



Título: OBTENCIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS MEDIANTE ALCOHOLISIS Y ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICAS

Nombre: Muñío Martínez, M^a del Mar

Universidad: Universidad de Almería

Departamento: Ingeniería química

Fecha de lectura: 25/09/2008

Programa de doctorado: INGENIERÍA DE BIOPROCESOS: FÁRMACOS, MEDIOAMBIENTE Y ALIMENTACIÓN

Dirección:

> **Director:** ALFONSO ROBLES MEDINA

> **Codirector:** LUIS ESTEBAN CERDÁN

Tribunal:

> **presidente:** FERNANDO CAMACHO RUBIO

> **secretario:** FRANCISCO GARCÍA CAMACHO

> **vocal:** SEBASTIÁN SÁNCHEZ VILLASCLARAS

> **vocal:** PATRICK ADLERCREUTZ

> **vocal:** EMILIO MOLINA GRIMA

Descriptores:

> ENZIMOLOGIA

> BIOQUIMICA DE LIPIDOS ALIMENTARIOS

> LIPIDOS

> ACIDOS GRASOS

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: RESUMEN

La evolución del concepto de nutrición a lo largo de los años ha ido unida al deseo de alcanzar la calidad de vida y el bienestar integral de los individuos. De esta forma surgió el concepto de alimento funcional. La utilización de la Biotecnología en el campo de los alimentos funcionales y de la nutrición clínica se dirige a la obtención de compuestos de interés nutricional y farmacológico que puedan ser incorporados a la dieta común o a las dietas específicas.

Entre los diferentes tipos de alimentos funcionales se encuentran los ácidos grasos omega-3, el ácido oleico, los fitosteroles, y otros (Silveira Rodríguez et al., 2003). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega 3 más



importantes son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA), ambos de origen marino. Muchos autores han estudiado estos ácidos y han confirmado el efecto beneficioso que ejercen sobre la salud humana.

El objetivo de este trabajo es la obtención de triacilglicéridos (TAG) estructurados (TAGE), es decir, TAG con una composición determinada en ácidos grasos colocados, además, en posiciones concretas de la molécula de TAG. De acuerdo con el conocimiento actual, su absorción intestinal depende de su composición y de la distribución de los ácidos grasos entre las posiciones extremas sn-1 y sn-3, y la posición central sn-2. Una distribución conveniente consiste en la presencia de ácidos grasos de cadena media (M) en las posiciones sn-1 y sn-3 del TAG y ácidos grasos de cadena larga n-3 (L) en la posición central (TAGE de estructura MLM). Numerosas empresas ya comercializan lípidos estructurados de varios tipos, como Betapol, Structolipid, Caprenin, Benefat y Captex810D.

La síntesis de lípidos estructurados (TAGE) se puede realizar básicamente mediante dos tipos de procesos: químicos y enzimáticos; estos últimos presentan la ventaja de controlar la distribución de los ácidos grasos en el producto final, por la especificidad posicional de las lipasas empleadas. Esta síntesis por catálisis enzimática puede hacerse mediante procesos de una etapa, como la acidolisis de TAG y ácidos grasos, y mediante procesos de dos etapas, como la alcoholisis y la esterificación. El presente trabajo se centra en el estudio de este último proceso, catalizando ambas reacciones enzimáticas mediante lipasas sn-1,3 específicas. Tras cada reacción debe procederse a la separación del producto deseado. Varios autores han empleado este método para la obtención de lípidos estructurados del tipo MLM, entre ellos Schmid et al. (1998), Soumanou et al. (1998), Irimescu et al. (2002) y González Moreno (2002).

Las lipasas que catalizan ambas reacciones deben presentar especificidad posicional sn-1,3; de esa forma, después de las dos reacciones, se debe conservar la composición en ácidos grasos de la posición central del TAG inicial.

A)ALCOHOLISIS DE ACEITES MARINOS CON ETANOL CATALIZADA POR LIPASAS sn-1,3 ESPECÍFICAS

Para la alcoholisis enzimática se han empleado como sustratos de partida aceites marinos ricos en PUFA, como los aceites de hígado de bacalao (AHB) y de atún (AT).

Para catalizar esta reacción se han ensayado cinco lipasas. De todas ellas fueron la lipasa D, de *Rhizopus oryzae*, y Novozym 435 (N-435), de *Candida antarctica*, las que proporcionaron los mayores rendimientos en 2-MAG.

En la alcoholisis de AHB con etanol absoluto seco, catalizada por la lipasa D inmovilizada sobre polipropileno microporoso (Accurel MP-1000), se alcanzaron rendimientos en 2-MAG del 75%. La relación molar alcohol/aceite más adecuada varió en función del tipo de aceite empleado; así, con el AHB la relación era de 22:1, mientras que para el AT fue de 11:1. También se estudió la influencia de la intensidad de tratamiento (IT, masa de lipasa \times tiempo/masa de aceite) y de la cantidad de disolvente sobre el rendimiento en 2-MAG; los valores más adecuados fueron 3 mL de acetona/g de aceite y 6 g lipasa \times h/g aceite, respectivamente. Cuando

esta reacción se llevó a cabo en ausencia de disolvente, la velocidad de reacción disminuyó considerablemente y fueron necesarias IT tres veces mayores que la mencionada para alcanzar rendimientos similares a los obtenidos con disolvente.

Sin embargo, a pesar de que con la lipasa D se alcanzaron los mayores rendimientos en 2-MAG, se apreció que perdía su estabilidad con relativa rapidez debido a su contacto prolongado con etanol; de esa forma, cuando era reutilizada seis veces, la lipasa presentaba una pérdida de actividad casi total. Esta desactivación provocaba, por ejemplo, que esta lipasa no pudiera utilizarse inmovilizada en un reactor de lecho empacado, debido al elevado tiempo de contacto de la lipasa con el alcohol.

Por este motivo, finalmente se seleccionó Novozym 435 para catalizar la alcoholisis. Con esta lipasa se obtuvieron rendimientos en 2-MAG del 90% utilizando etanol 96% (v/v) y AHB en una relación molar de 79:1. Se comprobó que esta lipasa se comportaba como sn-1,3 específica en esas condiciones de gran exceso de alcohol (como ya había puesto de manifiesto Irimescu et al., 2001a, b); sin embargo, en la mezcla final de reacción se encontró una considerable cantidad de ácidos grasos libres (4,5% en peso sobre el total de la mezcla), lo que haría difícil la posterior separación de los 2-MAG. Por este motivo se descartó la utilización de este tipo de etanol y se empleó etanol absoluto o absoluto seco, en la misma relación molar etanol/AHB. En estas condiciones, casi no aparecen ácidos grasos libres tras la reacción, a cambio el rendimiento en 2-MAG se redujo considerablemente en los primeros ensayos con esta lipasa.

La alcoholisis de AHB catalizada con Novozym 435 se ha llevado a cabo en dos tipos de reactores: el reactor de dispersión y el reactor de lecho empacado, trabajando ambos en continuo y en discontinuo. En cada uno de estos reactores se ha estudiado la influencia de la intensidad de tratamiento sobre el rendimiento en 2-MAG. Los máximos rendimientos en 2-MAG (62-65%) se han obtenido en el reactor de dispersión en discontinuo, a una IT de 1 g lipasa×h/g aceite. Cuando se empleó AT como sustrato de partida se alcanzó, a la misma IT, un rendimiento máximo del 49%, notablemente inferior al alcanzado con AHB.

La alcoholisis catalizada con Novozym 435 tiene lugar mediante dos reacciones en serie en las que los TAG se transforman en 2-MAG y a continuación estos se degradan a glicerina, con ambas etapas catalizadas por la lipasa. Si las dos reacciones son de primer orden los 2-MAG obtenidos, con ambos reactores en discontinuo, variarán con la intensidad de tratamiento, $mL_t/mTAG_0$, según una determinada ecuación.

Los resultados experimentales de alcoholisis de AHB se han ajustado aceptablemente a esta ecuación y las constantes cinéticas aparentes tienen valores de en torno a $k_{1ap}=1,44-1,72$ y $k_{2ap}=0,50$ (g lipasa×h/g aceite)⁻¹, en el reactor de dispersión y $k_{1ap}=0,51$ y $k_{2ap}=0,67$ (g lipasa×h/g aceite)⁻¹, en el de lecho empacado.

En los dos reactores operando en continuo se obtienen rendimientos en 2-MAG semejantes al alcanzar el estado estacionario (en torno al 50%). Este rendimiento está muy influido por el caudal de mezcla de reacción a través del reactor, ya que esta variable determina el tiempo de contacto con la lipasa y, por tanto, la intensidad de tratamiento.

En cuanto a la estabilidad, Novozym 435 permite su reutilización, al menos, siete veces en experimentos de 2 h

de duración. También mantenía su actividad tras 300 h continuadas de operación. Por este motivo fue la lipasa seleccionada para producir 2-MAG.

B)SEPARACIÓN DE LOS 2-MAG OBTENIDOS TRAS LA REACCIÓN DE ALCOHOLISIS

Tras la alcoholisis, la mezcla final contiene mayoritariamente ésteres etílicos (EE) y 2-MAG, que deben separarse para obtener los 2-MAG con la máxima pureza y rendimiento posibles. Para ello se han empleado dos métodos: la separación por cromatografía en una columna de gel de sílice, adaptando el procedimiento descrito por Köse et al. (2002), y la extracción con una serie de mezclas de disolventes, adaptando el procedimiento descrito por Irimescu et al. (2002).

Ambos métodos de separación han dado lugar a purezas y rendimientos muy elevados. Por cromatografía se han alcanzado purezas del 99% y rendimientos del 82%; por extracción la pureza y el rendimiento alcanzados han sido del 89% y 91%, respectivamente. Sin embargo, este último procedimiento emplea disolventes de baja toxicidad y la cantidad necesaria de estos es 18 veces menor que al utilizar la columna cromatográfica.

C)ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE 2-MAG CON ÁCIDO CAPRÍLICO

En esta reacción se emplearon como sustratos los 2-MAG purificados y ácido caprílico (8:0). De las cinco lipasas ensayadas, las lipasas D y DF, ambas de *Rhizopus oryzae*, inmovilizadas sobre Accurel MP-1000, fueron las que dieron lugar a mayores rendimientos en TAG estructurados (TAGE); estos rendimientos fueron del 95% en las condiciones más favorables (relación molar 8:0/2-MAG 3:1 e IT de 0,136 g lipasa×h/g 2-MAG). En esas condiciones se alcanzó además una incorporación de 8:0 a los TAGE del 64% y en la posición sn-2 solamente del 5%, es decir, más del 98% de todo el 8:0 incorporado lo había hecho en las posiciones extremas.

Se comprobó también que la posición central del aceite de partida permanecía prácticamente inalterada (46% de PUFA) y que la lipasa se mantenía estable al menos tras 5 usos de la misma, de forma que era posible su reutilización.

Sin embargo, al trabajar en ausencia de disolvente se alcanzaron rendimientos del 30% en TAGE sobre la mezcla final de esterificación y la posición central de los TAGE se encontraba muy contaminada con 8:0.

D)SEPARACIÓN DE LOS TAGE OBTENIDOS TRAS LA REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN

Los TAGE producidos en la esterificación se purificaron mediante la neutralización de los ácidos grasos libres con una disolución hidroetanólica de KOH y la extracción de los TAGE con hexano. Con este método se alcanzaron purezas de TAGE superiores al 95% y rendimientos del 80%. La composición y la estructura de los TAGE se mantuvo inalterada tras el proceso de purificación.

