López-Gallego F, Montes T, Fuentes M, Alonso N, Grazu V, Betancor L, Guisán JM. Chemical increase of the amount of reactive groups on enzyme surface to improve its stabilization via multipoint covalent attachment. *J Biotechnol* 2005, 116: 1-10.
- López-Serrano P, Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnol Lett* 2002, 24(16): 1379-1383.
- Lortie, R. Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol Advances* 1997, 15(1): 1-15
- Lotti M, Grandori R, Fusetti F, Longhi S, Brocca S, Tramontano A, Alberghina L. cloning and analysis of *Candida cylindracea* lipase sequences. *Gene* 1993, 124(1): 45-55.
- Majumder AB, Mondal K, Singh TP, Gupta MN. Designing cross-linked lipase aggregates for optimum performance as biocatalysts. *Biocatal Biotransfor* 2008, 26(3): 235-242.
- Malcata FH, Hill CG, Amundson CH. Use of a lipase immobilized in a membrane reactor to hydrolyze the glycerides of butter oil. *Biotechnol Bioeng* 1991, 38: 853-868.
- Malcata FH, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson CH. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. *J Am Oil Chem Soc* 1990, 67(12): 890-909.
- Masuev KA. The effect of polyunsaturated fatty acids of the Omega-3 class on the late phase of the allergic reaction in bronchial asthma patients. *Ter Arkh* 1997, 69(3): 31-33.

- Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb Technol* 2005; 37: 456-62.
- Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol* 2000, 26(7): 509-514.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 2007, 40: 1451-1463.
- Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazú V, López-Gallego F, Guisán JM. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39: 274-80.
- Merçon F, Lippel G, Nobrega R. Enzyme hydrolysis of babassu oil in a membrane bioreactor. *J Am Oil Chem Soc* 2000, 77(10): 534-540.
- Mladenoska I, Dimitrovski A. Lipase production by *Geotrichum candidum*-m2. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia* 2001, 20(1): 39-43.
- Moore S, Stephen R, McNeill GP. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. *J Am Oil Chem Soc* 1996, 73(11): 1409-1414.
- Mustranta A. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Appl Microbiol Biot* 1992, 38(1): 262-266.
- Negishi S, Arai Y, Arimoto S, Uehara H. Process for producing symmetrical triglyceride. EP 1642959A1, 2006.
- Nieto S, Gutierrez J, Sanhueza J, Valenzuela A. Preparation of sn-2 long-chain polyunsaturated monoacylglycerols from fish oil by hydrolysis with a stereospecific lipase from *Mucor miehei*. *Grasas y Aceites* 1999, 50(2): 111-113.
- Nieto S, Sanhueza J, Nuñez M, Ferrer C, Valenzuela A. Tissue accretion and milk content of docosahexaenoic acid in female rats after supplementation with different docosahexaenoic acid sources. *Ann Nutr Metab* 2005, 49: 325-332
- Nurok D, Kleyle RM, Muhoberac BB, Frost MC, Hajdu P, Robertson DH, Kamat SV, Russell AJ. Study of enzyme catalyzed reactions in organic solvents using multiple linear regression. *J Mol Catal B: Enzym* 1999; 7: 273-82.
- Oberhauser T, Faber K, Griengl H. A substrate model for the enzymatic resolution of esters of bicyclic alcohols by *Candida cylindracea* lipase. *Tetrahedron* 1989. 45(6): 1679-1682.
- Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. A.O.A.C. 2000. EUA.
- Okada T and Morrissey MT. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. *Food Chem* 2007; 103: 1411-9.
- Osada K, Takahashi K, Hatano M. Polyunsaturated fatty glyceride syntheses by microbial lipases. *J Am Oil Chem Soc* 1990, 67: 12-19.
- Osorio NM, Ferreira-Dias S, Gusmao JH, Da Fonseca MMR. Response surface modelling of the production of Omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. *J Mol Catal B-Enzym* 2001, 11: 677-686.
- Otero C, Fernández-Perez M, Hermoso JA, Ripoll MM. Activation in the family of *Candida rugosa* isolipases by polyethylene glycol. *J Mol Catal B-Enzym* 2005; 32(5): 225-9.
- Ottosson J, Fransson L, King JW, Hult K. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1594(2): 325-334.

- Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzym Microb Technol* 2002a, 31(7): 775-783.
- Palomo JM, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 2003a, 4: 1-6
- Palomo JM, Munoz G, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Fuentes M, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R: Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins. Hydrolytic resolution of (R,S)- 2-butyryl-2-phenylacetic acid. *J Mol Catal B-Enzym* 2003b, 21(4-6): 201-210.
- Palomo JM, Muñoz G, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B-Enzym* 2002b; 19-20: 279-86.
- Palomo JM, Segura RL, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Enzymatic resolution of (+)-glycidyl butyrate in aqueous media. Strong modulation of the properties of the lipase from *Rhizopus Oryzae* via immobilisation techniques. *Tetrahedron-Asymmetr* 2004, 15(7): 1157-1161.
- Park JH and Lee YC. Studies on the hydrolysis of milk fat by microbial lipases. *Korean J. Food Sci Technol* 1985, 17(2): 60-64.
- Pessela BC, Munilla R, Betancor L, Fuentes M, Carrascosa A, Vian A, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins. *J Chromatogr A* 2004, 1034(1-2): 155-159
- Pronk W, Kerkhof C, van Helden C, van't Riet K. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. *Biotechnol Bioeng* 1988, 32: 512-518.
- Rakshit SK, Vasuhi R, Kosugi Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from tuna oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2000, 23(3): 251-255.
- Ramadas S and Krupadanam GLD. Enantioselective acylation of (+/-)-cis-flavan-4-ols catalyzed by lipase from *Candida cylindracea* (CCL). *Tetrahedron-Asymmetr* 2004, 15(21): 3381-3391.
- Rice KE, Watkins J, Hill CG. Hydrolysis of menhaden oil by a *Candida cylindracea* lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. *Biotechnol Bioeng* 1999, 63(1): 33-45.
- Robles-Medina A, Cerdán LE, Giménez A, Camacho B, Ibáñez MJ, Molina E. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *J. Biotechnol* 1999, 70: 379-391.
- Rodrigues AR, Cabral JMS, Taipa MA. Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on eudragit s-100: coupling, characterization and kinetic application in organic and biphasic media. *Enzyme Microb Technol* 2002, 31: 133-141.
- Rodrigues RC, Godoy C, Filice M, Bolivar JM, Palau-Ors A, Garcia-Vargas JM, Romero O, Guisan JM. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem* 2009, 44(6): 641-644.
- Rúa ML, Diaz-Maurifio T, Fernfindez V, Otero C, Ballesteros A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim Biophys Acta* 1993, 1156: 181-189.
- Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT, Carballido JR. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2010, 11: 1-12.

- Ruxton CHS, Calder PC, Reed SC, Simpson MJA. The impact of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr Res Rev* 2005; 18: 113-29.
- Sagiroglu A, Kiliç A, Telefoncu A. Preparation and properties of lipases immobilized on different supports. *Artif Cell Blood Sub* 2004, 32(4): 625-636.
- Saify ZS, Akhtar S, Khan K, Perveen S, Ayattollahi S, Hassan S. A study on the fatty acid composition of fish liver oil from two marine fish, *Eusphyra blochii* and *Carcharhinus bleekeri*. *Turk J Chem* 2003, 27: 251-258.
- Schmitt-Rozieres M, Guilherm MC, Phan TLR, Corneau LC. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification. *Biocatal. Biotransform* 2000, 18: 355-340.
- Schneider LV. A three-dimensional solubility parameter approach to nonaqueous enzymology. *Biotechnol Bioeng* 1991, 37(7): 627-638.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 2001, 19(8): 627-662.
- Sheldon RA, Sorgedraeger M, Janssen MHA. Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chem Today* 2007, 25(1): 62-67.
- Shimada Y, Maruyama K, Okazaki S, Nakamura M, Nakamura A, Sugihara A, Tominaga. Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1995, 72(12): 1577-1581.
- Shimada Y, Maruyama K, Okazaki S, Nakamura M, Sugihara A, Tominaga Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71(7): 951-954.
- Shimada Y, Maruyama K, Sugihara A, Moriyama S, Tominaga Y. Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two-step enzymatic method: hydrolysis and selective esterification. *J Am Oil Chem Soc* 1997, 74(11): 1548-1553.
- Soler G, Bastida A, Blanco R, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents. *BBA - Protein Struct M* 1997, 1339(1): 167-175.
- Stamatis H and Xenakis A. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. *J Mol Catal B-Enzym* 1999, 6: 399-406.
- Tahoun MK. Large agarose-lipase beads for the hydrolysis of triglycerides. *Food Chem* 1986, 22: 297-303.
- Tanaka Y, Funada T, Hirano J, Hashizume R. Triglyceride specificity of *Candida cylindracea* lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1993; 70(10): 1031-4.
- Tanaka Y, Hirano J, Funada T. Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1992, 69: 1210-1217.
- Tanaka Y, Hirano J, Funada T. Synthesis of docosahexaenoic acid-rich triglyceride with immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1994, 71(3): 331-334.
- Tejo BA, Salleh AB, Pleiss J. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *J Mol Model* 2004; 10: 358-66.
- Ting WJ, Tung KY, Giridhar R, Wub WT. application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. *J Mol Catal B-Enzym* 2006, 42(1-2): 32-38.

- Triantafyllou AO, Wehtje E, Adlercreutz P, Mattiasson B. Effects of sorbitol addition on free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media. *Biotechnol Bioeng* 1995, 45(5): 406-414.
- Uauy R and Valenzuela A. Marine oils as a source of omega-3 fatty acids in the diet: how to optimize the health benefits. *Progr Food Nutr Sci* 1992, 16:199-243.
- Valenzuela A. 2008. Diploma de extensión (on-line): Grasas y aceites en la nutrición humana. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos INTA. Universidad de Chile.
- Valivety RH, Johnston GA, Suckling CJ. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium and rates of lipase esterification. *Biotechnol Bioeng* 1991, 38(10): 1137-1143.
- van der Padt A, Edema MJ, Sewalt JJW, van't Riet K. Enzymatic acylglycerol synthesis in a membrane bioreactor. *J Am Oil Chem Soc* 1990, 67(6): 347-352.
- Verger R, Riviere C, Moreau H, Garouri Y, Rogalska E, Nury S. Enzyme kinetics of lipolysis in lipases: structure, mechanism, and genetic engineering. *Monographs* 1990, 16: 105-116.
- Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B-Enzym* 2000, 9: 113-148.
- Volpato G, Filice M, Rodrigues RC, Heck JX, Guisán JM, Mateo C, Guisán JM. Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques. *J Mol Catal B-Enzym* 2009; 60: 125-32.
- Wanasundara U and Shahidi F. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *J Am Oil Chem Soc* 1998a; 75(8): 945-951.
- Wanasundara U and Shahidi F. Concentration of ω -3 polyunsaturated fatty acids of marine oils using *Candida cylindracea* lipase: optimization of reaction conditions. *J Am Oil Chem Soc* 1998b; 75(12): 1767-1774.
- Wigmore SJ, Ross JA, Falconer J, Plester CE, Tisdale MJ, Carter DC, Fearon K. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition* 1996, 12(1): S27-S31.
- Wijesundera C, Ceccato C, Watkins P, Fagan P, Fraser B, Thienthong N. Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1(3). *J Am Oil Chem Soc* 2008, 85(6): 543-548.
- Wilson L, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Illanes A, Guisan JM, Palomo JM. CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39(4): 750-5.
- Wong DWS. Lipase. *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker cop. 2003. New York.
- Yadav GD and Latthi PS. Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochem Eng J* 2003, 16(3): 245-252.
- Yahya ARM, Anderson WA, Moo-Young M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb Technol* 1998, 23(7-8): 438-443.
- Yamane T, Suzuki T, Sahashi Y, Vikersveen L, Hoshino T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis without solvent. *J Am Oil Chem Soc* 1992, 69(11): 1104-1107.
- Yoshinori A and Masami S. Method for manufacturing oil highly containing docosahexaenoic acid. Patent No JP 138073, 2003.
- Zaks A and Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. *J Biol Chem* 1988, 263: 8017-8021.



Anexos

ANEXOS

Índice de Anexos

ANEXO 1. Composición de ácidos grasos de los aceites de pescado	120
ANEXO 2. Parámetros de operación en HPLC para la caracterización de aceite de pescado	121
ANEXO 3. Determinación de la actividad enzimática, método p-NPB	123
ANEXO 4. Determinación del contenido de proteínas, método BCA.....	124
ANEXO 5. Preparación para electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	125
ANEXO 6. Matriz de diseño experimental factorial 2 ⁴ y tablas ANOVA para respuestas evaluadas	130
ANEXO 7. Protocolos de inmovilización de CCL en diferentes soportes.....	134
ANEXO 8. Cinéticas de inmovilización de CCL en diferentes soportes	139
DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	142

Índice de Tablas en Anexos

Tabla A.1. Composición de ácidos grasos de los aceites de pescado utilizados.....	120
Tabla A.2. Secuencia de operación para la fase móvil en HPLC-ELSD	121
Tabla A.3. Tiempos de retención y correlaciones de concentración por log de área obtenidas de las curvas de calibración para la detección de ácidos grasos en HPLC-ELSD	122
Tabla A.5. Tampón para el gel separador.....	127
Tabla A.6. Tampón para el gel concentrador	127
Tabla A.7. SDS al 10% (peso/volumen)	127
Tabla A.8. Persulfato amónico (APS) al 10%.....	127
Tabla A.9. Acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%.....	128
Tabla A.10. Gel separador 12% de acrilamida.....	128
Tabla A.11. Gel concentrador al 5% de acrilamida.....	128
Tabla A.12. Tampón de la muestra (carga)	128
Tabla A.13. Tampón de electroforesis Tris-Glicina	129
Tabla A.14. Solución de tinción azul de Coomassie	129
Tabla A.15. Solución de decolorante de geles.....	129
Tabla A.16. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 3,5 horas de reacción.....	131
Tabla A.17. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 7 horas de reacción.....	131
Tabla A.18. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 22 horas de reacción.....	132
Tabla A.19. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 3,5 horas de reacción.....	132
Tabla A.20. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 7 horas de reacción	133
Tabla A.21. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 22 horas de reacción.....	133

Índice de Figuras en Anexos

Figura A.1. Curva de calibración de ácidos grasos libres en HPLC-ELSD	121
Figura A.2. Curva de calibración para determinación de actividad enzimática	123
Figura A.3. Curva de calibración para la determinación de contenido de proteína.....	124
Figura A.4. Matriz de diseño experimental factorial 2 ⁴ no replicado.....	130
Figura A.5. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes hidrofóbicos	139
Figura A.6. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes iónicos	140
Figura A.7. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes iónicos con lauril sucrosa en el medio de inmovilización.....	141

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LOS ACEITES DE PESCADO

Tabla A.1. Composición de ácidos grasos de los aceites de pescado utilizados

Ácido Graso	PM	Contenido	
		aceite de jurel (SPK)	aceite de sardina (ICP)
Saturados			
C14:0 Mirístico	228,4	4,06%	6,83%
C16:0 Palmítico	256,4	10,56%	14,77%
C18:0 Estearico	284,5	2,93%	2,92%
Monoinsaturados			
C16:1n7 Palmitoleico	254,4	2,69%	8,99%
C18:1n9 Oleico	282,5	13,25%	6,49%
C18:1n7 Vaccénico	282,5	2,20%	3,18%
C20:1n9 Eicosaenoico	310,2	10,19%	1,00%
C22:1n9 Erúcico	338,6	4,11%	0,62%
C24:1n9 Nervónico	368,6	0,82%	0,24%
Poliinsaturados			
C18:2n6 Linoleico	280,5	1,04%	1,18%
C18:3n6 Linolénico	278,4	1,00%	8,24%
C20:5n3 EPA	302,5	4,00%	16,69%
C22:5n3 DPA	330,5	1,93%	2,15%
C22:6n3 DHA	328,5	9,64%	10,38%

ANEXO 2

PARÁMETROS DE OPERACIÓN EN HPLC PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ACEITE DE PESCADO

Tabla A.2. Secuencia de operación para la fase móvil en HPLC-ELSD

Solución	Tiempo (min)									
	0,0	6,5	6,6	7,5	7,6	15,0	15,1	18,0	18,1	22,0
%A	100	100	50	50	0	0	50	50	100	100
%B	0	0	50	50	100	100	50	50	0	0

Debido a que los detectores ELSD entregan una respuesta exponencial en mVolts, fue requerida la elaboración de una curva de calibración de modo de correlacionar la concentración de ácidos grasos con la lectura en mV en un rango lineal. Según especificaciones del manual del equipo, basta con realizar dicha curva con un representante del tipo de moléculas que se quieren analizar; sin embargo ya que los distintos ácidos grasos difieren en su estructura según la familia (saturados, mono y poliinsaturados), se prefirió realizar la curva con un mix de patrones que contienen ácidos grasos de las tres familias, tal como se muestra en la Figura A1.

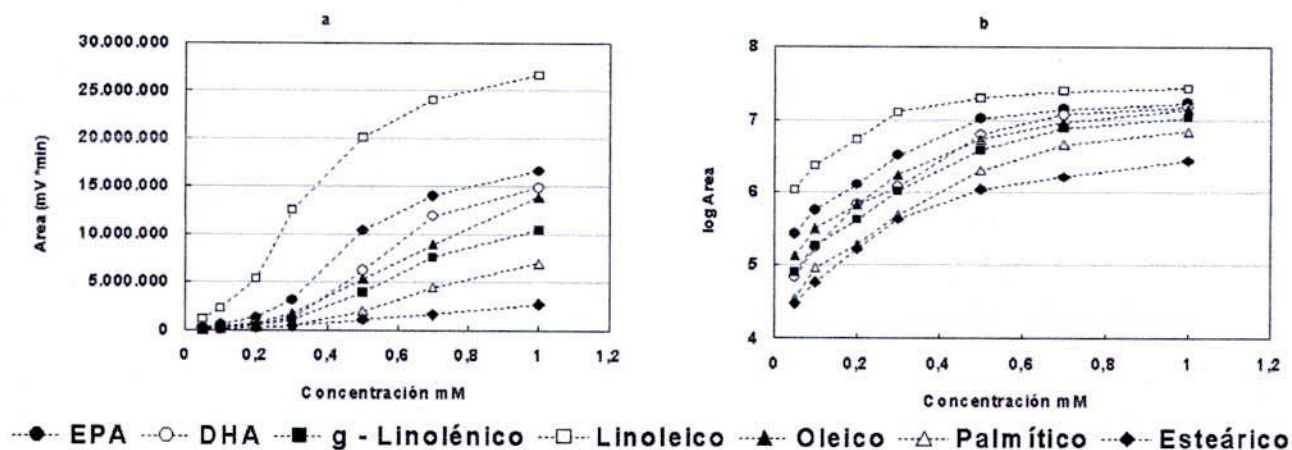


Figura A.1. Curva de calibración de ácidos grasos libres en HPLC-ELSD, a) concentración mM v/s área, b) concentración mM v/s logaritmo del área

Las pendientes de las correlaciones obtenidas en la calibración, presentadas en la Tabla A3, resultaron muy similares, corroborando que la curva de calibración se podría haber realizado con sólo un ácido graso representativo; y más aun, un valor promedio de las pendientes e interceptos podría utilizarse para cuantificar ácidos grasos no identificados presentes en el aceite de pescado a analizar.

Tabla A.3. Tiempos de retención y correlaciones de concentración por log de área obtenidas de las curvas de calibración para la detección de ácidos grasos en HPLC-ELSD

Acido Graso	Tiempo de retención (min)	Correlación (y: concentración mM, x: log área)
EPA	5,146	$y = 0,2840x - 1,5192$
DHA	5,461	$y = 0,2311x - 1,0980$
γ - Linolénico	5,690	$y = 0,2714x - 1,3100$
Linoleico	7,135	$y = 0,2366x - 1,3869$
Oleico	9,483	$y = 0,2818x - 1,4265$
Palmitico	9,561	$y = 0,2630x - 1,1758$
Esteárico	13,406	$y = 0,2783x - 1,2229$

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, MÉTODO P-NPB

La determinación de la actividad enzimática (U/mL), se realizó midiendo el aumento de absorbancia a 348 nm dada por la liberación de p-nitrofenol, como evidencia de la actividad catalítica.

Procedimiento

1. En una celda espectrofotométrica agregar 2,5 mL de tampón fosfato 25 mM pH 7,0.
2. Adicionar 20 μ L de p-NPB 50 mM a la celda que debe estar a 30°C y en agitación.
3. Adicionar entre 50 a 100 μ L de una solución de enzima en una concentración adecuada para caer dentro del rango de linealidad de medición
4. Medir la absorbancia en el tiempo, a 348 nm, usando como blanco un ensayo sólo con tampón fosfato 25 mM pH 7,0.
5. Para la realización de la curva de calibración, preparar una solución *standard* de p-nitrofenol tampón fosfato 25 mM pH 7,0.
6. A partir del standard, realizar diluciones de p-nitrofenol entre 0 y 0,15 mM.
7. Medir la absorbancia en el tiempo, a 348 nm, usando como blanco el ensayo sin p-nitrofenol
8. Las muestras pueden ser medidas entre 2 a 60 minutos después de ser preparadas

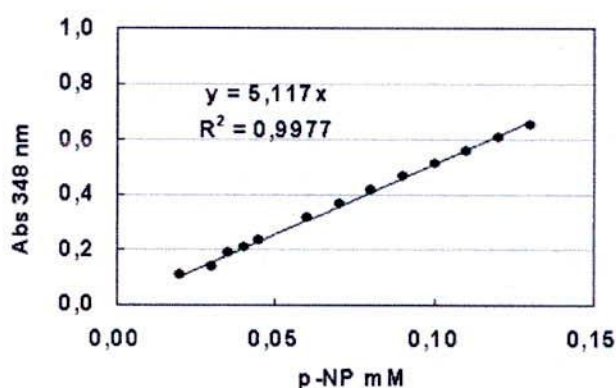


Figura A.2. Curva de calibración para determinación de actividad enzimática

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS, MÉTODO BCA

El contenido de proteína total se cuantificó utilizando el kit de determinación de proteínas BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Thermo Fisher Scientific, USA).

Procedimiento

1. Preparar los estándares de albúmina (BSA) usando la Tabla A1 como una guía.

Tabla A.4. Curva de calibración para determinación de proteínas

Vial	Volumen del diluyente	volumen de BSA	concentración final BSA
A	700 μ L	100 μ L del stock	250 μ g / mL
B	400 μ L	400 μ L del vial A	125 μ g / mL
C	450 μ L	300 μ L del vial B	50 μ g / mL
D	400 μ L	400 μ L del vial C	25 μ g / mL
E	400 μ L	100 μ L del vial D	5 μ g / mL
F	400 μ L	0 μ L	0 μ g / mL (blanco)

2. Preparar Reactivo de Trabajo (WR) BCA, con 50 partes de reactivo A y 1 parte de B.
3. Tomar 0,1 mL de muestra adecuadamente diluida.
4. Añadir 2 ml de Reactivo WR BCA a cada tubo y mezclar bien.
5. Tapar los tubos para evitar evaporación e incubar a 60°C por 30 minutos.
6. Enfriar los tubos a temperatura ambiente y leer en espectrofotómetro a 562 nm.
7. Realizar el mismo procedimiento para un blanco de agua destilada.
8. La absorbancia de todas las muestras se debe registrar idealmente dentro de 10 minutos

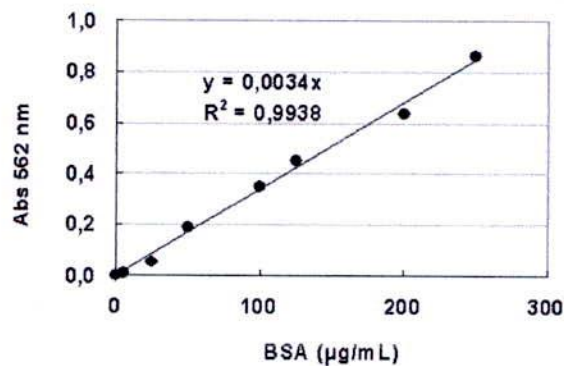


Figura A.3. Curva de calibración para la determinación de contenido de proteína

ANEXO 5

PREPARACIÓN PARA ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Preparación del gel separador al 12%

1. Mezclar en un matraz los componentes en el orden que se indica en la Tabla A.10
2. Añadir la mezcla en el interior del molde hasta una altura aproximada de 2 cm del borde superior de la placa mayor, de forma que quede suficiente espacio para el gel concentrador (se debe calcular 1 cm más de la longitud de los pocillos del peine).
3. Cubrir la superficie del gel con isobutanol, para prevenir el contacto del oxígeno con el gel que inhibe la reacción de polimerización.
4. Dejar que el gel polimerice por unos 60 minutos.

Preparación del gel de concentración al 5%

1. Eliminar el alcohol que cubre el gel separador y lavar la parte superior del gel 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier residuo de acrilamida no polimerizada. La parte de superior del gel se seca con papel absorbente con cuidado de no dañar el gel.
2. Mezclar en un matraz los componentes en el orden que se indica en la Tabla A.11
3. Introducir la solución directamente sobre la superficie del gel separador e inmediatamente insertar el peine en la solución concentradora con cuidado para evitar que se formen burbujas de aire.
4. Dejar que el gel polimerice por unos 30 minutos.
5. Retirar el peine cuidadosamente con un movimiento vertical y con una pizeta enjuagar los pocillos 2-3 veces con agua destilada para eliminar cualquier resto de acrilamida.

Preparación de las muestras

1. En el tiempo de espera durante la polimerización se preparan las muestras que se van a cargar en el gel.
2. Con una micropipeta colocar 20 μ l de muestra proteica preparada en tampón de carga (Tabla A.12) en un tubo eppendorf.
3. Preparar un tubo eppendorf con las proteínas estándar de peso molecular conocido.
4. Fijar las tapas de los tubos y calentar a 100°C durante 5 minutos.
5. Centrifugar por 15 segundos a máxima velocidad para concentrar el volumen en el fondo del tubo.

Electroforesis

1. Insertar las placas con los geles polymerizados en la unidad de electroforesis
2. Preparar el tampón de electroforesis a partir de la solución concentrada (Tabla A.13) y añadirlo en los reservorios interior y exterior.
3. Retirar las burbujas de aire y restos de acrilamida del interior de los pocillos, introduciendo tampón de electroforesis en los mismos.
4. Aplicar las muestras con una micropipeta (hasta 20 μ l) en los pocillos, en un orden predeterminado y previamente anotado.
5. Añadir en un carril la solución de proteínas estándar de peso molecular conocido.
6. Conectan los electrodos a la cubeta de electroforesis y a la fuente de alimentación y aplicar corriente eléctrica. La corriente eléctrica recomendada para geles de 0,75 mm de grosor es un voltaje constante de 100-200V.
7. La duración aproximada del proceso es de 1 hora y 15 minutos. La electroforesis acaba cuando el frente de azul de bromofenol alcanza la parte inferior del gel.
8. Desconectar la fuente de alimentación retirando los electrodos y sacando los geles de la cubeta de electroforesis. Estos se depositan en la mesa de trabajo.
9. Sacar los geles de acrilamida del interior del molde, separando ambos cristales cuidadosamente con ayuda de una espátula.
10. Eliminar el gel concentrador y hacer una muesca al gel en una de las esquinas para orientar la posición de las muestras.

Tinción del gel con azul de Coomassie

1. Transferir el gel de la placa de vidrio a un recipiente que contiene la solución de tinción de Coomassie (Tabla A.14).
2. Dejar el gel en agitación suave con suficiente volumen de esta solución a temperatura ambiente durante 1 hora.
3. Eliminar la solución de tinción con una pipeta y conservarlo para futuras tinciones.
4. Añadir solución decolorante (Tabla A.15) e incubar en agitación para eliminar el exceso de coloración hasta que sólo queden teñidas de azul las proteínas, cambiando la solución decolorante tantas veces como sea necesario. El gel puede quedar en esta solución toda la noche pero se pueden empezar a observar las proteínas en 20 minutos.
5. Eliminar la solución de desteñido y añadir agua destilada (o acético al 10%). Los geles pueden conservarse de esta forma durante largos periodos de tiempo de forma casi indefinida a 4°C.

Preparación de soluciones

Tabla A.5. Tampón para el gel separador

Tris-HCl 1,5 M SDS 0,4% pH 8,8.	
	100 mililitros
Tris-base	18,17 g
SDS	0,4 g
Disolver en 80ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 8,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

Tabla A.6. Tampón para el gel concentrador

Tris-HCl 0,5 M SDS 0,4% pH 6,8.	
	100 mililitros
Tris-base	6,06 g
SDS	0,4 g
Disolver en 80ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 6,8 con HCl concentrado	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

Tabla A.7. SDS al 10% (peso/volumen)

Solución sodio dodecil sulfato 10%	
	100 mililitros
SDS	10 g
Disolver en 80ml de agua destilada	
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

El SDS precipita si la temperatura ambiente es inferior a 18°C. Calentar ligeramente para favorecer la disolución.

Tabla A.8. Persulfato amónico (APS) al 10%

Solución APS 10%	
	10 mililitros
APS	10 g
Disolver en 8ml de agua destilada	
Agua destilada	Añadir hasta 10 ml

Una vez preparados los 10 mL se reparten en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se conservan a -20°C hasta su uso.

Tabla A.9. Acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%

Solución Acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%	
	100 mililitros
Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Agua destilada	Añadir hasta 100 ml

Tabla A.10. Gel separador 12% de acrilamida

Gel separador 12% en tampón Tris-H-Cl 0,375 M, pH 8,8	
	5 mililitros
Tris HCl 1,5M pH 8,8	1,25 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%	2 ml
APS 10 %	0,025 ml
TEMED	0,007 ml
Agua destilada	Añadir hasta 5 ml

Tabla A.11. Gel concentrador al 5% de acrilamida

Gel separador 5% en tampón Tris-H-Cl 0,125 M, pH 6,8	
Tris HCl 0,5M pH 6,8	0,750 ml
Acrilamida/bisacrilamida 30%-0,8%	0,3 ml
APS 10 %	0,015 ml
TEMED	0,005 ml
Agua destilada	1,5 ml

Tabla A.12. Tampón de la muestra (carga)

Tampón de carga	
Tris HCl 0,5M pH 6,8	1 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
Azul de Bromofenol, 1% ^b	0,4 ml
2-mercaptoetanol	0,4 ml
Agua destilada	Añadir hasta 3 ml

Debe de prepararse inmediatamente antes de usar.

Tabla A.13. Tampón de electroforesis Tris-Glicina

Tampón de electroforesis 10 X Tris Glicina pH 8,6	
	1 litro
Tris base	30,29 g
Glicina	144,4g
SDS	10g
Disolver en 800 ml de agua destilada	
Ajustar el pH a 8,6 con HCl concentrado	
Agua destilada	Hasta 1 litro
Tampón de electroforesis 1 X Tris Glicina pH 8,3	
	1 litro
Solución concentrada 10X	100ml
Agua destilada	Hasta 1 litro

Tabla A.14. Solución de tinción azul de Coomassie

Tampón de tinción azul de Coomassie	
	1 litro
Azul de Coomassie R-250	1g
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml
Agua destilada	Añadir hasta 1 litro

Se debe preparar en la campana de gases, ya que el metanol es tóxico, mantener en agitación hasta la disolución de la mayor parte de colorante. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente en botellas de color oscuro.

Tabla A.15. Solución de decolorante de geles

Solución decolorante	
	1 litro
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml
Agua destilada	Añadir hasta 1 litro

ANEXO 6

**MATRIZ DE DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL 2^4 Y TABLAS ANOVA PARA
RESPUESTAS EVALUADAS**

		A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	
	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	x_9	x_{10}	Y (respuesta)
(I)	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	
a	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	
b	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	
ab	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	
c	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	
ac	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	
bc	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	
abc	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	
d	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	
ad	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	
bd	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	
abd	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	
cd	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	
acd	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	
bcd	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	
abcd	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

Figura A.4. Matriz de diseño experimental factorial 2^4 no replicado para estudiar cuatro factores con dos niveles cada uno (alto y bajo), notación signal combinada con notación de Yates para efectos principales y secundarios

Tabla A.16. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 3,5 horas de reacción, $\alpha=0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	<i>p-value</i>	significancia del efecto
A: pH (x1)	19,4	1	19,4	7,64	0,0400	significativo
B: W/O (x2)	85,5	1	85,5	33,64	0,0020	significativo
C: [E] (x3)	1542,7	1	1542,7	607,30	0,0000	significativo
D: T (x4)	0,4	1	0,4	0,160	0,5550	no significativo
AB	0,2	1	0,2	0,075	0,6730	no significativo
AC	4,3	1	4,3	1,68	0,0930	no significativo
AD	1,3	1	1,3	0,523	0,3060	no significativo
BC	19,0	1	19,0	7,47	0,0070	significativo
BD	1,3	1	1,3	0,523	0,3060	no significativo
CD	1,0	1	1,0	0,387	0,3630	no significativo
error	12,7	5	2,54			
total	1687,7	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, *p-value*: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.16) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.1).

$$Y=16,7-1,1x_1-2,31x_2+9,82x_3-1,1x_2x_3$$

Ecuación A.1

Tabla A.17. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 7 horas de reacción, $\alpha=0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	<i>p-value</i>	significancia del efecto
A: pH (x1)	13,7	1	13,7	0,95	0,3740	no significativo
B: W/O (x2)	153,9	1	153,9	10,66	0,0220	significativo
C: [E] (x3)	2502,8	1	2502,8	173,36	0,0000	significativo
D: T (x4)	23,8	1	23,8	1,65	0,2550	no significativo
AB	1,0	1	1,0	0,07	0,8020	no significativo
AC	1,9	1	1,9	0,13	0,7330	no significativo
AD	2,3	1	2,3	0,16	0,7060	no significativo
BC	55,2	1	55,2	3,82	0,1080	no significativo
BD	0,3	1	0,3	0,02	0,8930	no significativo
CD	25,2	1	25,2	1,74	0,2440	no significativo
error	72,2	5	14,44			
total	2852,1	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, *p-value*: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.17) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.2).

$$Y=21,0-3,1x_2+12,5x_3$$

Ecuación A.2

Tabla A.18. ANOVA para hidrólisis de aceite de pescado a 22 horas de reacción, $\alpha=0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	p-value	significancia del efecto
A: pH (x1)	20,8	1	20,8	1,70	0,2490	no significativo
B: W/O (x2)	408,0	1	408,0	33,21	0,0020	significativo
C: [E] (x3)	3415,7	1	3415,7	278,04	0,0000	significativo
D: T (x4)	123,6	1	123,6	10,06	0,0250	significativo
AB	6,0	1	6,0	0,48	0,5190	no significativo
AC	7,4	1	7,4	0,60	0,4740	no significativo
AD	1,2	1	1,2	0,102	0,7620	no significativo
BC	19,1	1	19,1	1,56	0,2670	no significativo
BD	0,4	1	0,4	0,035	0,8590	no significativo
CD	4,8	1	4,8	0,39	0,5600	no significativo
error	61,4	5	12,29			
total	4068,4	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, p-value: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.18) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.3).

$$Y=29,7-5,1x_2+14,6x_3-2,8x_4$$

Ecuación A.3

Tabla A.19. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 3,5 horas de reacción, $\alpha=0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	p-value	significancia del efecto
A: pH (x1)	0,6	1	0,6	4,12	0,0980	no significativo
B: W/O (x2)	2,9	1	2,9	19,32	0,0070	significativo
C: [E] (x3)	46,9	1	46,9	311,01	0,0000	significativo
D: T (x4)	0,0	1	0,0	0,002	0,0020	significativo
AB	0,0	1	0,0	0,22	0,9660	no significativo
AC	0,2	1	0,2	1,44	0,2840	no significativo
AD	0,1	1	0,1	0,40	0,5550	no significativo
BC	0,8	1	0,8	5,58	0,0650	no significativo
BD	0,1	1	0,1	0,63	0,4630	no significativo
CD	0,0	1	0,0	0,05	0,8320	no significativo
error	0,8	5	0,15			
total	52,5	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, p-value: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.19) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.4).

$$Y=17,8-0,4x_2+1,7x_3-0,004x_4$$

Ecuación A.4

Tabla A.20. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 7 horas de reacción, $\alpha= 0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	<i>p-value</i>	significancia del efecto
A: pH (x1)	0,4	1	0,4	0,45	0,5320	no significativo
B: W/O (x2)	6,4	1	6,4	6,94	0,0460	significativo
C: [E] (x3)	90,3	1	90,3	97,38	0,0000	significativo
D: T (x4)	0,6	1	0,6	0,63	0,4630	no significativo
AB	0,2	1	0,2	0,17	0,6970	no significativo
AC	0,1	1	0,1	0,12	0,7430	no significativo
AD	0,2	1	0,2	0,27	0,6260	no significativo
BC	2,9	1	2,9	3,13	0,1370	no significativo
BD	0,1	1	0,1	0,13	0,7330	no significativo
CD	0,8	1	0,8	0,90	0,3860	no significativo
error	4,6	5	0,93			
total	106,8	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, *p-value*: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.20) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.5).

$$Y=18,7-0,6x_2+2,3x_3$$

Ecuación A.5

Tabla A.21. ANOVA para la concentración de EPA+DHA en forma de glicéridos a partir de la hidrólisis de aceite de pescado a 22 horas de reacción, $\alpha= 0,05$

FV	SC	GL	CM	F0	<i>p-value</i>	significancia del efecto
A: pH (x1)	0,5	1	0,5	0,45	0,5320	no significativo
B: W/O (x2)	26,6	1	26,6	22,63	0,0050	significativo
C: [E] (x3)	158,0	1	158,0	134,32	0,0000	significativo
D: T (x4)	2,8	1	2,8	2,40	0,1820	no significativo
AB	0,4	1	0,4	0,34	0,5850	no significativo
AC	0,2	1	0,2	0,20	0,6730	no significativo
AD	0,4	1	0,4	0,33	0,5910	no significativo
BC	4,7	1	4,7	3,98	0,1300	no significativo
BD	0,0	1	0,0	0,002	0,9660	no significativo
CD	0,0	1	0,0	0,01	0,9240	no significativo
error	5,9	5	1,18			
total	199,5	15				

FV: fuentes de variabilidad (efectos), SC: sumas de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios, F0: estadístico de prueba, *p-value*: significancia observada

A partir de las variables que poseen un efecto significativo (Tabla A.21) y del cálculo de los coeficientes del modelo de regresión, se obtiene la función a maximizar (Ecuación A.6).

$$Y=20,6-1,3x_2+3,1x_3$$

Ecuación A.6

ANEXO 7

PROTOCOLOS DE INMOVILIZACIÓN DE CCL EN DIFERENTES SOPORTES

A.7.1 Protocolo de inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones hidrofóbicas

- Preparar una suspensión de soporte hidrofóbico (octil-agarosa, butil-sepabeads, octadecil-sepabeads, lewatit y celita) con la solución de enzima en una concentración de proteína deseada. La suspensión debe estar en una relación 1:10, por ejemplo 5 g de octil agarosa en 50 mL de solución de enzima. La solución de enzima debe estar en tampón fosfato 25 mM pH 7.
- Dejar en el agitador de rodillo por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente (25°C).
- Medir actividad específica con p-NPB como sustrato tanto del sobrenadante como de la suspensión para obtener el rendimiento de inmovilización de la lipasa.
- Filtrar el derivado y lavar con agua destilada en primero y luego con tampón fosfato 25 mM pH 7.

A.7.2 Protocolo de entrecruzamiento de derivados de O-CCL con polímeros polifuncionales

i. Aminación química de la superficie de la enzima

- Preparar una suspensión del derivado de O-CCL en etilendiamina 1mM a pH 4,75 en una relación 1g por 10 mL, por ejemplo 5 g de O-CCL en 50 mL de EDA.
- Agregar la cantidad necesaria de EDC para que tenga una concentración en la suspensión del derivado de 10 mM y ajustar el pH a 4,75.
- Dejar en el agitador de rodillo por 90 minutos a temperatura ambiente (25°C).
- Medir actividad específica de la suspensión con p-NPB como sustrato.
- Filtrar y lavar los derivados aminados con agua destilada.

ii. Entrecruzamiento con dextrano sulfato

- Preparar una suspensión del derivado O-CCL aminado en tampón fosfato 100mM a pH 7 en una relación 1:10, por ejemplo 5 g de derivado en 50 mL de tampón.

- Agregar una cantidad tal de solución de dextrano sulfato de 100 kDa para obtener la concentración deseada de dextrano sulfato por mg de proteína adsorbida (0,5 mg/mg Prot).
- Dejar en el agitador de rodillo a temperatura ambiente (25°C) por 150 minutos.

iii. *Entrecruzamiento con dextrano aldehído*

El entrecruzamiento con dextrano aldehído consta de los siguientes pasos:

- a) Preparación del dextrano aldehído
- b) Entrecruzamiento
- c) Reducción

a) Preparación del dextrano aldehído

- Preparar una solución de dextrano (100 kDa) pesando 3,33 g de dextrano y disolverlos en 100 mL de agua destilada
- Agregar 8 g de periodato de sodio a temperatura ambiente por 3 horas. Esto permite la completa oxidación de la molécula de dextrano.
- Dejar *overnight* la solución dializándose en 50 volúmenes de agua destilada, con el fin de eliminar el formaldehído producido durante la oxidación.

b) Entrecruzamiento

- Preparar una suspensión del derivado aminado en tampón fosfato 100mM a pH 7 en una relación 1:10, por ejemplo 5 g de derivado en 50 mL de tampón.
- Agregar una cantidad tal de solución de dextrano aldehído para obtener la concentración deseada de dextrano aldehído por mg de proteína adsorbida (0,5 mg/mg prot).
- Dejar en el agitador de rodillo a temperatura ambiente (25°C) “overnight”.

c) Reducción

- A la suspensión del derivado se le agrega borohidruro de sodio (NaBH₄) en una concentración de 1mg de NaBH₄ por mL de suspensión.
- Dejar en agitación usando un agitador de paleta a temperatura ambiente y por 60 minutos, sin tapar para procurar la liberación de gases.
- Filtrar y lavar con agua destilada.

A.7.3 Protocolo de inmovilización de CCL mediante adsorción por interacciones iónicas

- Preparar una suspensión de soporte (Q-sepharose, MANAE-agarosa, CM-agarosa, glioxil-agarosa-PEI y agarosa-DxSO₄) con la solución de enzima en la concentración de proteína deseada. La suspensión debe estar en una relación 1 g de soporte por 10 mL de solución de enzima, la cual debe estar a baja fuerza iónica con tampón fosfato 5 mM pH 7.
 - Cuando se utiliza lauril sucrosa en el medio de inmovilización, ésta debe quedar en un 0,3% en el tampón fosfato 5 mM pH 7.
 - Dejar en el agitador de rodillo por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente (25°C).
 - Medir actividad específica con p-NPB como sustrato tanto del sobrenadante como de la suspensión para obtener el rendimiento de inmovilización de la lipasa.
 - Filtrar el derivado y lavar con agua destilada y luego con tampón fosfato 25 mM pH 7.
- i. Preparación de Glioxil-agarosa 4BCL recubierta con polietilenimina (PEI)*
- Agregar 1 g de PEI (tamaño molecular de 25.000) por gramo de soporte en una suspensión de 10 mL del soporte activado (glioxil-agarosa) y 80 mL de tampón bicarbonato 100mM a pH 11 y dejar en agitación suave por 3 horas a temperatura ambiente (25°C).
 - Agregar borohidruro de sodio, de forma tal que en la disolución se tenga 10 mg/mL, para la reducción de los soportes activados y dejar por 2 horas en agitación a temperatura ambiente (25°C).
 - Lavar los soportes modificados con tampón acetato sódico 100 mM pH 4, tampón borato de sodio 100 mM pH 9, solución 1 M de cloruro de sodio, y finalmente con agua destilada para eliminar cualquier molécula de PEI adsorbida al soporte y no unida al grupo glioxil.
- ii. Preparación de Agarosa 4BCL recubierta con dextrano sulfato*
- Disolver 0,5 g de dextrano sulfato (100 kDa), en 10 mL de tampón fosfato 25 mM a pH 7, a temperatura ambiente (25°C).
 - Agregar 5 g de agarosa y dejar en agitación en rodillo por 16 hrs.
 - Contactar el soporte con 1 L de tampón fosfato 100 mM a pH 7, bajo agitación suave por una hora a temperatura ambiente (25°C).
 - Lavar el soporte con abundante agua destilada para eliminar el exceso de dextrano sulfato.

A.7.4 Protocolo de inmovilización de CCL mediante enlace covalente a agarosa activada con bromocianógeno

La inmovilización de lipasas en CNBr-agarosa requiere de los siguientes pasos:

- a) Activación de la CNBr-agarosa
- b) Inmovilización de la enzima

a) Activación de la CNBr-agarosa

- Preparar una suspensión con CNBr-agarosa y agua destilada a pH 2,5 (ajustado con HCl) en una relación 1 g por 10 mL, considerando que la CNBr-agarosa al hidratarse aumenta alrededor de tres veces su peso. Por ejemplo si se requiere de 6 g de CNBr-agarosa, se debe pesar 2 g de soporte y suspenderlo en 60 mL de agua destilada a pH 2,5.
- Dejar en agitación a temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos.
- Filtrar sin lavar.

b) Inmovilización de la lipasa a CNBr-agarosa

- Preparar una suspensión de CNBr-agarosa activada con una solución de enzima en la concentración de proteína deseada. La suspensión debe estar en una relación 1:10, por ejemplo 5 g de CNBr-agarosa en 50 mL de solución de enzima. La solución de enzima debe estar en tampón fosfato 25 mM pH 7.
- Dejar en agitación en frío (4°C), usando un agitador de paleta por 15 minutos.
- Medir actividad específica con p-NPB como sustrato tanto del sobrenadante como de la suspensión para conocer el porcentaje de inmovilización de la lipasa.
- Filtrar y lavar con una solución de etanolamina 1 M pH 8.
- Resuspender en una solución de etanolamina 1 M pH 8, en relación 1:10 con el soporte, y dejar en agitación por 1,5 horas para bloquear los grupos reactivos remanentes del soporte.
- Filtrar y lavar con agua destilada.

A.7.5 Protocolo de inmovilización de CCL mediante enlace covalente a glioxil-agarosa

- Preparar una suspensión de glioxil-agarosa con una solución de enzima en la concentración de proteína deseada. La suspensión debe estar en una relación 1:10, por ejemplo 5 g de glioxil-agarosa en 50 mL de solución de enzima. La solución de enzima debe estar en tampón fosfato 25 mM pH 7
- Ajustar el pH a 9 y dejar en agitación a temperatura ambiente (25°C) “overnight”

- Medir actividad específica de la suspensión con p-NPB como sustrato.
- Filtrar y lavar con agua destilada.
- Resuspender en tampón bicarbonato 100 mM pH 10 y dejar en el agitador de rodillo a temperatura ambiente (25°C) por 3 horas.
- Medir actividad específica de la suspensión con p-NPB como sustrato.
- Agregar borohidruro de sodio (NaBH_4) en una concentración de 1mg de NaBH_4 por mL de suspensión del derivado
- Dejar en agitación usando un agitador de paleta a temperatura ambiente (25°C) y por 30 minutos, sin tapar para procurar la liberación de gases.
- Filtrar y lavar con agua destilada.

ANEXO 8

CINÉTICAS DE INMOVILIZACIÓN DE CCL EN DIFERENTES SOPORTES

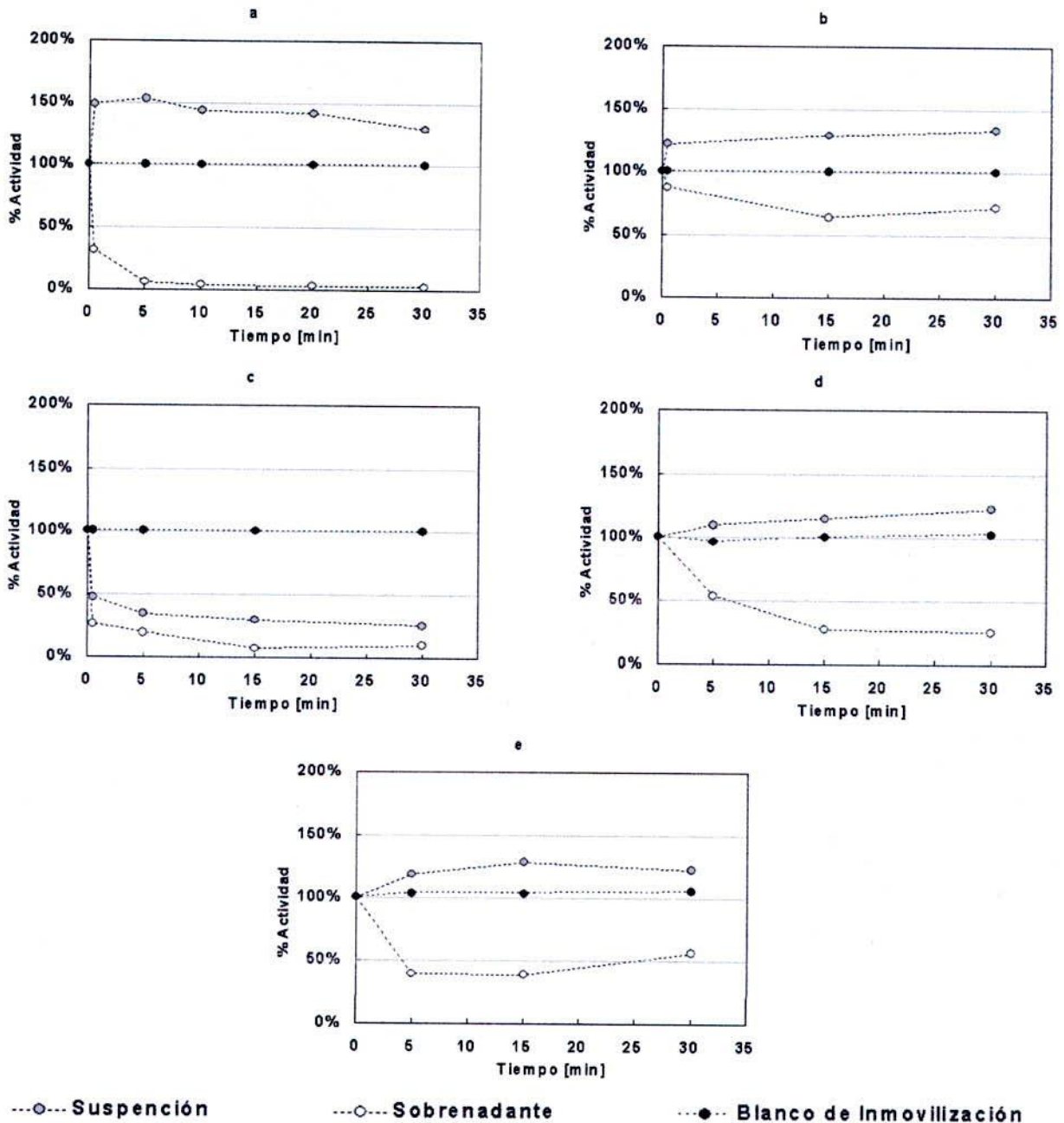


Figura A.5. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes con características hidrofóbicas, a) Octil-agarosa b) butil-sepabeads c) octadecil-sepabeads d) lewatis y e) celita

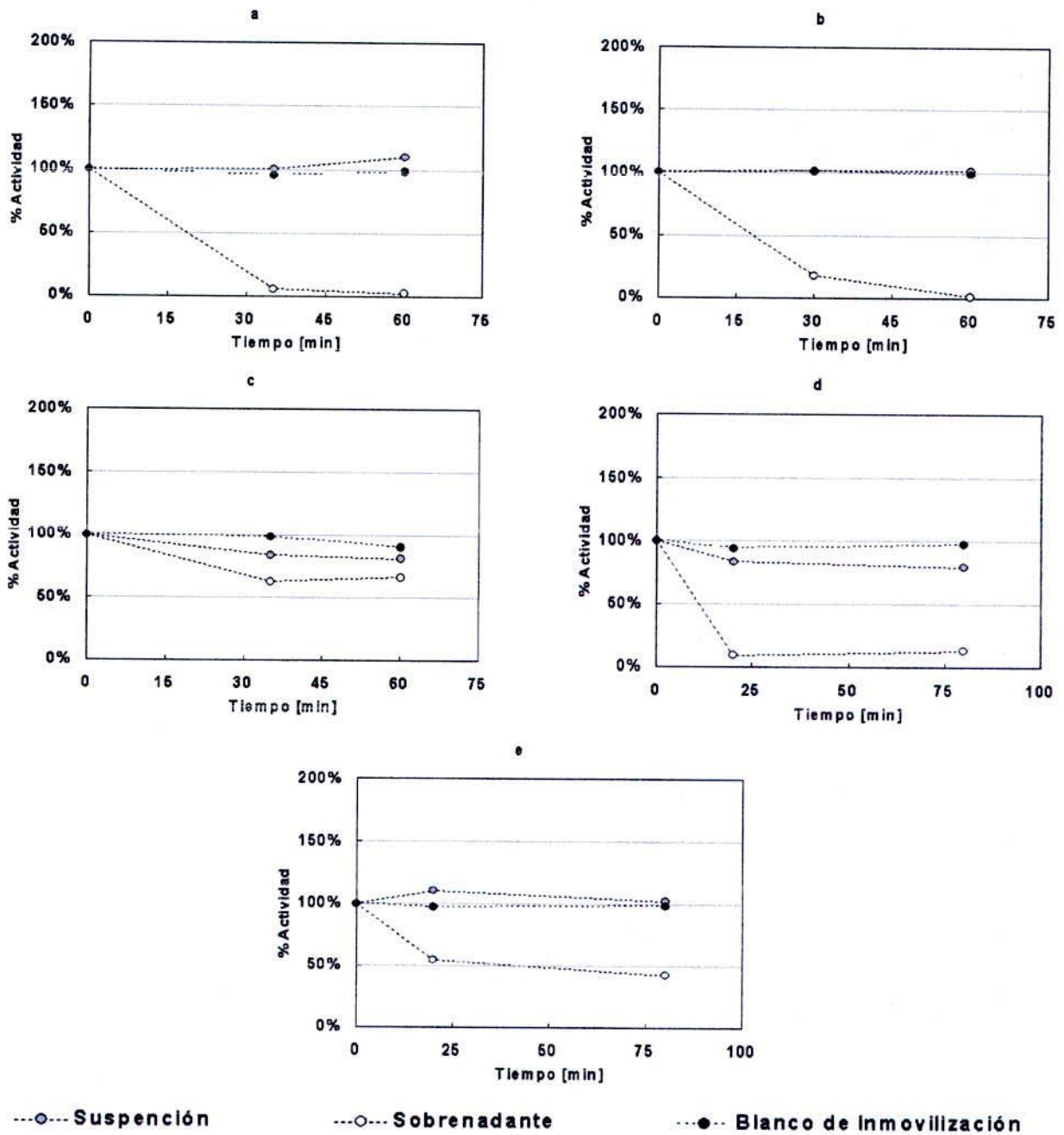


Figura A.6. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes iónicos, a) Q-sepharose b) MANAE-agarosa c) CM-agarosa d) glioxil-agarosa-PEI y e) agarosa-DxSO4

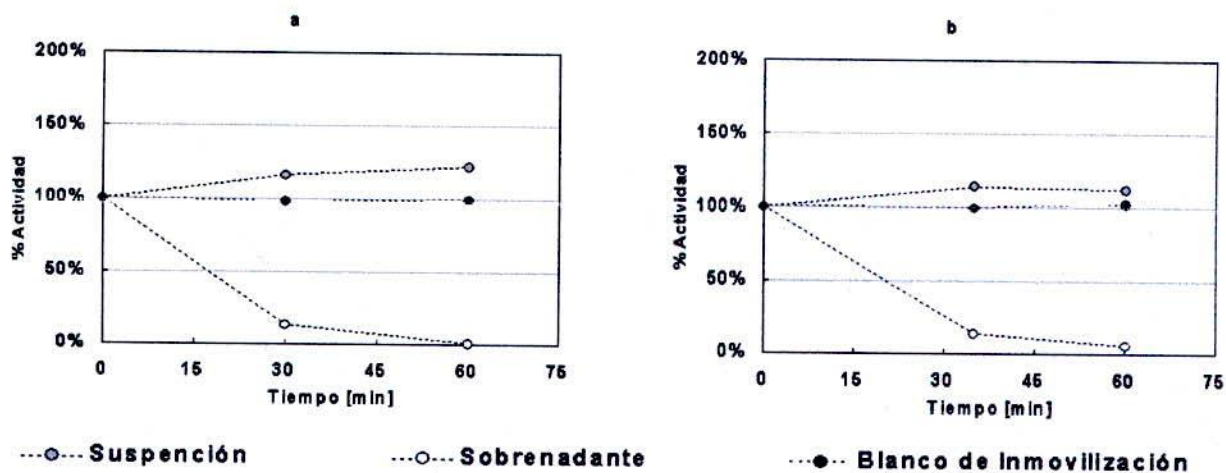


Figura A.7. Cinéticas de inmovilización de CCL en soportes iónicos con lauril sucrosa en el medio de inmovilización, a) Q-sepharose b) MANAE-agarosa

Difusión de la Investigación

Los resultados de la presente investigación han sido presentados en los siguientes congresos internacionales:

7th Euro Fed Lipid Congress “Lipids, Fats and Oils: From Knowledge to Application”,
Octubre 2009, Graz, Austria.

Trabajo presentado: “Enzymatic hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase: A comparison of reaction systems”

Autores: C. Pizarro, A. Markovits, R. Chamy, L. Wilson

14th European Congress on Biotechnology “Symbiosis: Science, Industry and Society”,
Septiembre 2009, Barcelona, España.

Trabajo presentado: “Fish oil hydrolysis with immobilized lipase from *Candida cylindracea*: A comparison of different derivatives”

Autores: C. Pizarro, A. Markovits, R. Chamy, L. Wilson

6th Euro Fed Lipid Congress “Oils, Fats and Lipids in the 3rd Millennium”,
Septiembre 2008, Atenas, Grecia.

Trabajo presentado: “Effect of use immobilized *Candida cylindracea* lipase on thermal stability and n-3 PUFAs separation by enzymatic hydrolysis”

Autores: C. Pizarro, A. Markovits, R. Chamy, L. Wilson

A la fecha se tiene una publicación derivada de la presentación en 14th European Congress on Biotechnology “Symbiosis: Science, Industry and Society” y cuatro artículos en preparación para ser publicados en revistas del área:

- C. Pizarro, L. Wilson, R. Chamy, A. Markovits. (2009). *Fish oil hydrolysis with immobilized lipase from Candida cylindracea: a comparison of different derivatives*. New Biotechnology 25: S154-S155.
- C. Pizarro, R. Chamy, A. Markovits, C. Brañes, G. Fernández-Lorente, J.M. Guisán, L. Wilson. *Stability study of Candida cylindracea lipase immobilized by different techniques for the hydrolysis of fish oil triacylglycerols*. Manuscrito en preparación.
- C. Pizarro, R. Chamy, A. Markovits, C. Brañes, L. Wilson. *Enzymatic hydrolysis of fish oil with different derivatives of Candida cylindracea lipase: Comparison of reaction conditions*. Manuscrito en preparación.
- C. Pizarro, R. Chamy, A. Markovits, C. Brañes, L. Wilson. *Applicability of using recycled hydrophobic supports for lipase immobilization in successive cycles of fish oil hydrolysis*. Manuscrito en preparación.
- C. Pizarro, R. Chamy, A. Markovits, C. Brañes, G. Fernández-Lorente, J.M. Guisán, L. Wilson. *Comparison of the thermal stability of different derivatives of Candida sp. lipases for fish oil hydrolysis*. Manuscrito en preparación.