

SINTESIS DE TRIACILGLICERIDOS RICOS EN ACIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) MEDIANTE ESTERIFICACION ENZIMATICA EN UN MEDIO LIBRE DE SOLVENTE

SYNTHESIS OF CLA-ENRICHED TRIACYLGLYCEROLS BY ENZYMATIC POLYESTERIFICATION IN A SOLVENT-FREE MEDIUM

A. Huesca-Toral¹, A. López-Hernández¹, J. O. Angulo-Guerrero¹, C. G. Hill, Jr.² y H. S. García^{1,*}

¹ UNIDA-Instituto Tecnológico de Veracruz. M. A. de Quevedo 2779, Veracruz, Ver. 91897 México.

² Department of Chemical and Biological Engineering, University of Wisconsin-Madison, 1415 Engineering Dr. Madison, WI 53706, EUA.

Recibido 18 Junio-2004; Aceptado 8 Abril-2005

Resumen

El término “ácido linoleico conjugado” (CLA) designa a la mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico. Diferentes isómeros han sido asociados con actividades biológicas como la anticarcinogénica. El CLA se encuentra presente de manera natural solo en algunos alimentos y en cantidades bajas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los factores temperatura (40, 50, 60 y 70°C), relación molar de sustratos (3:1 y 4:1 ácido graso:glicerol) y tipo de biocatalizador [lipasas comerciales de *Candida antarctica* fracción B (Chyrazyme L-2) y *Rhizomucor miehei* (IM-60)] sobre la producción de triacilglicéridos (TAGs) ricos en CLA, mediante poliesterificación enzimática sin disolvente orgánico. Las reacciones se efectuaron entre glicerol anhidro y un concentrado de CLA libre. La formación de mono-, di- y triacilglicéridos y la desaparición de ácidos grasos libres fue analizada mediante HPLC. Los mejores tratamientos se eligieron aplicando una prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos que permitieron la mayor generación de TAGs (76%±2.7 de los moles totales de ácido graso fueron esterificados para formar TAGs) fueron aquellos en los que se empleó ácido graso en exceso molar 4:1 y las temperaturas de reacción más elevadas (60 y 70°C). En estos casos se obtuvieron resultados similares para ambas enzimas. Se encontró una relación lineal entre la producción de TAGs en el equilibrio y la temperatura de reacción para ambas lipasas.

Palabras clave: ácido linoleico conjugado, triacilglicéridos, poliesterificación enzimática, temperatura, relación molar.

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is a term used to designate a mixture of positional and geometrical isomers of linoleic acid. Several of these isomers have been associated with important biological roles, including anti carcinogenic activity. Basically, the natural sources of CLA are dairy and meat products. However, its presence in such foods is in very small quantities. The present work was undertaken to evaluate the effect of temperature (40, 50, 60 and 70°C), molar ratio of substrates (3:1 and 4:1, free fatty acid: glycerol), and two commercially available biocatalysts [*Candida antarctica* fraction B (Chyrazyme L-2), and *Rhizomucor miehei* (IM-60)], on the rate of production of triacylglycerols (TAG) from glycerol and CLA via enzyme-mediated polyesterification reactions. The formation of acylglycerols and the consumption of the free fatty acids were monitored by periodic withdrawal of samples for analysis by HPLC. Best treatments were selected by the Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$). The conditions which produced maximum synthesis of TAG (76% ±2.7 moles of the original fatty acid were esterified to form TAG), were those in which free fatty acid was used in molar excess (4:1 mole ratio of CLA to glycerol) and high temperatures (60 and 70°C) were employed. For these conditions, there were no significant differences between the results obtained with either commercial enzyme. For both enzymes, a linear relationship was observed between the production of the TAG and the reaction temperature

Keywords: conjugated linoleic acid, triacylglycerides, enzymatic polyesterification, temperature, molar ratio.

*Autor para la correspondencia: hsgarcia@itver.edu.mx
Tel. (22) 99345701, Ext. 116, Fax: Ext. 201

1. Introducción

La tendencia actual en el consumo de alimentos está representada por un grupo de consumidores preocupados por obtener, además del efecto nutritivo, un beneficio para la salud. Este grupo está interesado en productos que contengan nutrientes naturales que le ayuden a prevenir o incluso curar enfermedades. El ácido linoleico conjugado (CLA) ha sido asociado con importantes actividades biológicas entre las cuales destacan la anticarcinogénica y antiaterogénica, así como la capacidad de disminuir el contenido de grasa corporal. Debido a las propiedades del CLA, las grasas que contienen residuos del ácido linoleico conjugado son de particular interés para la industria alimentaria. Se ha sugerido que la dosis diaria para obtener un efecto protector del CLA es de 3.5 g. CLA/día para una persona de 70 Kg. Desafortunadamente, el CLA se encuentra presente de manera natural sólo en algunos alimentos lácteos y cárnicos en muy baja concentración.

En virtud de los efectos benéficos a la salud ligados al consumo de CLA y en base a la baja cantidad del mismo en alimentos, resulta atractiva la generación de metodologías que permitan elevar su contenido en grasas alimenticias. Una estrategia para poder aumentar el consumo del ácido linoleico conjugado es la preparación de grasas enriquecidas con CLA, las cuales pueden ser empleadas en diversas formulaciones de alimentos. La tecnología enzimática es una alternativa viable para este fin. Por ejemplo, se ha reportado el enriquecimiento de grasa butírica con CLA mediante interesterificación enzimática (García y col., 1998), así como la preparación de mono- y diacilglicéridos a partir de CLA en un sistema sin disolvente (Arcos y col., 1998). El objetivo del presente trabajo fue evaluar condiciones de reacción que permitan generar la mayor proporción de triacilglicéridos ricos en CLA mediante

poliesterificación enzimática en un sistema sin disolvente orgánico.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para llevar a cabo las reacciones de poliesterificación se emplearon lipasas inmovilizadas. La lipasa de *Candida Antarctica* fracción B (CHIRAZYME L-2 carrier-fixed C2 Lyo) de Boëringer-Mannheim Corporation y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM L9) de Novo Nordisk. El CLA utilizado fue el producto comercial: "CLA one"; que contiene 75 % de CLA (obsequio de Pharmanutrients, Lake Bluff, IL). El glicerol anhidro se adquirió de Baker. El tamiz molecular consistente de pelets de 1/16 de pulgada y diámetro nominal de poro de 5 Å se compró a SIGMA CHEMICAL CO. Los solventes utilizados para el análisis de ácidos grasos por cromatografía de líquidos: hexano, alcohol isopropílico, acetato de etilo, fueron grado reactivo marca Baker, al igual que el cloroformo y el metanol utilizados para la dilución de las muestras de reacción.

2.2 Métodos

2.2.1 Síntesis de acilglicéridos

Para las reacciones de poliesterificación de CLA en glicerol con relación molar 3:1 (CLA:glicerol) se procedió como sigue: se prepararon 6 g de mezcla de reacción, para lo cual se pesaron 0.6 g de glicerol y 5.4 g de CLA en el matraz que fungió como reactor, posteriormente se adicionaron 0.8 g de mallas moleculares y 300 mg de enzima, que representan 5 % de la mezcla de reacción. Para las reacciones con relación molar 4:1 se pesaron 0.46 g de glicerol, 5.54 g de CLA, 0.8 g de mallas moleculares y 300 mg de enzima. Una vez lista la mezcla de reacción se tomó la muestra de tiempo 0 y después el matraz se colocó sobre una parrilla de agitación. La agitación

se mantuvo aproximadamente a 300 rpm con un agitador magnético para todas las reacciones. Las reacciones se efectuaron con cada enzima y a cada relación molar a 40, 50, 60 y 70 °C durante 48 h; lo cual arrojó un total de 16 tratamientos. Estos se llevaron a cabo de modo completamente aleatorio y con una repetición, dando un total de 32 reacciones. Se tomaron muestras de reacción de 200 µL con una pipeta automática directamente del reactor a los tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36 y 48 h; para esto fue necesario detener la agitación 5 minutos aproximadamente. Al terminar cada muestreo se burbujeó nitrógeno al espacio libre del reactor a fin de eliminar posible humedad y para desplazar el oxígeno presente para evitar oxidación.

La estequiometría de la síntesis del triéster de CLA en glicerol requiere una relación molar de ácido graso a glicerol de 3:1. Sin embargo, relaciones mayores de CLA a glicerol generalmente dan mayores porcentajes de triacilglicerol en la mezcla final de productos, asegurando así que la reacción prosiga por tiempo suficiente. Hay que hacer notar que la formación de mono- y diésteres ocurre rápidamente a 40 °C, pero para la síntesis de triésteres usando lipasas 1,3-específicas la migración de un grupo acilo desde la posición sn-1 o la sn-3 a la posición sn-2 es limitante de velocidad (Otero y col., 1999). Debido a que en este proyecto la intención fue obtener elevadas proporciones de TAGs, se probaron las relaciones molares 3:1 y 4:1 CLA:glicerol.

2.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cuantificación de acilglicéridos así como de ácido graso libre se llevó a cabo por HPLC como se describe a continuación. Las muestras de la mezcla de reacción se tomaron directamente del reactor. Se disolvieron 200 µL de cada muestra (fase acilglicerol/ácido graso) en 5 mL de una mezcla (2:1 v/v) de

cloroformo:metanol. De esta solución se tomó una alícuota de 1 mL. La alícuota se evaporó y posteriormente se resuspendió en 4 mL de solución de hexano:2-propanol 9:1. De esta nueva solución se inyectaron 10 µL al cromatógrafo y se analizaron de acuerdo al método reportado por Liu y col., (1993).

El contenido de mono- di-, triacilglicérols y ácidos grasos sin reaccionar en la fase acilglicerol/ácido graso fue determinado en un equipo HPLC marca Waters, acoplado a un detector láser evaporativo ELSD-500 marca Alltech. El sistema HPLC consiste de una bomba binaria Waters 1525, un automuestreador y un calentador de columna; el sistema es controlado mediante el software Breeze. La columna utilizada para la separación fue una Econosil Sílica 5U fase normal (250 x 4.6 mm) marca Alltech, la cual se mantuvo a 40 °C. El tiempo de cada análisis fue de 20 minutos. Éste se realizó siguiendo el método reportado por Liu y col., (1993), con una modificación: en la fase A no se incorporó ácido fórmico. Se emplearon dos fases móviles: la fase A consistió de hexano, 2-propanol y acetato de etilo en las proporciones respectivas (v/v) 80:10:10. La fase B consistió solamente de hexano. Se utilizó una válvula con la finalidad de enviar solamente el 50 % del flujo al detector y de esta manera tener una mejor resolución. El flujo de la fase móvil fue de 2 mL/min.

2.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Minitab v. 10.0, con el que se realizó un análisis de varianza ($p < 0.05$) así como la prueba de rango múltiple de Tukey. Lo anterior fue con el fin de establecer las diferencias entre tratamientos y elegir el que proporcionara, bajo las condiciones probadas en este trabajo, la mayor esterificación de ácido graso en forma de triacilglicérido.

3. Resultados y discusión

3.1 Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura sobre las reacciones de poliesterificación para cada enzima inmovilizada en cada una de las relaciones de sustratos. Los resultados de esterificación se expresaron como equivalentes de CLA, que representa el porcentaje de ácido graso esterificado en forma de mono-, di- o triacilglicéridos según el caso.

3.1.1 Efecto de la temperatura sobre la esterificación de ácido graso como MAG

En este trabajo no se empleó la relación de sustratos 2:1 sugerida por Arcos y col., (1998) para la síntesis de MAG y DAG, ya que el objetivo fue obtener la mayor cantidad posible de CLA esterificado como TAG, y para esto se requieren relaciones mayores, como 3:1 y 4:1. Bajo estas condiciones ya se sabía que el porcentaje que se obtendría de mono- y diacilglicéridos sería bajo. El mayor grado de esterificación de CLA como MAG con ambas enzimas se obtuvo a 40 °C dentro de las primeras 4 horas de reacción. Lo anterior concuerda con lo reportado por Otero y col., (1999), quienes encontraron que la formación de mono- y diésteres procedió rápidamente a 40 °C bajo condiciones similares a las seguidas en este trabajo (lipasa de *R. miehei* y relación estequiométrica de sustratos, sin solvente). Por otro lado, a 70 °C que fue la temperatura mayor de prueba, se alcanzó el menor porcentaje de CLA esterificado como MAG, para ambas enzimas a ambas relaciones molares, pues a lo largo del tiempo la concentración de MAG va disminuyendo para dar lugar a la formación de DAG y TAG. Los porcentajes de CLA esterificado como MAG alcanzados utilizando la lipasa de *C. antarctica* y relación molar 3:1, fueron diferentes para todas las temperaturas

($p < 0.05$). También fueron diferentes los tratamientos con relación 4:1, apreciándose una relación inversamente proporcional entre la temperatura y la cantidad de ácido graso esterificado como MAG. Igual comportamiento se obtuvo al trabajar con la lipasa de *R. miehei*. La formación de MAG es rápida al inicio de la reacción y disminuye con el tiempo debido a la formación de DAG y TAG. Estos resultados son similares a los reportados por Noriega (2002), quien también encontró que para tiempos de reacción cortos y temperaturas bajas se obtuvo la mayor formación de MAG. Noriega señaló que la formación de MAG para un intervalo de 30-66 °C, y tiempos de 0.2-8.2 h (comprendidos en el presente estudio) para una proporción molar alta de 5 (ácido graso:glicerol), se obtienen niveles de formación de MAG más elevados (80-85 %) a bajas temperaturas que cuando se utilizan altas proporciones molares y tiempos cortos de reacción.

3.1.2 Efecto de la temperatura sobre la cantidad de CLA esterificado como 1,3 DAG

En las reacciones catalizadas con la lipasa de *C. antarctica* la producción de 1,3 DAG fue inversamente proporcional a la temperatura, para las dos relaciones molares de estudio. Con el análisis de varianza ($p < 0.05$) se pudo observar que los tratamientos con la relación 3:1 mostraron diferencia significativa a las cuatro temperaturas, al igual que los tratamientos con la relación molar 4:1. Noriega (2002), reportó que para proporciones molares bajas se obtienen niveles altos de formación de DAG y para altas proporciones molares la formación de DAGs es baja.

Los resultados de varias investigaciones (Haraldsson, 1995; Kosugi y Azuma, 1994) muestran que en las primeras horas de reacción los niveles de DAG son altos (30-35 %), lo cual va de acuerdo con los resultados encontrados en el presente trabajo.

En cuanto a las reacciones llevadas a cabo con *R. miehei* la tendencia observada fue similar. Los porcentajes más altos de 1,3 DAG se obtuvieron a 40 °C para ambas relaciones molares.

3.1.3 Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como 1,2 DAG.

La relación de la producción de CLA esterificado como 1,2 DAG con la temperatura fue inversamente proporcional para ambas enzimas y relaciones molares estudiadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros investigadores (Haraldsson, 1995; Kosugi y Azuma, 1994) donde se muestra que en las primeras horas de reacción los niveles de DAG son altos y su producción es mayor a más bajas temperaturas (40 °C).

Con la lipasa de *R. miehei* se obtuvieron menores porcentajes de 1,2 DAG que con la de *C. antarctica*, debido probablemente a que esta enzima es considerada específica por las posiciones sn-1 y sn-3. Puesto que debe ocurrir una intraesterificación del 1,3-diacilglicérido al 1,2-diéster antes de una esterificación al tercer grupo hidroxilo, se considera que esta isomerización es responsable de la baja velocidad de reacción que se observa cuando ha reaccionado casi 2/3 del CLA original, de acuerdo a lo señalado por Lortie y col., (1992).

3.1.4 Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como TAG

En las reacciones llevadas a cabo con lipasa de *C. antarctica* hubo una relación directamente proporcional entre la temperatura y el porcentaje de CLA esterificado como TAG. Respecto a velocidad de reacción se observó un comportamiento como el de la mayoría de las reacciones químicas, donde aumenta la

velocidad conforme se incrementa la temperatura, tal como lo señaló Segel, (1975). Malcata y col., (1992), también reportaron un aumento en la velocidad de esterificación al aumentarse la temperatura. Esto sugiere que para el rango de temperaturas y tiempo utilizados en este trabajo la enzima aparentemente no sufrió daños en su estructura tridimensional. Entre las reacciones con relación molar 3:1, la mayor cantidad de CLA esterificado como TAG se alcanzó a 70 °C, que fue la temperatura más elevada probada, y en la cual se llegó más rápido al equilibrio (8 h) pues la velocidad de reacción fue mayor.

Estos resultados son similares a los reportados por Ergon y col., (1990), quienes señalaron que conforme aumentó la temperatura se facilitó la remoción de agua del medio de reacción y la reacción se dirigió hacia una mayor síntesis de TAGs. El tiempo requerido también fue reducido conforme aumentó la temperatura. Puesto que la temperatura juega un papel muy importante en la solubilización de los reactantes, además de su influencia sobre el equilibrio de reacción y sobre la actividad enzimática, es probable que esto contribuya a que a temperaturas más elevadas se obtengan porcentajes de CLA esterificado mayores.

Empleando la lipasa de *C. antarctica* y la relación de sustratos 4:1, a 60 y 70 °C se llegó al equilibrio a 30 y 24 h respectivamente, pero a 40 y 50 °C el equilibrio no se alcanzó en el tiempo de reacción (Figs. 1 y 2). Aparentemente con la mayor cantidad de sustrato a estas temperaturas podría aumentarse el grado de esterificación de CLA como TAG pero en tiempos mayores. Entre 60 y 70 °C ya no hubo diferencia ($p < 0.05$) en el porcentaje de CLA esterificado como TAG, probablemente atribuible a saturación de la enzima, de acuerdo a lo señalado por Shuler y Kargi (1992).

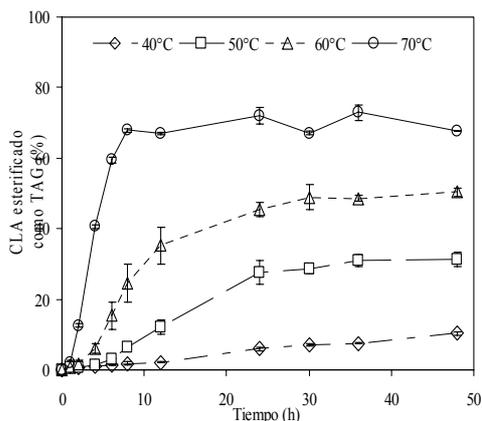


Fig. 1. Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como TAG en las reacciones con lipasa de *C. antarctica*. Relación molar de sustratos 3:1.

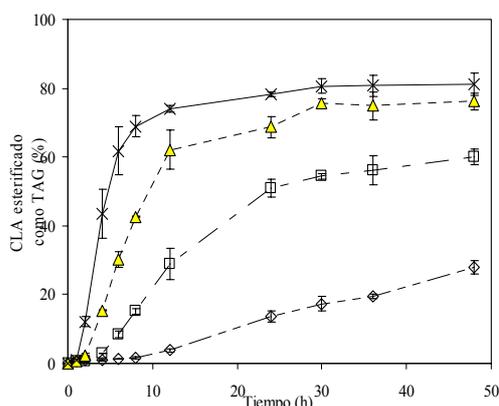


Fig. 2. Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como TAG en las reacciones con lipasa de *C. antarctica*. Relación molar de sustratos 4:1. La simbología es como en la Fig. 1.

Dentro del grupo de reacciones efectuadas con la lipasa de *R. miehei* con relación molar 3:1, hubo una producción ascendente de TAG conforme se incrementó la temperatura. Esto se puede entender considerando que un aumento en temperatura impartió más energía cinética a las moléculas reactantes, lo que permitió más colisiones productivas por unidad de tiempo; es decir, un aumento de las colisiones entre enzima y sustrato, lográndose por consecuencia el esperado aumento en velocidad de reacción (Fig. 3) (Segel, 1975).

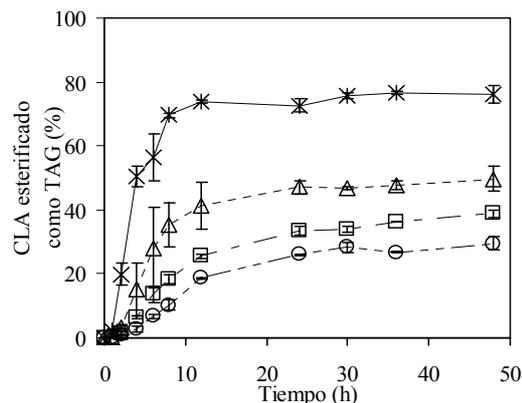


Fig. 3. Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como TAG en las reacciones con lipasa de *R. miehei*. Relación molar de sustratos 3:1. Simbología como en Fig. 1.

En las reacciones llevadas a cabo con la lipasa de *R. miehei* con relación de sustratos 4:1 (Fig. 4) el porcentaje de TAG alcanzado a 40 °C (40.78 ± 1.66) no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) con el logrado a 50 °C (38.7 ± 0.42). También fue el caso del porcentaje de TAG obtenido a 60 °C (74.6 ± 2.3) al compararlo con el porcentaje a 70 °C (71.3 ± 2.3).

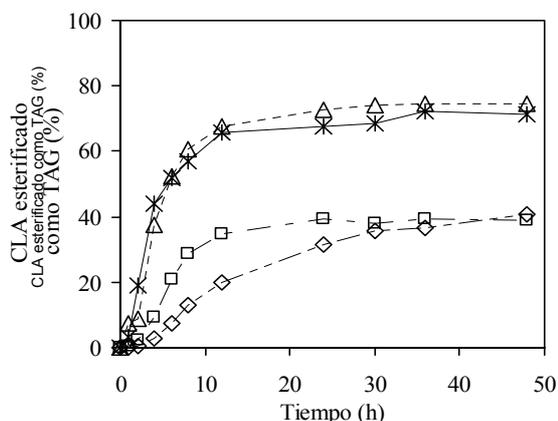


Fig. 4. Efecto de la temperatura sobre la esterificación de CLA como TAG en las reacciones con lipasa de *R. miehei*. Relación molar de sustratos 4:1. Simbología como en Fig. 1.

Estos resultados pudieron deberse a que la enzima ya se encontraba cerca de la saturación, es decir, con pocos sitios activos

disponibles para colisiones con el sustrato, y entonces se requería un aumento de temperatura superior a 10 °C para obtener un mayor porcentaje de CLA como TAG. Además, posiblemente se requirió más energía para movilizar la mayor cantidad de sustrato. Los porcentajes de CLA esterificado como TAG logrados en este trabajo fueron inferiores al 86 % de trioleína reportado por Ergon y col., (1990), sintetizada también empleando una relación estequiométrica de sustratos en un medio libre de solvente. Esta diferencia va de acuerdo con lo reportado por Selmi y col., (1998), quienes encontraron que en una reacción de esterificación, a mayor número de insaturaciones se obtuvo una menor velocidad de síntesis y del rendimiento final. Así pues, el menor rendimiento pudo deberse a la dificultad que representan las insaturaciones del CLA para las colisiones enzima-sustrato, mayor aún al ser conjugadas, pudieron haber plegado a la molécula de forma que se acentuó el impedimento estérico. Sin embargo, esta explicación es sólo una propuesta, para la cual no se cuenta aún con evidencia, además de que de acuerdo a Arcos y col., (2000), las reacciones de esterificación de glicerol con ácido oleico, linoleico y linoleico conjugado tienen un comportamiento similar.

3.1.5 Efecto de la temperatura sobre la cantidad de ácidos grasos libres (AGL)

En todas las reacciones llevadas a cabo con lipasa de *C. antarctica* con relación molar de sustratos 3:1 se observó diferencia entre los tratamientos ($p < 0.05$) por efecto de la temperatura, en la cantidad de AGL. El comportamiento mostró una relación lineal inversamente proporcional entre AGL en el equilibrio y la temperatura de reacción.

Fue a la temperatura más alta de prueba que se obtuvo la menor cantidad de AGL; es decir, la mayor cantidad de ácido graso esterificado. A esta temperatura (70 °C) se alcanzó más rápido el equilibrio dada la

mayor velocidad de reacción. Estos resultados concuerdan con los de Martínez (2001), quien en sus estudios de poliesterificación de CLA en glicerol reportaron que a mayor temperatura la velocidad de reacción fue mayor, se alcanzó más rápido el equilibrio y se obtuvieron además valores elevados de CLA de equilibrio en las condiciones probadas. Malcata y col., (1990) también reportaron un aumento en la velocidad de esterificación al aumentar la temperatura. Esto implica que para el rango de temperaturas y tiempo utilizado en este trabajo la enzima probablemente no sufrió daños en su estructura tridimensional.

Empleando la lipasa de *C. antarctica* y la relación molar de sustratos 4:1 no hubo diferencia estadística en el porcentaje de AGL en las reacciones efectuadas a 60 y 70 °C. Esto fue atribuible a la saturación de la enzima, de acuerdo a lo propuesto por Shuler y Kargi (1992). La temperatura más alta probada produjo mayor velocidad de reacción y se alcanzó el equilibrio más rápido.

Al estudiar las reacciones de esterificación con respecto a la relación de sustratos 3:1 en que se utilizó la lipasa de *R. miehei* a las diferentes temperaturas de prueba, se observó que la reacción que alcanzó el equilibrio más rápido (8 h) y los menores valores de AGL al equilibrio se midieron a la temperatura más elevada. Este efecto de la temperatura también se observó al emplear la relación de sustratos 4:1. Nuevamente fue la temperatura más alta probada la que generó los mejores resultados.

3.2 Efecto de la relación molar de sustratos

Se estudió el efecto de la relación molar de sustratos CLA:glicerol 3:1 y 4:1 sobre las reacciones de poliesterificación para cada enzima inmovilizada en cada una de las temperaturas. Como ya se mencionó en párrafos anteriores, se decidió emplear la relación 3:1 por ser la relación

estequiométrica sugerida para la síntesis de triacilglicéridos, así como la relación 4:1 para aumentar la cantidad de TAGs en la mezcla final de productos (Otero y col., 1999). No se emplearon relaciones menores como la 2:1 que utilizó Martínez (2001) puesto que esta dirige la reacción a la síntesis de mono- y diacilglicéridos, compuestos ampliamente utilizados en la industria alimentaria por su aplicación como emulsificantes. A continuación se discute sobre el efecto de la relación molar de sustratos sobre la reacción de esterificación de CLA ya sea como mono-, di- o triacilglicéridos.

3.2.1 Efecto de la relación molar de sustratos sobre la esterificación de CLA como MAG

Todas las reacciones efectuadas con la lipasa de *C. antarctica* mostraron diferencia significativa entre sí ($p < 0.05$) en la producción de MAG alcanzada con cada relación molar. Con la relación 4:1 se obtuvo menos MAG en el equilibrio que con la 3:1 a las cuatro temperaturas de estudio. Al ser la relación 4:1 mayor a la estequiométrica, una relación que favorece la producción de TAG, se entiende el resultado encontrado, que el MAG se consumió rápidamente tal como lo propusieron Arcos y col., (1998). Se observó una tendencia similar en resultados obtenidos por efecto de la relación molar en las reacciones catalizadas por la lipasa de *R. miehei*, a pesar de que esta enzima es considerada 1,3 específica. Estos resultados están de acuerdo con los señalados por Noriega (2002) quien estudió los niveles de MAG para un intervalo de proporción molar de 1.0-4.9 y los tiempos de 0.5-9.5 h. El autor observó que al utilizar bajas proporciones molares (< 2.0 ácido graso libre:glicerol) se requirieron mayores tiempos de reacción (> 5 h) para alcanzar altos niveles de MAG. Mientras que utilizando proporciones molares altas (> 4.0) y tiempos de reacción muy bajos (< 2 h) se obtuvo mayor formación de MAG, como fue el caso de este trabajo.

3.2.2 Efecto de la relación molar de sustratos sobre la esterificación de CLA como 1,3 DAG.

En el caso del porcentaje de CLA esterificado como 1,3 DAG, en las reacciones llevadas a cabo con la lipasa de *C. antarctica*, se esterificó más cuando se empleó la relación de sustratos 4:1. Esto fue propiciado probablemente por el rápido consumo de los MAGs dada la mayor disposición de sustrato. Al comparar los porcentajes de CLA esterificado como 1,3 DAG obtenidos con la relación 3:1 con los de la 4:1, todos los tratamientos mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$). Cuando se ocupó la lipasa de *R. miehei* la cantidad de CLA esterificado como 1,3 DAG fue menor cuando se empleó la relación de sustratos 4:1. De acuerdo con Li y Ward (1993), los niveles altos de formación de MAG y DAG son atribuidos a la especificidad posicional de la enzima de *R. miehei*. Esto implica que los niveles de formación de MAG y DAG no solamente pueden ser influenciados por las variables estudiadas en este trabajo, sino también por la especificidad de la enzima.

3.2.3 Efecto de la relación molar de sustratos sobre la esterificación de CLA como 1,2 DAG

En las reacciones llevadas a cabo con la lipasa de *C. antarctica* hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos realizados con relación molar 3:1 y los efectuados con relación 4:1 respecto a la producción de 1,2 DAG, en todas las temperaturas de estudio. Se produjeron porcentajes menores de CLA esterificado como 1,2 DAG con la relación 4:1 también a las cuatro temperaturas evaluadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Noriega (2002), quien señaló que para proporciones molares bajas se obtuvieron niveles altos de formación de DAG y para altas proporciones molares la formación de

DAGs fue baja. En las reacciones en que se empleó la lipasa de *R. miehei* también hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos efectuados con relación molar 3:1 y 4:1 a 40 y 50 °C. A dichas temperaturas se obtuvieron porcentajes menores de CLA esterificado como 1,2 DAG al emplear la relación 4:1, pero a 60 y 70 °C se esterificó igual cantidad de este tipo de acilglicérido con una y otra relación molar, debido probablemente a saturación de la enzima, de acuerdo con Shuler y Kargi (1992).

Los porcentajes de CLA esterificado como 1,2 DAG obtenidos con la lipasa de *R. miehei* fueron menores que los alcanzados con la lipasa de *C. antarctica* en todos los tratamientos, a excepción de los que se llevaron a cabo con la relación de sustratos 4:1 a 60 y 70 °C, condiciones bajo las cuales los porcentajes alcanzados fueron similares estadísticamente ($p < 0.05$). En los casos en que los porcentajes fueron menores probablemente se debió a un efecto limitante de velocidad de reacción dado por la necesaria migración de acilo de la posición sn-1 o sn-3 a la posición sn-2, previo a la formación del triéster, lo cual va de acuerdo con lo reportado por Lortie y col., (1992). A 60 y 70 °C con ambas relaciones se obtuvo el mismo porcentaje de CLA esterificado como 1,2 DAG, y bajo estas condiciones posteriormente se observó la mayor producción de TAGs.

3.2.4 Efecto de la relación molar de sustratos sobre la esterificación de CLA como TAG

En todas las temperaturas de prueba, con la lipasa de *C. antarctica* la relación 4:1 permitió la producción de porcentajes mayores de TAG que la relación 3:1 (Fig. 5). Lo anterior concuerda con lo señalado por Otero y col. (1999) referente a que la relación ácido graso:glicerol mayor a la estequiométrica generalmente da porcentajes mayores de TAG en la mezcla final de productos.

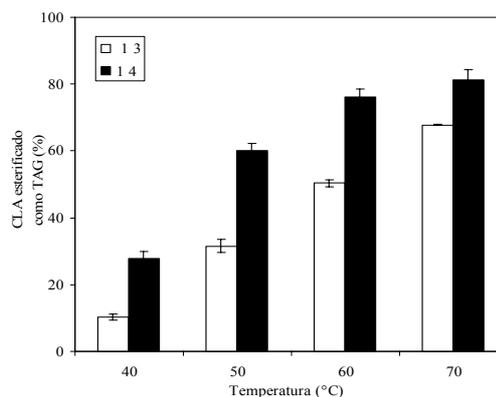


Fig. 5. Efecto de la relación molar de sustratos sobre la esterificación de CLA como TAG obtenidos en las reacciones con lipasa de *C. antarctica* a las 48 h.

En las reacciones llevadas a cabo con lipasa de *R. miehei* a 40 y 60 °C con la relación molar de sustratos 4:1 se obtuvo mayor porcentaje de CLA esterificado como TAG que con la relación 3:1 (Fig. 6). En cambio, a 50 y 70 °C no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en los valores de TAG alcanzados con ambas relaciones de prueba. Esto probablemente se deba a que la enzima estaba saturada. Para entender mejor el comportamiento de la enzima a estas temperaturas sería recomendable estudiar reacciones a temperaturas intermedias, y proponer más razones para estos resultados.

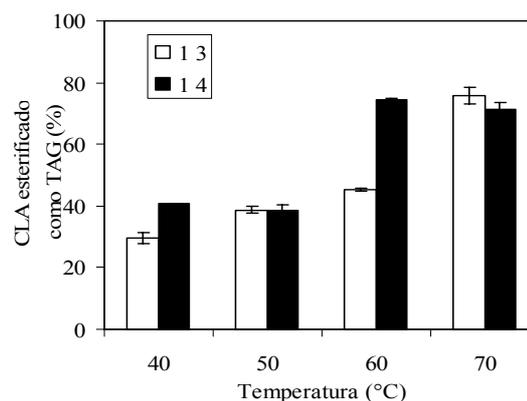


Fig. 6. Efecto de la relación molar de sustratos sobre la obtención de CLA esterificado como TAG en las reacciones con lipasa de *R. miehei* a las 48 h.

3.2.5 Efecto de la relación molar de sustratos sobre la cantidad de CLA como AGL

En todas las reacciones efectuadas con lipasa de *C. antarctica* se observó diferencia ($p < 0.0$) entre los tratamientos efectuados con relación molar de sustratos 3:1 (AGL:glicerol) y los llevados a cabo con la relación 4:1. Con la relación 4:1, en donde se empleó ácido graso en exceso, se alcanzaron porcentajes más altos de CLA esterificado, tal como se discutió en los apartados anteriores de este trabajo, permitiendo así una menor cantidad de AGL residuales. Las velocidades de reacción también han mostrado ser función de la concentración de sustratos en el medio de reacción (Akoh y Min, 1998), como se pudo constatar en el apartado 3.1.4. En trabajos previos la relación molar estequiométrica 3:1 (AGL:glicerol) se estableció como óptima para un alto rendimiento de TAGs (Cerdán y col., 1998; Arcos y col., 1998). Un exceso de glicerol incrementó el grado de esterificación debido a que el equilibrio se desplazó hacia la formación de productos; sin embargo, el rendimiento con respecto a la obtención de TAGs disminuyó debido a que se sintetizó una gran cantidad de MAG y DAG a causa del exceso de glicerol. Otero y col., (1999), al respecto han señalado que para la síntesis de TAGs se requiere la relación molar estequiométrica 3:1 (AGL:glicerol), pero relaciones mayores de AGL:glicerol generalmente rinden porcentajes mayores de TAGs en la mezcla final de productos. Así sucedió en este trabajo en las reacciones efectuadas con lipasa de *C. antarctica*. Con la relación 4:1 se esterificó más ácido graso, y con las temperaturas más elevadas (60 y 70 °C) se alcanzó la menor cantidad de AGL (12.0 ± 0.8).

En las reacciones en que se empleó la lipasa de *R. miehei* el efecto de la relación molar de sustratos difirió del observado en las reacciones con lipasa de *C. antarctica*. Con la lipasa de *R. miehei* sólo se observó

diferencia en el porcentaje de AGL debido a la concentración de sustratos en las reacciones llevadas a cabo a 60 °C. A las otras temperaturas evaluadas se supuso un grado de esterificación global similar para ambas relaciones de sustratos. Esta información se puede constatar al analizar la figura 6 donde se observa el efecto de la relación molar en la obtención de CLA esterificado como TAG en las reacciones con lipasa de *R. miehei*. Aquí se obtuvo un efecto notable a 40 °C además de a 60 °C. De manera que a 40 °C no se observó efecto de la relación molar en la esterificación total, o bien el porcentaje de AGL, pero sí en esterificación del CLA como TAG. Esta similitud en porcentaje de esterificación con las dos concentraciones estudiadas podría atribuirse a saturación de la enzima, de acuerdo con lo reportado por Shuler y Kargi (1992).

3.3 Control de humedad

En todas las reacciones se adicionaron mallas moleculares desde el inicio de la reacción, las cuales capturaron el agua producida en la reacción. No se probó el efecto de la adición de mallas debido a que la literatura reporta mejores resultados con su uso; de hecho Otero y col., (1999) reportaron que el uso de un agente desecante, como las mallas moleculares, aumenta la velocidad de reacción y el rendimiento de productos. Robles Medina y col., (1999) observaron que las mallas deben ser adicionadas desde el inicio de la reacción a fin de obtener velocidades iniciales de esterificación elevadas, como se realizó en este trabajo. Esto es contrario a lo mencionado por Ergun y col., (1990), quienes recomendaron la adición de las mallas en el momento en que la reacción se encontraba cerca del equilibrio. En el presente trabajo no se analizó el contenido de humedad a lo largo de las reacciones; se consideró que la adición de mallas moleculares permitió controlar

satisfactoriamente el agua producida en las reacciones de esterificación, pues en ninguna de ellas se observó hidrólisis de producto.

3.4 Tratamientos que permitieron mayor esterificación de CLA como TAG

Cinco de los tratamientos probados permitieron la obtención del mayor porcentaje de CLA esterificado como TAG (81.1 ± 3.2). En dos de ellos se empleó la lipasa de *C. antarctica* (Tratamiento 1: *C. antarctica*, 60°C, relación molar de sustratos 4:1, equilibrio a las 30 h de reacción; Tratamiento 2: *C. antarctica*, 70 °C, relación molar de sustratos 4:1, equilibrio a las 24 h) y en tres la de *R. miehei* (Tratamiento 3: *R. miehei*, 60 °C, relación molar de sustratos 4:1, equilibrio a las 24 h; Tratamiento 4: *R. miehei*, 70 °C, relación molar de sustratos 3:1, equilibrio a las 12 h; Tratamiento 5: *R. miehei*, 70 °C, relación molar de sustratos 4:1, equilibrio a las 24 h).

Se consideraron los factores costo de enzima, temperatura, relación molar de sustratos y tiempo en que se alcanzó el equilibrio para seleccionar un tratamiento.

Los tratamientos 3 y 5 llegaron al mismo tiempo al equilibrio. Entre estos fue mejor el 3 pues se empleó menor temperatura; para elegir entre el 3 y el 4 pareció mejor el 4 porque con este tratamiento se llegó al equilibrio en la mitad de tiempo (12 h) que el 4 y 5. Sin embargo, haría falta evaluar costos energéticos y considerar la vida útil de la enzima para elegir con mayor seguridad entre dichos tratamientos.

En cuanto a la relación molar de sustratos, este factor no fue determinante desde el punto de vista económico, pues el paso de relación molar 3:1 a 4:1 implicó un aumento muy pequeño en masa de CLA, de 5.4 a 5.54 g.

Los tratamientos 1 y 2 alcanzaron el equilibrio en 30 y 24 h respectivamente. Es probable que el tratamiento 1 permita un

importante ahorro en energía además de proteger a la enzima de un posible daño a 70 °C. No hubo diferencia entre enzimas para alcanzar el mayor porcentaje de CLA esterificado como TAG ($p < 0.05$ y prueba de Tukey). Este resultado podría apoyar lo señalado por Ergon y col., (1990), quienes sugirieron que la lipasa de *R. miehei* se comporta como enzima 1,3 específica en reacciones de hidrólisis pero es posible que esta especificidad sea totalmente diferente en reacciones de síntesis, ya sea por la reacción en sí o por el microambiente. Para elegir entre enzimas el criterio se basó en el costo, y la elegida fue la de *C. antarctica* pues actualmente su precio es aproximadamente 1/3 del costo de la lipasa de *R. miehei*. De manera que, bajo el alcance de este trabajo, el tratamiento considerado mejor fue aquel en que se utilizó la lipasa de *C. antarctica* a 60 °C con una relación molar de sustratos 4:1.

3.6 Potencial de la grasa obtenida para emplearse en la elaboración de alimentos

La grasa producida con el mejor tratamiento bajo las condiciones probadas en este trabajo, puede ser incorporada a algún producto alimenticio y obtener un alimento nutracéutico. Esta incorporación debe hacerse con una previa purificación de la grasa que puede efectuarse por destilación molecular, pues es necesario que se disminuya la cantidad de ácido graso en forma libre hasta por lo menos el 8 % (Arcos y col., 1998) para satisfacer los requerimientos relativos de la FDA para los ácidos grasos de una mezcla con fines alimenticios. Los mono- y diacilglicéridos recuperados pueden emplearse en reacciones posteriores de síntesis de lípidos estructurados o directamente utilizarse como emulsificantes en alimentos. Un alimento propicio para ser fortificado con esta grasa sería la leche de vaca, pues la grasa butírica es la que contiene la mayor cantidad de acilglicéridos ricos en CLA de manera natural. La leche tendría

además la facilidad de diversificar los productos fortificados en CLA, dada la gran gama de productos lácteos como queso, mantequilla, crema, yogurt, licuados, etc. que serían diferentes opciones para el consumidor potencial.

Conclusiones

Existe una relación proporcional entre la producción de TAGs en el equilibrio y la temperatura de reacción para ambas lipasas al utilizar la relación molar 3:1. Esta relación también se dio al emplear la relación 4:1, a excepción del intervalo 60-70°C para las dos lipasas y 40-50 °C para *R. miehei*.

En las reacciones llevadas a cabo con la lipasa de *C. antarctica* la relación molar 4:1 permitió mayor porcentaje de CLA esterificado como TAG que la 3:1 en todas las temperaturas de prueba.

Para la lipasa de *R. miehei*, la relación molar fue significativa para obtener mayor porcentaje de CLA esterificado como TAG con la relación molar 4:1 a 40 y 60°C, pero no a 50 y 70°C.

Las dos lipasas estudiadas produjeron un alto porcentaje de CLA esterificado como TAG.

Referencias

- Akoh, C.C. y Min, P.B. (1998). Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Marcel Dekker, Inc. EUA.
- Arcos, J., Otero, C. y Hill Jr., C.G. (1998). Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system. *Biotechnology Letters* 6, 617-621.
- Arcos, J.A., García, H.S. y Hill Jr., C.G. (2000). Continuous enzymatic esterification of glycerol with (poly) unsaturated fatty acids in a packed-bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 5, 563-570.
- Cerdán, L.E., Medina, R.A., Jiménez, G.A., Ibáñez, G.M.J. y Molina, G.E. (1998). Síntesis of polyunsaturated fatty acid-enriched triglycerides by lipase-catalysed esterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 10, 1329-1337.
- Ergan, F., Trani, M. y André, G. (1990). Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipases in non-aqueous media. *Biotechnology and Bioengineering* 35, 195-200.
- García, H.S., Storkson, J.M., Pariza, M.W. y Hill Jr., C.G. (1998). Enrichment of butteroil with conjugated linoleic acid via enzymatic interesterification (acidolysis) reactions. *Biotechnology Letters* 4, 393-395.
- Haraldsson, G., Gudmundsson, G. y Almarsson, O. (1995). The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron Letter*. 36, 941-952.
- Kosugi, Y. y Azuma, N. (1994). Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 12, 1397-1403.
- Li, Z. y Ward, P. (1993). Enzyme catalyzed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acid. *Biotechnology Letters* 15, 185-188.
- Liu, J., Lee, T., Bobik, Jr E., Guzman-Harty, M., y Hastilow, C. (1993). Quantitative determination of monoglycerides and diglycerides by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 4, 343-347.
- Lortie, R., Trani, M. y Ergan, F. (1992). Kinetic study of the lipase-catalyzed synthesis of triolein. *Biotechnology and Bioengineering* 41, 1021-1026.
- Malcata, F., Reyes, H., Garcia, H.S., Amundson C.H. y Hill Jr., C.G. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 426-446.
- Marangoni, A.G. y Rousseau, D. (1995). Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends in Food Science & Technology* 6, 329-335.
- Martínez, C. E. (2001). Empleo de lipasas en solventes orgánicos para preparar glicéridos enriquecidos con ácido linoleico conjugado (CLA). Tesis de Doctorado.

- Instituto Tecnológico de Veracruz.
México.
- Noriega, J. A.. 2002. Cinética de esterificación enzimática del ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico del aceite de sardina (*Sardinops sagax caeruleus*). Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Otero, C., Arcos, J.A., García, H.S. y Hill, C.G. Jr. (1999). Enzymatic synthesis and hydrolysis reactions of acylglycerols in solvent-free systems. En: *Methods in Biotechnology, Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*. (E. N. Vulfson, P.J. Halling, y H. L. Holland, eds.), Pp. 479-492. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Robles-Medina, A., Esteban-Cerdán, L., Jiménez-Giménez, A., Camacho-Paez, B., Ibáñez-González, M. J. y Molina-Grima, E. (1999). Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oil. *Journal of Biotechnology* 70, 379-391.
- Selmi, B., Gontier, E., Ergan, F. y Thomas, D. (1998). Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 182-186.
- Segel, I.H. (1975). Effects of pH and temperature. Capítulo 11, en: *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Pp 926-929. John Wiley & Sons. Nueva York.
- Shuler, M.L. y Kargi, F. (1992). *Bioprocess Engineering*. 1a. ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J. Pp 58-67.