

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

29



DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

298641

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

SINTESIS SELECTIVA DE ACILGLICERIDOS POR  
GLICEROLISIS ENZIMATICA EN MEDIOS  
NO CONVENCIONALES.

**T E S I S**

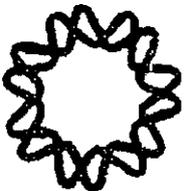
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

**( B I O Q U I M I C A S )**

P R E S E N T A

**XOCHITL RENDON POUJOL**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LES AGRADEZCO MUCHO...

A mis padres y hermana; Jorge, Xóchitl y Georgina por el gran apoyo que me han dado siempre.

Al Dr. Edmundo Castillo y al Dr. Agustín López-Munguía por ser guías de este proyecto.

Al Dr. Eduardo Bárzana, a la Dra. Amelia Farres y al Dr. Rafael Vázquez por sus valiosos comentarios.

A mis amigos y compañeros de laboratorio; Consuelo, Clarita, Doña Aurelia, Fernando, Lolita, Marta, Vanesa y Vero por estar siempre dispuestos a ayudar.

A Paco, por todo.

<b>1.0 RESUMEN.</b>	1
<b>2.0 INTRODUCCIÓN.</b>	2
<b>3.0 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	4
<b>3.1 ACILGLICÉRIDOS.</b>	4
<b>3.1.1 Estructura y Nomenclatura.</b>	4
<b>3.1.2 Propiedades Funcionales y Aplicaciones en la Industria.</b>	7
3.1.2.1. <i>Los acilglicéridos como intermediarios sintéticos y como productos terapéuticos.</i>	7
3.1.2.2 <i>Los acilglicéridos como moléculas emulsificantes.</i>	9
<b>3.2 SÍNTESIS DE ACILGLICÉRIDOS.</b>	12
<b>3.2.1 Métodos Industriales de Síntesis. Síntesis Química.</b>	12
<b>3.2.2 Síntesis Enzimática.</b>	12
<b>3.3 LAS ENZIMAS QUE CATALIZAN LA SÍNTESIS DE ACILGLICÉRIDOS. LAS LIPASAS.</b>	13
<b>3.3.1 Estructura y Mecanismo.</b>	15
<b>3.3.2 Las lipasas y su Especificidad.</b>	19
3.3.2.1. <i>Aparente Cambio de Regioespecificidad. Acilmigración.</i>	22
<b>3.3.3 Reacciones que Catalizan las Lipasas.</b>	25
3.3.3.1 <i>Hidrólisis.</i>	26
3.3.3.2 <i>Síntesis y Actividad de Agua</i>	30
<b>3.4 SOLVENTES ORGÁNICOS. SISTEMAS DE BAJA ACTIVIDAD DE AGUA.</b>	36
<b>3.4.1 Influencia de la Naturaleza del Solvente en el Equilibrio.</b>	36
<b>3.5 REACCIONES DE SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE MONO Y DIGLICÉRIDOS.</b>	38
<b>3.5.1 Hidrólisis de Triglicéridos.</b>	38
<b>3.5.2 Esterificación de Ácidos Grasos o Ésteres con Glicerol.</b>	40
<b>3.5.3 Glicerólisis.</b>	44
<b>4.0 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.</b>	49
<b>5.0 OBJETIVOS.</b>	51
<b>6.0 MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	52

<b>6.1 REACTIVOS Y SOLVENTES.</b>	52
<b>6.2 MATERIAL ENZIMÁTICO.</b>	52
<b>6.3 REACCIÓN DE GLICERÓLISIS.</b>	52
<b>6.4 ADSORCIÓN DE GLICEROL A SÍLICA GEL. SOLUCIÓN AL PROBLEMA DE LA INSOLUBILIDAD DEL GLICEROL EN MEDIOS HIDROFÓBICOS.</b>	53
<b>6.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS.</b>	54
<b>6.6 CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE AGUA.</b>	55
<b>7.0 RESULTADOS.</b>	57
<b>7.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GLICEROL ABSORBIDO A UN SOPORTE DE SÍLICA GEL.</b>	57
<b>7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA ÓPTIMA.</b>	58
<b>7.4 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SOLVENTE EN EL EQUILIBRIO DE LA REACCIÓN.</b>	60
<b>7.5 CAMBIO APARENTE DE REGIOESPECIFICIDAD, UNA NUEVA INTERPRETACIÓN .</b>	66
<b>7.6 EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN EL MEDIO DE REACCIÓN.</b>	73
<b>8.0 CONCLUSIONES GENERALES.</b>	82
<b>9.0 PERSPECTIVAS.</b>	84
<b>ANEXO.</b>	85
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	88
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>	89
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	93

## 1.0 RESUMEN

En este proyecto se recurrió a la Ingeniería de Solventes para lograr la síntesis selectiva de mono- o diglicéridos a través de una reacción de glicerólisis de trioleína catalizada por una enzima *sn*-1,3-específica. Se evaluó el efecto de mezclas de solventes con diferentes proporciones de *n*-hexano y 2-metil-2-butanol (2M2B) sobre la selectividad de la reacción, encontrándose que la síntesis de monooleína aumenta desde 10.6% mol en un sistema con 100% *n*-hexano hasta 64% mol en un sistema 100% 2M2B. Por el contrario, la mayor concentración de dioleína (62% mol) se alcanza en el sistema con *n*-hexano puro.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la relación *n*-hexano/2M2B en la reacción de glicerólisis de trioleína en términos de la producción de regioisómeros puros de dioleína. Dos diferentes perfiles de regioisómeros de dioleína fueron observados como función de la composición del solvente: mientras que la producción del isómero *sn*-1,2-dioleína se favorece conforme la proporción de 2M2B en *n*-hexano se incrementa, el isómero *sn*-1,3 se sintetiza preferencialmente en reacciones donde predomina *n*-hexano.

Se determinó que este resultado está estrechamente asociado al mecanismo de reacción por el que ocurre la glicerólisis. Se propone que dicho mecanismo puede ocurrir a través de dos vías: la transesterificación de los grupos ácido del triglicérido al glicerol o bien, a través de reacciones de hidrólisis y esterificación. Se comprobó también, por un lado, que dichas reacciones son controladas termodinámicamente mediante el uso de un solvente particular y por otro, que la síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína ocurre principalmente a través de la hidrólisis de triglicéridos, mientras que la síntesis del isómero de *sn*-1,3 ocurre a través de la esterificación de ácidos grasos con los grupos oxhidrilo del glicerol.

Finalmente se llevó a cabo un estudio detallado del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) en el control de la cinética de la reacción y su consecuencia sobre las reacciones de hidrólisis y síntesis que ocurren en el sistema. En este estudio se determinó que 0.2 es el valor de  $a_w$  óptimo, en el que se favorece la acumulación de acilglicéridos disminuyendo considerablemente las reacciones de hidrólisis. Además, se determinó que conforme aumenta el valor de  $a_w$  la síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína se favorece, mientras que la síntesis del isómero *sn*-1,3 disminuye. Este último resultado por un lado, confirma que la síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína ocurre a través de la hidrólisis de triglicéridos y que la producción de moléculas de *sn*-1,3-diglicéridos deriva de reacciones de esterificación. Por otro lado, refuerza la teoría que define el mecanismo por el cual ocurre la glicerólisis.

## 2.0 INTRODUCCIÓN

Hace más de cincuenta años los acilglicéridos, concretamente los mono- y diglicéridos, fueron utilizados por primera vez a nivel industrial como emulsificantes para la elaboración de margarina. Hoy en día son los emulsificantes más utilizados en la elaboración de diversos productos de las industrias de alimentos, de cosméticos y farmacéutica. Si bien industrialmente los mono- y diglicéridos son sobre todo utilizados como moléculas emulsificantes, en los últimos años se ha demostrado su utilidad como intermediarios sintéticos en la industria química. Además se ha reconocido, en su carácter de regioisómeros puros, su potencial como productos terapéuticos.

Así, la importancia de los acilglicéridos no radica únicamente en su papel como moléculas intermediarias en muchas reacciones bioquímicas. Actualmente los acilglicéridos son reconocidos también por su versatilidad en cuanto a aplicaciones industriales se refiere.

Los mono- y diglicéridos, como otros muchos productos, han sido tradicionalmente sintetizados a través de métodos químicos energéticamente muy costosos y no selectivos, lo que dificulta la obtención de mezclas puras de mono- y/o diglicéridos.

Ante estas desventajas, los procesos enzimáticos han surgido como una excelente alternativa. En estos, se busca aprovechar la alta selectividad de las enzimas y su capacidad de actuar como catalizadores a temperaturas y presiones moderadas para el desarrollo de procesos de menor costo energético y selectivos para la síntesis de productos específicos.

En virtud de las ventajas que ofrece el uso de enzimas como catalizadores, frente a los métodos tradicionales de síntesis química, se ha planteado la posibilidad de diseñar procesos enzimáticos para obtener rendimientos altos de acilglicéridos específicos. En este sentido, y dado que las lipasas actúan en la naturaleza como enzimas hidrolíticas, la hidrólisis de triglicéridos fue la primera opción estudiada. Sin embargo, cuando se rompió el dogma bioquímico de que las enzimas sólo actúan en sistemas acuosos al comprobarse que diversas enzimas, entre ellas las lipasas, conservan su actividad catalítica en condiciones de bajo contenido de agua, se abrieron posibilidades nuevas: la síntesis de acilglicéridos por reacciones de hidrólisis inversa, es decir, a través de reacciones entre ácidos grasos con glicerol, o por glicérolisis, es decir, a través de reacciones de transesterificación de triglicéridos con glicerol.

Una de las estrategias que ha probado ser útil en diversos procesos enzimáticos ha sido el uso de solventes orgánicos. Su uso en procesos catalizados por lipasas ofrece la

posibilidad de lograr medios de baja actividad de agua en los que es posible, por un lado, lograr una condición de equilibrio en la cual las reacciones de síntesis se favorecen frente a las de hidrólisis. Por otro, a través del uso de solventes particulares es posible manipular la actividad termodinámica de las especies que intervienen en la reacción, controlando de esta manera el equilibrio termodinámico de una reacción particular hacia la síntesis de acilglicéridos específicos.

El propósito principal de este trabajo fue hacer uso de las propiedades de diversos solventes para dirigir la reacción hacia la síntesis de acilglicéridos específicos en sistemas de baja actividad de agua. Para esto, se eligió estudiar un sistema de glicerólisis enzimática, pues se ha reportado como una reacción que tiene ventajas frente a cualquier otra de síntesis de acilglicéridos. Además, en un intento por hacer la descripción exacta de cómo influye un solvente determinado en el medio de reacción, se propuso el mecanismo de reacción por el que ocurre la glicerólisis catalizada por una enzima *sn*-1,3-específica.

Este trabajo constituye el primer informe detallado del efecto del uso de solventes en el medio de reacción sobre el equilibrio en una reacción de glicerólisis y forma parte del área de Catálisis en Medios no Convencionales del grupo de Ingeniería Enzimática del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### 3.1 ACILGLICÉRIDOS

Los acilgllicéridos son moléculas que tienen funciones esenciales en la naturaleza. Por un lado, son los mayores constituyentes de grasas y aceites naturales (triglicéridos). Por otro lado, funcionan como intermediarios en muchas reacciones bioquímicas y juegan también un papel importante en muchos de los procesos de señalización celular (mono- y diglicéridos) (Pandey *et al.*, 1999, Godfrey & West, 1996).

Hace más de cincuenta años los mono- y diglicéridos fueron utilizados por primera vez a nivel industrial en la elaboración de margarina (Bauman *et al.*, 1988). Hoy en día, estos acilgllicéridos y algunos de sus derivados son ingredientes fundamentales de productos elaborados por las industrias de cosméticos, de alimentos y farmacéutica. De aquí que la demanda de estos productos sea alta: 70% de los surfactantes que se consumen por año son mono- y diglicéridos, y la producción anual que satisface la demanda mundial es de 0.25 a 0.50 millones de toneladas de mono- y diglicéridos (Gunstone F.D., 1999).

La importancia de los acilgllicéridos en diversos sectores de la industria es consecuencia de las propiedades estructurales y funcionales de estas moléculas. Por esta razón resulta relevante la comprensión detallada de dichas propiedades.

#### 3.1.1 Estructura y Nomenclatura

Los acilgllicéridos (fig. 1), definidos bioquímicamente como lípidos, están formados de cadenas de ácidos grasos esterificados en cualquiera de los tres grupos hidroxilo del alcohol 1,2,3-propanodiol o glicerol.

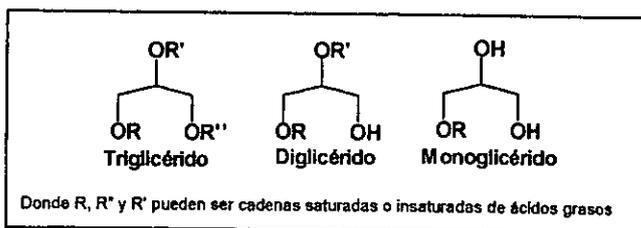


FIGURA 1. Representación esquemática de la estructura general de los acilgllicéridos

Para designar la configuración de los acilglicéridos se usa la misma regla que para cualquier derivado de glicerol. Los carbonos de dicho derivado deben ser numerados estereoespecíficamente usando la proyección de Fisher (fig. 2) con el hidroxilo secundario orientado a la izquierda del carbono 2; el átomo de carbono arriba del carbono 2 es designado carbono 1 y el de abajo carbono 3, el glicerol numerado de esta manera es llamado *sn*-glicerol<sup>1</sup>, de la misma manera que los acilglicéridos son llamados *sn*-acilglicéridos (<http://www.chem.qmu.ac.uk/iupac/lipid/lipid1n2html#p112>).

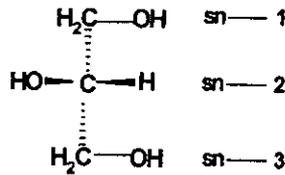


FIGURA 2. Glicerol estereoespecíficamente numerado

Por el número de enlaces éster presentes en la molécula los acilglicéridos son llamados triacil-, diacil- y monoacilglicerol. No obstante, las comisiones internacionales IUPAC-IUB de nomenclatura bioquímica han recomendado que los nombres triacil-, diacil- y monoacilglicerol sean remplazados por triglicérido, diglicérido y monoglicérido (Lehninger, 1970).

Por la posición, orientación y tipo de ácido graso esterificado en la molécula de glicerol existen infinidad de acilglicéridos con varias formas isoméricas y estereoisómeros; los triglicéridos (fig. 3), por ejemplo, pueden ser simples o monoácidos si contienen un solo tipo de ácido graso esterificado o compuestos (diácidos y triácidos) si contienen dos o tres tipos de ácido graso diferentes.

<sup>1</sup> "sn" por las siglas en inglés de stereospecifically numbered.

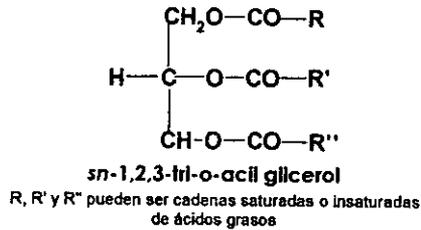


FIGURA 3. Estructura general de una molécula de triglicérido

Los triglicéridos compuestos pueden existir en varias formas isoméricas de las cuales algunas son estereoisómeros. La mayoría de las grasas y aceites naturales son mezclas extremadamente complejas de triglicéridos simples y compuestos (Stryer, 1995).

Los mono- y diglicéridos existen sólo como dos regioisómeros: *sn*-1- ó *sn*-2-monoglicéridos y *sn*-1,2- ó *sn*-1,3-diglicéridos (fig. 4). En algunas aplicaciones industriales, específicamente en la preparación de ciertos productos terapéuticos, se requiere de regioisómeros puros.

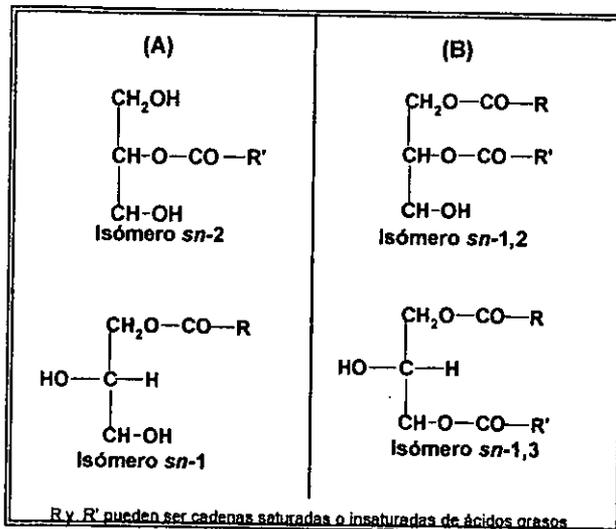


FIGURA 4. Estructura general de los isómeros de (A) monoglicéridos y (B) diglicéridos

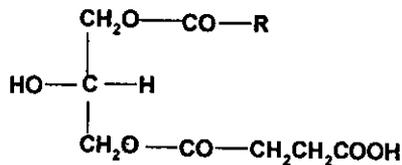
A diferencia de los triglicéridos, que son moléculas hidrofóbicas solubles sólo en solventes orgánicos, los mono- y diglicéridos poseen, además de grupos acilo hidrofóbicos, grupos hidroxilo libres hidrofílicos. Este carácter anfipático les atribuye propiedades funcionales importantes, razón por la cual los acilglicéridos son en la actualidad compuestos indispensables en la industria.

### 3.1.2 Propiedades Funcionales y Aplicaciones en la Industria

Si bien, industrialmente los mono- y diglicéridos son sobre todo utilizados como moléculas emulsificantes, también son útiles como intermediarios sintéticos en la industria química, y en años recientes se ha reconocido, en su carácter de regioisómeros puros, su potencialidad como productos terapéuticos.

#### 3.1.2.1. Los acilglicéridos como intermediarios sintéticos y como productos terapéuticos

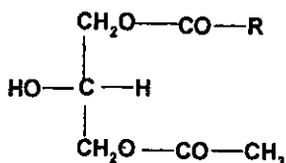
En los últimos años el uso de mono- y diglicéridos se ha extendido a aplicaciones muy diversas en la industria química. Se reporta, por ejemplo, que para la conservación y fortalecimiento de pastas pueden emplearse monoglicéridos succinilados. Para la elaboración de estos derivados, los monoglicéridos se hacen reaccionar con ácido succínico. Dicho ácido reacciona con alguno de los grupos oxhidrilo de la molécula de glicerol, de esta reacción resultan diversos isómeros de monoglicéridos succinilados (fig. 5).



R pueden ser una cadena saturada o insaturada de ácido graso

FIGURA 5. Representación esquemática de uno de los isómeros de monoglicéridos succinilados resultado de la reacción entre ácidos succínico y monoglicéridos

Otro ejemplo, es la síntesis de monoglicéridos acetilados que funcionan como plastificantes, estabilizantes y lubricantes. En el proceso de obtención de estos productos los monoglicéridos son acetilados con acético anhidro; de esta reacción resultan diferentes isómeros de monoglicéridos acetilados (fig. 6) (Anónimo, 1992)



R pueden ser una cadenas saturada o insaturada de ácido graso

FIGURA 6. Representación esquemática de uno de los isómeros de monoglicéridos acetilados resultado de la reacción entre ácido acético anhídrido y monoglicéridos

En muchas aplicaciones se requieren regioisómeros puros *sn*-1,3-diglicéridos o *sn*-1-monoglicéridos. Estos regioisómeros específicos pueden ser empleados para la síntesis de triglicéridos estructurados, fosfolípidos (Van Deenen & De Haas, 1963), glicolípidos y lipoproteínas (Wherli & Pomeranz, 1969). También son usados en la preparación de numerosos agonistas y antagonistas de enzimas (Waldinger & Schneider, 1996) y algunos más son útiles para la síntesis de productos terapéuticos. Por ejemplo, los *sn*-1,3-diglicéridos pueden conjugarse con el clorabucil para obtener un producto útil para el tratamiento del linfoma (Garzon *et al.*, 1983); por otro lado, los *sn*-1,2-diglicéridos pueden conjugarse con s-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa), de esta manera se obtiene un producto utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Garzon *et al.*, 1986).

Existen mono- o diglicéridos con utilidad terapéutica; por ejemplo, se sabe que los ácidos eicosapentanoico (AEP) y docosahexanoico (ADH) sirven en el tratamiento de algunos desórdenes cardiovasculares. Ante la poca aceptación de los ácidos grasos libres en los alimentos, la asimilación del AEP y del ADH como acilglicéridos (Li Zu-Yi & Ward, 1993) específicamente como *sn*-2-monoglicéridos, que es la forma en la que ambos ácidos grasos pueden ser absorbidos (Boyle, 1997), resulta una mejor alternativa.

### 3.1.2.2 Los acilglicéridos como moléculas emulsificantes

El uso de mono- y diglicéridos como emulsificantes en diversos sectores de la industria, ha crecido en los últimos años (Sonntag, 1984). Actualmente se consumen cerca de 0.70 millones de toneladas de surfactantes por año y 70% de este mercado de consumo pertenece a los mono- y diglicéridos (Arcos & Otero, 1996), son así, los agentes surfactantes más utilizados.

Los mono- y diglicéridos al igual que otras moléculas emulsificantes o surfactantes<sup>1</sup>, actúan en la interfase entre dos líquidos inmiscibles disminuyendo la tensión interfacial entre dichas fases.

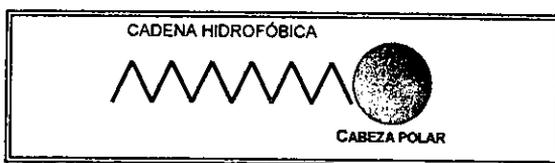


FIGURA 7 Representación esquemática de una molécula surfactante

Por su carácter anfipático (fig. 7) estas moléculas se agregan en un sistema de dos fases naturalmente inmiscibles entre sí, de manera que las cabezas polares se asocian con la fase acuosa y las cadenas hidrofóbicas entran en contacto con la fase orgánica u oleosa. Este sistema termodinámicamente inestable se conoce como emulsión. En este tipo de sistemas una de las fases (discontinua) está dispersa dentro de otra (continua).

Por la forma en la que se distribuyen las fases se definen dos principales tipos de emulsión: aceite en agua, en las que una fase continua hidrofílica está dentro de una fase discontinua hidrofóbica y las emulsiones agua en aceite, constituidas por una fase hidrofóbica continua y una fase hidrofílica discontinua. Los mono- y diglicéridos son surfactantes con un HLB<sup>11</sup> (valor que caracteriza la tendencia hidrofílica-lipofílica de moléculas surfactantes) por debajo de 6 que corresponde a surfactantes con tendencia lipofílica, por esta razón son utilizados en las industrias de alimentos, farmacéutica y de cosméticos para la síntesis de productos en los que es necesario dispersar una fase acuosa en una fase continua oleosa.

<sup>1</sup> Por el corto de surface-active-agents (surfactants).

<sup>11</sup> Por las siglas en inglés de hydrophilic-lipophilic balance.

La forma específica en las que los mono- o diglicéridos se asocian en la interfase depende de las propiedades particulares de los sistemas de los que forman parte (concentración de agua y acilglicéridos, temperatura, agitación y presencia de otras moléculas en el sistema). De acuerdo con esto, los acilglicéridos puedan formar cuatro distintas estructuras físicas conocidas como mesofases<sup>1</sup>: micelas, mesofase cúbica, laminar y estructura gel o cristalina (fig. 8). Estas mesofases difieren en estructura y propiedades físicas. Tal como se verá más adelante, diversas aplicaciones de los acilglicéridos están relacionadas con la formación de mesofases particulares.

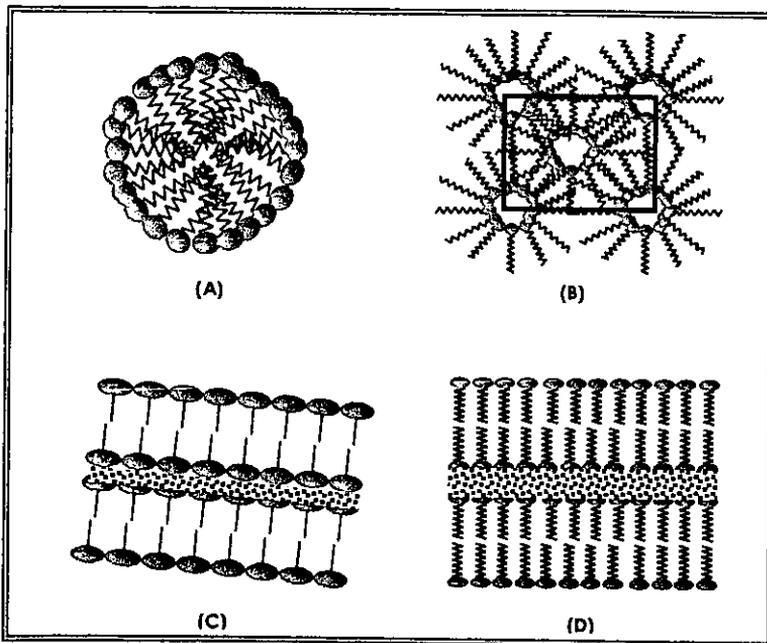


FIGURA 8 Arreglos moleculares de acilglicéridos en distintas mesofases: (A) micelas, (B) mesofase cúbica, (C) mesofase gel, (D) mesofase laminar.

A pesar de que los mono- y diglicéridos son útiles en diversos sectores de la industria en la elaboración de emulsiones, espumas, aerosoles y suspensiones, actualmente estos agentes surfactantes son sobre todo utilizados para la elaboración de productos de la

<sup>1</sup> Las mesofases tienen características de dos estados físicos simultáneamente, por ejemplo: semi-líquido/semi-sólido

industria de los alimentos. Su carácter no iónico, por el que no son sensibles a condiciones ácidas o básicas, y su potencial para formar mesofases particulares es aprovechado en diversos productos alimenticios.

El uso de monoglicéridos destilados<sup>1</sup> resulta más conveniente (Bornscheuer, 1995), pues se sabe que poseen mejores propiedades emulsificantes en la fabricación de productos alimenticios. Sin embargo, los altos costos en su fabricación, asociados a etapas necesarias para su purificación, ocasionan que se utilice sobre todo una mezcla de acilglicéridos cuya síntesis es menos costosa. Esta mezcla es reconocida con estatus GRAS<sup>II</sup> y es aceptada como aditivo (EEC código 71) por la Organización Mundial de la Salud (WHO). Para esto, es necesario que cumpla con los siguientes requisitos siguientes (Anónimo, 1992).

- (a) El contenido de mono- y diglicéridos debe ser de al menos el 70%(w/w).
- (b) El contenido de monoglicéridos no debe ser menor al 30%.
- (c) No más del 3, 7 y 10% de ácidos grasos libres, glicerol y triglicérido respectivamente, deben estar presentes en la mezcla.

Esta mezcla de acilglicéridos es incorporada a productos alimenticios a través de la fase oleosa y aunque son usados básicamente para crear sistemas en emulsión, también tienen otras aplicaciones (Anónimo, 1992) tales como:

- Modificación del almidón de cereales por medio de la formación de complejos con la amilosa. La formación de complejos previene la degradación del almidón y evita así la "rancidez" de los cereales. Los acilglicéridos en una mesofase cristalina-gel tienen la estructura física apropiada para acomplejarse con el almidón (fig. 8. C).
- Modificación de características físicas de las grasas controlando el polimorfismo de los cristales de grasa.
- Aereación de panes y pasteles. Para las funciones de aereación los acilglicéridos deben estar en fase-cristalina.
- Reducción o rompimiento de espumas en pudines y otros productos semejantes a través de la formación de diversas mesofases.
- Incorporación de productos solubles en agua, como saborizantes o edulcorantes, a fases oleosas de diversos productos mediante la formación de una mesofase cúbica (fig. 8. A).

<sup>1</sup> Una mezcla con al menos 90% de monoglicéridos.

<sup>II</sup> Por las siglas en inglés de Generally Recognized as Safe. Estatus dado a ingredientes y a aditivos alimenticios reconocidos como seguros después de haber estado en uso

- Texturizantes de diversos productos a través de la formación de mesofases cúbicas.
- La formación de diversas mesofases es aprovechada en algunas otras aplicaciones como: lubricación de alimentos y adulteración del rango de fusión en diversas fórmulas alimenticias.

Otra de las aplicaciones reportada de los acilglicéridos como moléculas emulsificantes son como aditivo para la elaboración de cosméticos, pasta de dientes y productos para el cabello (Baumann *et al.*, 1988).

## 3.2 SÍNTESIS DE ACILGLICÉRIDOS

### 3.2.1 Métodos Industriales de Síntesis. Síntesis Química

Los mono- y diglicéridos disponibles en el mercado son sintetizados industrialmente a través de un proceso en lote de glicerólisis alcalina. En este proceso el glicerol y los triglicéridos se hacen reaccionar a altas temperaturas (240-260°C) y presiones elevadas (Arcos & Otero, 1996). Estas condiciones de reacción necesarias para lograr la miscibilidad del glicerol en los triglicéridos utilizados.

La síntesis química de mono- y diglicéridos por glicerólisis alcalina no es un método selectivo para la síntesis de acilglicéridos ni para regioisómeros específicos. Por el contrario, el producto final de la reacción es generalmente una mezcla compleja de mono- (45-55%), di- (30-45%) y triglicéridos (8-12%). Además, durante esta reacción se generan productos de oxidación que dan a la mezcla un color y sabor desagradable y que deben ser removidos por un proceso adicional de purificación. Es posible obtener mezclas con un alto porcentaje de acilglicéridos específicos siempre y cuando el sistema sea sometido a destilación al alto vacío (proceso también conocido como destilación molecular en el que mono- y diglicéridos son separados mientras los demás componentes de la mezcla son reciclados a la reacción) (Gunstone, 1999).

### 3.2.2 Síntesis Enzimática

Frente a las desventajas del método químico de síntesis de acilglicéridos ha surgido el interés por desarrollar procesos que además de resultar más selectivos para la síntesis de mono- o diglicéridos y de regioisómeros específicos, sean procesos con un bajo costo energético. En este sentido, se ha identificado a la síntesis enzimática como un método

alternativo de síntesis de acilglicéridos. Este método consiste en aprovechar la capacidad catalítica de enzimas como las lipasas a bajas presiones y temperaturas moderadas (40-60°C) (Bornscheuer, 1995). Gracias a esto, el proceso enzimático de síntesis de acilglicéridos resulta ventajoso, ya que, por un lado, resulta energéticamente más económico y por otro, dadas las condiciones de reacción moderadas a las que se lleva a cabo la reacción, no se forman productos secundarios indeseables. Esto ocasiona la disminución de los pasos de purificación post-reacción. Una ventaja adicional de estos procesos es la posibilidad de dirigir la reacción hacia productos determinados aprovechando la alta selectividad reportada para las lipasas (Linko, 1995).

Todas estas ventajas representan un aliciente en el desarrollo de procesos enzimáticos rentables y competitivos de síntesis de acilglicéridos.

### 3.3 ENZIMAS QUE CATALIZAN LA SÍNTESIS DE ACILGLICÉRIDOS. LAS LIPASAS

Para entender a detalle los mecanismos de síntesis enzimática de acilglicéridos es importante tener en claro cuáles son las propiedades estructurales y catalíticas de las enzimas que catalizan dichas reacciones: las lipasas.

En la naturaleza, las lipasas, son enzimas que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de grasas y aceites en células animales, vegetales y también en numerosos microorganismos. Su principal función es la hidrólisis de triglicéridos.

Industrialmente han sido identificadas como uno de los biocatalizadores más versátiles en síntesis orgánica; su alta especificidad, su estabilidad en solventes orgánicos, su capacidad catalítica a temperaturas y presiones moderadas y su habilidad para aceptar una amplia gama de sustratos han hecho de las lipasas un grupo de enzimas con gran potencial en áreas como tecnología de alimentos, medicina, y la industria química. En procesos biotecnológicos relacionados con dichas áreas las lipasas de origen microbiano han recibido mucha atención, y a pesar de que un gran número de especies microbianas han sido usadas para la producción de estas enzimas, *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Rhizopus sp.* son hoy en día las fuentes más importantes de lipasas (Pandey *et al.*, 1999).

En 1968 Sarda y Desnulle propusieron por primera vez el mecanismo por el cual las lipasas son capaces de hidrolizar triglicéridos en ambientes altamente hidrofóbicos. En este mecanismo se establece que las lipasas son activadas al entrar en contacto con una interfase agua-lípido. En este proceso se suponen dos estados conformacionales de la

enzima, uno en el que el sitio activo está accesible al sustrato (forma abierta) y otro en el que el sitio está inaccesible (forma cerrada) (Dennis, 1997). Ambos estados, considerados termodinámicamente estables, dependen fuertemente del ambiente que rodea a la enzima. En sistemas acuosos las lipasas adoptan la forma cerrada (fig. 9), en la cual, la estructura terciaria de la enzima está estabilizada por las interacciones hidrofílicas entre los residuos polares de la superficie de la proteína y el medio acuoso.



FIGURA 9. Representación estructural de la forma cerrada de una lipasa. Un loop (verde) funciona como "tapa" del sitio activo (azul).

Al entrar en contacto con una interfase agua-aceite la enzima sufre un arreglo conformacional en el cual el loop que funciona como tapa del sitio activo se desplaza para favorecer la entrada del sustrato (forma abierta, fig. 10).

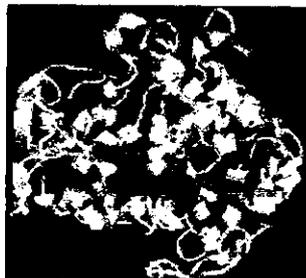


FIGURA 10. Representación estructural de la forma abierta de una lipasa. El loop que funciona como tapa del sitio activo (naranja) se desplaza de manera que el sustrato (amarillo) entra en contacto con sitio activo (azul).

Este fenómeno conocido como activación interfacial fue hasta hace poco tiempo usado para distinguir a las lipasas de las estererasas. Trabajos más recientes han demostrado que existen lipasas que no son activadas por una interfase (Lesuisse *et al.*, 1993; Hjorth *et al.*, 1993), lo que pone en evidencia que la clasificación basada en el fenómeno de activación interfacial no era adecuada. Hoy en día, una definición más correcta establece a las lipasas como carboxilesterasas que son capaces de catalizar la hidrólisis de triglicéridos, a diferencia de las estererasas que hidrolizan preferencialmente ésteres lineales soluble en un medio acuoso. Por esto, el sistema internacional de clasificación ha definido a las lipasas como glicerol-ester-hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992).

### 3.3.1 Estructura y Mecanismo

La estructura tridimensional de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990) y de la lipasa pancreática humana (Winkler *et al.*, 1990) fueron definidas en 1990. Desde entonces más de once estructuras de lipasas han sido determinadas. Las lipasas, de estructura tridimensional conocida, tienen un peso molecular que va desde 19 (cutinasa) a 60KDa (*G. candidum*) (Schrag *et al.*, 1991) con un número de aminoácidos que varía desde 270 a 641 (Malcata *et al.*, 1992).

El sitio activo, al igual que en el caso de las serin-proteasas, está formado por la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu, y en la mayoría de los casos, a diferencia de la mayoría de las enzimas, éste no está expuesto en la superficie sino que está cubierto por residuos hidrofóbicos de manera que no está accesible al solvente.

Todas las lipasas, cuya estructura se ha determinado, tienen un patrón de plegamiento  $\alpha/\beta$  compuesto por un "core" de hebras  $\beta$  rodeadas por hélices  $\alpha$ . Este patrón de plegamiento ha sido observado también en muchas estererasas y muchas otras enzimas (Dennis, 1997).

En la figura 11 se muestra el plegamiento común de las lipasas. La hélice A existe en todas las lipasas excepto para aquellas de la familia de *R. miehei*. De manera general, se ha comprobado que la posición de los residuos catalíticos es la siguiente: la serina está después de la hebra  $\beta 5$ , la histidina después de la hebra  $\beta 8$  y el ácido asp/glu después de la

hebra  $\beta 7$ . La lipasa pancreática es la excepción a este arreglo con el ácido asp/glu después de la hebra  $\beta 6$ .

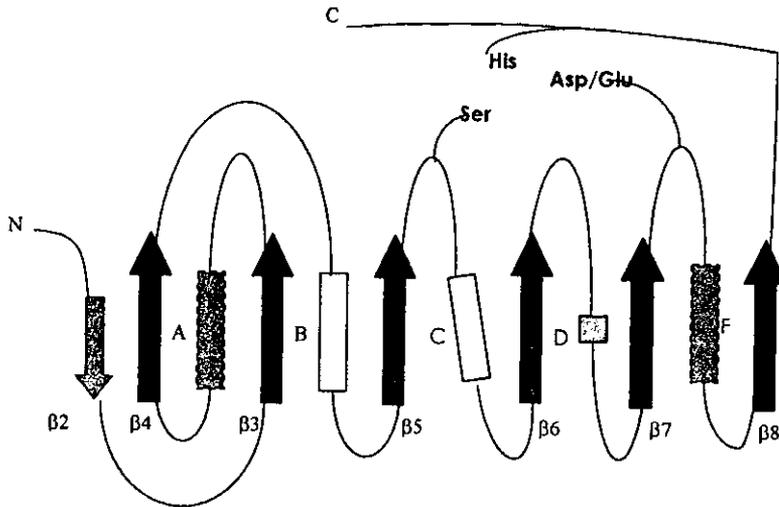


FIGURA 11. Plegamiento común de las lipasas. Las  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -hebras en negro o blanco (hebras  $\beta 3$ – $\beta 7$  y las hélices B y C) están en todas las lipasas, aquellas en gris (hebra  $\beta 2$  y hélices A, D y F) están en la mayoría. Las hélices A y F (con líneas punteadas) están en el lado concavo de las hebras B; las otras hélices están en el lado convexo. La hélice D está a menudo compuesta de una sola vuelta. Tomado de Dennis, 1997.

En algunas lipasas la tapa que cubre al sitio activo esta localizada desde el N terminal, mientras que en otras está localizada desde el C terminal. Además, mientras en algunas lipasas solo un rizo o "loop" sufre el rearreglo conformacional, en otras uno o incluso dos "loops" se mueven junto al que funciona como tapa para crear la conformación activa. La cutinasa es un ejemplo de lipasa sin tapa y en su estructura todos los loops son relativamente cortos (Dennis, 1997).

En el mecanismo de catálisis propuesto para las lipasas el residuo de serina del sitio activo actúa como nucleófilo y los otros dos aminoácidos están involucrados en los equilibrios de las cargas necesarios para la catálisis (Schmid & Verger, 1998).

En la figura 12 se define, de forma esquemática, el mecanismo de catálisis propuesto para las lipasas. Éste inicia con el ataque nucleofílico de la serina sobre el carbono del grupo carboxilo del enlace éster (a en fig. 12). Esto genera la formación de un primer intermediario

tetraédrico estabilizado por los puentes de hidrógeno que se crean entre el oxígeno cargado negativamente (oxianión) del intermediario tetraédrico y los grupos N-H de la proteína (b en fig. 12), este arreglo se conoce como agujero oxianión.

Posteriormente el hidrógeno del grupo hidroxilo de la serina se transfiere un instante al residuo de histidina, el intermediario sufre un rearreglo y el hidrógeno es transferido de la histidina al sustrato para de esta manera, generar la formación de un alcohol que es liberado al romperse el enlace ester-carboxilo.

El grupo acilo permanece covalentemente unido a la enzima por un enlace éster, estructura estable conocida como complejo acil-enzima (c en fig. 12). Este complejo es atacado nucleofílicamente por una molécula de alcohol, por una de agua o por una amina (d en fig. 12), todas las reacciones catalizadas por lipasas proceden vía la formación de este complejo acil-enzima, lo que se modifica es la molécula que actúa como nucleófilo. Apartir de este ataque nucleofílico se forma un segundo intermediario tetraédrico (e en fig. 12). Finalmente el segundo intermediario tetraédrico sufre un rearreglo estructural que, por un lado, provoca la liberación del éster en el caso en el que el ataque lo realice un alcohol o del ácido graso respectivo en el caso en el que el ataque nucleofílico lo realice el agua y, por otro lado, la liberación de la lipasa en su estado inicial (f en fig. 12).

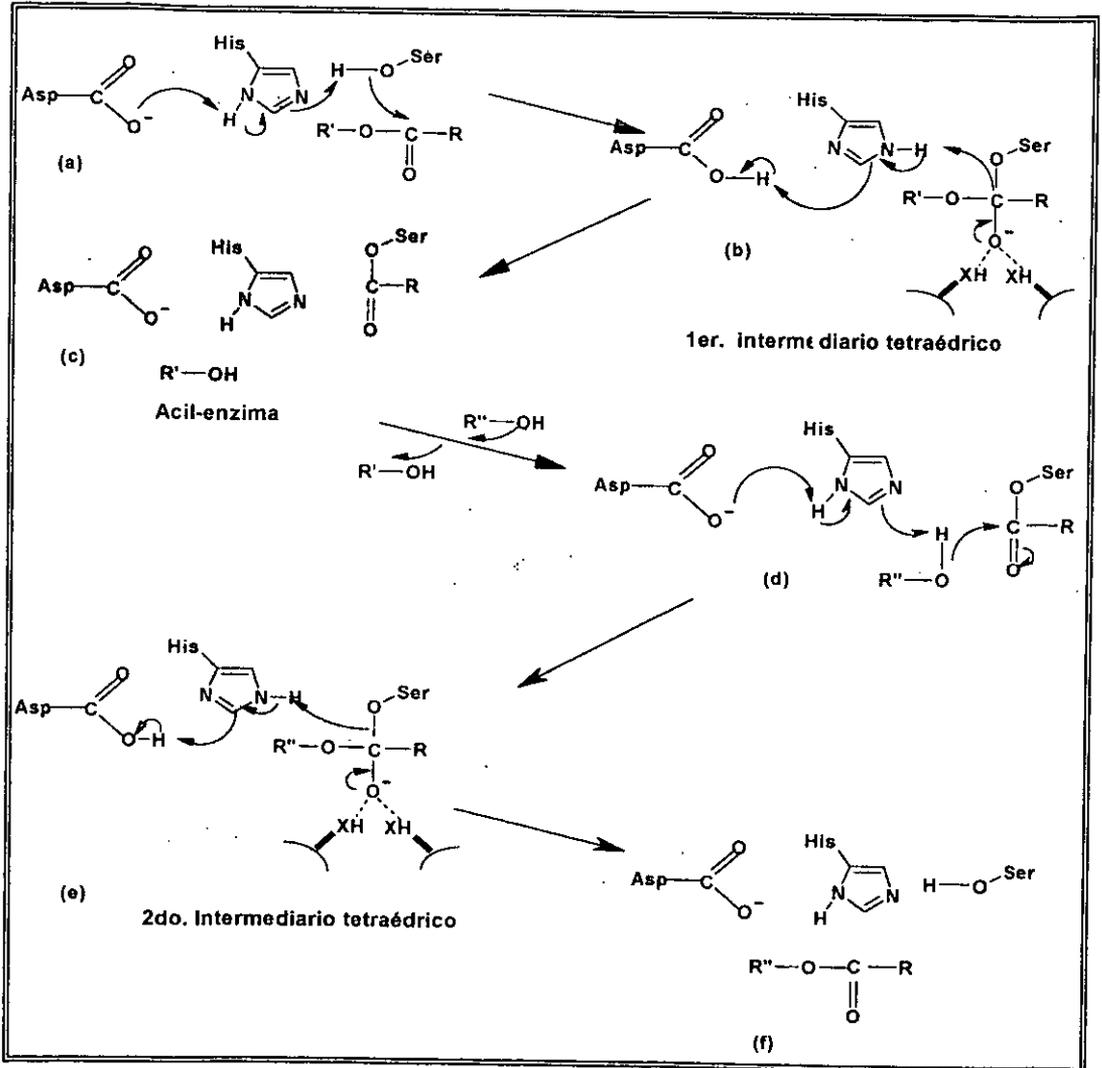


FIGURA 12. Mecanismo de catálisis propuesto para las lipasas

### 3.3.2 Las lipasas y su Especificidad

Una de las características importantes de las lipasas es su amplia especificidad, que ha sido aprovechada en las reacciones de síntesis para la obtención de productos específicos. Las lipasas poseen selectividad por sus sustratos en varios niveles:

#### (a) Por el número de sustituyentes en el glicerol o tipo de lípido

La selectividad de las lipasas por el tipo de sustrato ha sido observada, por ejemplo, en lipasas del plasma animal que contiene lipasas diferentes para la hidrólisis de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos (Jenssen *et al.*, 1990).

Otro ejemplo, es el caso de la lipasa de *Penicillium cyclopium* que tiene preferencia por los monoglicéridos más que por los di y triglicéridos (Okumura, 1980). Muchas otras lipasas como las lipasas pancreática y de *Mucor miehei* hidrolizan más rápidamente triglicéridos que los mono- y diglicéridos (Malcata, 1992).

Se ha observado que este tipo de selectividad depende fuertemente de las condiciones de reacción. Tal es el caso, por ejemplo, de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, cuya selectividad por el tipo de sustrato es dependiente de la temperatura de reacción (McNeill *et al.*, 1991).

#### (b) Por el ácido graso

Algunas lipasas distinguen entre los ácidos grasos de diferente longitud de cadena, con diferentes eficiencias catalíticas para cadenas acilo cortas, medianas y largas. Algunas otras lipasas distinguen los ácidos grasos por el grado de insaturación. La reactividad está también influenciada por las características estructurales de los grupos alquilo de las cadenas de ácidos grasos tales como la configuración de dobles enlaces y posición con respecto a la función acilo (Malcata *et al.*, 1992). Se ha reportado, por ejemplo, que las lipasas de *Candida cylindracea* y *Geotrichum candidum*, catalizan preferencialmente la hidrólisis de acilglicéridos con cadenas de ácidos grasos de 18 carbonos. Por el contrario, las lipasas de *Rhizopus arrhizus* y de *Rhizomucor miehei* prefieren, como sustratos de reacción de hidrólisis, a los triglicéridos cuyas moléculas poseen ácidos grasos esterificados de cadenas de 20, 33 y 24 carbonos (Mukherjee & Kiewitt, 1996).

#### (c) Estereoselectividad

La estereoselectividad de muchas lipasas ha sido ampliamente estudiada. Un gran número de investigadores han observado la estereoselectividad de las lipasas hacia

substratos como alcoholes secundarios de cadena corta (Kirchner *et al.*, 1985), ciclohexanos (Marlot *et al.*, 1985) y hacia algunos isómeros específicos de ésteres (Gray *et al.*, 1990). Los resultados estructurales de estos estudios sugieren que la discriminación entre estereoisómeros se debe a la forma del sitio de unión con el sustrato. La unión con el enantiómero no indicado en este sitio destruye la posición de la histidina catalítica, haciendo así menos efectiva la catálisis (Carrea & Riva, 2000).

La estereoselectividad hacia los acilglicéridos está definida como el ataque preferencial sobre las posiciones *sn*-1 o *sn*-3. Al estudiar la estereoespecificidad de 26 lipasas, Verger y colaboradores (Ransac *et al.*, 1990; Rogalska *et al.*, 1993) determinaron que en reacciones de hidrólisis de triglicéridos todas las lipasas, menos una, poseían un grado de estereoselectividad más común hacia la posición *sn*-1 y la selectividad *sn* podía cambiar dependiendo del largo de la cadena de triglicérido usado.

Se ha probado que en solventes orgánicos la estereoselectividad de las lipasas es diferente de aquella observada en agua. De los datos obtenidos hasta la fecha, distintas hipótesis se han formulado con el fin de explicar este fenómeno. Por ejemplo, se ha propuesto que el solvente, de acuerdo a su polaridad, puede modificar la conformación de la enzima, y así modificar la selectividad alterando los procesos de reconocimiento entre sustrato y enzima. Una segunda teoría propone que las moléculas de solvente pueden interaccionar con regiones cercanas al sitio activo y de esta manera interfiere con la asociación o transformación de un enantiómero más que de otro (Carrea & Riva, 2000).

Sin embargo, si se trata de predecir un cambio de estereoespecificidad como función del solvente, ambas hipótesis, basadas en las propiedades fisicoquímicas de los solventes y en su estructura molecular, pueden resultar poco certeras (Carrea & Riva 2000). El argumento que sustenta esta afirmación es que los dos modelos propuestos parecen ser sólo válidos para una enzima y sustrato específicos y para un tiempo específico en el que ocurre la formación del complejo solvente-enzima. De tal manera que una generalización no es posible debido al gran número de posibles complejos solvente-enzima que pueden formarse y porque cada complejo puede comportarse de manera diferente dependiendo de la naturaleza del sustrato.

Hoy en día el interés en la estereoespecificidad de las lipasas no está sólo en tratar de comprender a qué se debe y bajo qué condiciones se ve afectada. También existe el profundo interés en desarrollar procesos en los que la estereoespecificidad de las lipasas

sea aprovechada para la síntesis de enantiómeros puros requeridos sobre todo por la industria farmacéutica.

#### (d) Quimioselectividad

Las lipasas, como algunas otras enzimas del grupo de las hidrolasas hidrolasas, son capaces de reaccionar diferencialmente con grupos amino, hidroxilo o sulfhidrilo de una molécula. Este tipo de selectividad ya ha sido explotado en la monoacilación selectiva de aminoalcoholes y sulfanilalcoholes. En 1989, Klivanov y colaboradores describieron la quimioselectividad de *Aspergillus niger* hacia la acilación de 6-amino-1-hexanol, los autores observaron que la síntesis de amino alcoholes O-acilados puede ocurrir sin la necesidad de proteger grupos. Observaron también, que la relación entre la acilación O- y N- era totalmente dependiente de la polaridad del solvente (Carrea & Riva, 2000).

#### (e) Regioespecificidad.

Muchas lipasas actúan preferencialmente en alguno de los tres enlaces éster de una molécula de acilglicérido (*sn*-1(3) ó *sn*-2,), este fenómeno es conocido como regioespecificidad. Para entender muchos de los resultados obtenidos en este proyecto, resulta pertinente hacer un análisis profundo de esta clase de selectividad y de un fenómeno relacionado con el tema e interpretado en ocasiones como un "cambio aparente de regioespecificidad", que es también definido como **acilmigración**.

Las lipasas han sido clasificadas como *sn*-1,3-específicas, *sn*-2 específicas por la posición que atacan en las moléculas de triglicérido o como no específicas si no poseen la capacidad de atacar preferencialmente alguno de los enlaces éster de la molécula de acilglicérido. En 1991, Berger y Schneider estudiaron la isomerización de la 1,3-dilaurina en 1,2-dilaurina en presencia de diferentes enzimas comerciales, en medios orgánicos. Considerando que en medios orgánicos poco hidratados, los mono- y los diglicéridos son estables, es decir, no existe una transferencia de grupos acilo, estimaron que la relación 1,3-dilaurina/1,2dilaurina al equilibrio es representativa de la regioselectividad de la enzima probada.

Berger y Schneider definieron un valor  $RE^1$ , análogo al %ee o al %de (valores usados para definir el exceso enantiomérico o diaestereoisomérico), para definir la especificidad de las lipasas.  $RE$  está definido de la siguiente forma:

<sup>1</sup> por las siglas en ingles de regioisomeric excess

$$RE = \%r.e = \%(1,3 - \text{diglicérido}) - \%(1,2 - \text{diglicérido}).$$

En la tabla 1 se muestran los valores de RE determinados para tres enzimas diferentes. De acuerdo a dichos valores se define la especificidad de cada una de las lipasas probadas.

TABLA 1. Valores RE determinados para diferentes lipasas. Fuente: (Berger & Schneider, 1991)

FUENTE DE LA LIPASA	RE (%RE)	REGIOESPECIFICIDAD
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	79.0	1,3-selectiva
<i>Mucor miehei</i>	83.7	1,3-selectiva
<i>Rhizopus delemar</i>	98.1	1,3-especifica

De esta manera, en condiciones de hidrólisis las enzimas descritas en la tabla 1 atacan sobre todo los ácidos grasos de las posiciones extremas del triglicérido para la síntesis de *sn*-1,2-diglicéridos, *sn*-2-monoglicéridos y ácidos grasos libres; y en una reacción de esterificación favorecen la síntesis de los monoglicéridos *sn*-1, además de la formación de *sn*-1,3-diglicéridos.

### 3.3.2.1 Cambio Aparente de Regioespecificidad. Acilmigración.

Se ha observado que en algunos sistemas que involucran reacciones catalizadas por lipasas ocurre un cambio aparente de regioespecificidad. y colaboradores (1998), estudiando una reacción de transesterificación de propilenglicol con triglicéridos catalizada por lipasas en solventes orgánicos; observaron en el perfil de productos obtenidos un "aparente cambio de regioespecificidad". Los autores atribuyeron este comportamiento a un cambio estructural provocado por la presencia del solvente. Sin embargo, se ha probado que las lipasas son estables en estos medios por lo que un cambio de regioespecificidad asociado a un cambio estructural de la enzima no resulta factible.

Otros autores han atribuido el fenómeno de "aparente cambio de regioespecificidad" a otro fenómeno conocido como acilmigración. La acilmigración es generalmente descrito como un fenómeno espontáneo en medio acuoso, en el cual los isómeros *sn*-1,2-diglicéridos y *sn*-2-monoglicéridos sufren una isomerización para la síntesis de *sn*-1,3-diglicéridos y *sn*-1(3)-monoglicéridos respectivamente. La reacción de isomerización puede darse en el

sentido contrario, es decir los *sn*-1,3-diglicéridos y *sn*-1(3)-monoglicéridos por isomerización se transforman en *sn*-1,2-diglicéridos y *sn*-2-monoglicéridos respectivamente.

Diversos investigadores se han dado a la tarea de tratar de definir el mecanismo a través del cual ocurre este fenómeno. En 1991 Heisler y colaboradores definieron, en el estudio más detallado que existe al respecto, el mecanismo de isomerización de *sn*-1,2-dipalmitina en el isómero *sn*-1,3 con lipasas *sn*-1,3-regioespecíficas. En este trabajo Heisler establece que el agua juega un papel fundamental en las reacciones de isomerización. El mecanismo propuesto se muestra en la figura 13.

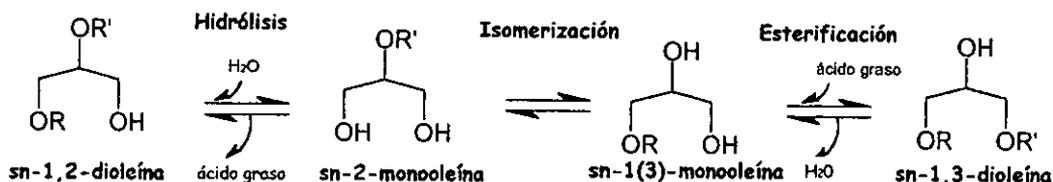


FIGURA 13. Mecanismo propuesto por Heisler para la transformación del isómero *sn*-1,2-dioleína en su isómero *sn*-1,3

Heisler y colaboradores proponen, de acuerdo a las cinéticas obtenidas, que la isomerización del *sn*-1,2-diglicérido para la síntesis del *sn*-1,3-diglicérido se explica por un primer paso de hidrólisis para la síntesis del *sn*-2-monoglicérido y un segundo paso de isomerización del *sn*-2-monoglicérido en *sn*-1-monoglicérido.

Además de la reacción de isomerización del *sn*-1,2 al *sn*-1,3-diglicéridos, Heisler y colaboradores estudiaron la reacción de síntesis de *sn*-1,2 dipalmitina a partir del *sn*-1-(3) monopalmitina. El mecanismo propuesto para esta reacción de síntesis es el descrito en la figura 14.

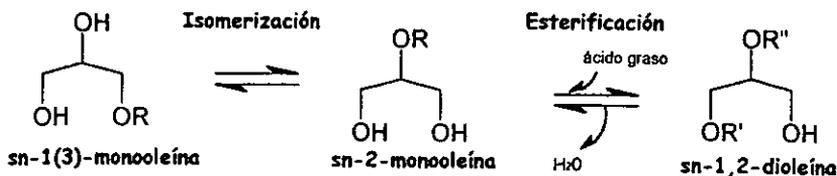


FIGURA 14. Mecanismo propuesto por Heisler para la síntesis de *sn*-1,2-dioleína a partir de *sn*-1(3)-monooleína

En el mecanismo propuesto el *sn*-1(3)-monoglicérido isomeriza a *sn*- 2-monoglicérido, para finalmente, a través de la esterificación de un ácido graso en la posición 1 de la molécula de glicerol, sintetizar el *sn*-1,2-diglicérido

De esta manera resulta evidente, que tanto la isomerización del isómero 1-monoglicérido a 2-monoglicérido, como la isomerización en sentido contrario son posibles y según lo suponen Heisler y colaboradores es una reacción espontánea.

A partir de este trabajo queda claro que el aparente cambio de regioespecificidad de las lipasas puede ser explicado en términos de la acilmigración que, en reacciones catalizadas por enzimas *sn*-1,3-específicas, ocurre a través de un primer paso de hidrólisis de diglicéridos en las posiciones *sn*-1(3), seguido por una interconversión espontánea de los isómeros de monoglicéridos y finalmente por reacciones de esterificación en las posiciones *sn*-1(3).

### 3.3.3 Reacciones que Catalizan las Lipasas

A pesar de que las lipasas han sido diseñadas por la naturaleza para el rompimiento de ácidos grasos de las cadenas de acilglicéridos (hidrólisis) (fig. 15. A), debido a su capacidad por aceptar una amplia gama de sustratos y la flexibilidad de sus cadenas proteicas, estas enzimas son también capaces de catalizar, en sistemas de baja actividad de agua, la síntesis de enlaces éster en diferentes moléculas (reacción de hidrólisis inversa) (fig. 15. B). Así, es posible que en sistemas adecuados las lipasas catalisen la esterificación de un ácido graso con un alcohol o reacciones de transesterificación en las que los intercambios de grupos acilo pueden ocurrir entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (interesterificación), un éster y un alcohol (alcohólisis) y un éster y una amina (aminólisis).

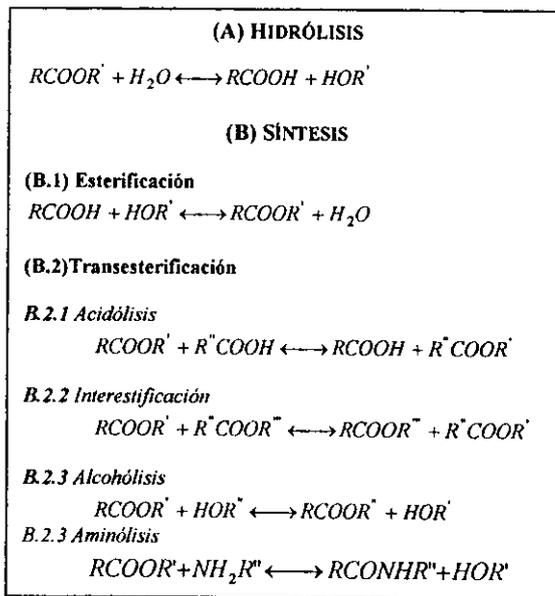


FIGURA 15. Reacciones más comunes catalizadas por lipasas

### 3.3.3.1 Hidrólisis

La hidrólisis enzimática catalizada por lipasas ha sido estudiada desde hace tiempo. El interés en esta reacción se debe, por un lado, al papel esencial que tienen las lipasas en la naturaleza como enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster, y por otro, a la importancia que tiene la hidrólisis de grasas y aceites en el sector industrial. En la tabla 2 se presentan algunas de las aplicaciones industriales que tienen las lipasas en su papel como enzimas hidrolíticas.

TABLA 2 Ejemplos de productos obtenidos por reacciones de hidrólisis enzimática catalizadas por lipasas

APLICACIÓN Y REFERENCIA	ENZIMA	OBSERVACIONES
Síntesis de ácidos grasos, utilizados en la producción de jabones y mejoramiento de sabores de chocolates y caramelos Hoq, 1985	<i>Candida rugosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proceso de menores costos y mejores rendimientos que el método industrial.
Remoción de grasas residuales en la manufactura de pieles Psorke, 1984	<i>Rhizopus nodosus</i>	Proceso más eficiente que el método químico de extracción con solventes
Remoción de las capas de grasa que se forman en los tanques para tratamientos aeróbicos de tratamiento de desechos Bailey & Ollis, 1986	<i>Candida rugosa</i>	Proceso que se lleva a cabo a nivel industrial
En formulación de detergentes para degradación de lípidos Andree, 1980	<i>Candida</i> <i>Chromoobacterium viscosium</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	Aplicación a nivel industrial
Maduración de quesos Arnold, 1975	Con lipasas de extractos pancreáticos	Aplicación a nivel industrial
Síntesis de sabores mantequilla/margarina Arnold, 1975	<i>C. rugosa</i>	Aplicación utilizada a nivel industrial

El problema fundamental, en los estudios sobre hidrólisis enzimática catalizada por lipasas, es determinar las condiciones de reacción que favorecen altas actividades catalíticas y altas conversiones del sustrato para la síntesis de ácidos grasos libres. En este sentido, se ha probado que el porcentaje de conversión del sustrato y la actividad de la enzima son

función de variables como: temperatura (Virto *et al.*, 1991), actividad de agua, concentración de sustrato (Hoshino *et al.*, 1990) y tipo de enzima (Park *et al.*, 1988). La modificación de cualquiera de estas variables resulta trascendental en términos de actividades enzimáticas y rendimientos obtenidos.

Se ha probado también que, tanto los rendimientos como las velocidades de reacción dependen fuertemente del área interfacial agua/aceite que se forma en el sistema triglicéridos/agua. Aumentando el área interfacial es posible tener más moléculas de lipasa en la superficie y consecuentemente incrementar la velocidad de reacción puesto que más enzima está disponible para la catálisis (Yahya *et al.*, 1998).

Diversos autores han señalado que resulta problemático llevar a cabo reacciones de hidrólisis en medios acuosos ya que en estos los sustratos son insolubles y las velocidades de hidrólisis están limitadas por el área interfacial. Ante esto, se han propuesto diversas estrategias (Yang & Russell 1995) descritas a continuación.

#### *Sistemas bifásicos (fig. 16. a).*

En los sistemas bifásicos la enzima se encuentra en la fase acuosa y los sustratos hidrofóbicos en la fase orgánica. A pesar de que en estos sistemas los sustratos están en solución en la fase orgánica, la reacción, dado que se lleva a cabo en la interfase, está limitada por su magnitud.

#### *Sistemas de micelas inversas o microemulsión (fig. 16. b).*

Estos sistemas constituyen la forma de aumentar la superficie de la interfase de sistemas bifásicos. En estos sistemas, las moléculas de enzima son solubilizadas en micelas inversas, formadas por surfactantes iónicos. De esta manera se forma una microemulsión en la que las micelas están dispersas dentro de una fase continua formada por el solvente orgánico no polar y los sustratos hidrofóbicos.

En condiciones apropiadas la solución de micelas inversas es homogénea, termodinámicamente estable y transparente (Yang & Russell, 1995).

Esta clase de sistemas exponen una interfase agua/solvente de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>/ml de microemulsión (Yahya *et al.*, 1998). Su principal inconveniente es la necesidad de romper la micela y remover el surfactante en la etapa de purificación del producto.

*Sistemas de solventes orgánicos hidrófilicos (fig. 16. c),*

El uso de solventes orgánicos hidrófilicos es una manera alternativa de proveer áreas interfaciales grandes. En estos sistemas, preparaciones sólidas de enzimas (liofilizadas o adsorbidas en un soporte) son suspendidas en el solvente en el que están solubilizados los substratos hidrofóbicos. El requisito fundamental en sistemas de reacción con solventes orgánicos es optimizar la cantidad de agua del sistema para que, por un lado, la enzima se mantenga estable y por otro lado, para que se cuente con la cantidad de agua necesaria como sustrato para la hidrólisis (Yang & Russell, 1995). Visualmente se notan dos fases una líquida constituida por el solvente y substratos y una sólida formada por las partículas de enzima.

El uso de solventes orgánicos es un punto medular dentro de este proyecto, no sólo por su capacidad de proveer un medio en el que los substratos hidrófilicos son solubles sino por muchas otras ventajas que se les ha atribuido. Por esto, los detalles y discusión respecto a su uso merecen una sección aparte.

*Reactores de membrana. (fig. 16. d),*

En estos sistemas las moléculas de lipasa son inmovilizadas en una membrana que separa a la fase orgánica de la fase acuosa. En los reactores de membrana, al igual que en el sistema de dos fases, la reacción está limitada por la superficie de la membrana que separa las fases. La ventaja es que la lipasa, inmovilizada en la membrana, puede ser usada por tiempos prolongados. (Guit *et al.*, 1991).

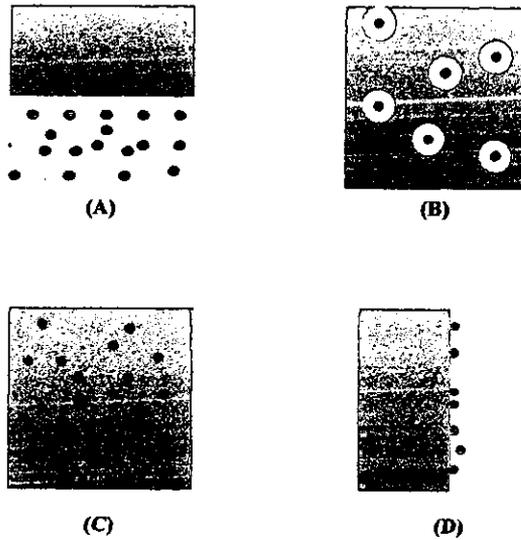


Fig 16 Representación esquemática de distintos sistemas de reacción en reacciones catalizadas por lipasas  
 □ Fase orgánica, □ fase acuosa, ● Biocatalizador, □ membrana en sistema de reactor con membrana

Existen diversos reportes en los que se busca determinar cuál o cuáles de los sistemas propuestos resulta el mejor en términos de lograr un área interfacial con la que la actividad enzimática y rendimientos se maximicen. Yang y Russell (1995) compararon los resultados obtenidos al llevar a cabo una reacción de hidrólisis en un sistema con micelas inversas y en presencia de solventes orgánicos. Las conclusiones a las que llegaron fueron las siguientes:

- Las más altas velocidades enzimáticas observadas fueron en el sistema micelar, mientras que el rendimiento en estos mismos sistemas esta limitado por las bajas concentraciones de enzima que existen.
- En sistemas con solventes orgánicos hay una buena velocidad enzimática y conversión de substratos a ácidos grasos libres.
- El uso de solventes orgánicos provee el ambiente más adecuado para llevar a cabo la hidrólisis en las condiciones de reacción utilizadas.

Aparentemente los sistemas de reacción de hidrólisis catalizada por lipasas en presencia de solventes orgánicos resultan ventajosos en términos de actividades enzimáticas y rendimientos. Sumado a esto, los sistemas con solventes orgánicos resultan

atractivos, puesto que no hay contaminación con surfactantes como en los sistemas con micelas inversas, ni tampoco existen problemas difusionales como en los sistemas de enzimas inmovilizadas o reactores de membrana (Tsai *et al.*, 1991).

### 3.3.3.2 Síntesis.

Las múltiples aplicaciones posibles de moléculas producto de reacciones de síntesis de enlaces éster (algunas de ellas mostradas en la tabla 3), las desventajas que existen en su producción a través de métodos químicos, la dificultad que existe para sintetizar algunas de ellas utilizando estos métodos y la posibilidad utilizar de grasas y aceites naturales como sustratos de la reacción en reacciones de alcoholólisis y acidólisis (lo que constituye una manera para su valorización); han sido las razones principales del gran interés que existe en el estudio de las reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas.

TABLA 3 Ejemplos de productos obtenidos por reacciones de síntesis enzimática catalizadas por lipasas

APLICACIÓN Y REFERENCIA	ENZIMA	OBSERVACIONES
Resolución de mezclas racémicas de ácidos y alcoholes, para síntesis de compuestos con interés terapéutico Kirchner, 1985	<i>A. niger</i> <i>Penicillium urticae</i>	No se lleva a cabo a nivel industrial
Síntesis de lípidos estructurados, utilizado como sustitutos de mantequilla de cocoa, productos terapéuticos y con valor nutricional Bloemer <i>et al.</i> , 1991; Björklíng, 1991	<i>C. rugosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aplicación a nivel industrial
Síntesis de Ésteres de bajo peso molecular, utilizados como aromatizantes, saborizantes, lubricantes, plastificantes Okumura <i>et al.</i> , 1979; Arnold <i>et al.</i> , 1975	<i>M. miehei</i> <i>R. delemar</i>	Aplicación a nivel industrial

Dadas sus muy particulares características estructurales las lipasas conservan su actividad catalítica en medios orgánicos con un bajo contenido de agua. Esto es debido a que, en solventes orgánicos poseen una conformación<sup>1</sup> en la que sus residuos hidrofóbicos están expuestos en la superficie de la proteína y en contacto con el medio hidrofóbico, mientras que los residuos hidrofílicos se distribuyen entre el interior de la proteína y la poca agua presente en el sistema. De esta manera, se establecen interacciones entre el medio

<sup>1</sup> definida como abierta en el fenómeno de activación interfacial.

orgánico y la región hidrofóbica de la enzima, así como entre sus residuos hidrofílicos y el agua, lo que permite a las lipasas mantener una forma tridimensional estable y activa. (Miller *et al.*, 1991). Esta conformación es estable y suficientemente flexible para aceptar una amplia gama de sustratos con los que pueden llevar a cabo reacciones de síntesis.

Como se ha dicho, las reacciones de síntesis están basadas en la manipulación del equilibrio termodinámico a través del control del contenido de agua en el sistema, que en el sentido más estricto y formal, por las razones que se explican a continuación, debe ser definida como actividad de agua ( $a_w$ ).

#### *Actividad de Agua y Reacciones de Síntesis*

En 1988 Zaks y Klivanov, estudiando la influencia del contenido de agua sobre la actividad de tres enzimas (fenol oxidasa, alcohol deshidrogenasa y alcohol oxidasa) en solventes con hidrofobicidad diferente, observaron por un lado, que las actividades de las enzimas eran función de la cantidad del agua unida a la enzima y no de la concentración de agua en el solvente; por otro lado, y puesto que los solventes orgánicos compiten por el agua esencial para la enzima, se percataron que en solventes hidrofóbicos la cantidad de agua necesaria para alcanzar la actividad enzimática óptima era menor que en solventes hidrofílicos.

De experimentos como éste se desprende que en sistemas de reacción de baja actividad de agua, la influencia del agua no depende de la concentración total de ésta sino de las interacciones entre el agua y todos los componentes de la reacción. Resulta entonces mucho más conveniente considerar en este tipo de sistemas la **actividad termodinámica del agua ( $a_w$ )** en lugar de la cantidad de agua total.

En reacciones de síntesis enzimática catalizadas por lipasas el agua tiene diferentes papeles. Por un lado, para favorecer la síntesis, la actividad termodinámica del agua se debe mantener tan baja como sea posible. Y por otro, y puesto que el agua está involucrada en interacciones no covalentes (puentes de H) por las que la enzima mantiene una estructura tridimensional activa, debe mantenerse a un nivel óptimo para la eficiencia catalítica de la enzima; sin agua, la catálisis enzimática sería imposible.

Dado el gran interés que existe en optimizar las reacciones de síntesis catalizadas por lipasas, diversos investigadores se han dado a la tarea de evaluar el efecto de la  $a_w$  en

reacciones de síntesis catalizadas por lipasas. Lo que han concluido se resume en los siguientes puntos:

- Valores altos de  $a_w$  favorecen las reacciones de hidrólisis sobre las de síntesis y por el contrario, con valores bajos de  $a_w$  las reacciones de síntesis se ven favorecidas (Wehthe & Adlercreutz, 1997; Zarevúka *et al.*, 1997; Dudal & Lortie, 1995). De tal manera que la gráfica típica de actividad enzimática vs  $a_w$  se vería como lo muestra la figura 17.

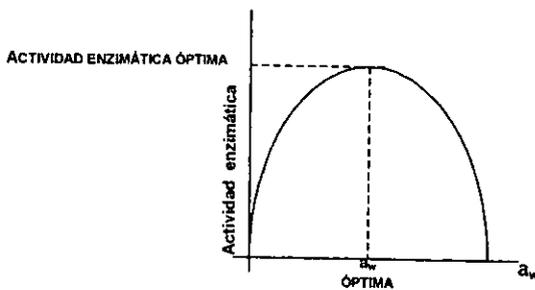


FIGURA 17. Perfil típico de  $a_w$  vs actividad enzimática en reacciones catalizadas por lipasas

Wehte y Adlercreutz (1997) demostraron que, en general, el perfil de actividad de las lipasas contra  $a_w$ , es independiente de la reacción utilizada para medir la actividad. Es decir, para cualquier reacción hay un óptimo de actividad enzimática en un valor de  $a_w$  específico, dicha actividad disminuye conforme aumenta o disminuye  $a_w$  (fig. 17).

Este comportamiento, a pesar de ser semejante en hidrólisis y síntesis, está relacionado, en cada una de las reacciones, con fenómenos diferentes (Yamane *et al.*, 1989; Valivety *et al.*, 1992).

En las reacciones de esterificación, este perfil típico de actividad enzimática vs  $a_w$ , se ha atribuido a que un incremento en la concentración de agua favorece las reacciones de hidrólisis del sistema, disminuyendo con esto la actividad de síntesis.

En hidrólisis se atribuye a limitaciones de transferencia de masa resultado de la agregación de la enzima a valores altos de actividad de agua.

- La actividad catalítica de las lipasas es diferente en medios de polaridades diferentes (Valivety *et al.*, 1993).

Esto es porque, a pesar de que en distintos medios de reacción con diferentes solventes de distintas polaridades exista el mismo contenido de agua, el valor  $a_w$  para cada uno no es el igual. Y dado que la  $a_w$  del medio es la que determina la actividad catalítica de la enzima (Zaks & Klivanov, 1988) entonces, dicha actividad será distinta de un solvente a otro a una misma concentración de agua. De aquí se puede entender la siguiente conclusión: el valor máximo de actividad en diferentes solventes permanece igual para un valor específico de  $a_w$ .

Por la importancia de tener un control de la actividad de agua durante las reacciones de síntesis, una parte fundamental en el estudio de las mismas ha sido definir un método por el cual sea posible mantener una baja actividad de agua.

En este sentido se han implementado diversas estrategias (tabla 4).

TABLA 4. Descripción de las estrategias implementadas para lograr medios de baja actividad de agua

METODO	PRINCIPIO	REFERENCIA
Uso de tamiz molecular	Absorber el agua presente en el sistema	Muskesht <i>et al.</i> , 1997, Kuan-Ju <i>et al.</i> , 1998, Yamaguchi & Mase, 1991
Pervaporación	Remoción del agua por adsorción o permeación selectiva a una membrana.	Kwon <i>et al.</i> , 1995
Uso de presiones reducidas	Remoción del agua del sistema	Linfield <i>et al.</i> , 1984
Reacción en medio sólido	Promover las reacciones de esterificación frente a las de hidrólisis	Ergan & André, 1991
Un medio con 25% de agua y con un exceso de glicerol	Bajar la actividad de agua, por interacciones moleculares entre el glicerol y el agua	Tsujiyaka <i>et al.</i> , 1977;
Uso de solventes orgánicos.	Bajar la actividad de agua, por interacciones moleculares entre los solventes orgánicos y el agua..	Goderis <i>et al.</i> , 1986 Bonkang <i>et al.</i> , 1994 Kuo & Parkin, 1996

#### Adsorción del agua en tamiz molecular

El uso de tamiz molecular activado ha probado ser un método útil para remover el agua producida durante la reacción. Hoy en día en la mayor parte de los trabajos de investigación en los que se requiere de un bajo contenido de agua se hace uso de este sistema.

El uso de este material en la reacción requiere un paso previo de optimización ya que la fuerte afinidad del agua por este puede causar una excesiva deshidratación de la enzima y disminución de los rendimientos de la reacción (Muskes *et al.*, 1997). Resulta entonces importante, definir el contenido de tamiz molecular óptimo para la reacción, por el que se permita la máxima disminución de las reacciones de hidrólisis sin afectar los rendimientos de la reacción.

#### *Pervaporación*

Este es un método atractivo para la remoción de agua en solventes orgánicos y en sistemas sin solvente. Su aplicación hace posible la remoción del agua por adsorción selectiva en una membrana homogénea, polimérica y no porosa. Esto es seguido de una difusión selectiva a través de la membrana y evaporación en una fase vapor. La diferencia entre las presiones parciales entre los dos lados de la membrana es la fuerza motriz para los procesos mientras que las diferencias de solubilidad de los componentes de la reacción en la membrana mejora la selectividad. Este método fue llevado a cabo con éxito por Kwon y colaboradores (Kwon *et al.*, 1995) en una reacción de esterificación entre ácido oléico y *n*-butanol catalizada por Lipozyme<sup>™</sup> en isooctano a 25°C. Una conversión de 95% fue obtenida con pervaporación con una membrana de acetato de celulasa, mientras que sin pervaporación la conversión era sólo del 61%.

#### *Presiones reducidas*

Mediante este método es posible remover el agua del sistema por evaporación a bajas temperaturas, trabajando en un medio de reacción a presiones reducidas. Lienfield y colaboradores (1984) han demostrado la efectividad de este método, en una reacción de esterificación entre glicerol y ácido oléico. Ellos demostraron que la remoción del agua producida utilizando una bomba al vacío incrementaba el rendimiento de triglicéridos de 45 a 93%.

#### *Medios sólidos*

Diversos investigadores han probado con éxito que es posible llevar a cabo reacciones de síntesis catalizadas por lipasas en medios sin solvente. En estos, los substratos son miscibles unos con otros y la temperatura de reacción está definida por el punto de fusión del substrato. Este último aspecto junto a la dificultad en la separación de productos de la mezcla, constituyen las grandes desventajas del método.

Este método no constituye un sistema por el que se remueva el agua durante la reacción. A través del uso de medios sólidos se pretende lograr un valor inicial de  $a_w$  bajo.

### *Síntesis y Estrategias de Reacción*

Otro de los objetivos en el estudio de reacciones de síntesis catalizadas por lipasas, además de definir el medio adecuado para las reacciones de síntesis, ha sido determinar la mejor vía de síntesis de un producto específico. Es el caso de Castro y colaboradores (1997), quienes compararon tres vías diferentes para la síntesis de acetato de citonitrilo:

1. Esterificación de ácido acético y de citronelol.
2. Alcohólisis del acetato de butilo con el citronelol
3. Interesterificación de acetato de butilo con butirato de citronelilo.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en *n*-heptano en presencia de una enzima inmovilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme<sup>™</sup>). Los resultados obtenidos permiten concluir que la alcohólisis es la mejor opción ya que, en las condiciones de reacción en las que se llevó a cabo el experimento, esta reacción permite obtener una conversión de 20% en acetato de citonitrilo mientras que la esterificación y la interesterificación permiten una conversión tan solo del 2 y 5% respectivamente.

Castro y colaboradores atribuyen este resultado al **carácter polar de los sustratos que determina la distribución del agua en el medio de reacción**. La partición de las moléculas de agua entre la fase sólida constituida por la enzima y la fase líquida constituida por los sustratos y productos resulta en un cambio en las conversiones obtenidas para cada reacción.

Resulta entonces que las reacciones de síntesis enzimática son principalmente función de dos condiciones:

- a. La actividad de agua del sistema, que debe definir una condición de equilibrio termodinámico que permita que las reacciones de síntesis se favorezcan frente a las de hidrólisis.
- b. La polaridad del sistema determina el agua disponible para la enzima por la que se condiciona su actividad. Y que, como se verá más adelante, también influye en la condición de equilibrio termodinámico que se establece en un determinado medio de reacción.

### 3.4 SOLVENTES ORGÁNICOS. SISTEMAS DE BAJA ACTIVIDAD DE AGUA.

Tal como se expuso, una de las alternativas para lograr medios de baja actividad de agua en los que se favorezcan las reacciones de síntesis frente a las de hidrólisis es el uso de solventes orgánicos. En 1985 (4) Zaks y Klibanov probaron por primera vez la eficiencia catalítica de las lipasas en medios orgánicos, desde ese año hasta la fecha se han estudiado diversas reacciones de síntesis catalizadas por lipasas en sistemas con solventes orgánicos.

#### 3.4.1 Influencia de la Naturaleza del Solvente en el Equilibrio

Hasta hace algunos años el efecto del solvente en la manipulación del equilibrio no había sido considerado a detalle. Su uso tenía, el único objetivo de lograr medios de baja actividad de agua en los que las reacciones de síntesis se vieran termodinámicamente favorecidas frente a las hidrolíticas. Sin embargo dada la importancia que tiene el poder dirigir una reacción hacia la síntesis de productos específicos, se ha intentado establecer correlaciones que consideren las interacciones entre los substratos, productos y solvente en la predicción del equilibrio en una reacción.

En este sentido Halling (1989) utilizó los coeficientes de partición octanol/agua ( $\log P$ ) de diferentes solventes para predecir las concentraciones al equilibrio en cada uno de ellos y también demostró que existe una **correlación entre la posición de equilibrio predicho y la solubilidad de agua en el solvente**. Halling también se percató que en solventes hidrofóbicos con elevados valores  $\log P$  la cantidad de agua necesaria para alcanzar la actividad enzimática óptima es menor que en solventes hidrofílicos con valores de  $\log P$  menores. De aquí que los solventes con un alto  $\log P$  sean usualmente considerados más apropiados para una buena actividad y/o estabilidad de la enzima.

Diversos investigadores han corroborado la correlación entre posición de equilibrio y  $\log P$  determinada por Halling. Tal es el caso de Valivety y colaboradores (1991), quienes confirmaron esta correlación estudiando la influencia de la polaridad de varios solventes en la constante de equilibrio de la esterificación de dodecanol y ácido dodecanoico.

Esta correlación ha sido interpretada en términos de las **propiedades de solvatación y extracción** que posee cada solvente. Es el caso del trabajo de Kuo y colaboradores (1996) quienes asociaron la síntesis selectiva de mono- y diésteres de glicerol y 1,3-propanodiol en solventes con diferentes  $\log P$  a dichas propiedades. Por su parte, Torres y colaboradores

(1999) observaron que la polaridad del solvente tiene una enorme influencia en la distribución del ácido málico y monoéster. El argumento propuesto por estos autores sigue la misma línea que el planteado por Kuo: el monoéster posee una mayor solubilidad que el ácido málico en solventes hidrofóbicos, esto promueve una rápida esterificación en el correspondiente diéster.

El modelo propuesto por Halling y comprobado por Valivetty resulta certero si se trata de predecir el equilibrio de una reacción en sistemas diluidos, en los que la actividad termodinámica ( $a$ ) de una sustancia es igual a su concentración y los coeficientes de actividad ( $\gamma$ ) que consideran las interacciones moleculares entre substratos, productos y solvente en un sistema son cercanos a uno.

Con el propósito de predecir las concentraciones al equilibrio de una reacción en un sistema no diluido se han propuesto modelos que consideran los coeficientes de actividad de substratos y productos (Eggers *et al.*, 1989; Halling, 1989, Castillo *et al.*, 1998).

En 1998, Castillo y colaboradores propusieron, para una reacción de síntesis enzimática entre glicerol y ácido oleico catalizada por una lipasa, un sistema de producción selectiva de monoglicéridos, en el que la síntesis de monooleína se favorece en medios de reacción con solventes hidrofílicos en los que su coeficiente de actividad termodinámica es bajo, de esta manera, el equilibrio de la reacción se desplaza a favor de su síntesis.

El fundamento teórico de este sistema está basado en las siguientes consideraciones:

- La actividad termodinámica puede ser expresada como el producto de la fracción mol ( $x_i$ ) y el coeficiente de actividad ( $\gamma_i$ ).

$$a_i = x_i \gamma_i$$

Así, por ejemplo, en la reacción  $A + B \rightleftharpoons C$  la constante de equilibrio se define como:

$$K = \frac{(x_C \gamma_C)}{(x_A \gamma_A)(x_B \gamma_B)}$$

- El valor de las constantes de equilibrio ( $K$ ) debe ser el mismo, independientemente del solvente orgánico en el que se lleve a cabo la reacción.

- Sustancias hidrofílicas poseen bajos coeficientes de actividad en solventes polares y altos en no polares<sup>1</sup>.
- Sustancias hidrofóbicas poseen altos coeficientes de actividad en solventes polares y altos en no polares<sup>1</sup>.

Es posible entonces, utilizando un solvente de polaridad determinada, dirigir una reacción hacia la síntesis de productos específicos. A esta manipulación del equilibrio de una reacción a través de la manipulación de la polaridad del medio, mediante el uso de diferentes solventes se le ha incluido en una nueva herramienta de la biocatálisis conocida como Ingeniería de Solventes.

### 3.5 REACCIONES ENZIMÁTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE MONO- Y DIGLICÉRIDOS

Las reacciones catalizadas por lipasas como: la hidrólisis selectiva de triglicéridos, esterificación de glicerol con ácidos grasos y glicerólisis de grasas y aceites han sido estudiadas por diversos grupos de investigación con el fin de lograr la producción selectiva de mono- y diglicéridos. A continuación se detallan los trabajos más relevantes hechos al respecto.

#### 3.5.1 Hidrólisis de Triglicéridos

El problema principal al que se ha enfrentado el estudio de las reacciones de hidrólisis enzimática de triglicéridos para la producción de mono- y diglicéridos, ha sido definir aquellas condiciones bajo las cuales se evite una hidrólisis completa del sustrato. Para lograr esto, la regioselectividad de las lipasas debe ser aprovechada, de manera que, utilizando una enzima *sn*-1(3)-específica sea posible la producción de *sn*-2-monoglicéridos y utilizando lipasas *sn*-2-específicas sea posible la obtención de *sn*-1,3-diglicéridos (fig. 18)

<sup>1</sup> Dado que es una parte fundamental para entender los resultados de este proyecto, el por qué de estas aparentes contradicciones es aclarado en el capítulo 6. Resultados.

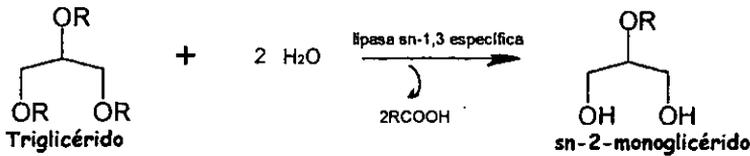


FIGURA 16 Síntesis de acilglicéridos por hidrólisis de triglicéridos

Al utilizar una enzima *sn*-1(3)-específica Holberg y Osterberg (1988) fueron capaces de obtener 2-monoglicéridos con un rendimiento del 80%, con. Sin embargo, después de varias horas de reacción y debido a fenómenos de acilmigración, obtuvieron una hidrólisis completa hasta ácidos grasos y glicerol.

Hoy en día, no existe una teoría clara sobre los mecanismos por los cuales ocurre la acilmigración espontánea, mas si existe un enorme interés en definir aquellas condiciones de reacción que permitan reprimir las reacciones de acilmigración, pues resulta un punto clave para lograr que la hidrólisis de triglicéridos no sea completa, y así, favorecer su conversión para la producción de mono- y diglicéridos.

La hidrólisis parcial de triglicéridos ya ha sido lograda por diversos autores. Por ejemplo Plou y colaboradores (1996) obtuvieron una conversión del 79% hacia la síntesis de mono- y dioleína en un medio sólido a 40°C con la lipasa pancreática inmovilizada en Celita. Estos autores atribuyen su resultado a dos de las características del biocatalizador: (a) su 1,3-especificidad y (b) la alta hidrofobicidad del soporte.

Ergan y colaboradores (1991) definieron que otro sistema útil para la síntesis de mono- y diglicéridos es aquél en el que se usa una enzima *sn*-1(3)-específica y se añade al sistema de reacción únicamente la cantidad de agua necesaria para ser usada como sustrato.

Finalmente algunos otros autores han logrado obtener mono- y diglicéridos por hidrólisis de aceites naturales. Tal es el caso Flenker y Spencer (1984) que hidrolizando enzimáticamente aceite de ricino usando una lipasa *sn*-1,3-específica de *Rhizopus arrizhus*, a un pH 5.5, obtuvieron 23% de monoglicéridos y 66% de ácido ricinoleico después de tres horas de reacción.

Otro de los objetivos ha sido, además de lograr condiciones de reacción por las que no exista una hidrólisis completa, el definir un medio por el que sea posible el aumento del área interfacial triglicérido/agua. Para lograr tal objetivo se han utilizado sistemas bifásicos

agua/solvente, en emulsión o en microemulsión (Mazur *et al.*, 1988). En todos estos sistemas los triglicéridos son solubilizados en la fase hidrofóbica y la enzima es utilizada en suspensión o solubilizada en la fase acuosa.

En este sentido, el método más eficiente ha sido el presentado por Mazur y colaboradores (1988) para la síntesis de *sn*-2-monoglicérido. Este método consiste de *n*-hexano, 2-butanol y una enzima *sn*-1,3-específica (Lipozyme<sup>™</sup>). El rendimiento es del 70%. Este método resultó aplicable para triglicéridos de C<sub>8,0</sub> a C<sub>14,0</sub>.

La producción de mono- y diglicéridos por hidrólisis enzimática es por tanto, un método que requiere un estricto control de la reacción para evitar la hidrólisis completa. Su principal desventaja son los bajos rendimientos que se obtienen, ya que por una mol de triglicérido sólo se sintetiza una de monoglicérido y dos moles de ácidos grasos libres. La presencia de ácidos grasos libres en el producto de la reacción hacen necesarios métodos para su remoción lo que constituye otra de las desventajas del proceso.

### 3.5.2 Esterificación de Ácidos Grasos o Ésteres con Glicerol

Uno de los grandes campos de investigación en el área de las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, lo constituye el estudio de la síntesis de acilglicéridos a través de la esterificación de ácidos grasos o ésteres con glicerol como se muestra en la figura 19.

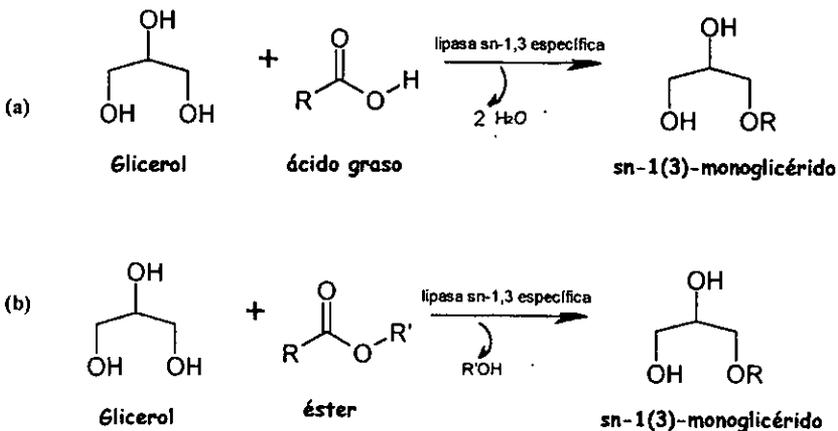


FIGURA 19 Síntesis de acilglicéridos por esterificación de ácidos grasos (a) y ésteres (b) con glicerol

Para optimizar estas reacciones se han seguido las mismas líneas que las descritas para las reacciones de síntesis catalizadas por lipasas:

- a. Determinar métodos por los cuales sea posible remover el agua que se genera durante la reacción, para de esta manera lograr un sistema en el cual se favorezcan las reacciones de esterificación frente a las de hidrólisis.
- b. Proveer medios que favorezcan el área interfacial, en los que se favorezcan las velocidades enzimáticas y los rendimientos.
- c. Definir condiciones de reacción óptimas de temperatura, relación molar entre substratos y la mejor enzima que favorezcan altas conversiones hacia la síntesis de mono- y diglicéridos.

En esta tarea se han utilizado diversos substratos, pero sin duda la esterificación de ácido oleico con glicerol para la síntesis de mono-, di y trioleína ha sido la reacción que ha servido como modelo de estudio para la mayor parte de los trabajos publicados. Las conversiones del ácido oleico para la síntesis de acilglicéridos difieren entre estos trabajos y tal como se observa en la tabla 5 dichas conversiones son función del tipo de lipasa utilizada y el sistema de reacción, entre otros parámetros.

TABLA 5. Reacciones de esterificación de ácido oleico con glicerol para síntesis de acilglicéridos

ENZIMA Y REFERENCIA	MEDIO DE REACCIÓN	TEMPERATURA	CONVERSIÓN AC. OLEICO	PORCENTAJE DE ACILGLICÉRIDOS	RELACIÓN GLICEROL/ AC. OLEICO
Lyozyme <sup>SM</sup> Ergan <i>et al.</i> , 1991	Medio sin solvente y uso de tamiz molecular	60°C	95%	90% trioleína y 10% dioleína	3.3
Potato lipid acid hidrolasa Macrae <i>et al.</i> , 1998	Medio sin solvente. Remoción de agua por presiones de vacío	50°C	> 90%	97% de monoglicéridos	0.85
<i>Penicillium roquefortii</i> Waldinger <i>et al.</i> , 1996	Medio en fase sólida	40°C	90%	85% de monoglicéridos 75% de diglicéridos	0.2 2.0
<i>R. miehei</i> Castillo <i>et al.</i> , 1998	2-metil-2-butanol/hexano (10:90). Adsorción selectiva de monoglicéridos	40°C	71%	100% de monoglicéridos	2
Lipasa G  Lipozyme Schuch & mukherjee, 1989	Sistema sin solvente	40°C	90%  79%	75% de monoglicéridos  45% de diglicéridos y 38% de triglicéridos	2
<i>Penicillium camembertii</i> Yamaguchi & Mase, 1991	Uso de tamiz molecular	40°C	97.3%	74% de monoglicéridos	2

De los trabajos presentados en la tabla 5, destaca el que la principal estrategia en la manipulación de los rendimientos obtenidos ha sido definir aquella relación oleico/glicerol que resulta óptima para obtener rendimientos altos de acilglicéridos específicos (Ergan *et al.*, 1991; Macrae *et al.*, 1998; Waldinger *et al.*, 1996). Otra alternativa explorada ha sido el utilizar la Ingeniería de Solventes con el fin de dirigir la reacción hacia la síntesis de acilglicéridos específicos (Castillo *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 1993).

En este sentido Castillo y colaboradores lograron un medio de reacción selectivo para la síntesis de monoglicéridos en un sistema hidrofílico (n-hexano/2M2B, 90/10) en el que la actividad termodinámica de los monoglicéridos es menor que la de los di y triglicéridos.

En esta misma línea se encuentra el trabajo de Janssen y colaboradores (1993) quienes reportaron el efecto de la polaridad de distintos solventes en la posición de equilibrio en la síntesis de acilglicéridos con ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Estos autores demostraron como la polaridad influye en los rendimientos obtenidos en el equilibrio de la reacción. Los resultados muestran que en solventes hidrofóbicos se favorece la formación de los triglicéridos y en los solventes polares se favorece la formación de monoglicéridos

Estos trabajos demuestran que, en reacciones de esterificación catalizadas por lipasas llevadas a cabo en solventes orgánicos, las actividades termodinámicas de los componentes de la reacción influyen en la condición de equilibrio termodinámico del sistema y de esta manera en la selectividad de la reacción.

Resulta entonces evidente que tanto el medio de reacción utilizado, como la temperatura y relación molar ac. graso/glicerol son variables que condicionan las conversiones del sustrato para la síntesis de mono- y diglicéridos en reacciones de esterificación directa. A pesar de que mediante esta reacción se pueden obtener conversiones altas, tiene la desventaja de requerir ácidos grasos, obtenidos mediante hidrólisis, lo que, desde el punto de vista industrial, no resulta atractivo.

## Glicerólisis

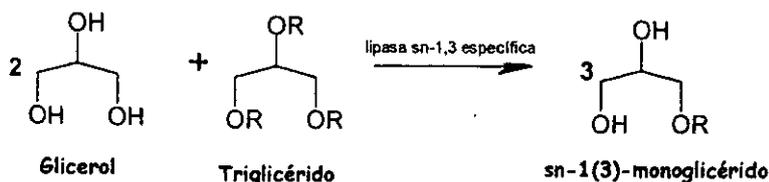


FIGURA 20 Síntesis de acilglicéridos glicerólisis

Ante las desventajas de los métodos de hidrólisis parcial y de esterificación directa, la glicerólisis resulta una buena alternativa, dado que estequiométricamente los rendimientos obtenidos deben ser mayores ya que tres moles de monoglicéridos se pueden sintetizar a partir de un mol de triglicérido. Además no existen subproductos ni se requiere de un paso de hidrólisis previo.

Dadas las ventajas de la glicerólisis para la producción de acilglicéridos, el objetivo ha sido definir las condiciones de reacción que favorezcan rendimientos altos de acilglicéridos específicos (mono- o diglicéridos). Las preguntas que se han planteado son: ¿cuál es la temperatura óptima en la que se favorecen altas conversiones para la síntesis de mono- o diglicéridos?, ¿en qué medio de reacción se reprimen las reacciones de hidrólisis y se favorecen las de transesterificación?, ¿qué relación molar glicerol/triglicéridos permite obtener altas concentraciones de monoglicéridos o de diglicéridos?, ¿cuál es la mejor enzima? y ¿con qué valor de actividad de agua es posible disminuir al máximo posible la hidrólisis de acilglicéridos sin afectar la actividad de la enzima?

En la tabla 6 se resumen y a continuación se discuten, diversas estrategias que abordan las preguntas antes planteadas

## 3. GENERALIDADES

TABLA 6. Reacciones de glicerólisis llevadas a cabo por diversos autores en distintas condiciones de reacción.

SUBSTRATO	ENZIMA	TEMPERATURA	RELACIÓN MOLAR GLICEROL/ TRIGLICÉRIDO	MEDIO DE REACCIÓN	ACTIVIDAD DE AGUA	CONVERSIÓN DE TRIGLICÉRIDOS	PORCENTAJE DE ACILGLICÉRIDOS EN EL SISTEMA
Aceite de olivo Ferreira-Dias & Fonseca, 1995	<i>Candida rugosa</i>	30°C	4.5	Sistema con <i>n</i> -hexano (11%w/v)	La determinada como óptima: 0.23	70%	70% de MG (w/w)
Aceite de palma Tüter et al., 1999	<i>Rhizopus delemar</i>	40°C	2	Medio sólido	No especificada	66%	30% de MG
Aceite de olivo Shick & Shick, 1991	<i>Chromobacterium viscosium</i>	37°C	No especificada	Microemulsión	No especificada	80%	30% MG
Aceite de semillas Elfman-Börjesson & Häröb, 1999	Lypozyme IM	75°C	6	48% isooctano	0.17	64%	17.4% MG 36.8% DG
Aceite de olivo Coteron et al., 1998	Novozyme 435	75°C	3	Medio sólido	No especificada	55%	22% MG 39% DG
Grasa animal McNeill et al., 1990	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42°C	1.5-2.5	Medio sólido	No especificada		90% MG (mol MG/MOL TG)
Aceite de girasol Tüter et al., 1998	D "Amano"	40°C	2	Medio sólido	No especificada	55%	53% acilglicéridos
Aceite de palma Holberg & Osterberg, 1988	<i>Rhizopus delemar</i>	35°C	2	Microemulsiones	No especificada		80% MG (mol MG/MOL TG)
Aceite de palma Holmberg et al., 1989	<i>Lipasa pancreática</i>	37°C	3.1	Microemulsiones	No especificada	56%	32% MG

### *Temperatura óptima*

McNeill y colaboradores (1993, 1990, 1991) demostraron que por glicerólisis de triglicéridos podían obtenerse altos rendimientos de monoglicéridos cuando la reacción se lleva a cabo a temperaturas que propician su cristalización. Dicha temperatura depende del substrato usado, que, para el caso de grasas animales, según se ha reportado, es de 30-45°C y para aceites vegetales es de 5-10°C (Elfman-Börjesson & Härröd, 1999; Thude *et al*, 1997). La cristalización de los monoglicéridos presentes en el medio constituye una forma de remoción de estos del sistema, de esta manera, la reacción se desplaza a favor de la producción de más monoglicéridos.

El método de cristalización de monoglicéridos a temperaturas bajas ha probado ser efectivo para la obtención de altos rendimientos de monoglicéridos. Sin embargo, tiene ciertas desventajas. Por un lado, la eficiencia catalítica de las lipasas disminuye a temperaturas bajas y por otro lado, mientras que se pretende realizar la glicerólisis en un proceso de dos etapas (una de reacción y otra de enfriamiento para la cristalización de monoglicéridos), el costo del proceso aumenta por la necesidad de un sistema de enfriamiento. Finalmente, esta opción está limitada a las grasas pues los aceites tienen puntos de cristalización muy bajos.

### *Relación molar triglicérido/glicerol óptima*

Yamane y colaboradores (1994) demostraron que el rendimiento en la preparación de acilglicéridos específicos no sólo depende de la temperatura de reacción, sino también de la relación molar glicerol/triglicérido. Teóricamente la glicerólisis se puede llevar a cabo en relaciones molares de 2:1, 1:2 o 1:1 para producir mono-, diglicéridos o ambos.

Diversos grupos de investigación han probado que trabajando a relaciones molares altas glicerol/triglicérido es posible obtener altos rendimientos de monoglicéridos.

Elfman-Börjesson y Härröd (1999), y de Tüter y colaboradores (1988) evaluaron un rango de relaciones molares glicerol/triglicérido, definiendo que el mejor rendimiento de monoglicéridos fue de 6/1 y 3/1 respectivamente.

En sentido práctico, el incrementar la relación molar glicerol/triglicérido no resulta el mejor método para obtener altos rendimientos de monoglicéridos, ya que en las condiciones de reacción que se describen en la literatura, al final de la reacción ciertas cantidades de glicerol no reaccionan.

### *Actividad de agua óptima*

De manera similar que en las reacciones de esterificación, en la glicerólisis enzimática la actividad de agua es un parámetro importante de controlar.

En 1989 Holmberg y colaboradores demostraron que incrementando la relación glicerol/agua, la velocidad de glicerólisis aumenta respecto a la hidrólisis. Sin embargo, también llegaron a la conclusión que en sistemas no acuosos la velocidad de glicerólisis disminuye. Se sabe que es importante controlar la cantidad de agua en el sistema de reacción con el fin de tener una actividad de agua pequeña que favorezca la glicerólisis respecto a la hidrólisis.

En 1995 Ferreira-Dias y Fonseca demostraron, en reacciones de glicerólisis, que a valores de  $a_w$  menores que 0.43, la hidrólisis era completamente reprimida sin inhibir la glicerólisis. El mayor rendimiento de MG (70% w/w) lo obtuvieron a un valor de  $a_w$  de 0.23.

### *Selección de la enzima*

En realidad no existe una enzima ideal para el proceso, puesto que la actividad catalítica depende de las condiciones de reacción. Sin embargo, resulta evidente que los rendimientos obtenidos en diferentes sistemas de reacción dependen de la enzima utilizada. Así lo demostraron Mymes y colaboradores (1995) estudiando la glicerólisis de aceites marinos catalizada por distintas lipasas. En las condiciones de reacción de su sistema, Mymes y colaboradores demostraron que con lipasas 1,3 específicas de *Rhizopus niveus* y *Rhizopus delemar* el contenido de monoglicéridos en la reacción era de 14 a 21%. Bajo las mismas condiciones de reacción el contenido de monoglicéridos se incrementó a 46 y 53% usando lipasas no específicas de *Pseudomonas sp.*

Sin duda las condiciones de reacción de un sistema específico condicionan la actividad catalítica de cualquier enzima, de manera que el problema de selección de la enzima, debe por un lado considerar a la enzima adecuada en términos de especificidad y actividad, y por el otro, debe determinar aquellas condiciones de reacción que resulten óptimas para la enzima en la síntesis de un producto específico.

### *Selección del medio de reacción*

Diversos medios de reacción han sido utilizados para el estudio de las reacciones de glicerólisis enzimática. Los objetivos del uso de estos medios son el tener un medio en el que los substratos hidrofóbicos sean solubles, proveer un sistema de baja actividad de agua en el

que se repriman las reacciones de hidrólisis al máximo posible y por último, favorecer el contacto entre la lipasa y el sustrato.

Las propuestas en este sentido son semejantes a las planteadas para las demás reacciones de síntesis catalizadas por lipasas. El uso de sistemas en microemulsión, de medios sólidos y con solventes orgánicos han sido los métodos más empleados.

En este sentido, Holmberg y colaboradores (1988, 1989) demostraron que, usando una lipasa *sn*-1,3-específica, la glicerólisis de aceite de palma puede llevarse a cabo en sistemas de microemulsiones. En estos sistemas el glicerol reemplaza al agua como componente polar. Este sistema se enfrenta a las mismas desventajas que las ya descritas en sistemas de micelas inversas o microemulsiones: la necesidad de la remoción del agente surfactante del producto final.

Por su parte, McNeill y colaboradores (1990, 1991), así como Tüter y colaboradores (1988) han comprobado que la glicerólisis puede llevarse a cabo en un medio sólido sin solvente.

Otros autores han propuesto el uso de solventes orgánicos en el medio de reacción con el fin de lograr una baja  $a_w$  y permitir la solubilidad de los sustratos (Ferreira-Dias & Fonseca, 1995; Elfman-Börjesson & Härröd, 1999).

El uso de solventes en los trabajos de McNeill y Tüter se justifica por dos causas: favorece la solubilidad de los sustratos y logra un medio de baja  $a_w$  en el que las reacciones de hidrólisis se repriman. Sin embargo, su uso no solamente resulta favorable en este sentido, sino que, como se explicó, es posible controlar la reacción hacia la síntesis de productos específicos. Esto constituye la principal ventaja del uso de solventes orgánicos en reacciones catalizadas por lipasas.

La variación en las condiciones de reacción (temperatura, concentración y relaciones molares de sustratos y actividad de agua) ha sido la estrategia principal para lograr medios de reacción selectivos. Una técnica alternativa, como se ha planteado, consiste en el uso de solventes orgánicos en el medio de reacción, cuyo uso, en reacciones de glicerólisis enzimática, hasta la fecha se ha reducido únicamente a lograr medios de baja actividad de agua en el que los sustratos hidrófobos estén solubles. Sin embargo, usando medios con solventes se abre una posibilidad distinta, controlar termodinámicamente una reacción hacia la síntesis de acilglicéridos específicos.

## 4.0 CONCLUSIONES DEL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

De la revisión bibliográfica, conviene destacar los puntos fundamentales que constituyeron el punto de partida de este proyecto:

Resulta claro que los mono- y diglicéridos son moléculas con aplicaciones diversas en diferentes sectores de la industria y debido a su carácter anfipático son utilizados sobre todo como moléculas emulsificantes. Esta es la razón del interés industrial que existe en la síntesis de estos productos.

Tradicionalmente los mono- y diglicéridos han sido sintetizados por métodos químicos energéticamente costosos y poco selectivos. Estas desventajas han sido el motivo principal del gran interés que existe hoy en día por los procesos enzimáticos catalizados por lipasas, enzimas que son capaces de catalizar no solamente reacciones de hidrólisis de triglicéridos, sino que en sistemas de baja actividad de agua catalizan la esterificación de ácidos grasos con glicerol. Las grandes ventajas de los métodos enzimáticos frente a los métodos químicos son que: por un lado, dada la especificidad de las enzimas, son procesos selectivos y por otro, dada la capacidad catalítica de las lipasas a bajas presiones y temperaturas, son procesos energéticamente menos costosos que los procesos químicos.

La síntesis de acilglicéridos por vía enzimática ha sido estudiada a través de diversas reacciones: hidrólisis de triglicéridos, esterificación de ácidos grasos con glicerol y glicerólisis. Entre ellas, la glicerólisis resulta la más ventajosa dado que estequiométricamente los rendimientos obtenidos deben ser mayores ya que tres moles de monoglicéridos se pueden sintetizar a partir de un mol de triglicérido. Además no existen subproductos ni se requiere, como en el caso de la esterificación de ácidos grasos con glicerol, de un paso de hidrólisis previo.

En el estudio de reacciones de producción enzimática de acilglicéridos, el problema fundamental ha sido diseñar métodos mediante los cuales sea posible obtener altos rendimientos de acilglicéridos específicos; las estrategias han ido básicamente en dos sentidos: diseñar métodos y condiciones de reacción que permitan que el producto de interés sea removido del sistema con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción a favor de su síntesis y usar sustratos en exceso para así aumentar la concentración de productos en el equilibrio de la reacción.

Un método alternativo para lograr medios selectivos es el uso de solventes orgánicos como medios de reacción. A través de su uso se logran sistemas de baja actividad de agua en los que el equilibrio se desplaza hacia el sentido de síntesis en una reacción catalizada por lipasas (enzimas naturalmente hidrolíticas).

Diversos autores han propuesto el uso de solventes orgánicos para lograr sistemas en los que se sintetizan productos específicos, la mayoría bajo el fundamento de la compatibilidad de polaridades entre los sustratos, productos y el solvente; la idea es favorecer la solubilidad o dispersión de sustratos y productos en el medio favoreciendo así su consumo o producción.

Un criterio refinado de estos conceptos se basa en las constantes de equilibrio de una reacción; lo que se pretende es manipular el equilibrio termodinámico para dirigir la reacción hacia la síntesis de productos específicos manipulando los coeficientes de actividad de las sustancias en medios no diluidos. Sustancias hidrofóbicas tendrán un mayor coeficiente de actividad en medios hidrofóbicos en los que las sustancias hidrofílicas tienen coeficientes de actividad bajos.

Finalmente, se ha demostrado que, independientemente de la reacción por la que ocurra, la síntesis de acilglicéridos depende fuertemente de las condiciones de reacción: temperatura, concentración de sustrato, tipo de enzima y actividad de agua. La influencia de este último parámetro ha sido uno de los puntos más discutidos: su control resulta fundamental para favorecer las reacciones de hidrólisis frente a las de síntesis y para mantener a la enzima activa.

## 5.0 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto consiste en lograr la síntesis selectiva de acilglicéridos a través de una reacción de glicerólisis enzimática, haciendo uso de la Ingeniería de Solventes, utilizando trioleína y glicerol como sustratos y una enzima inmovilizada de *Rhizomucor miehei* como catalizador de la reacción.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Definir las técnicas de análisis útiles en la cuantificación de las reacciones.
- Definir el método por el cual sea posible resolver el problema de la insolubilidad del glicerol en solventes orgánicos.
- Determinar la actividad de agua óptima en la que las reacciones de síntesis se favorecen frente a las de hidrólisis, y en la que la enzima se mantiene catalíticamente activa.
- Evaluar el efecto de la naturaleza del solvente en la selectividad de la reacción en términos de acilglicéridos específicos y en términos de regioisómeros específicos.
- Evaluar el efecto de la actividad de agua en la cinética de las reacciones.
- Finalmente, proponer un modelo que describa en detalle cómo ocurren las reacciones de glicerólisis y por el que se explique la influencia de la naturaleza del solvente en el control termodinámico de la reacción.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 REACTIVOS Y SOLVENTES

El glicerol, el ácido oleico (ácido *cis*-9-octadecanoico), la monooleína (1(3)-monooleil-*rac*-glicerol), dioleína (*sn*-1,3-dioleoil glicerol/*sn*-1,2-dioleoil glicerol 85/15) trioleína (trioleoil glicerol) y la sílica gel de tamaño de poro de 60Å (malla 70-230) fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (St. Louis Mo. USA). Los solventes 2-metil-2-butanol (2M2B), *n*-hexano y éter etílico así como las sales usadas (LiCl  $a_w=0.1$ , LiBr  $a_w=0.2$ , MgCl  $a_w=0.33$  y Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  $a_w=0.53$ ) fueron adquiridos de J.T. Baker (USA). Los solventes utilizados en los análisis de HPLC, la acetona y el acetonitrilo, fueron adquiridos en Burdick & Jackson (USA). Finalmente, el tamiz molecular (5Å, 8-12 beads) fue adquirido en Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee WI. USA). Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en su más alto grado de pureza.

### 6.2 MATERIAL ENZIMÁTICO

La enzima utilizada en este proyecto fue la lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* Lipozyme™, proporcionada por la compañía Novo Nordisk A/S (Bagsvaard, Dinamarca). Esta enzima está inmovilizada en una resina microporosa de intercambio aniónico (Duolite 560, tiene diámetro de partícula de 450µm, y tamaño de poro de 50 a 300Å) de naturaleza hidrofílica. El material enzimático contiene aproximadamente 14% (g/g) de proteína y entre 5-10% de agua (gH<sub>2</sub>O/g de soporte seco). Se reporta que la lipasa inmovilizada de esta manera es estable hasta 80°C, y tiene una actividad óptima entre 40 y 70°C. Su actividad como hidrolasa es de 23-25 BIU/g de enzima inmovilizada; 1BIU es equivalente a 1µmol de ácido butírico liberado por minuto utilizando tributirina como sustrato.

Lipozyme™ está definido como un catalizador *sn*-1(3)-específico.

### 6.3 REACCIÓN DE GLICERÓLISIS

A menos que sea establecido de otra forma, la reacción general de glicerólisis se llevó a cabo de la siguiente manera: 0.1g de Lipozyme™ fueron añadidos a la mezcla de reacción con 5ml de solvente, 50mM de trioleína (0.221g) y 100mM de glicerol (0.096g de la mezcla glicerol/sílica gel), la cantidad de glicerol fue elegida para obtener una relación molar 1:2, trioleína: glicerol.

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 12ml con tapón rosca en baño termocontrolado a 40°C, con agitación magnética. Las mezclas de solvente evaluadas fueron 100/0, 75/15, 50/50, 0/100; 2M2B/n-hexano %v/%v.

#### 6.4 ADSORCIÓN DE GLICEROL A SÍLICA GEL. SOLUCIÓN AL PROBLEMA DE LA INSOLUBILIDAD DEL GLICEROL EN MEDIOS HIDROFÓBICOS

El glicerol es un poliol insoluble en medios de reacción de carácter hidrofóbico. Como lo plantean Castillo y colaboradores (1997) esto provoca el bloqueo del sitio activo de la enzima (fig. 21 A), lo cual da origen a problemas de transferencia de masa al interior del biocatalizador. Ante tal problema, se ha propuesto que la adsorción del glicerol en sílica gel resulta una técnica eficaz (Berger & Schneider 1992, Castillo *et al* 1999). De esta manera, se logra un sistema en el que la sílica gel actúa como un "reservorio" del glicerol (Castillo *et al* 1999), evitando así el bloqueo de la enzima en reacciones de síntesis en las que se utiliza glicerol como sustrato (fig. 21 B). Reacciones que son posibles gracias al contacto entre el glicerol adsorbido y la enzima

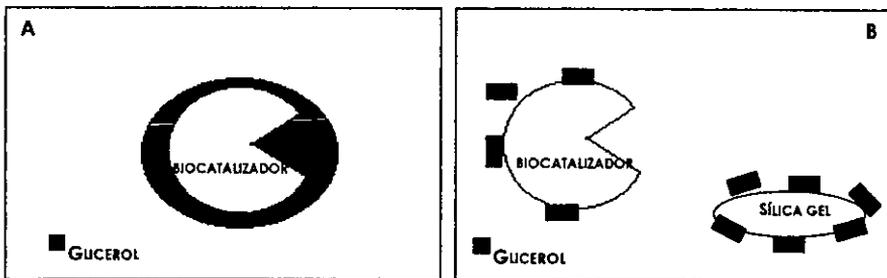


FIGURA 21. Representación esquemática del efecto de sílica gel en un medio de reacción. (A) Forma bloqueada de la enzima por glicerol insoluble en medio hidrofóbico. (B) La sílica funciona como reservorio del glicerol, de esta manera se evita el bloqueo del sitio activo por este. (Tomado de Castillo y colaboradores, 1999).

La adsorción del glicerol en la sílica gel se lleva a cabo de la siguiente manera: 1 g de sílica gel es mezclado vigorosamente con 1g de glicerol hasta obtener una mezcla fluida y homogénea.

## 6.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS

### CUÁNTIFICACIÓN POR HPLC

Las reacciones fueron analizadas cuantitativamente por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

500  $\mu$ l de muestra son tomados del medio de reacción, estas muestras son centrifugadas para eliminar la enzima y la sílica restante. Posteriormente cada muestra se somete a evaporación en un evaporador centrífugo a una temperatura de 50°C y 20 bar de presión de vacío; de esta manera es eliminado el solvente. Finalmente, las muestras centrifugadas y evaporadas son resuspendidas en acetona/acetonitrilo (50/50) para posteriormente ser analizadas.

El método requirió un controlador de flujo Waters 600E con control de temperatura ajustado a 45°C, un detector UV/VIS Waters 486 a 206 nm (Waters, Milford, MA, USA), una columna C<sub>18</sub> de fase reversa Spherisorb 80-15 ODS-2 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm) (Macherey-Nagel; Düren, Alemania). La columna fue eluida con un gradiente de flujo y de composición de fase descrita en el anexo.

La concentración del sustrato (trioleína) y de los productos de la reacción (ácido oleico, monooleína y dioleína) fueron calculados usando los factores de respuesta derivados de curvas de calibración. Dichas curvas fueron hechas a partir de soluciones de trioleína, dioleína, monooleína y ácido oleico de concentraciones conocidas de 5, 10, 15, 30 y 50 mM.

Cabe mencionar que a pesar de estar descrito en la sección de materiales y métodos, el desarrollo de los métodos de cuantificación por HPLC formó una parte importante del trabajo de este proyecto, de manera que en realidad constituyen un resultado más de este proyecto. Los detalles del desarrollo del método se describen en el anexo.

### ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA REACCIÓN POR TLC

Los análisis cualitativos de las reacciones se llevaron a cabo por el método de cromatografía en capa fina (TLC). Muestras de 100  $\mu$ l fueron tomadas del medio de reacción, diluidas 1/10 (v/v) en n-hexano y aplicadas en placas de sílica gel (Alugram Kieselgel 60, Macherey-Nagel; Düren, Germany). El sustrato y productos fueron eluidos usando el sistema n-hexano/éter etílico/ácido acético (75/25/1). El revelado de las placas se llevó a cabo mediante el rociado de una solución de acetato de cobre diluida 50:50 (v/v) con una

solución al 85% de ácido ortofosfórico y calentándolas a 200°C durante 10min. Este tratamiento permite la oxidación de dobles enlaces presentes en la trioleína, dioleína, monooleína y ácido oleico, de esta manera es posible su visualización.

## 6.6 CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE AGUA

Una técnica eficaz en el control de la actividad de agua inicial de las reacciones es ajustar la actividad de agua del catalizador y de la mezcla glicerol/silica a un mismo valor (Elfman-Börjesson y Härrod 1999).

Se empleó la técnica de soluciones saturadas de sales para ajustar el valor de  $a_w$  de la enzima y de la mezcla sílica /glicerol.

El principio de dicha técnica se entiende considerando que la actividad de agua es definida como la relación de la presión parcial de agua en fase vapor entre la presión de agua pura a la misma temperatura. Una solución saturada con una sal específica, con un valor de presión de vapor específico, debe ser colocada en contacto con la enzima y la mezcla glicerol/silica en un sistema cerrado (fig. 22). De esta manera, cuando el agua del sistema alcance el equilibrio a través de la fase vapor, la enzima y la mezcla glicerol/silica tendrán el mismo valor de  $a_w$  que el de la solución saturada de sal.

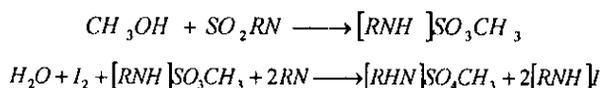


FIGURA 22 . Representación esquemática de la técnica para equilibrar  $a_w$  de la enzima y la mezcla glicerol/silica a un mismo valor

Al menos que se especifique que se realizó de diferente manera, la enzima y la mezcla glicerol/silica fueron ajustadas a una actividad de agua inicial de 0.2 con una solución saturada de LiBr, durante al menos cuatro días a temperatura ambiente, hasta que la enzima y la mezcla glicerol/silica alcanzaran un porcentaje de agua constante.

Los solventes utilizados (n-hexano y 2M2B) fueron secados en tamiz molecular de 5Å activado a 200°C durante 12 hrs.

El contenido de agua de los solventes, de la enzima y de la mezcla glicerol/silica se determinó por el método de Karl Fisher. Este método se basa en una reacción de neutralización del ácido metilsulfónico con agua y yodo. Dicho ácido se forma a partir de una reacción entre metanol y dióxido de azufre y es neutralizado por una base RN que es parte del reactivo.



La titulación es efectuada con un aparato de titulación automática compuesto de una bureta Titrimo controlada automáticamente por un titulador Méthrom.

La bureta es llenada de reactivo Karl Fischer (sin piridina) HYDRANAL. El agua presente en la mezcla es neutralizada por el agente de titulación. El metanol tiene la función de actuar como solvente de la reacción.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL GLICEROL ADSORBIDO SOBRE UN SOPORTE DE SÍLICA GEL.

El objetivo inicial de este proyecto fue definir las condiciones generales para una reacción de glicerólisis. Se partió de la suposición que el glicerol adsorbido a sílica gel resulta un sistema ventajoso en un medio de reacción hidrofóbico en el que el glicerol se utiliza como sustrato. Para esto, se llevó a cabo un análisis comparativo entre dos reacciones de glicerólisis en *n*-hexano (solvente muy hidrofóbico en el que los triglicéridos son altamente solubles), una de ellas con el sistema glicerol/sílica y la otra con el glicerol sin haber sido previamente adsorbido a sílica.

Ambas reacciones fueron monitoreadas cada 2hrs durante las 10 primeras horas. En la figura 23 se muestran los resultados obtenidos de este monitoreo hecho por TLC.

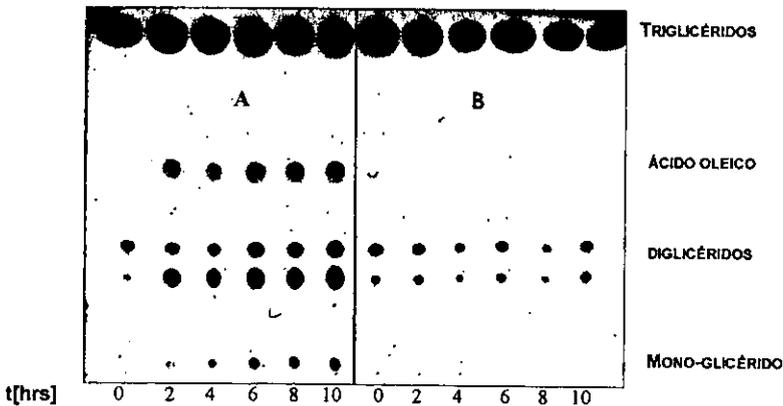


FIGURA 23 Análisis cualitativo comparativo entre una reacción de glicerólisis. (A) con glicerol adsorbido sobre sílica y (B) con glicerol sin adsorber. Condiciones de reacción 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lypozyme IM, 0.048 g de glicerol (0.5mmol de glicerol), 40°C.

En esta figura se observa que, mientras que en la reacción (A) la producción de acilglicéridos (mono- y diglicéridos) y la liberación de ácido oleico son mayores que en la reacción (B) en la cual, debido a limitaciones de transferencia de masa en el interior del biocatalizador, la velocidad de reacción es mucho menor de tal manera que la concentración de acilglicéridos y de ácido oleico no parecen modificarse considerablemente en las primeras 10hrs de reacción.

En ambos sistemas, tal como está descrito en la tabla 7, se alcanza una condición de equilibrio semejante: en ambos la conversión de trioleína fue similar y ambos muestran un equilibrio en el que se favorece la presencia de las especies hidrofóbicas (dioleína y trioleína).

TABLA 7. Comparación del equilibrio entre un sistema con glicerol adsorbido a sílica (A) y un sistema con el glicerol sin adsorber (B). Condiciones de reacción 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lysozyme IM, 0.048 g de glicerol (0.5mmol de glicerol), 40°C

SISTEMA DE REACCIÓN	Trioleína [%mol]	Dioleína [%mol]	Monooleína [%mol]	Ácido oleico [%mol]
A	28.3	57.3	10.1	4.3
B	29.7	53.3	12.4	4.6

A pesar de que se establece una condición de equilibrio semejante, el uso de sílica gel en la reacción resulta ventajoso ya que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio es menor que el requerido en una reacción sin sílica. Es por esto que en las reacciones subsiguientes se utilizó el sistema glicerol/sílica.

## 7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA ÓPTIMA

En reacciones de síntesis catalizadas por lipasas la actividad de agua ( $a_w$ ) es un parámetro esencial a controlar. Se sabe que para tales reacciones existe una actividad de agua óptima, en la que se reprimen al máximo posible las reacciones de hidrólisis, favoreciendo así las de síntesis y al mismo tiempo se mantiene la estructura terciaria de la enzima, conservando su actividad catalítica.

Durante este proyecto, en el camino de optimizar las condiciones de reacción, fue crucial definir la actividad óptima para las reacciones de glicerólisis llevadas a cabo bajo las condiciones ya descritas. El objetivo fue definir el valor de  $a_w$  que permitiera conservar a la enzima estable y activa, y en cuyo valor las reacciones de hidrólisis y con esto la presencia de ácidos grasos libres disminuyera al máximo posible.

Para tal efecto se realizaron diferentes reacciones de glicerólisis, con un rango de valores de  $a_w$  de 0.1 a 0.53. Este rango fue establecido tomando como referencia los valores de  $a_w$  reportados por Ferreira-Dias y Fonseca (1995), y por Efman-Börgenson y Härröd (1999). Efman-Börgenson y Härröd determinaron que la actividad de agua óptima para la

síntesis de monoglicéridos por glicerólisis enzimática es de 0.17. Por su parte, Ferreira-Dias y Fonseca propusieron que para aquellos valores de  $a_w$  menores de 0.43 la hidrólisis de triglicéridos era completamente reprimida, mientras las reacciones de glicerólisis se favorecían. De manera que, la  $a_w$  de la de la enzima y de la mezcla sílica/glicerol fueron ajustados empleando soluciones saturadas de LiCl ( $a_w=0.1$ ), LiBr ( $a_w=0.2$ ), MgCl ( $a_w=0.33$ ) y Mg ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub> ( $a_w=0.53$ ). En cada uno de los sistemas se utilizó *n*-hexano como medio de reacción.

La figura 24 muestra las concentraciones obtenidas al equilibrio tanto del sustrato como de los productos de la reacción para distintos valores iniciales de  $a_w$ .

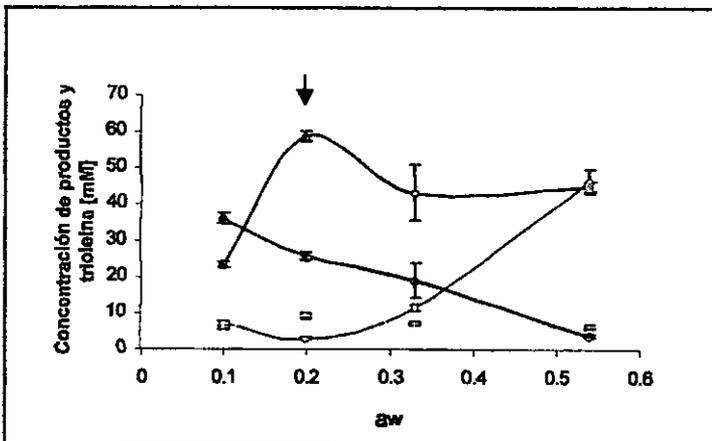


FIGURA 24. Influencia de la actividad de agua inicial sobre la producción de ácido oleico  $\circ$ , monooleína  $\blacktriangle$  y dioléína  $\blacksquare$ , así como sobre el consumo de trioleína  $\bullet$  después de 72h. Condiciones de reacción: 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lypozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C y 5ml de volumen de reacción.

Como se ve en la figura 24, la menor producción de ácidos grasos libres ocurre cuando el valor de  $a_w$  es de 0.2. En este mismo valor, la concentración de monooleína y dioléína es la máxima. Por arriba de 0.2, se percibe un aumento de la conversión del sustrato por reacciones de hidrólisis de triglicéridos resultando en una mayor producción de ácidos grasos libres y menor concentración de dioléína y monooleína. Por abajo de 0.2, en  $a_w$  de 0.1, la conversión de trioleína para la síntesis de mono- y diglicéridos es baja después de 72 hrs de reacción.

De los resultados aquí obtenidos se eligió un valor de  $a_w=0.2$ , para llevar a cabo las reacciones de glicerólisis subsecuentes. En este valor, el agua presente en el sistema es suficiente para mantener a la enzima estable y activa, y la síntesis de ácidos grasos libres, provenientes de reacciones de hidrólisis, es mínima.

De este resultado, surge además una observación interesante, la cual nos lleva a plantear la pregunta: ¿a qué se debe la presencia de ácidos grasos a actividades de agua muy bajas, e incluso por qué la concentración de estos es mayor en  $a_w$  de 0.1 que en 0.2?. La respuesta a esto no se definirá en esta sección, ya que constituye parte importante de las evidencias del mecanismo de reacción propuesto, cuyos detalles se discuten en la parte final de este capítulo. Sin embargo, se dejó en claro el por qué 0.2 fue seleccionada como valor de  $a_w$  para llevar a cabo el estudio del efecto de la polaridad del medio en la selectividad de la reacción.

### 7.3 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SOLVENTE EN EL EQUILIBRIO DE LA REACCIÓN

En la revisión bibliográfica se puso en evidencia que para lograr la manipulación de la posición del equilibrio termodinámico de una reacción es requisito fundamental lograr la manipulación de los coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma_i$ ) de las especies que intervienen en la reacción. Esto es factible en la medida que sea posible manipular la forma en que las moléculas interactúan entre sí y con el medio de reacción, es decir, en la medida en que se logran diferentes grados de solvatación para cada compuesto  $i$ .

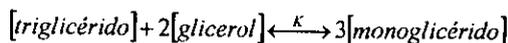
La modificación de la polaridad del medio es una de las estrategias más utilizadas para la modificación de los grados de solvatación de los componentes de un sistema. Estos están relacionados inversamente con el coeficiente de actividad termodinámica de una sustancia específica  $i$  de manera que:

- **Sustancias hidrofílicas poseen bajos coeficientes de actividad en solventes polares y altos en no polares.**
- **Sustancias hidrofóbicas poseen altos coeficientes de actividad en solventes polares y altos en no polares.**

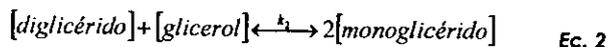
En nuestro sistema de estudio la manipulación de la polaridad del medio fue utilizada como estrategia para lograr diferentes grados de solvatación y por ende diferentes coeficientes de actividad termodinámica de mono-, di- y trioleína. Utilizando esta estrategia fue posible diseñar un medio de reacción en el que fuera posible la síntesis selectiva de

mono- o diglicéridos a través de una reacción de glicerólisis. Para entender a detalle cómo ocurre esto conviene hacer una descripción de las ecuaciones que definen el equilibrio de la reacción en cuestión:

La ecuación global que describe una reacción de glicerólisis en la que la relación estequiométrica glicerol/triglicéridos es 2/1, definida para la síntesis preferencial de monoglicéridos, es:



esta reacción puede ser definida también como dos reacciones secuenciales que satisfacen dos condiciones de equilibrio independientes:



Así, las constantes de equilibrio de las ecuaciones 1 y 2, en términos de las concentraciones de productos y substratos, están definidas por:

$$keq_1 = \frac{[\text{monoglicérido}][\text{diglicérido}]}{[\text{triglicérido}][\text{glicerol}]} \text{ Ec. 3}$$

$$keq_2 = \frac{[\text{monoglicérido}]^2}{[\text{diglicérido}][\text{glicerol}]} \text{ Ec. 4}$$

En términos formales, para soluciones no diluidas conviene expresar las constantes de equilibrio 1 y 2, en términos de las actividades termodinámicas:

$$keq_1 = \frac{(a_{\text{monoglicérido}})(a_{\text{diglicérido}})}{(a_{\text{triglicérido}})(a_{\text{glicerol}})} \text{ Ec. 5}$$

$$keq_2 = \frac{(a_{\text{monoglicérido}})^2}{(a_{\text{diglicérido}})(a_{\text{glicerol}})} \text{ Ec. 6}$$

sustituyendo  $a_i = \gamma_i x_i$  en las ecuaciones 5 y 6.

$$keq_1 = \frac{(x_{\text{monoglicérido}} \gamma_{\text{monoglicérido}})(x_{\text{diglicérido}} \gamma_{\text{diglicérido}})}{(x_{\text{triglicérido}} \gamma_{\text{triglicérido}})(x_{\text{glicerol}} \gamma_{\text{glicerol}})} \text{ Ec. 7}$$

$$keq_2 = \frac{(x_{\text{monoglicérido}} \gamma_{\text{monoglicérido}})^2}{(x_{\text{diglicérido}} \gamma_{\text{diglicérido}})(x_{\text{glicerol}} \gamma_{\text{glicerol}})} \text{ Ec. 8}$$

Por definición, el valor de las constantes de equilibrio es el mismo para cualquier medio utilizado y depende de los valores particulares de las fracciones mol  $x_i$  y de los coeficientes de actividad  $\gamma_i$ . De manera que, para alcanzar el valor de la constante de equilibrio en un medio de reacción polar en el que los monoglicéridos tienen un coeficiente de actividad termodinámica menor que los de triglicéridos y diglicéridos, debe aumentar la fracción mol de monoglicéridos en el sistema. Por el contrario, en un medio de reacción hidrofóbico en el que el coeficiente de actividad termodinámica de esta misma especie es mayor, su acumulación se ve desfavorecida, disminuyendo la fracción mol de monoglicéridos en el equilibrio. Análogamente, en sistemas hidrofóbicos, se favorece una alta concentración de las especies hidrofóbicas (di- y triglicéridos) debido a sus menores  $\gamma_i$ .

Para comprobar esta hipótesis se eligieron diferentes mezclas de solventes miscibles con polaridades diferentes, los solventes utilizados fueron:

1. *n*-hexano. Un solvente altamente hidrofóbico ( $\log P=3.5$ ) que favorece la solvatación de las especies hidrofóbicas como los diglicéridos y triglicéridos y en el que los monoglicéridos no son solubles. Así, en *n*-hexano la dioleína y la trioleína tendrán coeficientes de actividad termodinámica bajos y la monooleína, por el contrario, tendrá un coeficiente de actividad termodinámica alto.
2. 2-metil-2-butanol (2M2B). Un solvente polar ( $\log P=1.3$ ) en el que los diglicéridos y monoglicéridos son poco solubles y los monoglicéridos son altamente solubles. Es decir: la dioleína y trioleína poseen en 2M2B coeficientes de actividad termodinámica altos, mientras que la monooleína tienen un coeficiente de actividad termodinámica bajo. La otra razón para seleccionar 2M2B, es que es un alcohol terciario que no es sustrato para las lipasas pues se sabe que las lipasas son específicas únicamente por alcoholes primarios y secundarios.

Para evaluar un rango de polaridades entre los dos solventes empleados, se utilizaron diferentes mezclas de 2M2B en *n*-hexano (100/0, 50/50, 75/15 y 0/100; V/V 2M2B/*n*-hexano). El objetivo al emplear dichas mezclas era lograr un aumento de polaridad gradual mientras aumentaba la proporción de 2M2B en la mezcla. Las reacciones de glicerólisis se llevaron a cabo en las condiciones de reacción ya descritas (5ml de volumen de reacción, 100mg de enzima, 50mM de trioleína, 2/1 relación molar glicerol/ trioleína, 0.2

$a_w$  enzima y  $a_w$  mezcla silica/glicerol) y fueron analizadas por HPLC. Los resultados de este análisis son los que se muestran en la figura 25.

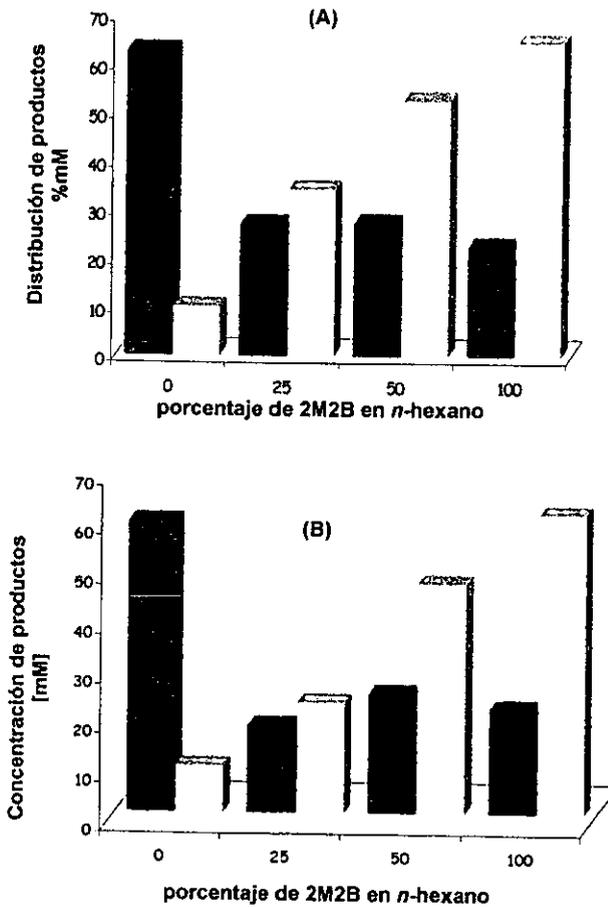


FIGURA 25. Influencia del medio de reacción sobre la distribución al equilibrio de monooleína y dioléina. (A) Distribución de productos en mol%, (B) Concentración de productos en la mezcla final. Condiciones de reacción 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lyozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C, 5ml de volumen de reacción y diferentes porcentajes de 2M2B en *n*-hexano (v/v).

En la figura 25 se puede observar que conforme el porcentaje de 2M2B en *n*-hexano aumenta, la concentración de monoglicéridos también se incrementa hasta llegar a un máximo de 60.5 mM en el sistema 100% 2M2B, lo que constituye el 65% del total de acilglicéridos presentes en la reacción (trioleína, dioleína, monooleína)

Por el contrario, en las mismas condiciones la síntesis de diglicéridos disminuye. Así, en el sistema 100% *n*-hexano la concentración de diglicéridos es la máxima: 50mM lo que representa el 63% del total de acilglicéridos en la mezcla de reacción. En este caso con un incremento de la polaridad del sistema equivalente al 25% de 2M2B la selectividad hacia la síntesis de dioleína disminuye considerablemente.

Un resultado que se desprende de estos experimentos fue el hecho de que la conversión de trioleína aumentó en la medida que aumenta la polaridad del sistema (fig.26)

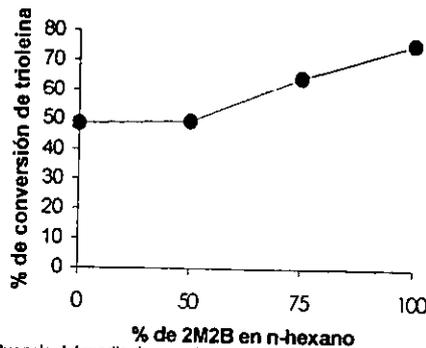


FIGURA 26. Influencia del medio de reacción en el porcentaje de conversión de trioleína a través de glicerólisis enzimática

En la figura 26 se puede observar que la menor conversión de trioleína (48%), se presenta en los sistemas hidrofóbicos (*n*-hexano y 25% de 2M2B). En el sistema más polar (100% 2M2B) se alcanzó la más alta tasa de conversión, equivalente a 76%.

De acuerdo con la predicción de equilibrio planteada, el coeficiente de actividad termodinámica de la trioleína aumenta gradualmente conforme la polaridad del sistema lo hace. Esto genera condiciones desfavorables para la solubilidad de esta especie en los sistemas de mayor polaridad. Bajo esta consideración y bajo la observación planteada para la solubilidad de mono- y diglicéridos, se podría explicar el hecho de que en *n*-hexano poca

trioleína sea transformada en di- y monooleína. Por el contrario, en 100% 2M2B la acumulación de trioleína es desfavorable y por lo tanto esta es transformada en mayor proporción.

Los resultados expuestos nos llevan a proponer que:

- Un sistema favorable para la síntesis de monooleína es un sistema hidrofílico, en el que el menor coeficiente de actividad termodinámica de la monooleína y los mayores coeficientes de actividad termodinámica de dioleína y trioleína, favorecen una alta concentración de monooleína para satisfacer la condición de equilibrio termodinámica. Los valores de conversión obtenidos para la trioleína (76%) y de porcentaje de monooleína acumulado en el sistema (63%) son comparables a los valores más altos reportados en la literatura para sistemas más complejos en los que se requiere de un paso de remoción de monoglicéridos (McNeill *et al*, 1990,1991, 1993)

En este caso se trata de un proceso efectuado en una sola etapa con tiempos de reacción cortos, ya que no se requiere llevar a cabo la reacción a baja temperatura o de una etapa de enfriamiento en la que los monoglicéridos son cristalizados.

Finalmente, el porcentaje de monoglicéridos obtenido a través de una reacción de glicerólisis enzimática en un sistema hidrofílico, es incluso mayor al que se obtiene mediante el método químico (44-45% monoglicéridos).

- El mejor medio para la síntesis de diglicéridos es un medio hidrofóbico, en dicho medio se logra una producción de diglicéridos que constituye el 63% de los acilglicéridos presentes en el sistema, correspondiente a una conversión de sustrato del 40%. A pesar de que la conversión de trioleína no es muy alta, este proceso representa una buena alternativa, ya que hasta la fecha, tal como lo señalan Fureby y colaboradores (1997), los procesos de síntesis selectiva de diglicéridos han sido poco estudiados. Este es el primer reporte en el que, a través de una reacción de glicerólisis enzimática en un medio con solvente orgánico, se demuestra que la síntesis de diglicéridos puede ser selectiva.

En conclusión, manipulando la polaridad del medio de reacción es posible controlar la selectividad de la misma. Así, la síntesis de mono- o diglicéridos puede ser favorecida en tanto que la polaridad del medio sea la apropiada.

#### 7.4 CAMBIO APARENTE DE REGIOESPECIFICIDAD, UNA NUEVA INTERPRETACIÓN

Tal como ha sido definido, el catalizador utilizado durante este proyecto fue Lypozyme<sup>™</sup>, una enzima inmovilizada de *Mucor miehei* definida como *sn*-1,3-específica que actúa principalmente en las posiciones 1 y 3 de las moléculas de triglicérido y glicerol. Al principio de este estudio se planteó que en una reacción de glicerólisis catalizada por esta enzima, la síntesis del isómero *sn*-1,2-diglicérido debería ser mayoritaria, tal como está planteado en la figura 27.

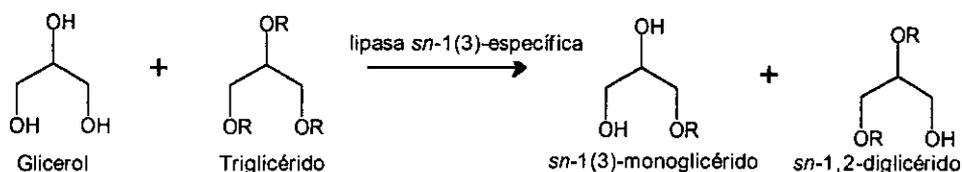


FIGURA 27. Ecuación que describe la glicerólisis de un triglicérido catalizada por una enzima *sn*-1(3)-específica para la obtención de mono- y diglicéridos

Sin embargo, como se observa en la figura 28 existen diferentes perfiles de los isómeros de dioleína de acuerdo a la polaridad del sistema: mientras que la presencia de *sn*-1,2-dioleína aumenta conforme lo hace la proporción de 2M2B en el sistema, el isómero *sn*-1,3-dioleína se sintetiza preferencialmente en el sistema 100% *n*-hexano.

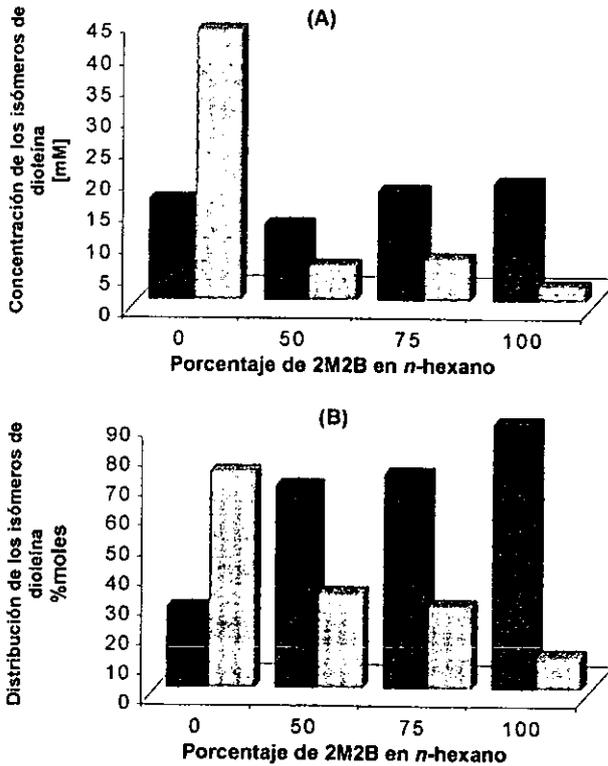


FIGURA 28. Influencia del medio de reacción sobre la distribución al equilibrio de los distintos isómeros de dioleína (*sn*-1,2-dioleína ■ y *sn*-1,3-dioleína ▨). (A) Concentración de productos en la mezcla final. (B) Distribución de productos en mol%. Condiciones de reacción 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lypozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C y diferentes porcentajes de 2M2B en *n*-hexano (v/v).

Con el fin de explicar este cambio de selectividad del sistema, aparentemente inducida por la hidrofobicidad del medio, se llevaron a cabo reacciones de glicerólisis en dos sistemas: 100% *n*-hexano y 100% 2M2B. Los perfiles cinéticos de formación de productos de las reacciones se monitorearon por HPLC. Los resultados se presentan en la figura 29.

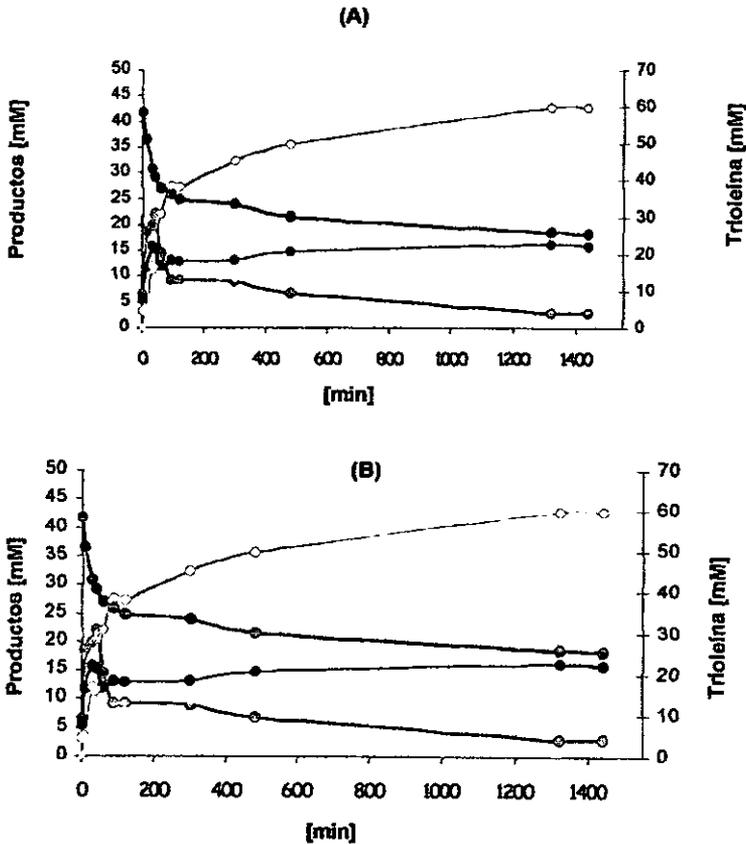


FIGURA 29. Cinética de reacción de la síntesis enzimática de acilglicéridos. (A) cinética en 2M2B, (B) cinética en *n*-hexano. Acido oleico  $\circ$ , monooleína  $\bullet$ , *sn*-1,2-dioleína  $\blacksquare$ , *sn*-1,3-dioleína  $\circ$ , trioleína  $\blacklozenge$ . Condiciones de reacción: 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lysozyme IM, 0.092 g de glicérol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicérol), 40°C y diferentes porcentajes de 2M2B en *n*-hexano (v/v)

Del comportamiento observado de las cinéticas mostradas en la figura 29 y de los balances de materia en cada punto desde  $t=0$  min hasta  $t=1440$  min resulta claro que la producción del isómero *sn*-1,2-dioleína, ocurre mayoritariamente durante la primera hora de reacción en ambos sistemas. La acumulación de *sn*-1,2-dioleína está asociada al aumento en la concentración de ácidos grasos en el medio de reacción y a la disminución de trioleína,

sin duda debido a la acción específica de la enzima sobre la posición 1 de la trioleína. De manera subsecuente, la producción del isómero *sn*-1,3-dioleína, en el sistema 100% *n*-hexano aumenta notablemente después de la primera hora de reacción y está asociada sobre todo al consumo de ácidos grasos como consecuencia de las reacciones de esterificación.

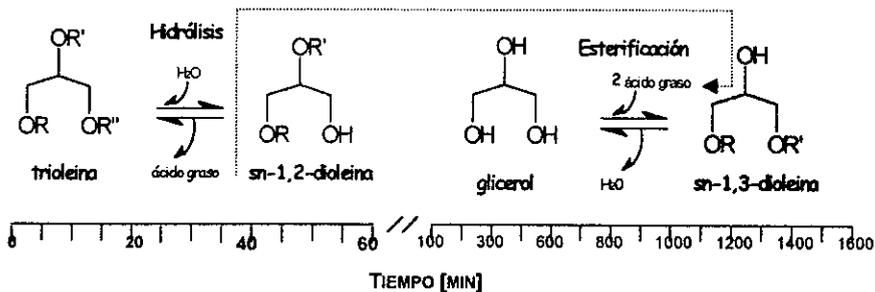


FIGURA 30. Descripción esquemática de la síntesis de los principales productos de la reacción a lo largo de la reacción de glicerólisis en un sistema 100% *n*-hexano.

En 2M2B al igual que en el sistema 100% *n*-hexano, durante la primera hora hay una acumulación del isómero *sn*-1,2-dioleína asociada a reacciones de hidrólisis. Sin embargo, después de este período, y a diferencia de la reacción en *n*-hexano, no se observa un consumo de ácidos grasos libres para la síntesis de *sn*-1,3-dioleína. Por el contrario, en 2M2B después de la primera hora de reacción la acumulación del isómero de dioleína continúa, producto ya sea de la hidrólisis o glicerólisis de trioleína.

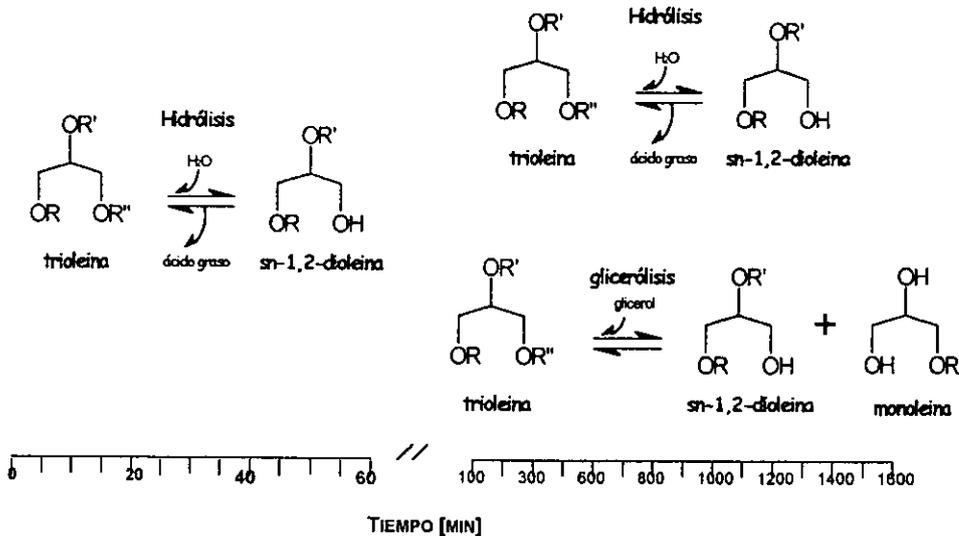
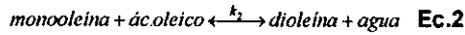
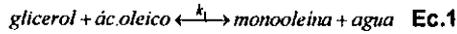


FIGURA 31. Descripción esquemática de la síntesis de los isómeros de dioleína a lo largo de la reacción de glicerólisis en un sistema 100% 2M2B

La producción de *sn*-1,2-dioleína por hidrólisis y glicerólisis, y de *sn*-1,3-dioleína por esterificación, es una evidencia clara de que bajo las condiciones aquí estudiadas la síntesis selectiva de los regioisómeros específicos de dioleína está condicionada al mecanismo de reacción. Este resultado, al menos bajo las condiciones de reacción empleadas, descarta la propuesta hecha por Kuan-Ju y colaboradores (1998), en el sentido de que el “aparente cambio de regioespecificidad” se debe a un cambio estructural provocado por la presencia del solvente particular. Por el contrario, los resultados aquí obtenidos concuerdan con los propuestos por Heisler y colaboradores (1991), quienes aseguran que la síntesis del isómero *sn*-1,3-diglicérido a partir del isómero *sn*-1,2-diglicérido era producto de una sucesión de reacciones de hidrólisis y esterificación catalizadas por una lipasa 1,3-*sn*-específica.

En este mismo sentido, los resultados indican que en el sistema ocurren tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis (esterificación y transesterificación). En estas reacciones los coeficientes de actividad termodinámica de las especies, dependientes del solvente de la reacción, tienen un papel fundamental, pues determinan las posibles reacciones que puedan ocurrir dentro de un sistema específico, condicionando así la especificidad hacia un isómero particular en la reacción.

Para explicar esto, conviene definir y analizar las ecuaciones que describen el equilibrio en una reacción de esterificación entre ácido oleico y glicerol para la producción de acilglicéridos



En el sistema 100% *n*-hexano, el que  $\gamma_{\text{monooleína}}$  sea mayor que el valor de  $\gamma_{\text{dioleína}}$ , favorece una condición de equilibrio que promueve la producción de dioleína, definida por la ecuación dos. En 2M2B, por el contrario, la producción de monooleína, descrita por la ecuación 1, se favorece frente a la producción de dioleína debido al valor de  $\gamma_{\text{dioleína}}$  superior al valor  $\gamma_{\text{monooleína}}$ . Esta es la razón por la que en un sistema hidrofílico como 2M2B no se favorecen las reacciones de esterificación, por las cuales es posible la síntesis del isómero *sn*-1,3-dioleína usando una enzima *sn*-1,3-específica como catalizador de la reacción.

Evidencia de este efecto es el trabajo de síntesis selectiva de diglicéridos en un medio hidrofóbico (*n*-hexano) por reacciones de esterificación llevado a cabo en 1999 por Castillo y colaboradores. Ellos demostraron, tal como se reproduce en la figura 32, que era posible obtener altos niveles de diglicéridos por reacciones de esterificación en un medio con *n*-hexano.

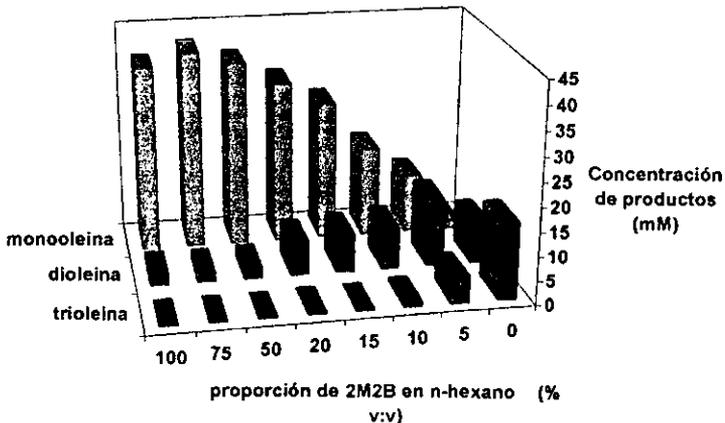


FIGURA 32. Influencia del solvente en el perfil de productos obtenidos a través de una reacción de esterificación entre ácido oleico y glicerol. Tomado de Bellot *et al.*, 2001.

En 2M2B, tal como se observa en la figura 32 y como lo demuestran los resultados en este proyecto, la reacción de síntesis de dioleína a partir de monooleína y ácido oléico está termodinámicamente desfavorecida por el valor inferior de  $\gamma_{\text{monooleína}}$  con respecto al valor de  $\gamma_{\text{dioleína}}$ .

De esta manera, la presencia de un isómero específico está condicionada a la especificidad de la enzima y a la reacción por la que ocurra su síntesis.

Se probó aquí que la reacción estudiada, en la que se utilizan trioleína y glicerol, y que se lleva a cabo en un medio hidrofóbico (100% *n*-hexano) es favorable para la síntesis del isómero *sn*-1,3. Este resultado es relevante dada la importancia que tiene este regioisómero específico como intermediario sintético en la industria química y debido a que existen pocos reportes con relación a su (Millqvist *et al.*, 1997).

Se probó también que la síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína se favorece frente a la síntesis del isómero *sn*-1,3 en un sistema en el que se favorecen las reacciones de hidrólisis, como en 2M2B. Sin embargo, este es un medio en el que no se favorecen concentraciones altas de diglicéridos en el equilibrio, ya que como fue probado es un medio selectivo para monoglicéridos, de manera que no resulta el sistema más adecuado para la acumulación de *sn*-1,2. La propuesta es, si se requiere obtener altas concentraciones de *sn*-1,2-diglicéridos: trabajar en medios hidrofóbicos selectivos para la acumulación de diglicéridos, en condiciones de hidrólisis (de alta actividad de agua) con una enzima *sn*-1(3)- específica<sup>1</sup>.

Por último, los resultados obtenidos aquí nos llevan no solo a plantear las condiciones de reacción que favorecen la síntesis de diglicéridos específicos, sino también a proponer que en muchas reacciones aparentemente de glicerólisis, en realidad ocurren reacciones de hidólisis y síntesis. **La glicerólisis sería entonces el resultado de una combinación de reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación.**

Es decir, lo que en la literatura se considera una reacción de glicerólisis enzimática parece no ser siempre una reacción exclusiva de transesterificación en la que los grupos acilo son transferidos directamente a los grupos oxhidrilo del glicerol, sino que es acompañada por una sucesión de reacciones de hidrólisis de triglicéridos y de la esterificación de los ácidos grasos libres con glicerol. La proporción de estas reacciones son función de  $a_w$  y de la naturaleza del solvente de la reacción.

---

<sup>1</sup> En el estudio del efecto de la actividad de agua sobre la reacción se retoma esta afirmación. El objetivo es confirmar que es posible en un medio con *n*-hexano a altas actividades de agua sintetizar altas concentraciones de *sn*-1,2-diglicéridos.

Algunos investigadores han demostrado que las reacciones de transesterificación enzimática ocurren a través de reacciones de hidrólisis y esterificación catalizadas enzimáticamente (Schuch *et al.*, 1989; Heisler *et al.*, 1991). En 1995 Ferreira-Díaz y Fonsaca definieron por primera vez a la glicerólisis como una sucesión de reacciones de hidrólisis y esterificación; la evidencia experimental por la que llegaron a esta conclusión fue la presencia de ácidos grasos libres en medios de muy baja actividad de agua en los sistemas en los que los substratos iniciales eran glicerol y triglicérido.

En este proyecto, las cinéticas de reacción evaluadas en intervalos de tiempos cortos y los balances de materia puntuales son las evidencias experimentales que nos permiten afirmar que efectivamente, en la glicerólisis ocurren, además de la transesterificación, reacciones sucesivas de hidrólisis y síntesis.

## 7.5 EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA EN EL MEDIO DE REACCIÓN

Hemos ya definido la actividad de agua óptima para los sistemas de reacción aquí estudiados en términos de aquella que permite conservar a la enzima estable y activa, y en cuyo valor las reacciones de hidrólisis y con esto la concentración de ácidos grasos al final de la reacción fuera la mínima posible.

Sin embargo, si consideramos que hemos planteado a la glicerólisis como una sucesión de reacciones de hidrólisis, esterificación y transesterificación, un estudio detallado de la actividad de agua no sólo debe considerar su efecto en el perfil de productos presentes al final de la reacción, sino también debe incluir el efecto de la actividad de agua en el control de la cinética de la reacción en términos de las reacciones que ocurren en el sistema. De esta manera, tal como se verá, será posible obtener más evidencias para reforzar la teoría del mecanismo propuesto por el que ocurre la glicerólisis y de los mecanismos que controlan la síntesis de isómeros específicos de acilglicéridos.

Con el objetivo de llevar a cabo un estudio minucioso sobre el efecto de la actividad de agua en el medio de reacción, se llevaron a cabo cinéticas en *n*-hexano y en 2M2B. En cada caso la enzima y la mezcla glicerol/silica, como en el caso de la determinación de la actividad de agua óptima, fueron ajustadas a cuatro valores distintos de  $a_w$  empleando

soluciones saturadas de LiCl ( $a_w=0.1$ ), LiBr ( $a_w=0.2$ ), MgCl ( $a_w=0.33$ ) y Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ( $a_w=0.53$ ) durante el tiempo necesario para que la mezcla glicerol/silica y la enzima alcanzaran un porcentaje de agua constante. De esta manera se contaba con ocho reacciones diferentes, cuatro con *n*-hexano, cada una de ellas con la enzima y mezcla silica/glicerol ajustada a una actividad de agua distinta, y cuatro con 2M2B, cada una, al igual que el caso de *n*-hexano, ajustadas a una  $a_w$  distinta.

El curso de todas las reacciones fue analizado por HPLC. Los resultados de este análisis se presentan a continuación:

En todos los sistemas la cinética de reacción dependió del valor de  $a_w$ . Como se observa en la figura 33 la velocidad inicial de producción de ácido oleico, tanto en los sistemas con *n*-hexano como en los sistemas con 2M2B, es mayor conforme la actividad de agua aumenta. En efecto, independientemente del solvente utilizado a valores altos de actividad de agua, el agua disponible como sustrato para las reacciones de hidrólisis aumenta considerablemente, aumentando así la producción de ácido oleico.

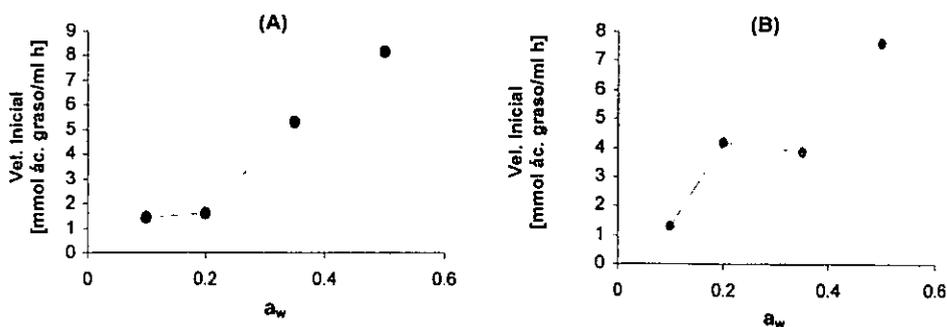


FIGURA 33. Velocidades iniciales de producción de ácido oleico en distintos valores de  $a_w$ . (a) sistema 100% *n*-hexano, (b) sistema 100% 2M2B. Condiciones de reacción :0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lipozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a silica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C .

Como se observa, incluso a un valor muy bajo de actividad de agua (0.1) existe liberación de ácidos grasos libres (alrededor de 1.3 mmol/ml h, en ambos sistemas).

Este incremento en la velocidad inicial de liberación de ácido oleico por efecto del aumento en la actividad de agua en el medio, por un lado es una demostración del hecho de que es difícil no tener hidrólisis en reacciones de glicerólisis sin importar la polaridad del solvente. Y por otro lado, está directamente relacionado con un incremento en la velocidad

de producción del isómero *sn*-1,2-dioleína (fig 34). Este resultado confirma que la síntesis del isómero *sn*-1,2-diglicérido es resultado de reacciones de hidrólisis de triglicéridos.

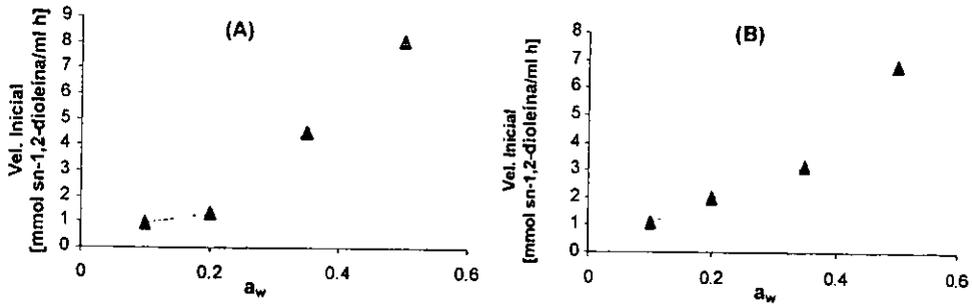


FIGURA 34. Velocidades iniciales de síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína en distintos valores de  $a_w$ . (A) sistema 100% *n*-hexano, (B) sistema 100% 2M2B. Condiciones de reacción: 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lypozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C.

A pesar de que en *n*-hexano y en 2M2B la velocidad de producción de *sn*-1,2-dioleína está asociada a la velocidad de liberación de ácido oleico, en 2M2B esta asociación no es perfecta (figs. 33b y 34b) esto se debe a que, como ha sido demostrado, en este medio se favorece el consumo de dioleína para la síntesis de monooleína.

Otros autores (Ferreira-Dias y Fonseca, 1995) han ya relacionado un aumento de la velocidad de síntesis de diglicéridos con un aumento de la actividad de agua del sistema. Una aportación importante de este trabajo es que sólo cuando se realiza un estudio detallado de la síntesis de cada uno de los isómeros de diglicéridos a través de todo el curso de la reacción, particularmente al inicio de ésta, es posible distinguir las reacciones de las cuales provienen los *sn*-1,2 que, como se ha visto, son diferentes de aquellas por las que se obtiene el isómero *sn*-1,3.

Efectivamente, con el aumento de la actividad de agua aumenta la velocidad de las reacciones de hidrólisis y con esto la velocidad de síntesis de los *sn*-1,2-diglicéridos. Este comportamiento es totalmente diferente para el caso de los *sn*-1,3-diglicéridos (fig. 35):

En *n*-hexano, tal como ya fue definido hay un valor óptimo de  $a_w$  (0.2), en el que las reacciones de síntesis se favorecen frente a las de hidrólisis. En la figura 36 se presentan los valores iniciales de producción de *sn*-1,3-dioleína en ambos solventes, observándose que cuando  $a_w$  es igual a 0.2, la velocidad de producción de *sn*-1,3-dioleína es la mayor (3.8

mmol/ml h). Los valores bajos de la velocidad de producción del isómero *sn*-1,3 en condiciones en las que hay hidrólisis (ver fig. 33) es una evidencia más para establecer que la producción de las moléculas de *sn*-1,3-diglicéridos deriva de reacciones de esterificación catalizadas por una enzima *sn*-1(3)-específica.

Adicionalmente en 2M2B las velocidades de producción de *sn*-1,3-dioleína siempre son bajas. La razón de esto, es porque, como ya ha sido demostrado, la producción de diglicéridos en sistemas hidrofílicos está termodinámicamente desfavorecida.

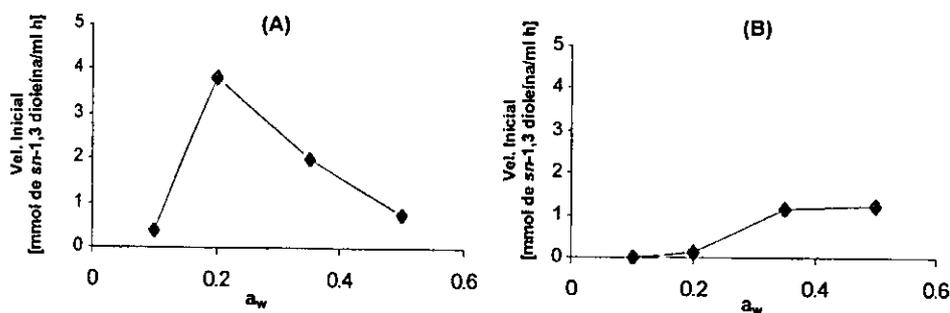


FIGURA 35. Velocidades iniciales de síntesis de *sn*-1,3-dioleína en distintos valores de  $a_w$ . (A) sistema 100% *n*-hexano, (B) sistema 100% 2M2B. Condiciones de reacción :0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lypozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C.

En términos de la acumulación de monooleína, ya ha sido demostrado que *n*-hexano no es un medio favorable para la síntesis de este producto, lo que se refleja en valores bajos de velocidad inicial de producción a cualquier actividad de agua (fig. 36.A). Por el contrario, en 2M2B (fig. 36.B), sistema en el que se favorece la síntesis de los monoglicéridos, la velocidad de producción de monooleína alcanza su máximo valor (4.8 mmol/ ml h) en condiciones en las que se favorecen las reacciones de síntesis. En esta misma gráfica se nota que a actividades de agua mayores a 0.2 (0.35 y 0.5), las velocidades iniciales de producción son muy cercanas a su valor óptimo (3.8 y 4.0 mmol/ ml h). De aquí podría suponerse que aunque la mayor parte de la monooleína parece venir de reacciones de esterificación, ciertamente también se sintetiza por reacciones de hidrólisis de dioleína y no se descarta el hecho de que pudiera ser también producto de la transesterificación.

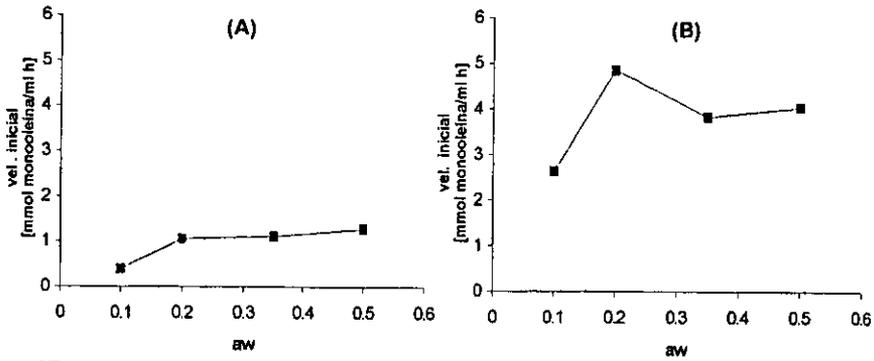


FIGURA 37. Velocidades iniciales de síntesis de monooleína en distintos valores de  $a_w$  (a) sistema 100% *n*-hexano, (b) sistema 100% 2M2B. Condiciones de reacción :0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lipozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C .

Finalmente, si comparamos las distribuciones al equilibrio de productos y sustratos, tanto en el sistema con *n*-hexano como en sistema con 2M2B, para los diferentes valores de  $a_w$  probados, veremos que los resultados obtenidos son una evidencia más de lo que aquí se ha propuesto.

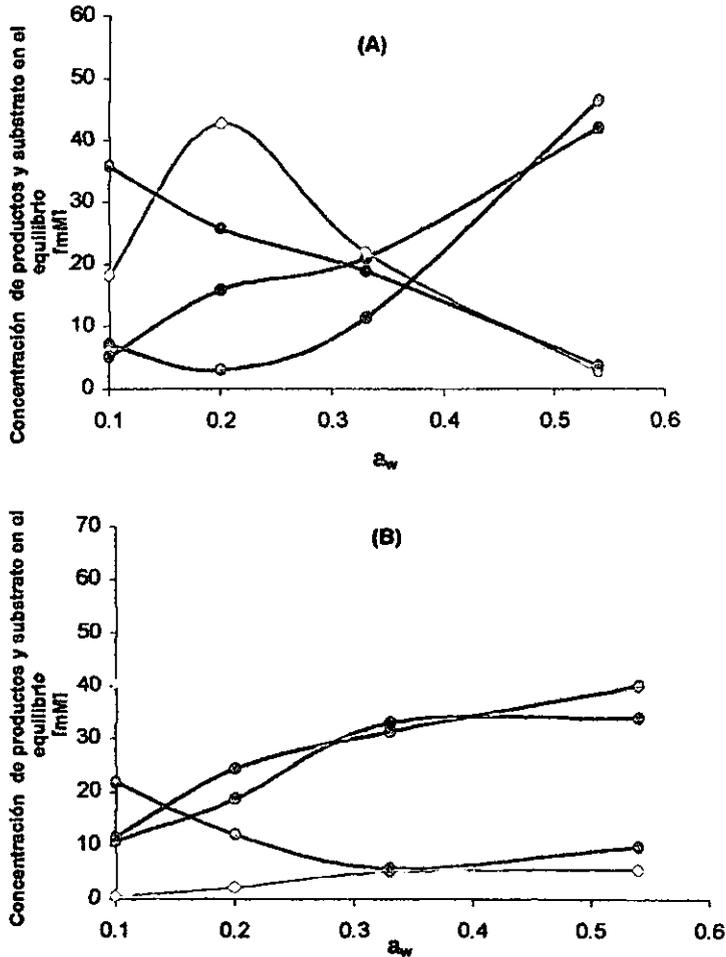


FIGURA 37. Concentraciones al equilibrio de ácido oleico ○, monooleína ●, sn-1,2-dioleína ◻, sn-1,3-dioleína ◇ y trioleína ◼ en función de diferentes valores de  $a_w$ . Condiciones de reacción: 0.25mmol de trioleína, 0.1g de Lysozyme IM, 0.092 g de glicerol adsorbido a sílica gel (0.5mmol de glicerol), 40°C. (A) sistema con *n*-hexano, (B) sistema con 2M2B.

En la figura 37 se observa que tanto en el sistema con *n*-hexano, como en el sistema con 2M2B, hay un aumento de la concentración en el equilibrio del isómero de sn-1,2-dioleína conforme la actividad de agua aumenta. Esto concuerda con la teoría de que este isómero es producto principalmente de la hidrólisis de trioleína.

La concentración más alta de este isómero en el equilibrio se obtienen en el sistema con *n*-hexano en la mayor actividad de agua probada (0.5). De este resultado es posible concluir que el sistema que resulta óptimo para la síntesis de *sn*-1,2-dioleína es un sistema en condiciones de reacción de hidrólisis en un medio hidrofóbico como *n*-hexano.

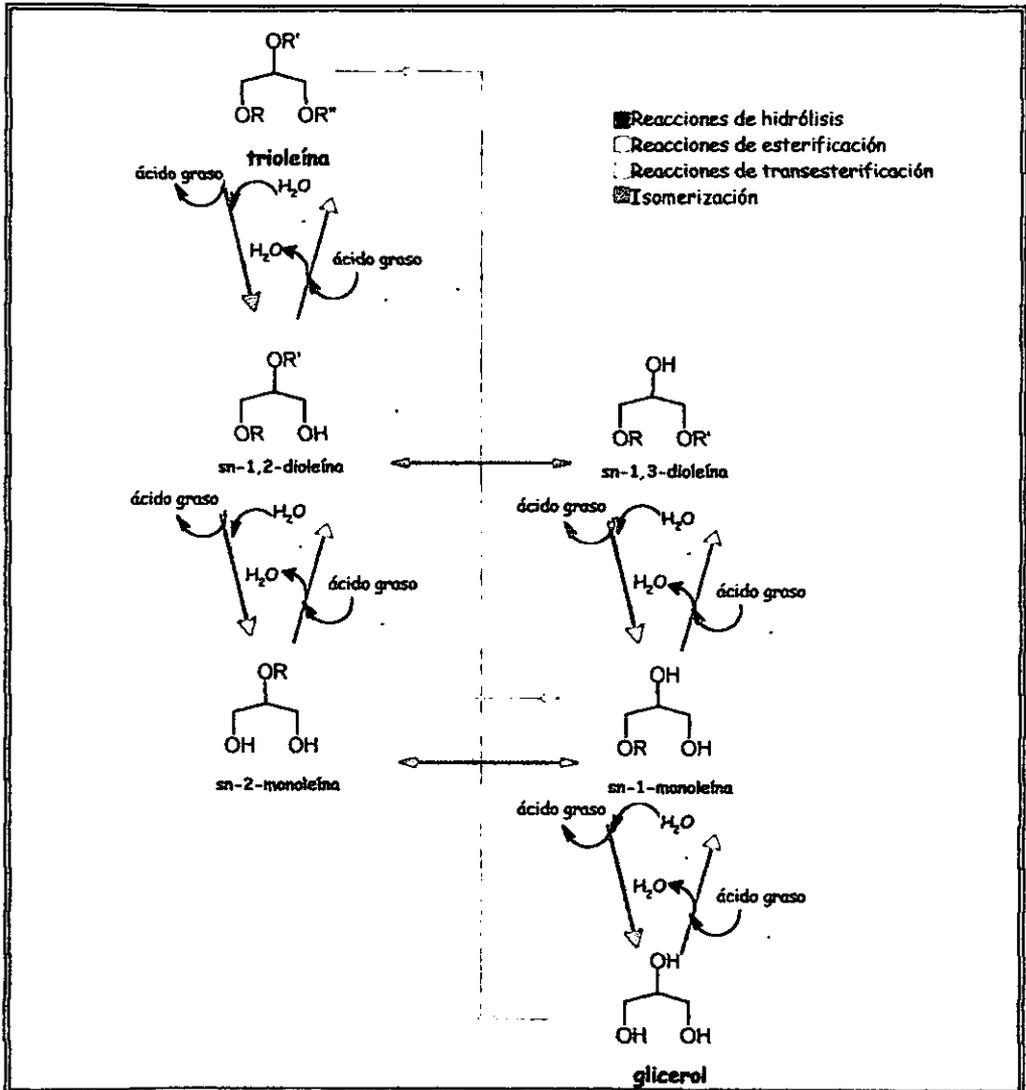
Las gráficas de equilibrio en función de la actividad de agua aquí mostradas, son también una evidencia más para demostrar que en condiciones de  $a_w$  (0.2) donde las reacciones de síntesis se favorecen frente a las de hidrólisis, las concentraciones de monooleína en *n*-hexano y *sn*-1,3-dioleína en 2M2B son las más altas que se obtienen. Esto concuerda con lo ya también definido: la mayor parte del isómero *sn*-1,3-dioleína y de la monooleína proviene de reacciones de esterificación.

Sin embargo y tomando en cuenta su presencia a actividades de agua altas no podemos descartar de que sean producto de reacciones de transesterificación o de reacciones de isomerización.

#### GLICERÓLISIS: SISTEMA DE MÚLTIPLES REACCIONES.

A partir de las cinéticas de reacción con las que se demuestra que la producción de los isómeros de dioleína ocurre por reacciones diferentes, y de los resultados obtenidos del estudio detallado del efecto de la actividad de agua en *n*-hexano, existen las evidencias suficientes para proponer un modelo con las diversas reacciones que ocurren en un sistema en el que los substratos iniciales son trioleína y glicerol y en las que el catalizador es una lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei sn*-1,3-específica. Este modelo se plantea en la figura 38.

ESTA TESIS NO FUE  
DE LA BIBLIOTECA



**FIGURA 38** Esquema propuesto de las principales reacciones catalizadas por Lyozyme IM, una lipasa sn-1,3-específica de *Rhizomucor miehei*, en un sistema en el que se utilizan glicerol y trioleína como substratos iniciales de la reacción, comúnmente denominada glicérolisis

En la figura 38 se plantea que, por un lado, la enzima cataliza reacciones de hidrólisis de ácidos grasos esterificados en la posición 1(3) de la molécula de trioleína, para la síntesis de *sn*-1,2-dioleína y *sn*-2-monooleína. Por otro lado, la enzima cataliza reacciones de esterificación entre los ácidos grasos libres y las posiciones *sn*-1(3) del glicerol. Por esta ruta de esterificación es posible la síntesis del *sn*-1(3)-monooleína y *sn*-1,3-dioleína. Aunado a esto se propone la producción de *sn*-1,2-dioleína y *sn*-1(3)-monooleína por transesterificación entre la trioleína y el glicerol. Finalmente, en el esquema se incluye a la isomerización entre los isómeros *sn*-2 y *sn*-1-monooleína y entre los isómeros *sn*-1,2-dioleína y *sn*-1,3-dioleína, reacciones que son necesarias para lograr la síntesis de trioleína a partir de *sn*-1,3-dioleína o para lograr la producción de glicerol a partir de *sn*-1,2-dioleína.

## 8.0 CONCLUSIONES GENERALES

- Durante este proyecto se definió que el método de HPLC útil para la cuantificación de una reacción de glicerólisis de trioleína es el basado en el de Ergon y André (1989) con una modificación en el gradiente de flujo descrito en el anexo.
- Se comprobó la eficacia del método de adsorción del glicerol a un soporte de sílica, ya antes probado por Berger y Schneider (1992) y por Castillo y colaboradores (1999), para resolver el problema de la insolubilidad del glicerol en medios de reacción orgánicos.
- Se definió que 0.2 es la actividad de agua óptima que, en las condiciones de reacción en las que se llevaron a cabo los experimentos durante este proyecto, favorece las reacciones de síntesis frente a las de hidrólisis
- Se verificó que el perfil de productos en el equilibrio, de una reacción en la que se utilizan trioleína y glicerol como sustratos iniciales, depende del solvente utilizado. En este sentido se definió que en un medio hidrofóbico (100% *n*-hexano) se favorece la síntesis selectiva de diglicéridos y que un medio hidrofílico (100% 2M2B) se obtienen los rendimientos más altos de monoglicéridos.
- Los valores de conversión obtenidos para la trioleína (74%) y de porcentaje de monooleína acumulado en el sistema (63%) son comparables a los valores más altos reportados para sistemas en los que se requiere de un paso de remoción de monoglicéridos. Asimismo el porcentaje de monoglicéridos obtenido aquí, a través de una reacción de glicerólisis enzimática en un sistema hidrofílico, es ventajoso al compararlo con los que se obtienen por el método químico (44-45% monoglicéridos).
- Se probó, mediante el estudio cinético de la reacción, que la producción de un isómero particular de dioleína está condicionada a la especificidad de la enzima y a la reacción que ocurre en el sistema. En este sentido se comprobó que la síntesis de *sn*-1,2-dioleína ocurre principalmente a través de la hidrólisis de triglicéridos catalizada por una lipasa *sn*-1,3-específica y que la síntesis del isómero *sn*-1,3 a través de la esterificación de ácidos

grasos con los grupos oxhidrilo del glicerol catalizada también por una lipasa *sn*-1,3-específica.

- Puesto que en 2M2B se favorece la síntesis del isómero de dioleína *sn*-1,2 y en *n*-hexano, por el contrario, se favorece la síntesis del isómero *sn*-1,3, se propuso y se comprobó que la polaridad del sistema de reacción define condiciones termodinámicas particulares que permiten que se lleve a cabo ya sea la hidrólisis de acilglicéridos o la esterificación de ácidos grasos en los grupos hidroxilo del glicerol.
- Se demostró que un incremento en el valor de  $a_w$  está asociado a un aumento en la producción de ácidos grasos libres y del isómero *sn*-1,2-dioleína. Este resultado confirma que la síntesis del isómero *sn*-1,2-diglicérido ocurre a través de la hidrólisis de triglicéridos catalizada por una enzima *sn*-1,3-específica.
- Se demostró que en condiciones de hidrólisis disminuye la síntesis del isómero *sn*-1,3 de dioleína. Esta es una evidencia más para establecer que la producción de las moléculas de *sn*-1,3-diglicéridos deriva de reacciones de esterificación.
- A partir de las cinéticas de reacción con las que se demuestra que la producción de los isómeros de dioleína ocurre por reacciones diferentes y de los resultados obtenidos del estudio detallado del efecto de la actividad de agua, se obtuvieron las evidencias suficientes para definir a la glicerólisis como un sistema de múltiples reacciones, en el que ocurren reacciones simultáneas de hidrólisis de acilglicéridos, esterificación, transesterificación e isomerización.

## 9.0 PERSPECTIVAS

Los resultados aquí obtenidos demuestran que es posible manipular una reacción de glicerólisis enzimática para la síntesis de acilglicéridos específicos. Esto se ha hecho a través de la manipulación del medio de reacción mediante el uso de solventes orgánicos. Sin embargo, hace falta evaluar el efecto de la temperatura de reacción, relación molar triglicérido/glicerol y tipo de lipasa. La optimización de estas variables es parte del diseño de un proceso por el que se pueden obtener rendimientos aún más altos de los reportados en este trabajo.

Las estrategias y la vía utilizadas en este proyecto para la síntesis de acilglicéridos constituyen una forma para el aprovechamiento de aceites y grasas naturales, en este sentido, sería interesante llevar a cabo un estudio detallado de una reacción de glicerólisis usando como substrato, además del glicerol, un aceite o grasa disponible en la naturaleza. Esto es una posible manera para la revalorización de estos substratos.

Por otro lado, sería interesante diseñar un método de purificación de productos, implementar un método de remoción del solvente, proponer y diseñar un método de control de actividad de agua para llevar a cabo la reacción a gran escala y evaluar la rentabilidad del proceso a nivel industrial.

Finalmente, la utilización de compuestos marcados radioactivamente es una técnica para corroborar que la glicerólisis, tal como se ha propuesto en este proyecto, ocurre a través de diversas reacciones.

El método de HPLC usado en la cuantificación de las reacciones de glicerólisis está basado en el utilizado por Ergon y André (1989) para la detección de ácido oléico, monooleína, dioleína y trioleína.

Dicho método se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Detector UV a 206nm.
- Columna Spherisob ODS-2.
- Fase móvil acetona acetonitrilo 50:50.
- Gradiente de flujo descrito en la tabla 8.

TABLA 8. Gradiente de flujo utilizado en el método de de Ergon y André (1989) para la separación de ácido oléico, monooleína, dioleína y trioleína

tiempo [min]	flujo [ml/min]
0	8
6	8
10	4
21	4
25	0.8
30	0.8

Durante el desarrollo del método adecuado para cumplir con los objetivos de este proyecto fue necesario llevar a cabo un ajuste al gradiente de flujo utilizado por Ergon y André. De esta manera fue posible la cuantificación de los isómeros de dioleína.

El gradiente de flujo que nos resulto útil es el que se presenta en la tabla siguiente.

El método de HPLC usado en la cuantificación de las reacciones de glicerólisis está basado en el utilizado por Ergon y André (1989) para la detección de ácido oleico, monooleína, dioleína y trioleína.

Dicho método se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Detector UV a 206nm.
- Columna Spherisob ODS-2.
- Fase móvil acetona acetonitrilo 50:50.
- Gradiente de flujo descrito en la tabla 8.

TABLA 8. Gradiente de flujo utilizado en el método de de Ergon y André (1989) para la separación de ácido oleico, monooleína, dioleína y trioleína

tiempo [min]	flujo [ml/min]
0	8
6	8
10	4
21	4
25	0.8
30	0.8

Durante el desarrollo del método adecuado para cumplir con los objetivos de este proyecto fue necesario llevar a cabo un ajuste al gradiente de flujo utilizado por Ergon y André. De esta manera fue posible la cuantificación de los isómeros de dioleína.

El gradiente de flujo que nos resulto útil es el que se presenta en la tabla siguiente.

TABLA 9. Gradiente de flujo utilizado en la cuantificación de ácido oleico, monooleína, dioleína y trioleína presentes en el medio de reacción

tiempo [min]	Flujo [ml/min]	Acetona/acetonitrilo [v/v]
0	0.5	50/50
2	0.5	50/50
5	0.5	40/60
12	0.5	40/60
14	3.0	40/60
18	3.0	40/60
23	0.5	50/50

El perfil cromatográfico obtenido mediante este método se presenta en la figura 39.

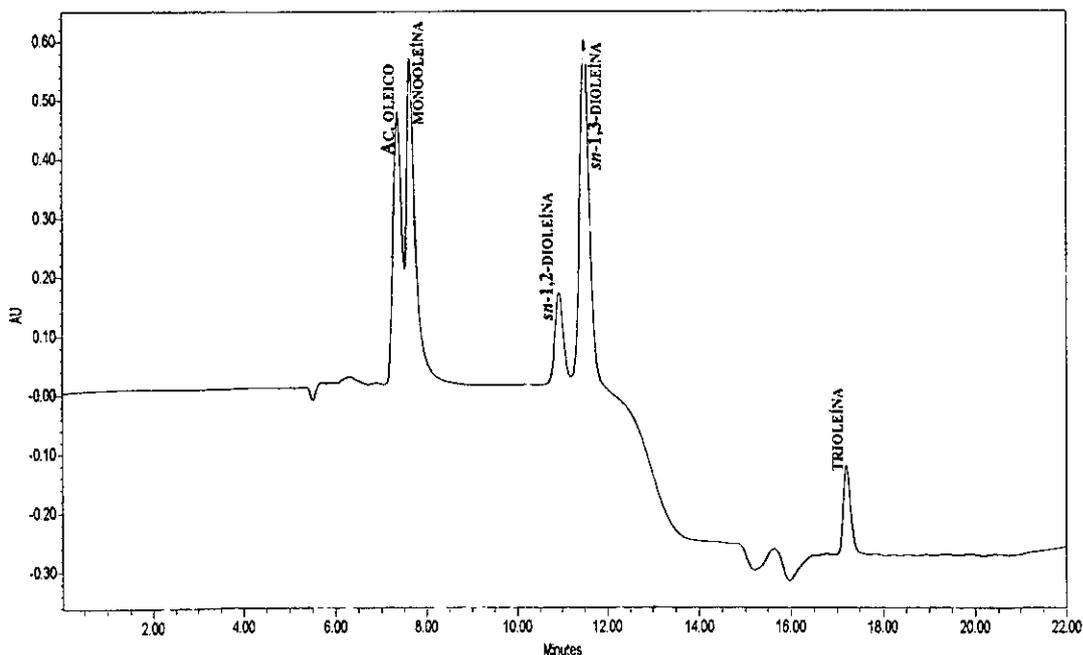


FIGURA 39. Ejemplo del perfil cromatográfico obtenido por HPLC para la separación de una mezcla de ácido oleico, monooleína, sn-1,2-dioleína, sn-1,3-dioleína y trioleína con un controlador de flujo Waters 600E con control de temperatura ajustado a 45°C, un detector UV/VIS Waters 486 a 206nm, una columna C<sub>18</sub> de fase reversa Spherisorb 80-15 ODS-2 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6mm) y con un gradiente de flujo descrito en la tabla 9.

Tal como se observa a través del método fue posible, además de la detección de ácido oleico monooleína, dioleína, trioleína y dioleína, la separación de los dos isómeros de dioleína (*sn*-1,2-dioleína y *sn*-1,3-dioleína).

**TABLA 1**

Valores de regioespecificidad (RE) determinados para diferentes lipasas. Fuente: (Berger & Schneider, 1991).

**TABLA 2**

Ejemplos de productos obtenidos por reacciones de hidrólisis enzimática catalizadas por lipasas.

**TABLA 3**

Ejemplos de productos obtenidos por reacciones de síntesis enzimática catalizadas por lipasas.

**TABLA 4**

Descripción de las estrategias implementadas para lograr medios de baja actividad de agua.

**TABLA 5**

Reacciones de esterificación de ácido oleico con glicerol para síntesis de acilglicéridos.

**TABLA 6**

Reacciones de glicerólisis reportadas en función de diferentes condiciones de reacción.

**TABLA 7**

Comparación del equilibrio entre un sistema con glicerol adsorbido sobre sílica.

**TABLA 8**

Gradiente de flujo utilizado en el método de de Ergun y André (1989) para la separación de ácido oleico, monooleína, dioleína y trioleína.

**TABLA 9**

Gradiente de flujo utilizado en la cuantificación de ácido oleico, monooleína, dioleína y trioleína presentes en el medio de reacción.

- FIGURA 1.**  
Representación esquemática de la estructura general de los acilglicéridos.
- FIGURA 2.**  
Glicerol estereoespecíficamente numerado.
- FIGURA 3**  
Estructura general de una molécula de triglicérido.
- FIGURA 4**  
Estructura general de los isómeros de monoglicéridos y diglicéridos.
- FIGURA 5**  
Representación esquemática de uno de los isómeros de monoglicéridos succinilados resultado de la reacción entre ácidos succínico y monoglicéridos.
- FIGURA 6**  
Representación esquemática de uno de los isómeros de monoglicéridos acetilados resultado de la reacción entre ácido acético anhidro y monoglicéridos.
- FIGURA 7**  
Representación esquemática de una molécula surfactante.
- FIGURA 8**  
Arreglos moleculares de acilglicéridos en distintas mesofases.
- FIGURA 9**  
Representación estructural de la forma cerrada de una lipasa.
- FIGURA 10.**  
Representación estructural de la forma abierta de una lipasa.
- FIGURA 11**  
Plegamiento común de las lipasas. .
- FIGURA 12**  
Mecanismo de catálisis propuesto para las lipasas.
- FIGURA 13**  
Mecanismo propuesto por Heisler para la transformación del isómero *sn*-1,2-dioleína en su isómero *sn*-1,3.
- FIGURA 14**  
Mecanismo propuesto por Heisler para la síntesis de *sn*-1,2-dioleína a partir de *sn*-1(3)-monooleína.
- FIGURA 15**  
Reacciones más comunes catalizadas por las lipasas.

**FIGURA 16**

Representación esquemática de distintos sistemas de reacción en reacciones catalizadas por lipasas.

**FIGURA 17**

Perfil típico de  $a_w$  vs actividad enzimática en reacciones catalizadas por lipasas.

**FIGURA 18**

Representación esquemática de la síntesis de acilglicéridos por hidrólisis de triglicéridos.

**FIGURA 19**

Representación esquemática de la síntesis de acilglicéridos por esterificación de ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos con glicerol.

**FIGURA 20**

Representación esquemática de la síntesis de acilglicéridos mediante una reacción de glicerólisis.

**FIGURA 21**

Representación esquemática del efecto de sílica gel en un medio de reacción.

**FIGURA 22**

Representación esquemática de la técnica para equilibrar  $a_w$  a un valor constante.

**FIGURA 23**

Análisis cualitativo comparativo entre una reacción de glicerólisis con glicerol adsorbido a sílica y con glicerol no adsorbido a sílica.

**FIGURA 24**

Influencia de la actividad de agua inicial sobre la producción de ácido oleico, monooleína y dioleína, así como sobre el consumo de trioleína por glicerólisis enzimática.

**FIGURA 25**

Influencia del medio de reacción sobre la distribución al equilibrio de monooleína y dioleína. Productos sintetizados por glicerólisis enzimática.

**FIGURA 26**

Influencia del medio de reacción en el porcentaje de conversión de trioleína a través de glicerólisis enzimática.

**FIGURA 27**

Ecuación que describe la glicerólisis de un triglicérido catalizada por una enzima *sn*-1(3)-específica para la obtención de mono y diglicéridos.

**FIGURA 28**

Influencia del medio de reacción sobre la distribución al equilibrio de los distintos isómeros de dioleína (*sn*-1,2, dioleína y *sn*-1,3-dioleína).

**FIGURA 29**

Cinética de reacción de la síntesis enzimática de acilglicéridos.

**FIGURA 30**

Descripción esquemática de la síntesis de los isómeros de *sn*-1,2-dioleína a lo largo de la reacción de glicerólisis en un sistema 100% *n*-hexano.

**FIGURA 31**

Descripción esquemática de la síntesis de los isómeros de dioleína a lo largo de la reacción de glicerólisis en un sistema 100% 2M2B.

**FIGURA 32**

Influencia del solvente en el perfil de productos obtenidos a través de una reacción de esterificación entre ácido oleico y glicerol. Tomado de Castillo et al 2001.

**FIGURA 33**

Velocidades iniciales de producción de ácido oleico en distintos valores de  $a_w$ .

**FIGURA 34**

Velocidades iniciales de síntesis del isómero *sn*-1,2-dioleína a diferentes valores de  $a_w$ .

**FIGURA 35**

Velocidades iniciales de síntesis de *sn*-1,3-dioleína a diferentes valores de  $a_w$ .

**FIGURA 36**

Velocidades iniciales de síntesis de monooleína a diferentes valores de  $a_w$ .

**FIGURA 37**

Concentraciones al equilibrio de ácido oleico, monooleína, *sn*-1,2-dioleína, *sn*-1,3-dioleína y trioleína en función de diferentes valores de  $a_w$ .

**FIGURA 38**

Esquema de reacciones catalizadas por Lypozyme IM, una lipasa *sn*-1,3-específica de *Rhizomucor miehei*, en un sistema en el que se utilizan glicerol y trioleína como sustratos iniciales de la reacción.

**FIGURA 39**

Ejemplo del perfil cromatográfico obtenido por HPLC para la separación de una mezcla de ácido oleico, monooleína, sn-1,2-dioleína, sn-1,3-dioleína y trioleína.

- Andree, H.; Muller, W.R. and Schmid R.D. (1980).  
Lipases as Detergent Components.  
*J. Appl. Biochem.* 2,218-229.
- Anónimo. (1992).  
*Food Aditives. U.S. Products, Applications, Markets.* Technomic Publishing Co.
- Arcos, J.A. and Otero, C. (1996).  
Enzyme, Medium and Reaction Engineering to Design a Low-Cost Selective Production Method for Mono- and Dioleoylglycerols.  
*J. Am. Oil Chem Soc.* 73,673-682.
- Arnold, R.G.; Shahani, K.M. and Dwivedi, B.K. (1975).  
Application of Lypolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products.  
*J. Dairy Sci.* 58, 1127-1143.
- Bailey, J. E. and Ollis. (1986).  
*Applied Enzyme Catalysis in Biochemical Engineering Fundamentals.*  
Edn. McGraw-Hill. New York, pp 157-227
- Baumann, H.; Büler, M.; Fochem, H.; Hirsinger, F.; Zobelein, H. and Falbe, J. (1988).  
Natural Fats and Oils-Renewable Raw Materials for the Chemical Industry.  
*Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 27, 41-46.
- Bellot, J. C.; Vhoidnstf, L.; Castillo, E. and Marty, A. (2001).  
Combining Solvent Engineering and Thermodynamic Modeling to Enhance Selectivity During Monoglyceride Synthesisi by Lipase-Catalyzed Esterification.  
*Enzyme. Microb. Technol.* 28, 362-369
- Berger, M. and Schneider, M.P. (1991).  
Regioselectivity of Lipases in Organic Solvents.  
*Biotechnol. Lett.* 13,333-338
- Berger, M. and Schneider, M.P. (1992)  
Enzymatic Esterification of Glycerol II. Lipase-Catalysed Synthesisi of Regioisomerically Pure 1(3)-*rac*-Monoacylglycerols.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 961-965.
- Björkling, F.; Godtfredsen, S.E and Kirk, O. (1991).  
The Future Impact of Industrial Lipases.  
*Trends. Biotechnol.* 9, 60-363
- Bloomer, S.; Adlecreutz, P. and Mattiasson, B. (1991).  
Tryglyceride Interesterification by Lipases. 2. Reaction Parameters for the Reduction of Trisaturated Impurities and Dyglycerides in Bach Reactions.  
*Biocatalysis.* 5, 145-162.
- Bonkang, Y.; Shu-Jung, K.; Hariyadi, P.; and Kirkk, L.P. (1994).  
Solvent Suitability for Lipase-Mediated Acyl-Transfer and Esterification Reactions in Microaqueous Millieu is Related to Substrate and Product polarities.  
*Enzyme Microb. Technol.* 16, 577-583.
- Bornscheuer, U.T. (1995).  
Lipase-Catalyzed Suntheses of Monoacylglycerols.  
*Ibidem.* 17, 578-586.

- Boyle, E. (1997).  
Monoglycerides in Food Systems: Current and Future Uses.  
*Fod Tech.* 51,52-59.
- Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; Dodson, E.; Tolley, G.; Turkenburg, J.P.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B.; Noskov, L.; Thim, and Menge, U. (1990).  
A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase.  
*Nature* 343,767-771
- Carrea, G. and Riva, S. (2000).  
Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents  
*Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 2226-2254.
- Castillo, E.; Dossat, V.; Combes, D.; Marty, A. and Condoret, S. (1997).  
The Role of Silica Gel in Lipase Catalysed Esterification Reactions of High Polar Substrates.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 77-86
- Castillo, E.; Dossat, V.; Combes, D. and Marty, A. (1998).  
Efficient Lipase-Catalysed Production of Tailor-Made Emulsifiers Using Solvent Engineering Coupled to Extractive Processing.  
*Ibidem.* 75,309-313.
- Castro, H.F.; Oliveira, P.C. and Pereira, E.B. (1997).  
Evaluation of Different Approaches for Lipase Catalysed Synthesis of Citronellylacetate.  
*Biotechnol. Lett.* 19, 229-232.
- Coteron, A.; Martinez, M. and Aracil, J. (1998)  
Reactions of Olive Oil and Glycerol over Immobilized Lipases.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 657-661.
- Chopinear, J.; McCafferty, F.D.; Thersidod, M. And Klivanov, A.M. (1988).  
Production of Bisurfactants from Sugar Alcohols and Vegetable Oils Catalyzed by Lipases in Nonaqueous Medium  
*Biotechnol. Bioeng.* 31,208-214.
- Daryl K. Eggers, Harvey W. Blanch and John M. Prausnitz. (1989).  
Extractive Catalysis: Solvent Effects on Equilibria of Enzymatic Reactions in Two Phase Systems.  
*Enzyme Microb. Technology.* 11,84-89
- Dennis, E.A. (1997).  
*Methods in Enzymology. Lipases.* Academic Press. Vol 284.
- Dudal, Y. And Lortie, R. (1995).  
Influence of Water Activity on the Synthesis of Triolein Catalyzed by Immobilized *Mucor miehei* Lipase.  
*Biotechnol. Bioeng.* 45,129-134.
- Duran, G. Et Monsan, P. (1974).  
Les Enzymes Immobilisées.  
*Apria*, Paris.
- Eigtved, P. (1992).  
Enzymes and Lipid Modification.  
*Adv. In Appl. Lip. Res.* 1, 1-64.
- Elfman-Börgensson, I. And M. Häröd. (1999).

Synthesis of Monoglycerides by Glycerolysis of Rapeseed Oil Using Immobilized Lipase.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 701-707.

Ergan, F.; Trani, M. and André, G. (1991).  
Use of Lipases in Multiphasic Systems Solely Composed of Substrates.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 412-417.

Ferreira-Dias, S. and da Fonseca, M.M.R. (1995)  
Production of Monoglycerides by Glycerolysis of Olive Oil with Immobilized Lipases: Effect of the Water Activity.  
*Bioprocess. Engineering.* 12, 327-337.

Flenker, J. and Spencer, F. (1990).  
DECHMA-Biotecnology Conference. 4, 139-142.

Fureby, M. A.; Tian, Li; Adlecreutz, P. and Mattiasson, B. (1997)  
Preparation of Diglycerides by Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Triglycerides.  
*Enzyme and Microb. Tech.* 20, 198-206.

Gandhi, N.N. (1997).  
Applications of Lipase  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 6,621-634.

Garzon-Arbubeh, A.; Poupaert, J.H.; Claesen, M.; Dumont, P.; and Atassi, G. (1983).  
1,3-dipalmitoiglycerol ester of clorabucil as Lymphotropic, Orally Administrable Antineoplastic Agent  
*J. Med. Chem.* 26,1200-1203

Garzon-Aburbah, A.; Poupert, J.H.; Claesen, M.; and Dumont, P. (1986).  
A lymphotropic prodrug of L-dopa: Synthesis, Pharmacological Properties and Pharmacokinetic Behavior of 1,3-dihexadecanoyl-2-[(S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoyl]propan-1,2,3-triol.  
*Ibidem.* 29,687-691

Goderis, H.L.; Ampe, G.; Feyten, M.P.; Fouw'W, B.L.; Guffens, W.M.; Van Cauwenbergh, S.M. and Tobback, P.P. (1986).  
Lipase-Catalyzed Ester Exchange Reactions in Organic Media with Controlled Humidity.  
*Biotechnol. Bioeng.* 30, 258-266.

Godfrey, T. and West, S. (1996).  
*Industrial Enzymology.* Stockton Press, New York, U.S.A., Second Edition.

Gray, C.J. Narang, J.S. and Berker, S.A. (1990).  
Immobilization of Lipase from *Candida cylindracea* and its Use in the synthesis of Menthol Esters by Transesterification  
*Enzyme Microb. Technol.* 12, 800-807.

Guit, R.P.M.; Kloosterman, M.; Meindersma, G.W.; Mayer, M. and Meijer, E.M. (1991).  
Lipase Kinetics. Hydrolysis of Triacetin by Lipase from *Candida cylindracea* in Hollow-Fiber Membrane Reactor.  
*Biotechnol. and Bioeng.* 38, 727-732.

Gunstone, F.D. (1999)  
Enzymes as Biocatalysts in the Modification of Natural Lipids.

*J. Sci. Food Agric.* 79, 1535-1549.

Halling P.H. (1989).

Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic Systems. Predictions of Effects on Equilibrium Position.

*Biotechnol. Bioeng.* 35,691-701

Heisler, A.; Rabiller, C. Hublin. (1991).

Lipase Catalysed Isomerisation of 1,2(2,3)-diglyceride into 1,3-diglyceride. The Crucial Role of Water.

*Biotechnol. Lett.* 13,327-332.

Hjorth, A.; Carriere, F.; Cudrey, C.; Wöldike, H.; Boel, E.; Lawson, D.M.; Ferrato, F.; Cambillau, G. (1993).

A Structural Domain (the Lid) Found in Pancreatic Lipases is Absent in the Guinea Pig Phospholipase

*Biochemistry.* 32, 4702.

Holberg, K. and Osterberg, E. (1988).

Enzymatic Preparations of Monoglycerides in Microemulsion

*J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1544-1548.

Holmberg, K.; Lassen, B. and Stark Maj-Britt. (1989).

Enzymatic Glycerolysis of a Triglyceride in Aqueous and Nonaqueous Microemulsions.

*Ibidem.* 66, 17796-1800.

Hoq, M.M.; Yamane, T.; Shimizu, S.; Funada, T. and Ishida, S. (1985).

Bioreactor for Enzymatic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives. III Continuous Hydrolysis of Olive Oil by Lipase in a Microporous Hydrophobic Membrane Reactor .

*Ibidem.* 62, 1016-1021.

Hoshino, T.; Yamane, T.; and Shimizu, S. (1990).

Bioreactor for Enzymatic Reaction of Fat and Fatty Acid Derivatives. Part XII Selective Hydrolysis of Fish Oil by Lipase to Concentrate n-3- $\omega$ -polyunsaturated Fatty Acids(n-3 Pufa).

*Agric. Biol. Chem.* 54, 1459-1467

International Union of Biochemistry and Molecular Biology International Union of Biochemistry and Molecular Biology Ed. (1992)

*Enzyme Nomenclature*

Academic Press, New York,

Janssen, A.E.M.; Van der Padt, A; Van't, L. (1993).

Solvent Effects on Lipase-Catalysed Esterification of Glycerol and Fatty Acids.

*Biotechnol. Bioeng.* 42, 953-962.

Jeager, K. and Reetz, M. (1998).

Microbial Lipases from Versatile Tools for Biotechnology.

*Tibtech.* 16, 396-402.

Jenssen, R.G.; Galluzzo, D.R.; and Bush, V.J. (1990).

Selectivity is an Important Characteristics of Lipases (Acylglycerol Hydrolase).

*Biocatalysis.* 3, 307-316.

Kido, H.; Fukunsen, N.; Ishido, K.; and Karunama, N. (1986).

Diacylglycerol Amplifies the Induction in vivo of Tyrosine Aminotransferase and Ornithine Decarboxylase by Glucocorticoid.

*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138, 257-282

- Kirchner, G.; Scollar, M.P. and Klibanov, A.M. (1985).  
Resolution of Racemic Mixtures via Lipase Catalysis in Organic Solvents.  
*J. Am. Chem.Soc.* 107, 7072-7076.
- Ikeda , I. and Klibanov, A.M. (1993).  
Lipase-Catalyzed Acylation of Sugar Solubilized in Hydrophobic Solvents by Complexation.  
*Biotechnol. Bioen.* 42, 785-791.
- Kuan-Ju L.; Shui-Tein C. and Jei-Ku S. (1998).  
Lipase-Catlyzed Transesterification of Propylene Glycol with Triglycerid in Organic Solvents.  
*J. Agric Food Chem.* 46, 3835-3838.
- Kwon, S.J.; Song, K.M.; Hong, W. H. and Rhee, J.S. (1995).  
Removal of Water Produced from Lipase-Catalysed Esterification in Organic Solvent by Preevaporation.  
*Biotechnol. Bioeng.* 46, 393- 395.
- Kuan-Ju Liu; Shui-Tein Chen; and Jei-Fu Saw. (1998).  
Lipase-Catalyzed Transesterification of Propylene Gycol With Triglyceride In Organic Solvents.  
*J. Agric. Food Chem.* 46, 3835-3838.
- Kuo, S.J. and Parkin, K.L. (1996).  
Solvent Polarity Influences Product Selectivity of Lipase-Mediated Esterification Reactions in Microaqueous Media.  
*J. Am. Oil. Chem. Soc.* 11, 1427-1433.
- Langrand, G., Secchi, M.; Buono, G.; Baratti, J. And Tiantophylides, C. (1985).  
Lipase-Catalyzed Ester Formation in Organic Solvents an Esasy Preparative Resolution of  $\alpha$ -Substituted Cyclohexanols.  
*Tetrahedrom Lett.* 26, 1857-1860.
- Lesuisse, E.; Schanck, K. and Colson, C. (1993).  
Purification and Preliminary Characterization of the Extracellular Lipase of *Bacillus subtilis* 168, an Extremely Basic pH-tolerant Enzyme.  
*Eur. J. Biochem.* 216, 155
- Lenhinger A. L. (1970).  
*Biochemistry.* Woth Publishers, Inc. Second Edition. p. 284.
- Li Zu-Yi and Ward O.P. (1993).  
Lipase Esterification of Glycerol and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Concentrate in Organic Solvent  
*J. Am. Oil. Chem. Soc.* 70,745-748.
- Linfield, W.M.; Barauskas, R.A.; Sivieri, L.; Serota, S. and Stevenson, R.W. (1984)  
Lipid-Lipase Interactions I. Fat Splitting with Lipase from *Candida rugosa*.  
*Ibidem.* 62: 191-196
- Linko; Y-Y.; Limsa, M.; Huhtala, A. And Rantanen, O. (1995).  
Lipase Biocatalysis in the Production of Esters.  
*Ibidem.* 72, 1293-1299.
- Macrae, A.R.; Visicchio, J.E. and Lanot, A. (1998).  
Application of Potato Lipid AcylHydrolasa for the Synthesisi of Monoacylglycerols.  
*Ibidem.* 75, 1489-1494.
- Malcata, F.X; Reyes, H.R.; García, H.S.; Hill, C.G. and Admson C.H. (1992).  
Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalysed by Immobilized Lipases.

*Enzyme Microb. Technol.* 13, 426-446.

Martot, C., Langran, G.; Triantaphylides, C. and Baratti, J. (1985).  
Ester Synthesis in Organic Solvent Catalyzed by Lipases Immobilized on Hydrophilic Supports.  
*Biotechnol. Lett.* 7, 647-650

Mathias Berger and Manfred P. Schneider. (1991).  
Regioselectivity of Lipases in Organic Solvents  
*Ibidem.* 13, 33-338.

Mattson, F.H. (1984).  
Fatty Acid Derivates: Important Surfactants for Household, Cosmetic and Industrial Purposes.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 2, 259-267.

Mazur, A. W.; Hiler, G.D.; El-Nokaly, M. (1988).  
Microemulsion and Emulsions in Foods  
*ACS Symp. Ser.* 448, 51-61.

McNeill, G.P.; Shimizu, S. and Yamane, T. (1990).  
Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in High Yield of Monoglyceride.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 67, 779-783.

McNeill, G.P.; Shimizu, S. and Yamane, T. (1991).  
High-Yield Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils.  
*Ibidem.* 68, 1-5.

McNeill P.G. and Berger G.R. (1993)  
Enzymatic Glycerolysis of a Palm Oil Based Model Mixture Relationship Between Fatty Acid Composition and Monoglyceride Yield.  
*Food Biotechnol.* 7, 75-87.

Miller, D.A.; Prausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (1991).  
Kinetics of Lipase-Catalyzed Interesterification of Triglycerides in Cyclohexane.  
*Enz. Microb. Technol.* 13, 98-103.

Millqvist Fureby A.; Adlercreutz P. and Mattiasson B. (1996).  
Triglyceride Synthesis in a Solvent Free System.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1489-1495.

Muskesh, D.; Jadhav, S.; Benerji, A. A.; Thakkar, K. and Bevinakatty, H.S.  
Lipase-Catalysed Esterification Reaction. Experimental and Modelling Studies.  
*Chem. Tech. Biotechnol.* 69, 239-248.

Mukherjee K.D. and Kiewitt. (1996).  
Enrichment of Very-Long-Chain Mono-Unsaturated Fatty Acids by Lipase-Catalysed Hydrolysis and Transesterification.  
*Appl Microbial. Biotechnol.* 44, 557-562.

Myrnes, B.; Garstad, H.; Olsen, R.L. and Elvevoll, O. (1995).  
Solvent-Free Enzymatic Glycerolysis of Marine Oils.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1339-1344.

Nagao, A.; Kito, M. (1989).  
Synthesis of O-acyl-L-homoserine by Lipase.  
*Ibidem.* 66, 710-713.

- Okumura, S.; Iwai, M.; Tsujikasa, Y. (1979).  
Synthesis of Various Kind of Esters by Four Microbial Lipases.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 575,156-167
- Okumura, S.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. (1980).  
Synthesis of Various Kind of Esters by Four Microbial Lipases.  
*J. Biochem.* 87, 205-211.
- Orsat, B.; Drtina, G.J.; William, M.G. and Klibanov, A.M. (1994).  
Effect of Support Material and Enzyme Pretreatment on Enantioselectivity of Immobilized Subtilisin in Organic Solvents.  
*Biotechnol. Bioeng.* 44, 1265-1269.
- Pandey, A.; Benjamin, S. Soccol, C.; Nigman, P. Krieger, N. and Soccol, V. (1999).  
The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology.  
*Biotech, Appl. Biochem.* 29, 119-131.
- Park, Y.K.; Pastore, G.M. and DeAlmeida, M.M (1988).  
Hydrolysis of Soybean Oil by Combined Lipase System.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 252-254.
- Plou, F.J.; Barandiarán, M.; Calvo, M.V.; Ballesteros, A. and Pastor, E. (1996).  
High Yield Production of Mono- and Dioleoylglycerol by Lipase-Catalysed Hydrolysis of Triolein.  
*Enzyme and Microb. Technol.* 18, 66-71.
- Posorke, L.H. (1984).  
Industrial-Scale Applications of Enzymes to the Fats and Oils Industry .  
*J. Am. Oil Chem. Soc.*61, 1758-1760.
- Ransac, S.; Rogalska, E.; and Verger, R. (1990).  
Stereoselectivity of Lipases II. Stereoselectivity Hydrolysis of Triglycerides by Gastric and Pancreatic Lipases  
*J. Biol. Chem.* 256, 20271-20276.
- Rogalska, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F.; and Verger, R. (1993).  
Stereoselectivity Hydrolysis of Triglycerides by Animal and Microbial Lipases.  
*Chirality.* 5, 24-30.
- Schrag, J.D.; Li, Y.G.; Wu, S.; and Cygler, M. (1991)  
Ser-His-Glu Triad Forms the Catalytic Site of the Lipase from *Gesotichium candidum*.  
*Nature.* 351, 761.
- Schmid, R.D. and Verger, R. (1998).  
Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications  
*Angew. Chem Int. Ed.* 37,1608-1633. (1998)
- Seino, H.; Uchibori, T. and Nishitani, T.  
Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters of Fatty Acids.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 61,1761-1765.
- Shick, P. and Shick, J. (1991).  
Continuous Glycerolysis of Olive Oil by *Chromobacterium viscosum* Lipase Immobilized on Liposome in Reversed Micelles.  
*Biotechnol. Bioeng.* 38, 1159-1165.
- Sonnet, P.E. and Baillargeon, M.W. (1987).

**Kinetic Resolution of Secondary Alcohols With Commercial Lipases: Application to Rootworm Sex Pheromone Synthesis.**

*J. Chem. Ecol.* 13, 1279-1292.

Sonntag, N.O.V. (1984).

**New Developments in the Fatty Acid Industry in America.**

*J. Am. Oil Chem Soc.*, 61, 229-232

Stryer, L. (1995).

*Biochemistry*. 4th edition, W. H. Freeman and Company, Inc. New York. U.S.A

Sarda, L. and Desnulle, P. (1968).

**Lipase Pancreatic Action on Esters in Emulsion.**

*Biochim. Biophys. Acta.* 37, 570-581.

Schuch, R. and Murherjee, K. (1989).

**Lipase-Catalyzed Reactions of Fatty Acids With Glycerol and Acylglycerols.**

*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30, 332-398.

Thude, S.L.; Shukun, L.; Said, M.B. and Bornscheuer, U.T. (1997).

**Lipase-Catalysed Synthesis of Monoacylglycerides by Glycerolysis of Campher Tree Seed Oil and Cocoa-Butter.**

*Feet/lipid.* 99, 246-250.

Torres, C.; Bernabé, M. and Otero, C. (1999).

**Part II. Two Enzymatic Procedures for the Selective Synthesis of Malic Acid Monoesters.**

*Enzyme Microb. Technol.* 25, 753-761.

Tsai, Shau-Wei; Wu, Guang-Huei. (1991).

**Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Olive Oil in Biphasic Organic-Aqueous Systems.**

*Biotechnol. Bioeng.* 38, 761-766.

Tüter, M.; Babah, B.; Küse, O.; Dural, S. and Aksoy, A. (1999)

**Solvent-Free glycerolysis of Palm and Palm Kernel Oils Catalyzed by a 1,3-specific Lipase and Fatty Acid Composition of Glycerolysis Products.**

*Biotechnol. Lett.* 21, 245-248.

Tsujiisaka, Y.; Okumura, S. and Iwai, M. (1977).

**Glyceride Synthesis by Four Kinds of Microbial Lipase.**

*Biochim. Biophys. Acta* 489, 415

Valivety, R.H.; Johnston, G.A.; Suckling, C.J. and Halling, P.J. (1991).

**Solvent Effects on Biocatalysis in Organic Systems: Equilibrium Position and Rates of Lipase Catalysed Esterification.**

*Biotechnol. Bioeng* 38,1137-1143

Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow A.D. and Macrae, A.R. (1992).

**Reaction Rate with Suspended Lipase Catalyst Shows Similar Dependence on Water Activity in Different Organic Solvents.**

*Biochim Biophys. Acta.* 1118, 218.

Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. and Macrae, A.R. (1993).

**Water as a Competitive Inhibitor of Lipase Catalysed Esterification in Organic Media.**

*Biotechnol. Lett.* 15,1133-1138

Valivety, R.H.; Halling, P.J.; Peilow, A.D. and Macrae, A.R. (1994).

Relationship Between Water Activity and Catalytic Activity of Lipases in Organic Media. Effects of Supports, Loading and Enzyme Preparation.  
*Eur. J. Biochem.* 222, 461-466.

Van , L.L.M. and de Haas, G.H. (1963).  
The Substrate Specificity of Phospholipase A.  
*Biochim. Biophys. Acta.* 70, 538-370.

Virto, M.D.; Lascaray, J.M.; Solozabal, R. and DERenobales M. (1991).  
Enzymatic Hydrolysis of Animal Fats in Organic Solvents at Temperatures Below Their Melting Points.  
*J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 324-326.

Waldinger, C. and Schneider, M. (1996).  
Enzymatic Esterification of Glycerol III. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regiosomerically Pure 1,3-diacylglycerols and 1(3)-*rac*-monoacylglycerols Derived from Unsaturated Acid.  
*Ibidem.* 73,1513-1519.

Wehthe, E. And Adlecreutz, P. (1997).  
Enzymatic Esterification of Glycerol III. Lipase-Catalysed Synthesis or Regiosomerically Pure 1,3-diacylglycerols.  
*Ibidem.* 19,537:540.

Wherli, H.P. and Pomeranz, Y. (1969).  
Synthesis of Galactosyl Glycerides and Related Lipids.  
*Chem Phys. Lipids.* 3,357-370.

Winkler, F.K.; D'Arcy, A. and Hunziker, W.(1990).  
Structure of Human Pancreatic Lipase.  
*Nature* 343,771.

Yahya, R.M.; Anderson, W.A. and Moo-Yung, M. (1988).  
Ester Synthesis in Lipase-Catalysed Reactions.  
*Enzyme and Microb. Technol.* 23,438-450.

Yamaguchi, S. and Mase, T. (1991).  
High-yield Synthesis of Monoglyceride by Mono and Diacylglycerol Lipase from *Penicillium camemberti* U-150.  
*J. of Ferm. And Bioeng.* 72, 162-167.

Yamane T.; Kang S.T.; Kawara K. and Koizumi Y. (1994).  
High Yield Diacylglycerol Formation by Solid-Phase Enzymatic Glycerolysis of Hydrogenated Beef Tallow.  
*J. Am. Oil. Chem. Soc.* 71,339-342.

Yamane, T.; Kojima, Y.; Ichirryu, Y.; Nagata, M. and Shimizu, S. (1989).  
Intermolecular Esterification by Lipase Powder in Microaqueous Benzene: Effect of Moisture Content.  
*Biotechnol. Bioeng.* 34, 838.

Yang, F. and Russell A.J. (1995).  
A Comparison of Lipase-Catalysed Ester Hydrolysis in Reverse Micelles, Organic Solvents and Biphasic Systems.  
*Ibidem* 47, 60-70.

Zaks, A. And Klibanov, A.M. (1985).  
Enzyme Catalyzed Process in Organic Solvents.  
*Biochemistry.* 82: 3192-3196.

Zaks, A. and Klibanov A.M. (1988).

The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media.

*J. Biol. Chem.* 263, 8017-8021.

Zaks, A. and Klibanov, A.M. (1988)

Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents.

*Ibidem.* 263, 3194-3201.

Zarevúka, M.; Rejzek, M.; Hoskovec, M.; Svatos, A. Wimmer, Z.; Koutek, B.; and Legoy, M.D. (1997).

Initial Water Content and Lipase-Mediated Ester Formation in Hexane.

*Ibidem* 19, 745:750.