



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA APLICACIÓN DE LAS LIPASAS
EN EL DESARROLLO DE
PRODUCTOS ALIMENTICIOS.**

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS
DE EDUCACIÓN CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

QUÍMICA DE ALIMENTOS

**P R E S E N T A :
MARÍA ENEIDA JIMÉNEZ LÓPEZ**



MÉXICO, D.F.



**ESQUEMAS PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Asterozo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo documental.

NOMBRE: María Eneida Jiménez López
FECHA: 11 de diciembre 2003
FIRMA: María Eneida Jiménez López

Jurado Asignado

- Presidente** **María de Lourdes Gómez Ríos**
- Vocal** **Karla Mercedes Díaz Gutiérrez**
- Secretario** **Beatriz Ruiz Villafán**
- 1er. Suplente** **María de Lourdes Osnaya Suárez**
- 2do. Suplente** **Zoila Nieto Villalobos**

Beatriz Ruiz Villafán
Asesor

M. en B. Beatriz Ruiz Villafán

María Eneida Jiménez López
Sustentante

María Eneida Jiménez López

ÍNDICE

I.	Introducción	1
II.	Generalidades sobre las lipasas.....	7
III.	Objetivo.....	14
IV.	Aplicaciones.....	15
V.	Conclusiones	26
VI.	Bibliografía	27

I. INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas en el procesamiento de alimentos ha existido desde épocas muy antiguas (más de 8000 años). Aunque nuestros antepasados desconocieran que en la elaboración artesanal de productos fermentados como vino, cerveza, pan, vinagre, quesos y salsa de soya, se veían implicados cambios enzimáticos, el estudio de éstos ha sido un punto de partida para la enzimología aplicada.

Se estima que existen alrededor de 25, 000 enzimas diferentes que catalizan diversos tipos de reacciones, de las cuales en la actualidad se han caracterizado cerca de 4000 y de estas sólo unas 200 son de uso comercial. (Ver tabla1).

El uso de enzimas en procesos industriales ha tenido un gran impacto en la biotecnología ofreciendo oportunidades en nuevas áreas como la ingeniería de proteínas.

Alrededor del 62% del mercado mundial de enzimas producidas encuentran su aplicación en alimentos, un 33% en detergentes y 5% en textiles. Aproximadamente un 75% de las enzimas producidas a nivel industrial son hidrolíticas, de las cuales 60% son proteasas, 30% carbohidrasas, 3% lipasas y el resto enzimas para especialidades químicas (15).

Un gran número de investigaciones se han dirigido a mejorar la producción de enzimas microbianas, de ahí el incremento de su uso en procesos en los cuales se empleaban tradicionalmente enzimas de plantas y animales.

En la industria más, del 50% de las enzimas utilizadas provienen de hongos y levaduras, más del 33% son de bacterias, un 3% de animales y de un 4 a 1% son de plantas (9) (Ver tabla 2).

CLASE	FUNCIÓN
Hidrolasas	Hidrólisis de enlaces C-C, C-N, C-O
Oxidoreductasas	Oxigenación o adición de un átomo de hidrógeno
Isomerasas	Isomerizaciones, racemizaciones
Transferasas	Transferencia de grupos acilo, azúcar, fosfato, metilo, aldehído, cetónico o sulfuro de una molécula a otra
Liasas	Adición o formación de C=C, C=O ó C=N
Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-O ó C-N con ATP u otros nucleósidos trifosfatados

Tabla 1. Clases de enzimas y tipos de reacciones que catalizan (34).

ENZIMA	FUENTE	USO
	ANIMALES	
Lipasa Renina Tripsina	Páncreas Abomaso Páncreas	Alimentos Queso Curtiduría
	PLANTAS	
α -amilasa β -amilasa Bromelina Papaina	Cebada malteada Cebada malteada Látex de piña Látex de papaya	Cervecería Cervecería Cervecería Carnes
	BACTERIANAS	
α -amilasa β -amilasa Glucosa isomerasa Proteasas	<i>Bacillus</i> <i>Bacillus</i> <i>Bacillus, Streptomyces</i> <i>Bacillus</i>	Almidón Almidón Jarabes fructosados Detergentes
	FUNGALES	
α -amilasa Aminoacilasa Glucoamilasa Catalasa Celulasa Dextranasa Glucosa oxidasa Lactasa Lipasa Renina Pectinasa Proteasas	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus, Rhizopus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i>	Panadería Farmacéutica Almidón Alimentos Desechos Alimentos Alimentos Leche Alimentos Queso Bebidas Panadería
	LEVADURAS	
Invertasa Lactasa Lipasa	<i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Candida</i>	Confitería Leche Alimentos

TABLA 2. Enzimas de uso industrial y sus fuentes (9).

Algunas de las aplicaciones de las enzimas dentro del sector alimentario son las siguientes:

- Producción de jarabes fructosados, usando amilasas, amiloglicosidasas, pululanastas y glucosa isomerasa.
- Elaboración y modificación de leche, quesos y cremas, utilizando proteasas, lactasas y lipasas.
- Producción y clarificación de cerveza con amilasas, celulasas, beta-glucanasas y proteasas.
- Clarificación de jugos de fruta y vinos con pectinasas.
- En panadería se emplean alfa y beta-amilasas, además de proteasas, para mejorar la calidad de los productos, por medio de la hidrólisis parcial de gluten para retardar el envejecimiento de la harina.
- Producción de aminoácidos, empleando enzimas como aminoacilasas, aspartasas, fumarasas, triptofanasas, tirosinasas, etc.

En cuanto a las lipasas, su uso comercial incluye negocios por un billón de dólares, dentro de los cuales se han desarrollado una amplia variedad de nuevas aplicaciones en la síntesis de biopolímeros y biodiesel, en la producción de fármacos enantiopuros, agroquímicos, compuestos de sabor y nutracéuticos . Tabla 3 (23, 24, 28, 31).

Algunas de las lipasas que han sido aisladas incluyen enzimas extremófilas de especies termofílicas y psicrófilas (11). Estas lipasas han sido caracterizadas extensivamente con respecto a sus capacidades hidrolíticas y sintéticas, además de su enantioselectividad con sustratos artificiales, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes y aminas; incluyendo las cinéticas de resolución de mezclas racémicas, como en el caso del (R,S)-ibuprofeno y (-)-mentol que son sustratos de un alto valor comercial (7,8).

INDUSTRIA	EFEECTO	PRODUCTO
Alimentos lácteos	Hidrólisis de grasa de leche Maduración de queso Modificación de mantequilla	Agentes saborizantes Queso Mantequilla
Panadería	Mejora el sabor y prolonga la vida media	Productos de panadería
Bebidas	Mejora el aroma	Bebidas
Condimentos	Mejora la calidad	Mayonesas, condimentos
Complementos alimenticios	Transesterificación	Complementos alimenticios
Cárnicos	Desarrollo de sabor y remoción de grasa	Productos cárnicos
Grasas y aceites	Transesterificación Hidrólisis	Mantequilla de cacao, margarina Ácidos grasos, glicerol, mono y diglicéridos
Química farmacéutica	Enantioselectividad Síntesis Transesterificación Hidrólisis	Bloques quirales y químicos Químicos Lípidos especiales Digestivos
Cosméticos	Síntesis	Emulsificadores y agentes humectantes
Peletería	Hidrólisis	Productos de peletería
Papejería	Hidrólisis	Productos de papel
Limpieza	Hidrólisis	Removedores de grasa y agentes surfactantes

Tabla 3. Áreas de aplicación industrial de las lipasas microbianas (17).

A nivel mundial existe un gran interés por identificar y aislar nuevos genes de lipasas, y para optimizar las propiedades deseadas de las ya existentes, lo cual hoy en día es posible por evolución dirigida.

Desde el punto de vista biotecnológico, la característica más importante es la obtención de lipasas de una alta enantioselectividad, debido al rápido incremento en la demanda de compuestos enantioméricamente puros producidos por procesos biocatalíticos (42).

La predilección por enzimas microbianas ante otras fuentes enzimáticas se debe a las ventajas que ofrecen éstas (24); en el caso particular de las lipasas son :

Primero: Presentan una extraordinaria quimioselectividad, regioselectividad y estereoselectividad.

Segundo: Son de fácil disponibilidad en grandes cantidades y sus fermentaciones resultan ser relativamente económicas en gran escala debido a que presentan ciclos cortos de fermentación en medios de producción de bajo costo.

Tercero: La resolución de las estructuras cristalinas de muchas lipasas, facilita considerablemente diseñar una estrategia de ingeniería bien planeada.

Finalmente: Estas enzimas, por lo general, no requieren cofactores, ni catalizan reacciones secundarias (23, 24).

En la industria alimentaria, la mayoría de las enzimas microbianas proceden de un número limitado de géneros ya que se prefieren microorganismos conocidos como seguros (GRAS).

II. GENERALIDADES SOBRE LAS ENZIMAS LIPOLÍTICAS

II.1 Definición

Las lipasas se definen como glicerol éster hidrolasas [EC 3.1.1.3.] que hidrolizan enlaces de tipo éster presentes en tri, di y monoacilgliceroles, cuando se encuentran en la interfase agua-aceite. La diferencia entre las lipasas y las carboxilesterasas ordinarias (esterasas y acilhidrolasas) no se debe al tamaño del radical del ácido graso del sustrato, sino al estado físico del mismo: las lipasas no son capaces de atacar a moléculas de sustrato completamente dispersas en agua (23, 24, 29).

II.2 Fuentes de obtención de las lipasas.

Las lipasas pueden ser obtenidas de fuentes animales, vegetales y diversos microorganismos. De las fuentes animales se han identificado a las lipasas pancreáticas, esterazas pregástricas, lipasas linguales y lipasas presentes en la leche.

Las primeras fuentes más importantes de estas enzimas son preparaciones derivadas del estómago de cameros, corderos y terneros, muchas de las cuales han sido purificadas y comercializadas.

Las lipasas de origen vegetal han sido encontradas en diversos frutos y semillas como el trigo, arroz, avena y soya entre otros, sin embargo no han sido ampliamente explotadas, ya que existen pocos estudios sobre ellas.

Las lipasas de origen microbiano han sido ampliamente utilizadas y sus fuentes incluyen hongos levaduras, bacterias y algunos actinomicetos (17, 22) Tabla 4.

Tabla 4. Microorganismos productores de lipasas que se han reportado en la literatura (43).

Fuente	Género	Especie	Referencia	
Bacteria (Gram positiva)	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	Godfredsen, 1990	
		<i>B. cereus</i>	El-Shafai and Rezkallah, 1997	
		<i>B. stearothermophilus</i>	Kim et al., 1998	
		Recombinante de <i>B. subtilis</i> 168	Lesuisse et al., 1993	
		<i>B. brevis</i>	Hou, 1994	
		<i>B. thermocatenulatus</i>	Rus et al., 1998	
		<i>Bacillus</i> sp.	Helisto and Korpela, 1998	
		<i>B. coagulans</i>	El-Shafai and Rezkallah, 1997	
		<i>B. acidocaldarius</i>	Manco et al., 1998	
		<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	Lee et al., 1999	
		<i>Bacillus</i> sp. J 33	Nawani and Kaur, 2000	
		<i>Staphylococcus</i>	<i>S. hyicus</i>	Van Kampen et al., 1998
			<i>S. epidermidis</i>	Simons et al., 1998
			<i>S. warneri</i>	Talon et al., 1995
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbruckii</i> sub. sp. <i>bulgaricus</i>	El-Sawah et al., 1995
			<i>Lactobacillus</i> sp.	Meyers et al., 1996
		<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	Sztajer et al., 1988
<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>	Hou, 1994		
	<i>M. luteus</i>	Hou, 1994		
	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acne</i>	Sztajer et al. 1988	
	<i>Pr. granulosum</i>	Sztajer et al. 1988		
<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Yeo et al., 1988		
	<i>Bu. glumae</i>	El Khattabi et al., 2000		
Bacteria (Gram negativo)	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ito et al., 2001	
		<i>P. fragi</i>	Mencher and Alford, 1967	
		<i>P. mendocina</i>	Jaeger and Hertz, 1998	
		<i>P. putida</i> 3SK	Lee and Rhee, 1993	

Continuación tabla 4.

Fuente	Género	Especie	Referencia
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. glumae</i>	Noble et al., 1994
		<i>P. cepacia</i>	Hsu et al., 2000
		<i>P. fluorescens</i>	Lacointe et al., 1996
		<i>P. pseudoalcaligenes F-111</i>	Lin et al., 1995,1996
		<i>Pseudomonas</i> sp.	Dong et al., 1999
		<i>P. fluorescens MF0</i>	Guillou et al., 1995
		<i>Pseudomonas</i> sp. KW156	Yang et al., 2000
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Ch. viscosum</i>	Diogo et al., 1999
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Act. pseudoalcaligenes</i>	Sztajer et al., 1988
		<i>Act. radioresistens</i>	Chen et al., 1999
	<i>Aeromonas</i>	<i>Ae. hydrophila</i>	Anguita et al., 1993
		<i>Ae. sorbita LP004</i>	Lotrakul and Dharmathiti, 1997
Hongo	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizop. delemar</i>	Lacointe, et al., 1996
		<i>Rhizop. oryzae</i>	Hiol et al., 2000
		<i>Rhizop. arrhizus</i>	Elibol and Ozer, 2001
		<i>Rhizop. nigricans</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. nodosus</i>	Nakashima et al., 1988
		<i>Rhizop. microsporius</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. chinensis</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Rhizop. japonicus</i>	Nakashima et al., 1988
		<i>Rhizop. niveus</i>	Khono et al., 1994, 1999
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	Long et al., 1996, 1998
		<i>A. niger</i>	Chen et al., 1995
		<i>A. japonicus</i>	Satyánarayan and Jhori, 1981
		<i>A. awamori</i>	Satyánarayan and Jhori, 1981
		<i>A. fumigatus</i>	Satyánarayan and Jhori, 1981
		<i>A. oryzae</i>	Ohnishi et al., 1994*,b
		<i>A. carneus</i>	Helisto and Korpela, 1998

Continuación tabla 4.

Fuente	Género	Especie	Referencia
	<i>Aspergillus</i>	<i>A. repens</i>	Kaminishi et al., 1999
		<i>A. nidulans</i>	Mayordomo et al., 2000
	<i>Penicillium</i>	<i>P. cyclopium</i>	Chahinian et al., 2000
		<i>P. citrinum</i>	Szajer and Maliszewska, 1989
		<i>P. roqueforti</i>	Petrovic et al., 1990
		<i>P. fusiculosum</i>	Hou, 1994
		<i>Penicillium</i> sp.	Helistö and Korpela, 1998
		<i>P. camemberti</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>P. wortmanii</i>	Costa and Peratta, 1999
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor miehei</i>	Piou et al., 1998
		<i>M. javanicus</i>	Ishihara et al., 1975
		<i>M. circinelloides</i>	Balcão et al., 1998
		<i>M. hiemalis</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>M. racemosus</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>Ashbya</i>	<i>Ashbya gossypii</i>	Stahmann et al., 1997
	<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>Geotrichum</i> sp.	Macedo et al., 1997
	<i>Beauveria</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	Hogedus and Khachatourians, 1998
	<i>Humicola</i>	<i>H. lanuginosa</i>	Zhu et al., 2001
	<i>Rhizomucor</i>	<i>R. miehei</i>	Jaeger and Hertz, 1998
	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	Rapp, 1995
		<i>F. heterosporum</i>	Takahashi et al., 1998
	<i>Acremonium</i>	<i>A. strictum</i>	Okeke and Okolo, 1990
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	Berto et al., 1997
	<i>Eurotium</i>	<i>Eurotium herbanorum</i>	Kaminishi et al., 1999
	<i>Ophiostoma</i>	<i>O. piliferum</i>	Brush et al., 1999
Levaduras	<i>Candida</i>	<i>C. rugosa</i>	Brocca et al., 1998
		<i>C. tropicalis</i>	Takahashi et al., 1998

Continuación tabla 4.

Fuente	Género	Especie	Referencia
	<i>Candida</i>	<i>C. antarctica</i>	Arroyo et al., 1999
		<i>C. cylindracea</i>	Helisto and Korpela, 1998
		<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe et al., 1996
		<i>C. deformans</i>	Lacointe et al., 1996
		<i>C. curvate</i>	Ghosh et al., 1996
		<i>C. valida</i>	Ghosh et al., 1996
	<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Pignede et al., 2000
	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rho. glutinis</i>	Paparaskevas et al., 1992
		<i>Rho. pilimomae</i>	Tahoun et al., 1985
	<i>Pichia</i>	<i>Pl. bisbora</i>	Hou, 1994
		<i>Pl. maxicana</i>	Hou, 1994
		<i>Pl. svicola</i>	Suñihara et al., 1995
		<i>Pl. xikosa</i>	Suñihara et al., 1995
		<i>Pl. burtonii</i>	Suñihara et al., 1995
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. lipolytica</i>	Tahoun et al., 1985
		<i>S. crassaegenesis</i>	Hou, 1994
	<i>Torulospora</i>	<i>Torulospora globora</i>	Hou, 1994
	<i>Trichosporon</i>	<i>Trichosporon asteroides</i>	Dharmathiti and Ammaranond, 1997
Actinomicetos	<i>Streptomyces</i>	<i>Str. fradiae</i> NCIB 8233	Sztajer et al., 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. PCB27	Sztajer et al., 1988
		<i>Streptomyces</i> sp. CCM 33	Sztajer et al., 1988
		<i>Streptomyces coelicolor</i>	Hou, 1994
		<i>Streptomyces cinnamomeus</i>	Sommer et al., 1997

II.3 Reacciones que cataliza.

Hidrólisis :

En la reacción de hidrólisis la lipasa rompe los enlaces éster de los triacilgliceroles teniendo como producto final glicerol y ácidos grasos libres. (Figura1)

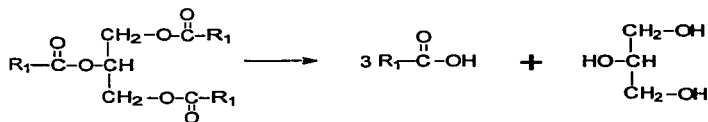


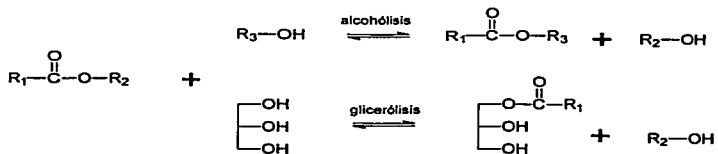
Figura 1. Reacción de hidrólisis catalizada por lipasas (44).

La velocidad de la reacción de hidrólisis depende de factores como: a) la naturaleza del sustrato, ya sea éste trí, di o monoacilgliceroles; b) la posición del enlace éster, ya que puede haber hidrólisis específica de ésteres primarios o hidrólisis no específica tanto de ésteres primarios como secundarios; c) preferencia por algunos ácidos grasos de acuerdo al grado de insaturación o del tamaño de la cadena; d) la estereoespecificidad, que puede favorecer la hidrólisis en la posición *sn*-1 o *sn*-3 en los triacilgliceroles y 1,3-diacilgliceroles.

Las reacciones de síntesis o de "hidrólisis reversa" que catalizan las lipasas son útiles en la formación de ésteres a partir de diversos alcoholes (alcoholólisis), ácidos grasos (acidólisis) y otros ésteres de ácidos grasos (figura 2). Sin embargo, este tipo de reacciones tiene como factor limitante la eficiencia en la eliminación del agua del medio de reacción. Se pueden distinguir dos tipos de reacción de síntesis: la transesterificación y la interesterificación. La transesterificación implica la transferencia de un grupo acilo de un triacilgliceroles a un alcohol o a un gliceroles.

En la interesterificación el grupo acilo se intercambia entre un (tri)glicérido y un ácido graso (acidólisis) o un éster de ácido graso a otro (tri)glicérido.

Transesterificación



Interesterificación

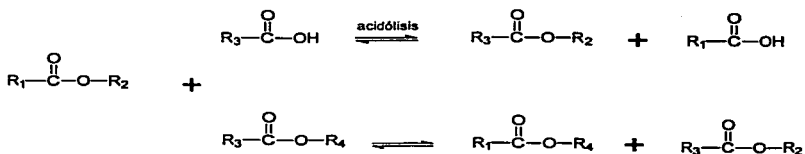


Figura 2. Reacciones de síntesis que catalizan las lipasas (22).

III. OBJETIVO

Objetivo general:

Estudiar los usos de las lipasas dentro de la industria alimentaria.

IV. APLICACIONES

IV.1 Lipasas en la Industria de alimentos

a) Grasas modificadas

La manteca de cacao es una grasa de alto valor comercial, por su contenido de ácidos palmítico y esteárico, que hace que su punto de fusión sea de 37°C , siendo esto la principal razón de que se funda en la boca. La tecnología basada en lipasas involucra una alternancia de metodologías de hidrólisis y síntesis, que son usadas comercialmente para disminuir el contenido de grasas indeseables en los sustitutos de manteca de cacao. Uno de estos procesos utiliza una lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei*, que cataliza una reacción de transesterificación reemplazando el ácido palmítico por ácido esteárico del aceite de palma (23, 43). Por otro lado, en Japón se utilizan los aceites de semillas de girasol y de cártamo para producir enzimáticamente los sustitutos de manteca de cacao (6).

La modificación química de aceites para cambiarles la textura y requerimientos nutricionales es usada en la manufactura de margarinas, mantequillas y otras grasas plásticas. Cuando estas grasas son obtenidas por hidrogenación se forman ácidos grasos *trans*, los cuales aumentan el riesgo a desarrollar enfermedades coronarias debido a su consumo. Las enzimas al ser altamente específicas, previenen la formación de ácidos grasos *trans*. Zaida Zainal y Mohd Suria Affandi Yusoff utilizaron una lipasa de *Rhizomucor miehei* para la modificación de los aceites del fruto y hueso de palma, con lo que se obtuvieron grasas sólidas con menos de 0.5% de ácidos grasos *trans* (48). Se han utilizado también aceites vegetales ricos en ácido oleico, que es un ácido graso hipocolesterolémico, para reemplazar al ácido mirístico y palmítico en la posición *sn-2* de la grasa de mantequilla, mediante el uso de una lipasa que cataliza una reacción de interesterificación. Otra alternativa a la síntesis es usar directamente mezclas de grasa de mantequilla y aceite de canola para modificar el contenido de lípidos de la mantequilla (36).

b) Generación de ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen efectos metabólicos positivos ya que son esenciales para la síntesis normal de los lípidos membranales y de las prostaglandinas, un factor que es frecuentemente ignorado cuando se recomienda una dieta libre de grasa (23, 43). Se ha incrementado el uso de estos ácidos grasos como fármacos; antiolesterolémicos, antiinflamatorios y como agentes que combaten los problemas arteriales o de circulación (19, 43). Como nutracéuticos y aditivos para alimentos son usados para productos de panadería, bebidas, así como en el desarrollo de sabor en quesos madurados (18, 43).

Los ácidos grasos poliinsaturados se obtenían normalmente por medio de un tratamiento drástico con alta temperatura, lo que los degradaba. Ante este problema, en algunos sectores de la industria los aceites vegetales poliinsaturados eran tratados con un álcali seguido de una acidificación, sin embargo este procedimiento no lograba una hidrólisis completa (39). El proceso enzimático de generación de ácidos grasos poliinsaturados emplea una lipasa de avena inmovilizada que hidroliza a un aceite vegetal, como el aceite de castor, obteniéndose ácido ricinoléico, evitando así la formación de ácidos poliricinoléicos por el tratamiento con calor. La catálisis de la lipasa en un solvente orgánico permite obtener hasta un 90% de ácido ricinoléico (40).

c) Nutracéuticos

Los triacilglicérolos que contienen residuos de ácido linoléico pueden ser usados como agentes nutracéuticos, antioxidantes, anticarcinogénicos y ayudan en problemas arteriales o de circulación. Por esto es que se vuelve atractivo modificar productos lácteos convencionales para aumentar su contenido de ácido linoléico. Esta modificación puede llevarse a cabo sustituyendo los residuos de ácidos grasos presentes en los triacilglicérolos que constituyen la grasa láctea o por adición de glicéridos sintéticos que contengan residuos de ácido linoléico. La misma modificación se utiliza en mantequilla, margarina y otros productos lácteos ricos en grasa de leche empleando la lipasa de *Candida antarctica* (Novozym 435) lo que aumenta el contenido de ácido linoléico de 0.6 g/100 g de grasa a 15 g/100 g de grasa de leche.

En el caso de la síntesis directa de glicéridos a partir de glicerol y ácido linoléico, la reacción de esterificación se puede llevar a cabo con una lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme IM, de Novo Nordisk), en donde se ha obtenido una incorporación de hasta un 95% del ácido linoléico original (20).

Se ha encontrado que esteroles de plantas y sus ésteres pueden ser efectivos para la disminución de la concentración de colesterol en plasma, al inhibir su absorción en el intestino delgado. Estos ésteres de plantas, fitoesterol y fitoestanol, son adicionados a margarinas especiales, las cuales son viables comercialmente como alimentos funcionales que reducen el colesterol total y los niveles de LDL-colesterol. Estos productos son preparados vía esterificación catalizada por la lipasa inmovilizada de *Candida rugosa*, siendo posible evitar el uso de algún solvente orgánico o agua (47).

d) Producción de ésteres como agentes de sabor.

Las lipasas han sido usadas con éxito como catalizadores para la síntesis de ésteres. Los ésteres generados a partir de ácidos grasos de cadena corta son usados como saborizantes en la industria de alimentos (46), por ejemplo en productos con sabor frutal (bebidas, dulces, jaleas y jamonés), alimentos cocinados, vinos y productos lácteos. La síntesis individual de ésteres y su mezclado para la obtención de diversos sabores y aromas puede representar mucho tiempo y un trabajo duro de laboratorio. Sin embargo, alternativamente pueden ser sintetizados vía enzimática utilizando materiales naturales de bajo costo como ácidos grasos y alcoholes, siendo ésta la mejor opción para productos lácteos, donde al obtener mezclas complejas de ésteres se determina el sabor final de los productos, lo cual finalmente va a depender de la combinación de alcoholes y enzimas utilizadas.

Las enzimas que probaron Jungbae y col. para obtener ésteres fueron divididas en tres categorías: I. Lipasas microbianas: R10 (*Penicillium roqueforti*), AY30 (*Candida rugosa*) de Amano Enzyme (Lombard, IL), y lipasa 5000 (*Aspergillus niger*) de Enzyme Development Corp. (New York, NY). II. Lipasas de mamíferos: Italasa C (becerro) y Capalasa K (cabrito) de SBI (Waukesha, WI). III. Lipozoma 10,000 L (*Mucor miehei*) y Palatasa M 1000 L (*Rizomucor miehei*) de Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), estas últimas fueron dializadas, ultrafiltradas y liofilizadas para su uso. Estas enzimas

se probaron con 35 diferentes alcoholes, (ver tabla 5), y generaron cerca de 175 diferentes ésteres utilizando octanol como solvente (30).

La importancia comercial de la adición de ésteres de bajo peso molecular en productos elaborados a base de fruta y en productos lácteos, se debe a que durante los procesos de manufactura de estos productos, los ésteres de bajo peso molecular se pierden, lo que debe ser compensado al final de dicho proceso. Estos ésteres se han podido producir por transesterificación y algunos otros se generan por esterificación de ácidos y alcoholes (14, 29). Los ésteres de importancia comercial se han producido en medio anhidro, con solventes orgánicos por transesterificación con lipasas microbianas de *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus arrahisuis*, *Rhizopus niveus* ó *Candida cylindracea* (33). Se ha encontrado además, que varios terpenos con sabor a menta podían ser formados por la acción de enzimas microbianas sobre geraniol, citronellol, farnesol y fitol en medios con solventes como butano, hexano y ácido oleico (14).

Por otro lado, se han encontrado lipasas en plantas como trigo, maíz o linola las cuales han sido usadas en la obtención de ésteres de bajo peso molecular. Las lipasas de plantas poseen propiedades interesantes que hacen que su utilización sea especialmente rentable para la síntesis de ésteres, como son el fácil manejo de las semillas y los bajos costos de producción para obtener las enzimas (33).

Alcoholes	Propiedades organolépticas	Conversión después de 20h (%)
3-Metil-2-buten-1-ol	Fresco, frutal, verde o crudo, lavanda	66
Geraniol	Dulce, floral, rosa, frutal	84
3-Heptanol	Herbáceo	12
1 R-Mirtenol	Alcanfor, menta	94
Farnesol	Tierno, floral, oleoso	84
DL-Mentol	Menta, arbolado o leñoso	21
Propilenglicol	Inodoro	0
Cis-3-Hexen-1-ol	Fresco, hierba verde	27
Nonil alcohol	Rosa, cítrico	93
3,7-Dimetil-1-octanol	Dulce, rosa	68
α -Metilbencil alcohol	Jacinto suave	35
Fenetil alcohol	Rosa, miel, aromático, floral	64
3-fenil-1-propanol	Dulce, balsámico, floral	62
S- Perilil alcohol	Verde o crudo, pungente, graso	39
Amil alcohol	Fuerte, un poco dulce, balsámico	78
2-Octanol	Graso, oleoso, terroso	11
Furfuril alcohol	Olor suave, sabor azúcar cocinada	17

Tabla 5. Alcoholes con propiedades organolépticas utilizados para obtener ésteres (30)

e) Quesos madurados

El sabor y la textura son considerados como los dos principales criterios para determinar la aceptabilidad de quesos madurados. El tiempo requerido para desarrollar esas características varía desde pocas semanas para quesos suaves y hasta tres años para variedades de sabor fuerte (26).

El uso de lipasas microbianas incrementa la cantidad de ácidos grasos libres lo que ha permitido que aumente el sabor de diversas variedades de quesos (2).

En los quesos de veta azul es de gran importancia la lipólisis de la grasa de leche para el desarrollo de su sabor característico. Por ello, se han efectuado diversos estudios sobre la lipasa de *P. roqueforti*, en los que se observó su alta especificidad por triacilgliceroles de bajo peso molecular. Los ácidos grasos libres sirven como precursores de las metilcetonas y alcoholes secundarios, los cuales son esenciales para obtener el sabor característico de este tipo de queso (2).

Durante la maduración de los quesos inoculados con microorganismos, se llevan a cabo cuatro cambios catalizados vía enzimática en donde se producen los compuestos aromáticos que contribuyen al sabor del queso: 1) liberación de los ácidos grasos de la grasa de la leche por lipólisis, 2) oxidación de los ácidos grasos libres para formar (beta)-cetoácidos, 3) descarboxilación de (beta)-cetoácidos produciendo metilcetonas y 4) reducción de metilcetonas para formar alcoholes secundarios (29) (Fig. 3).

El fino equilibrio entre productos primarios y secundarios es el responsable del sabor típico del queso y su textura (26).

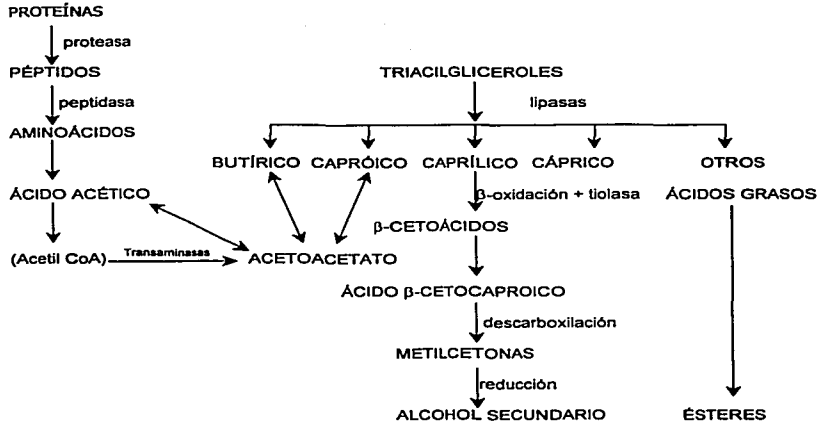


Figura 3. Formación de metilcetonas y alcoholes secundarios por *P. roqueforti* (32).

En el sistema tradicional, un microorganismo transforma varios de los compuestos de la leche, generando el efecto organoléptico deseado. Esta transformación completa no se obtendría al utilizar exclusivamente una enzima, además de que se podrían causar defectos de sabor y textura por una lipólisis excesiva. (14, 26, 35).

Con un sistema de enzimas exógenas purificadas, las diferencias cuantitativas en contenido de ácidos grasos son minimizadas. Como en un proceso natural, la modificación enzimática de productos lácteos se basa en el mismo cambio químico que ocurre con el proceso tradicional. Los tiempos de reacción para la transformación

enzimática son substancialmente más cortos que los de procesos tradicionales, brindando un mejor control en el proceso, produciéndose menos variabilidad en el producto final.

Al utilizar enzimas puras sobre la grasa de leche, se obtienen ingredientes que pueden ser utilizados en cremas fermentadas, mantequillas, quesos, saborizantes de queso azul y puede producirse también un queso italiano a un bajo costo (14).

Dwivedi y Kinsella (1974) substituyen en productos como aperitivos, aderezos y dips, el uso de un queso azul, por un concentrado sabor queso azul obtenido por fermentación sumergida con *P. roqueforti* y grasa de leche (12, 13, 14).

Al evaluar sensorialmente el sabor del producto obtenido por medio de esta fermentación, el panel de jueces encontró su sabor similar al de un queso azul producido por el método tradicional. Del mismo modo, al evaluar sensorialmente productos tipo dip, unos elaborados con el producto fermentado y otros con queso azul, no encontraron ninguna diferencia.

En estudios recientes se han usado enzimas micro-encapsuladas para regular las reacciones sustrato-enzima, evitando una textura y sabor inconvenientes producidos por las enzimas libres. Estas preparaciones enzimáticas son eficientes en la generación de ingredientes para alimentos, sin embargo, en la aceleración de la maduración de quesos llegaban a causar defectos de textura y rancidez. Para evitar lo anterior, se han propuesto mezclas como proteasa/peptidasa, proteasa/lipasa o proteasa/peptidasa/lipasa (26).

Las cápsulas con revestimiento de grasa-leche fueron el primer desarrollo de Magee y Olson (1981). Arnadottir (1986) utilizó estos revestimientos grasa-leche para micro-encapsular una mezcla de lipasa pancreática y esporas de *P. roqueforti* (1). Panel y Olson (1991 a,b) también usan los micro-encapsulados para mejorar la producción de metilcetonas y acelerar la maduración del queso de veta azul (33, 34). En el estudio hecho por Arnadottir (1986) el queso de veta azul elaborado con las micro-cápsulas, muestra un contenido sustancialmente mayor de metilcetonas en un tiempo de maduración más corto que el requerido en un queso elaborado de manera tradicional o elaborado con enzimas y esporas sin encapsular (1, 25). Kheadr y

Vuilleumard (2002) encapsularon diferentes cantidades de Palatase M y Lipasa 50 en liposomas obteniendo buenos resultados, ya que esto sirvió como un sistema transportador de lipasas para acelerar la ruptura de la grasa durante el proceso de madurado del queso. El éxito de este sistema depende de una apropiada selección del tipo y concentración de la enzima adicionada. Con encapsulados de Palatase M ó de la Lipasa 50 a una concentración de 0.5 unidades de enzima/ g de grasa de leche se puede acelerar la lipólisis del queso, dejando fuera parámetros de textura y sabor defectuosos (25).

IV.2 Lipasas en resolución de mezclas racémicas de ácidos y alcoholes

La estereoselectividad de lipasas ha sido usada para resolver mezclas racémicas de ácidos orgánicos en sistemas bifásicos inmiscibles (27). Los alcoholes racémicos pueden ser resueltos en su forma pura enantiomérica por una reacción de transesterificación catalizada por una lipasa (43).

El profeno (2-aril ácido propiónico), es un compuesto importante no esteroideal que se utiliza como medicamento antiinflamatorio (21). El R-isómero de cetoprofeno se produjo por una reacción de esterificación en medio no acuoso usando la lipasa B de *C. antártica* en un solvente aquiral (3).

IV.3 Lipasas en acilación regioselectiva

Las lipasas acilan ciertos esteroides, azúcares y derivados de azúcares con una alta regioselectividad. Los azúcares monoacilados pueden ser producidos en piridina anhidra, con trietilcarboxilatos y varios monosacáridos (45). Por otro lado, también se puede hacer la desacilación regioselectiva, este es el caso del metil- β -D-glucopiranosido, para el que se usó una lipasa de *A. niger* (10).

Las lipasas también son utilizadas en la síntesis de edulcorantes artificiales como la sucralosa por una hidrólisis regioselectiva de octaacetilsucrosa (4, 16).

IV.4 Lipasas en la síntesis de lípidos estructurados

El valor comercial de las grasas depende de los ácidos grasos que conforman su estructura (16). Los triacilgliceroles son reestructurados para contener el tipo de ácidos grasos deseados en posiciones específicas. Estos lípidos modificados son llamados lípidos estructurados.

Diversas investigaciones han revelado que los lípidos estructurados enriquecidos con ácidos grasos de cadena media, exhiben significativos efectos benéficos en la salud, al compararlos con las mezclas físicas de aceites con una composición similar de ácidos grasos.

En el cuerpo, la lipoprotein-lipasa y la lipasa pancreática se ven involucradas en la hidrólisis de triacilgliceroles en el flujo sanguíneo y en el intestino respectivamente. Ambas enzimas son más eficientes en la hidrólisis de ésteres de cadena media que en los de cadena larga; por ello los lípidos estructurados son extensivamente usados en la práctica clínica como una fuente de energía (5).

Tanto los lípidos estructurados como las mezclas de aceites, bajan los niveles de colesterol en hígado, sin embargo se ha encontrado que los lípidos estructurados muestran beneficios metabólicos superiores en comparación con las mezclas de aceites. Se han reportado efectos benéficos de los lípidos estructurados, tales como la retención superior de nitrógeno, preservación de la función retículo endotelial, atenuación del catabolismo de proteínas y la respuesta hipermetabólica al estrés por daño térmico.

Así tenemos, que el aceite de coco es un aceite comestible rico en ácidos grasos saturados de cadena media y larga, pero es deficiente en ácidos grasos esenciales. Siendo éste una fuente rica en ácidos grasos de cadena media (C8:0-C12:0), se utiliza en la preparación de una fórmula infantil parenteral, nutrición enteral y en productos alimenticios para casos de mal absorción de grasa. Sin embargo, su alto contenido de ácidos grasos saturados, especialmente C14:0, C16:0 y C12:0 ha sido una causa de interés para modificar la composición de ácidos grasos saturados por ácidos grasos esenciales poliinsaturados. Lo anterior se puede obtener por la reacción de interesterificación catalizada por una lipasa, entre el aceite de coco y el aceite omega 6, rico en ácidos grasos poliinsaturados (41).

IV.6 Lipasas en la síntesis de surfactantes

El poliglicerol y ésteres de ácidos grasos glucosilados son ampliamente usados como emulsificantes en una gran variedad de formulaciones de alimentos, como: productos bajos en grasa fácilmente dispersables (uso en aerosol), salsas, helados y mayonesas (16).

V. CONCLUSIONES

Las lipasas constituyen el grupo más importante de biocatálisis para las aplicaciones biotecnológicas, por su alta enantioselectividad y especificidad por el sustrato, eficiencia, condiciones de operación con bajos costos de operación, no requiere de cofactores y por su estabilidad en solventes orgánicos.

Hay un evidente avance en el uso de lipasas para obtener productos lácteos, comenzando con el uso de enzimas purificadas, seguido del uso de enzimas microencapsuladas, logrando productos con una mayor aceptabilidad por parte de los consumidores en un tiempo menor y con un mayor control de los procesos enzimáticos, y por último contar con enzimas de una mayor enantioselectividad obtenidas por evolución dirigida.

En la actualidad existe un mayor desarrollo de productos nutracéuticos, obtenidos a partir de la adición de ácidos grasos poliinsaturados, o al uso de grasa de leche modificada, cubriendo así necesidades nutricionales, al mismo tiempo que se obtienen beneficios en problemas arteriales o de circulación, anticolesterolémicos, antioxidantes y anticarcinogénicos.

Por otro lado, podemos contar con una amplia variedad de ésteres de bajo peso molecular como agentes de sabor, que de manera más efectiva y rápida se obtienen por transesterificación, o por esterificación de ácidos grasos y alcoholes con diversas lipasas.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Arnadóttir A. 1986. Methyl ketone synthesis in milk-fat-coated microcapsules to accelerate ripening of blue cheese. M.S. Thesis, University of Wisconsin Madison.
- 2 Arnold GR, Shahani KM y DK Dwivedi. 1974. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J Dairy Sci. 58(8): 1127-43.
- 3 Arroyo M y JV Sinisterra. 1995. Influence of chiral carbones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. Biotechnol Lett. 17:525-30
- 4 Bornemann S, Cassells JM, Combesordick JS y AJ Hacking. (1989) . Deacylation of sucrose esters. UK Patent No. 2 224 504 (Tate & Lyle p/c).
- 5 Björkling F, Godtfredsen SE y O Kirk. 1991. The future impact of industrial lipases. TIBTECH, Vol 9:360-363.
- 6 Bloomer S, Adlercreutz P y B Mattiasson. 1992. Kilogram-Scale Ester Synthesis of acyl donor and use in lipase-catalyzed interesterifications. J Am Oil Chem Soc, Vol. 69, no. 10 october. 966-973.
- 7 Cardenas F, de Castro MS, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Valmaseda M, Elson SW y E Alvarez. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. Enzyme Microb Technol 28:145-154.
- 8 Cardenas F, Alvarez E, de Castro MS, Sánchez-Montero JM, Valmaseda M, Elson SW y JV Sinisterra. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. J Mol Catal B: Enzymatic 14:111-123
- 9 Chaplin MF y C Bucke. 1990. Enzyme technology. Cambridge University Press, Great Britain. 1-78
- 10 Chen HP, Hsiao KF, Wu SH y KT Wang. 1995. Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett; 17:305-8.
- 11 Demirjian DC, Moris-Varas F y CS Cassidy. 2001. Enzymes from extremophiles. Curr Opin Chem Biol. 5:144-151.
- 12 Dwivedi BK y JE Kinsella. 1974. Carbonyl production from lipolyzed milk fat by the continuous mycelial culture of *Penicillium roqueforti*. J Food Sci.39:83
- 13 Dwivedi BK y JE Kinsella. 1974. Continuous production of Blue-type cheese flavor by submerged fermentation of *Penicillium roqueforti*. J Food Sci.39:620.

- 14 Dziezak, J. 1986. Enzyme modification of dairy products. *Food Technol.* 44:114-20.
- 15 Dziezak JD. 1991. Enzyme catalysts for food processes. *Special Report. Food Technol* 45(1):78-85.
- 16 Ghosh PK, Saxena TK, Gupta R, Yadav RP y S Davidson. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci Prog.* 79:119-57.
- 17 Godfredesen SE. 1990. Microbial enzymes and biotechnology. Chap 7. *Microbial Lipases*. Fogarty MW y TC Kelly (Eds). Elsevier Applied Science, USA 255-273.
- 18 Gill I y R Valivety. 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol.* 15, 401-409
- 19 Gill I y R Valivety. 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 2: biotransformations and biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 15, 470-478
- 20 Hill ChG Jr, Garcia H, Sehanputri P, Crowley C, Arcos J, Keough K y C Torres. 1999. Use of immobilized lipases to prepare dairy products enriched in conjugated linoleic acid (CLA). *CDR Annual Report*.
- 21 Hutt AJ y J Cadwell. 1984. The importance of stereochemistry in the clinical pharmacokinetics of the 2-arylpropionic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Pharmacokinetic.* 9:371-3.
- 22 Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel VM, Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microb Rev* 15:129-163.
- 23 Jaeger KE y MT Reetz. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16:396-403.
- 24 Jaeger KE y T Eggert. 2002. Lipases for Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13:390-397.
- 25 Kheadr EE, Vuillemand JC y SA El Deeb. 2002. Acceleration of Cheddar Cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. *Journal of Food Science.* 67, No. 2:485-92.
- 26 Kheadr EE, Vuillemand JC y SA El Deeb. 2003. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International.* 36:241-52.
- 27 Klibanov AM. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc Chem Res.* 23:114-20.

- 28 Kilbanov AM. 1997. Why are the enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends Biotechnol.* 15:97-101.
- 29 Kilara A. 1985. Enzyme-modified lipid food ingredients. *Process Biochem.* 120: 35-45.
- 30 Kim J, Altreuter DH, Clark DS y JS Dordick. 1998. Rapid synthesis of fatty acid esters for use as potential food flavors. *JAOCS.* 75(9):1109-13.
- 31 Koeller KM y CH Wong. 2001. Enzymes for chemical synthesis. *Nature Vol.* 409 11 January 232-240.
- 32 Law BA. 1984. Flavor development in cheese. En: *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Davis FL y Law BA (ed). Elsevier Appl Sci Pub Barking Inglaterra. 187-208.
- 33 Liaquat M y RK Owusu Apenten. 2000. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of Food Science.* 65(2): 295-99.
- 34 Neidleman SL. 1986. Enzymology and food processing. *Biotechnology food process.* Marlander SK, Labuza TP. (Eds) Noyes publications New Jersey. USA. 37-41.
- 35 Magee E y NF Olson. 1981. Microencapsulation of cheese ripening system: Formation of microcapsules. *J Dairy Sci* 64(4):600-610.
- 36 Marangoni AG y D Rousseau. 1999. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Research International.* 31(8): 595-99
- 37 Pannell L y NF Olson. 1991 a. Methyl Ketone production in milk-fat-coated microcapsules. 1. Variation of lipase and spore concentration. *J Dairy Sci* 74(7):2048-2053.
- 38 Pannell L y NF Olson. 1991 b. Methyl Ketone production in milk-fat-coated microcapsules. 2. Methyl Ketones from controlled concentration of free fatty acids. *J Dairy Sci* 74(7):2053-2059.
- 39 Piazza GJ. 1991. Generation of polyunsaturated fatty acids from vegetable oils using the lipase from ground oat (*Avena Sativa L.*) seeds-as a catalyst. *Biotechnol Lett.* 13(3):173-78.
- 40 Piazza GJ. 1991. Generation of ricinoleic acid from castor oil using the lipase from ground oat (*Avena Sativa L.*) seeds-as a catalyst. *Biotechnol Lett.* 13(3):179-84.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 41 Rao R y BR Lokesh. 2003. Nutritional evaluation of structured lipid containing omega 6 fatty acid synthesized from coconut oil in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 248: 25-33.
- 42 Reetz MT y KE Jaeger. 2002. Directed evolution as a means to create enantioselective enzymes for use in organic chemistry. In *Directed Molecular Evolution of Proteins*. Edited by Brakmann S, Johnson K. Weinheim: Wiley-VCH, 245-279.
- 43 Sharma R, Chisti Y y U Chand Banerjee. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*.19:627-62
- 44 Sonnet PE. 1988. Lipase selectivities. *J Am Oil Chem.Soc* 65(6):900-904.
- 45 Therisod M y AM Klivanov. 1987. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugar catalyzed by lipases in organic solvents. *J. Am Chem Soc*. 109:3977-81.
- 46 Vulfson EN. 1994. Industrial applications of lipases. In: Woolley P, Peterson SB, editors. *Lipases- their structure, biochemistry and applications*. Cambridge: Cambridge Univ. Press. pp. 271-88.
- 47 Weber N, Weitkamp P y KD Mukherjee. 2002. Cholesterol-lowering food aditives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Research International*. 35: 177-181.
- 48 Zainal Z y MS Affandi. 1999. Enzymatic Interesterification of Palm Stearin and Palm kernel Olein. *AOACS*.76(9):1003-1008.