



## **TRABAJO FIN DE GRADO**

### **Grado en Biotecnología**

# **OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDO DHA PARA LA SÍNTESIS DE FOSFOLÍPIDOS ESTRUCTURADOS**

**Autor: Raquel del Pilar Aranda Cañada**

Villaviciosa de Odón, *Junio 2022*

Título del Trabajo: Obtención enzimática de ácido DHA para la síntesis de fosfolípidos estructurados.

Este trabajo de fin de grado ha sido desarrollado en el Instituto de investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL). Instituto mixto perteneciente a la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El CIAL fue inaugurado el 24 de marzo del 2011. Se encarga del desarrollo de la investigación científica de calidad en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos, en concreto en la búsqueda de evidencias científica sobre los efectos fisiológicos de los alimentos, sus contribuciones a la salud humana y la prevención de enfermedades.

Se ha realizado en el grupo Microbio “Síntesis enzimática de fosfolípidos estructurados ricos en DHA para su aplicación como nutraceúticos en enfermedades neurodegenerativas” dirigido por la doctora Gloria Fernández Lorente.

Tutores: Gloria Fernández Lorente y Silvia Roscales García.

## INDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
LIPASAS.....	9
INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	10
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACEITE DE ANCHOVETA.....	11
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
1. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....	12
2. MATERIALES .....	12
3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD .....	14
4. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	15
5. ENSAYOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	15
6. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	16
7. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A 4°C.....	17
8. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC).....	17
9. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LIQUIDA (HPLC) .....	18
10. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD.....	21
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA .....	21
2. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA .....	22
3. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A TEMPERATURA AMBIENTE .....	22
<i>TLC</i> .....	23
<i>HPLC</i> .....	25
4. COMPARACIÓN DE LAS ENZIMAS INMOVILIZADAS CON LAS ENZIMAS COMERCIALES .....	27
5. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A 4°C.....	29
6. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD .....	32
7. SOSTENIBILIDAD.....	33
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS:.....</b>	<b>38</b>

## Índice de abreviaturas

C18: Soporte Immobeads; IB-ADS-3

CALB: Lipozyme<sup>®</sup>CALB

DHA: Ácido docosahexaenoico

EPA: Ácido eicosapentaenoico

EVERSA: Eversa<sup>®</sup> Transform2.0

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

LECI: Lecitase<sup>®</sup> Ultra

NOVO: Novozym<sup>®</sup>40119

p-NPB: P- nitrofenilo butirato

PALA Comercial: Lipozyme RM IM

PALA: Palatase<sup>®</sup> 20000

PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados

QLOW: Quara<sup>®</sup>LowP

t<sub>0</sub>: Tiempo cero

TG: Triglicérido

TLC: Cromatografía de capa fina

TLL Comercial: Lipozyme 435

TLL: Lipozyme<sup>®</sup>TL

## Resumen

El conocimiento de la relación entre la alimentación y la salud no es algo de reciente descubrimiento; entre los múltiples compuestos que se conocen cuya ingesta es beneficiosa, se ha visto que el Ácido docosahexaenoico (DHA) está directamente relacionado con la prevención del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la hidrólisis enzimática del aceite de anchoveta que conduce a la obtención del ácido DHA, que posteriormente se utilizará como sustrato en la futura obtención de fosfolípidos estructurados de gran interés clínico.

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo empleando siete lipasas diferentes inmovilizadas por adsorción hidrofóbica a soportes comerciales (Immobeads-C18). Se estudió la cinética de las reacciones mediante HPLC y TLC a temperatura ambiente y a 4°C. Se comparó la hidrólisis de enzimas inmovilizadas en el laboratorio y comerciales. Adicionalmente, también se estudió la estabilidad de las enzimas en las condiciones normales de reacción.

Tras realizar los estudios se concluyó que las mejores enzimas para la hidrólisis del aceite de anchoveta son: PALA, Eversa y NOVO. La baja temperatura ralentiza la hidrólisis, produciendo que enzimas con comportamientos diferentes a temperatura ambiente se comporten de manera semejante a bajas temperaturas y en la primera hora de reacción. Al comparar TLL y PALA inmovilizadas en el laboratorio con las enzimas inmovilizadas comerciales podemos concluir que las enzimas comerciales hidrolizan de manera más lenta. Por último, los estudios de estabilidad confirman que los derivados son activos en las condiciones de reacción durante prolongados tiempos de incubación.

## **Abstract**

Knowledge of the relationship between food and health is not something of recent discovery; among the many known compounds whose intake is beneficial, docosahexaenoic acid (DHA) has been found to be directly related to the prevention of the development of neurodegenerative diseases.

The aim of this work was to study the enzymatic hydrolysis of anchoveta oil leading to the production of DHA acid, which will subsequently be used as a substrate in the future production of structured phospholipids of great clinical interest.

The hydrolysis reactions were carried out using seven different lipases immobilised by hydrophobic adsorption to commercial supports (Immobeads-C18). The kinetics of the reactions were studied by HPLC and TLC at room temperature and at 4°C. The hydrolysis of laboratory-immobilised and commercial enzymes was compared. In addition, the stability of the enzymes under normal reaction conditions was also studied.

After carrying out the studies it was concluded that the best enzymes for the hydrolysis of anchovy oil are: PALA, EVERSA and NOVO. The low temperature slows down hydrolysis, causing enzymes with different behaviour at room temperature to behave similarly at low temperatures and in the first hour of reaction. When comparing TLL and PALA immobilised in the laboratory with commercial immobilised enzymes, we can conclude that commercial enzymes hydrolyse more slowly. Finally, stability studies confirm that the derivatives are active under the reaction conditions during prolonged incubation times.

## Introducción

La preocupación por la salud es algo que la sociedad lleva acarreado años, gracias a los grandes avances logrados en medicina y en nutrición, hoy en día se puede establecer una estrecha relación entre alimentación y bienestar.

Ya Hipócrates hacía mención a la importancia de una buena alimentación para la salud con su célebre frase: “Que tu medicina sea tu alimento y el alimento, tu medicina”.(1)

Como indica la Tabla 1, actualmente existen diferentes conceptos que relacionan directamente la alimentación con la ingesta de ciertos nutrientes que repercuten de manera beneficiosa en la salud.

	<b>FUNCIÓN</b>	<b>PRESENTACIÓN</b>
<b>Alimento funcional</b>	Mejoran la salud y reducen el riesgo de padecer enfermedades	Alimentos
<b>Nutracéutico</b>	Previenen o tratan enfermedades	Forma farmacéutica
<b>Complemento Alimenticio</b>	Aportar los nutrientes necesarios para asegurarnos los niveles adecuados	Forma farmacéutica
<b>Suplemento Alimenticio</b>	Se emplean para suplir una deficiencia en la dieta	Forma farmacéutica

Tabla 1: Resumen sobre las principales diferencias entre alimento funcional, nutracéutico, complemento y suplemento alimenticio.(2)

Hay numerosos estudios que determinan que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tienen múltiples beneficios para la salud humana. El ácido docosahexaenoico (DHA) (Figura 1) es un ácido graso omega-3 imprescindible para el correcto desarrollo de los sistemas visual y nervioso, considerándose el ácido poliinsaturado de cadena larga omega-3 más relevante de los fosfolípidos del cerebro.(3–5)

Se relaciona el consumo de DHA con la prevención del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer. Esto se debe a que el DHA es necesario para la neurogénesis, la neurotransmisión y prevención del daño causado por el estrés oxidativo. En concreto se ha demostrado que el DHA permite preservar la fluidez de la membrana plasmática y la integridad funcional de las neuronas, coopera en el reclutamiento de compuestos antiapoptóticos, inhibe señales proapoptóticas y reprime mediadores de señales inflamatorias.(6–8)

El DHA se puede encontrar en fitoplancton y en animales mayoritariamente. Los mariscos y el pescado son las fuentes más ricas de DHA, destacando el aceite de anchoveta.(4,7)

La anchoveta (*Engraulis ringens*) es un pez que habita en el océano Pacífico y de él se extrae el aceite de anchoveta, que contiene como mínimo un 27% de los ácidos grasos omega 3 (ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexanoico (DHA)), por ello se considera la especie de pescado con más contenido de DHA.(4,9–11)

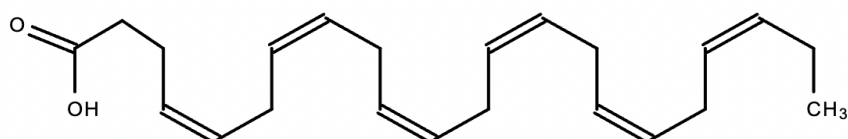


Figura 1: Fórmula de ácido docosahexaenoico. Elaboración propia.

En el mercado hay suplementos o complementos alimenticios de DHA en forma de triglicérido; son apolares lo que dificultan su biodisponibilidad, por ello muchas investigaciones que se están realizando actualmente se centran en el DHA en forma de fosfolípido estructurado, ya que los fosfolípidos, gracias a su densidad de carga eléctrica, son considerados compuestos polares.(7,12)

Los fosfolípidos están formados por una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos y un grupo fosfato (Figura 2). A este compuesto se le conoce como ácido fosfatídico y normalmente está unido, a través del grupo fosfato, a una base orgánica, la cual le confiere la polaridad a la molécula.(4,12–14)



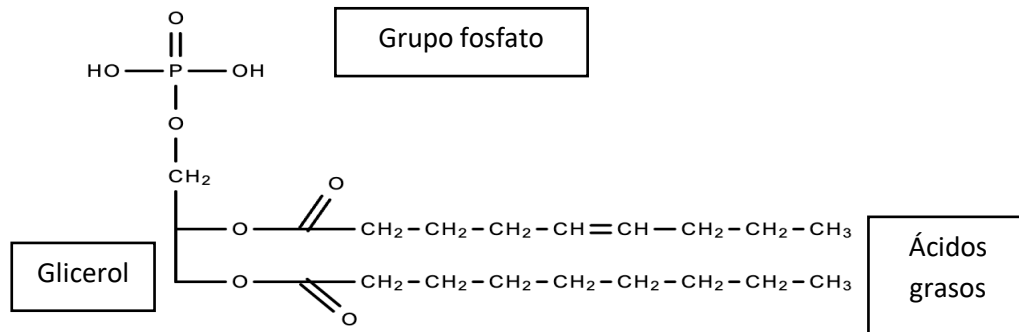


Figura 2: Fórmula del ácido fosfatídico. Elaboración propia.

La capacidad anfipática les permite formar micelas y facilita la digestión, esta se produce por dos enzimas pancreáticas a nivel intestinal, las fosfolipasas A1 y A2, que hidrolizan los ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-2. Tras su digestión pasan a la circulación sanguínea y, por último, gracias a sus propiedades, llega al cerebro atravesando la barrera hematoencefálica. En concreto se ha observado que los fosfolípidos que presentan mayor biodisponibilidad a nivel cerebral son los que presentan en la posición sn-2 el ácido graso. (12–16)

### Lipasas

Las enzimas pueden llevar a cabo múltiples reacciones pudiendo llegar a sustituir procesos químicos. Estas se pueden clasificar en función de la reacción que catalicen: hidrolasas, transferasas, isomerasas, oxidorreductasas, ligasas y liasas.(17)

En este trabajo se va a destacar la actividad de las lipasas. Estas enzimas llevan a cabo el metabolismo de las grasas, siendo su sustrato natural los triglicéridos. También catalizan reacciones de hidrólisis, entre las que se encuentran las hidrólisis de aceites y grasas. (17–19)

Las lipasas son éster hidrolasas carboxílicas, rompen enlaces éster de los triglicéridos por medio de la adicción de una molécula de agua, produciendo ácidos grasos libres y glicerol. (17,18)

Las lipasas tienen un mecanismo de acción catalítica propio. Están en equilibrio entre una forma cerrada e inactiva con una conformación abierta debido al desplazamiento de la tapa. En ausencia de interfase el equilibrio se encuentra desplazado hacia la forma

cerrada mayoritariamente, impidiendo el contacto entre el sustrato y el centro activo. Sin embargo, en presencia de su sustrato natural o cualquier molécula hidrofóbica, la tapa se desplaza dando lugar a su conformación abierta y permitiendo el acceso del sustrato a su centro catalítico. Este mecanismo de acción se denomina “activación interfacial”, tiene gran relevancia a la hora de inmovilizar las lipasas.(17–19)

### **Inmovilización enzimática**

El aumento del uso de las enzimas en biotecnología se encuentra justificado debido a las características que poseen: gran actividad catalítica, gran especificidad y selectividad de sustrato, y alta actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica. Sin embargo, presentan desventajas que dificultan sus usos en numerosos procesos, estas son: no muestran estabilidad en las condiciones normales de trabajo y son solubles en agua dificultando su separación y con ello su reutilización. Estos inconvenientes se han logrado solucionar con la inmovilización enzimática.(20,21)

La inmovilización enzimática es el proceso mediante el cual la enzima queda fijada a un soporte o una matriz, dando lugar a formas insolubles facilitando su posterior recuperación. También se puede lograr una mejora en la estabilidad, actividad o selectividad enzimática.(20,21)

Se pueden clasificar los diferentes métodos de inmovilización en dos grandes grupos: Retención física y unión química. (20,22)

1. Las retenciones físicas se producen por atrapamiento en matrices sólidas, formadas por polímeros, inclusión en membranas o adsorción iónica.
2. La unión química se produce por: unión covalente y entrecruzamiento/reticulado.

La inmovilización por adsorción hidrofóbica es un método de inmovilización enzimática por retención física. Como su nombre indica se lleva a cabo por interacciones hidrofóbicas, estas se producen gracias a las regiones hidrofóbicas presentes en la enzima próximas al centro activo. La forma abierta y activa de las lipasas se estabiliza por la adsorción superficial que se produce al soporte hidrofóbico a baja fuerza iónica (Imagen 1). (18,21,22)

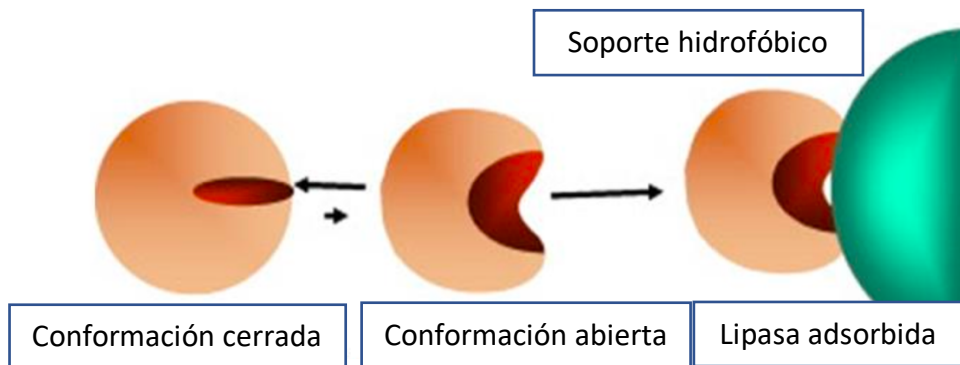


Imagen 1: Adsorción hidrofóbica sobre soporte hidrofóbico. Imagen modificada.(22)

### Hidrólisis enzimática del aceite de anchoveta

Para poder llevar a cabo la síntesis de un fosfolípido estructurado de DHA es necesario realizar previamente la hidrólisis del aceite de anchoveta para obtener el sustrato de la posterior fosforilación.

Las lipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster de tri-, di- y monoglicéridos en ácidos grasos y glicerol, entre otros sustratos posibles.(23)

Las lipasas poseen especificidad posicional o selectividad, distinguen las posiciones externas de los triglicéridos (sn-1 y sn-3) y la posición interna (sn-2). La mayoría de las enzimas presentan especificidad sn-1 y sn-3, siendo inhabitual la sn-2. (16)

La hidrólisis es una reacción química mediada por el agua, en la que se produce la ruptura del enlace éster del glicerol mediante la adición de una molécula de agua (Figura 3). El aceite de anchoveta es hidrolizado obteniéndose DHA.

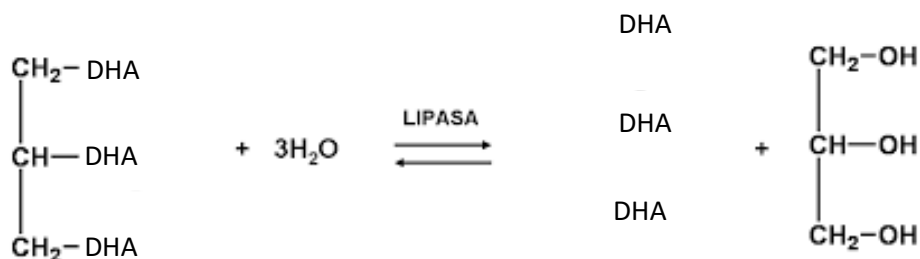


Figura 3: Reacción de hidrólisis del aceite de anchoveta. Figura modificada. (24)

## Objetivos

El objetivo principal del trabajo es el estudio de la hidrólisis del aceite de anchoveta para la obtención de DHA, empleando diferentes enzimas inmovilizadas y para posteriormente utilizarlo como sustrato en la síntesis de un fosfolípido estructurado. Con este fin se proponen una serie de objetivos secundarios:

- Estudio de las diferentes cinéticas enzimáticas para la determinación de la más óptima para la producción de DHA.
- Comparación de dos métodos analíticos para determinar la cinética de la reacción de hidrólisis.
- Comparación de las enzimas inmovilizadas con las enzimas comerciales en la reacción de hidrólisis.
- Realización de reacción de hidrólisis a bajas temperaturas y comparación con las cinéticas a temperatura ambiente.
- Estudios de estabilidad enzimática en las condiciones de hidrólisis.

## Materiales y Métodos

### 1. Búsqueda bibliográfica

Para la búsqueda bibliográfica se emplearon principalmente las siguientes bases de datos: Google académico, PubMed y biblioteca UEM Dulce Chacón. También se emplearon artículos publicados por el propio grupo de investigación Microbio.

Las palabras claves han sido: Lipasas, enzimas, enzimas inmovilizadas y DHA.

### 2. Materiales

	PRODUCTO	MARCA COMERCIAL
Equipos	Espectrofotómetro UV-Vis Modelo V-1280	Shimadzu
	Espectrofotómetro UV-Vis Modelo V-630	Jasco

	Campana de extracción de gases	Burdinola V21
	Balanza	Cobos Precision
	pHmetro	Metter Toled
	Rodillos agitadores	Selecta
	Agitador	Boeco Germany
	HPLC	VWR Chemicals
<b>Enzimas</b>	Novozym <sup>®</sup> 40119 (NOVO)	Novozymes
	Quara <sup>®</sup> LowP (QLOW)	
	Lipozyme <sup>®</sup> TL (TLL)	
	Eversa <sup>®</sup> Transform2.0(EVERSA)	
	Lipozyme <sup>®</sup> CALB (CALB)	
	Palatase <sup>®</sup> 20000(PALA)	
	Lecitase <sup>®</sup> Ultra (LECI)	
	Lipozyme 435 (TLL Comercial)	
	Lipozyme RM IM (PALA Comercial)	
<b>Soportes</b>	Immobeads; IB-ADS-3 (C18)	Chiral Vision
<b>Sustrato</b>	Ácido docosahexaenoico (DHA)	NuaBiological
<b>Productos químicos</b>	Reactivo de Bradford (Azul de Coomassie G-250)	Sigma-Aldrich
	Acetato de etilo	
	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	

	P-Nitroferilo butirato (p-NPB)	
	Tampón fosfato	
	Tampón bicarbonato	
<b>Disolventes</b>	Acetonitrilo	VWR Chemicals
	Ácido acético glacial	
	Hexano	
<b>Otros materiales</b>	Placas de gel de sílice	Supelco
	Parafilm	Bemis
	Just TLC	Sweday

Tabla 2: Materiales usados con sus respectivas marcas comerciales.

Se emplean 7 lipasas para desarrollar este trabajo:(23,25)

1. **TLL:** lipasa Lipozyme TL de *Thermomyces lagunosus*, es una enzima termoestable y basófila.
2. **EVERSA:** lipasa Eversa Transform 2.0, se trata de una modificación genética de TLL aumentando la termoestabilidad, producida en *Aspergillus oryzae*.
3. **CALB:** lipasa B de *Candida antártica*. Se trata de una lipasa no específica.
4. **PALA:** lipasa de *Rhizomucor miehei*. Se considera un catalizador eficaz en la hidrólisis de ácidos grasos.
5. **NOVO:** lipasa de *Aspergillus*. Catalizador eficaz en la hidrólisis de triglicéridos.
6. **QLOW:** Hidroliza los fosfolípidos produciendo ácidos grasos libres.
7. **LECI:** fosfolipasa de *Aspergillus oryzae*.

La elección de las enzimas se realizó por su disponibilidad en el laboratorio.

### 3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Bradford es un método empleado para determinar la concentración de proteínas. Se realiza mediante la unión de las proteínas al colorante Azul de Coomassie G-250,

produciendo una reacción colorimétrica detectable en el espectrofotómetro, debido a que el coeficiente de extinción formado por la interacción del colorante con las proteínas es mayor que el colorante libre.(26)

Para ello se emplearon cubetas de espectrofotómetro, a las que se añadió 1ml del reactivo de Bradford y 20  $\mu$ l de la enzima a diferentes diluciones realizadas con tampón fosfato sódico 10 mM a pH=7, en el caso del blanco se adicionó solo tampón fosfato. Las preparaciones se agitaron y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y cubiertas con parafilm. A continuación, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis a 595 nm. Posteriormente se extrapoló la concentración de proteínas con la recta BSA estándar ( $y= 0,3714x$ ) (Anexo 1) (obtenida previamente por el grupo de investigación) y con ello se calcularon los miligramos de enzimas por mililitro de disolución. De esta forma se conoció cuanta masa de enzima se añadió a las posteriores inmovilizaciones. (26)

#### **4. Inmovilización enzimática**

Las enzimas solubles fueron inmovilizadas por adsorción hidrofóbica para poder llevar a cabo la recuperación de la enzima y con ello su reutilización. La inmovilización se realizó en el soporte Immobeads-IB-ADS-3 (C18), se trata de una cadena de 18 átomos de carbono, la cual le confiere hidrofobicidad.

El protocolo que se siguió para la inmovilización de las enzimas fue el siguiente: 148 ml de tampón fosfato pH 7 y el volumen de enzima necesario para inmovilizar 200 mg de enzima por gramo de soporte, se puso en agitación durante 5 min y se realizó la toma de muestra del blanco, a la que se denominó t0. Posteriormente se adicionaron 5 g de soporte, previamente hidratado con agua, y se volvió a agitar a temperatura ambiente.

Se comprobó la inmovilización a través del empleo de la espectrofotometría. Una vez inmovilizada, se recuperó el derivado mediante filtración; se realizaron lavados con agua destilada y finalmente se guardó en frascos de plástico a 4º C.

#### **5. Ensayos espectrofotométricos de actividad enzimática**

Durante el proceso de inmovilización se analizó la unión de enzima al soporte C-18 usando un espectrofotómetro que mide a una longitud de onda de 348 nm. Para ello se

emplearon unas probetas en las que se adicionaron los siguientes reactivos en el orden descrito: 2'5 ml de tampón bicarbonato pH 8'5 y 20  $\mu$ l de p-NPB, dando lugar al blanco; este se midió a la vez que fue agitado y posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de la muestra a medir, para finalmente analizar el dato obtenido.

El p-NPB es hidrolizado por las enzimas dando lugar a la formación de p-nitrofenilo y ácido butírico, lo que permite deducir indirectamente la actividad de las diferentes enzimas en suspensión y en el sobrenadante. Cuando la actividad en el sobrenadante es mínima con respecto al tiempo 0 ( $t_0$ ), se confirma que la enzima se encuentra inmovilizada.

Una vez se tiene el  $t_0$  este se considera el 100%, de manera que, sabiendo el valor del sobrenadante, se puede conocer el porcentaje de enzima que todavía se encuentra sin inmovilizar y, por tanto, el porcentaje de derivado.

Al saber la carga enzimática que se añadió a la inmovilización (200 mg/g) y el porcentaje de la enzima que se inmovilizó, se puede deducir la masa de enzima inmovilizada por gramos de soporte.

## **6. Reacción de hidrólisis enzimática a temperatura ambiente**

Se analizó la actividad de las diferentes enzimas inmovilizadas mediante la formación del DHA a partir de la hidrólisis del aceite de anchoveta. Se llevó a cabo en un sistema bifásico, donde la parte acuosa es el tampón fosfato y la orgánica el hexano. Se realizó en un bote de cristal, añadiendo los componentes en el siguiente orden: 4,7 ml de hexano, 5 ml de tampón fosfato pH 6 100mM y 300  $\mu$ l de DHA; para poder determinar el  $t_0$ , previamente se tuvo que conseguir que ambas fases se mezclasen, empleándose para ello un agitador; posteriormente se añadieron 100 mg de la enzima.

Todas las muestras de la hidrólisis fueron diluidas 1/16: 900  $\mu$ l de acetonitrilo y 60  $\mu$ l de la reacción al tiempo correspondiente.

Para poder realizar el estudio de la hidrólisis de las diferentes enzimas, se registraron datos a los mismos tiempos de cada reacción para poder compararlas; los tiempos



seleccionados fueron: t0, 15 min (0'25 horas), 30 min (0'5 horas), 1 hora, 3 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Para que la enzima hidrolice el aceite de anchoveta debe tener agitación, por lo tanto, entre las tomas de muestras, las enzimas estuvieron en un agitador. Toda la reacción se realizó a temperatura ambiente.

#### **7. Reacción de hidrólisis enzimática a 4°C**

Para poder determinar si las bajas temperaturas afectan a las enzimas a la hora de realizar la hidrólisis, se llevó a cabo la hidrólisis con TLL y EVERSA a 4°C, con ayuda de una cámara frigorífica, siguiendo el mismo protocolo que la hidrólisis a temperatura ambiente.

#### **8. Análisis por cromatografía de capa fina (TLC)**

El seguimiento de las hidrólisis enzimáticas del aceite de anchoveta se realizó mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). La fase móvil utilizada fue una mezcla de: 7 ml de hexano, 3 ml de acetato de etilo y 20 µl de ácido acético glacial.

Las muestras tomadas fueron depositadas en las placas de gel de sílice con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio. Las placas se colocaron en una cubeta de cromatografía, en la que previamente se había depositado la fase móvil, y se dejó que ascendiese por capilaridad. Por último, se revelaron las placas empleando sales de yodo, se realizó en un recipiente el cual tiene en su interior las sales de yodo durante 7 minutos.

El yodo sublima reaccionando con los componentes de la placa de sílice, formando manchas de color marrón-amarillo (Imagen 2 y 3). La coloración se debe a la facilidad del yodo de reaccionar con muchos compuestos orgánicos, por lo que se le considera un reactivo inespecífico.

Con ayuda del patrón de DHA se dedujo que mancha corresponde al ácido que se va formando conforme avanza la reacción de hidrólisis. Se pinchó en una placa TLC un blanco, tiempo 0, una muestra de la hidrólisis, en este caso NOVO a las 24 horas de reacción, y por último el patrón de DHA, con ello se dedujo que la mancha central corresponde al ácido de DHA (Imagen 2).

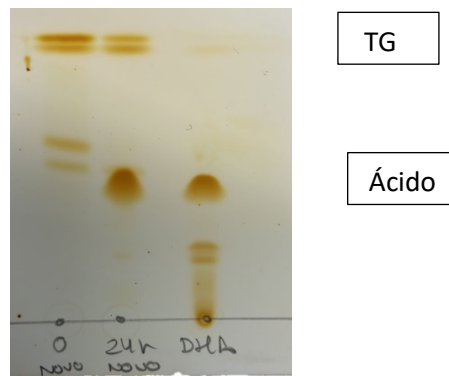


Imagen 2: Placa de TLC con un tiempo 0, una muestra de hidrólisis y el patrón DHA para identificar la mancha que corresponde al ácido.

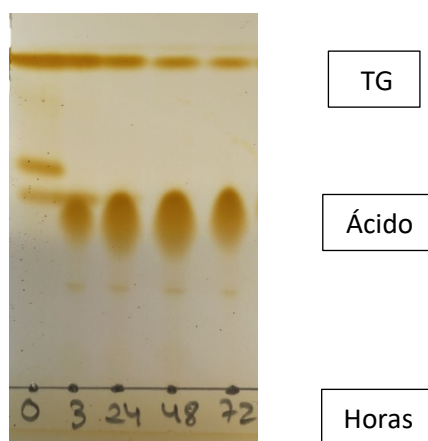


Imagen 3: Ejemplo de una TLC de la hidrólisis del aceite de anchoveta, donde se observa como aumenta la formación del ácido DHA conforme pasan las horas de reacción.

## 9. Análisis por cromatografía líquida (HPLC)

Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución se realizaron con RP-HPLC (bomba Spectra Physic SP 100 junto con un detector UV Spectra Physic SP 8450) utilizando una columna de C8 Kromasil (0.4 cm × 15 cm). Los productos se eluyeron a un flujo de 1ml/min utilizando como fase móvil 750 ml de acetonitrilo, 250 ml de agua milliq y 1 ml de ácido acético glacial. La longitud de onda empleada para la detección es de 215 nm a un tiempo de retención de 12 minutos. (27)

Los rendimientos de la hidrólisis se calcularon con el área de los picos correspondientes a diferentes concentraciones de ácido docosahexaenoico.

Para calcular los porcentajes de DHA se realizaron cálculos teniendo en cuenta los siguientes datos:

El peso molecular del aceite de anchoveta es 1023,44 g/mol y su densidad 0,922 g/ml. La cápsula de aceite de anchoveta contiene 72% de DHA y Ácido eicosapentaenoico (EPA).

### Concentración de DHA

$$\rho = \frac{m}{v} \rightarrow 0,922 \text{ g/ml del aceite de anchoveta}$$

$$0,922 \text{ g/ml del aceite de anchoveta} \times 0,300 \text{ ml} = 0,276 \text{ g de DHA}$$

$$n = \frac{m}{PM} = \frac{0,276 \text{ g DHA}}{1023,44 \text{ g/mol}} = 0,000270 \text{ mol}$$

$$M = \frac{n}{v} = \frac{0,000270}{0,005 \text{ l}} = 0,0537 \text{ M} \rightarrow 53,7 \text{ mM}$$

$$53,7 \text{ mM} \rightarrow 100\% \text{ del aceite de anchoveta}$$

$$X \rightarrow 72\% \text{ DHA y EPA} \quad X = 38,66 \text{ mM DHA y EPA}$$

Sabiendo que el 90% es DHA y el 10% restante es EPA:

$$38,66 \text{ mM} \times 0,90 = 34,79 \text{ mM de DHA}$$

Por cada molécula de aceite, triglicérido, hay 3 moléculas de DHA o EPA, por lo que se puede calcular la concentración máxima de DHA que se puede alcanzar cuando la molécula se ha hidrolizado completamente:

$$34,79 \text{ mM} \times 3 = \mathbf{104,39 \text{ mM de DHA}}$$

Por lo tanto, 104,39 mM de DHA corresponde al 100% de la reacción de hidrólisis del aceite de anchoveta.

### Velocidades iniciales

Se seleccionó el área en la que se producía un porcentaje de DHA entre 8-12%, esta área se multiplicó por la dilución de las muestras (x16), y se dividió entre la multiplicación del tiempo correspondiente al área por el área del patrón de DHA.

Se realizó el patrón de DHA del que se obtuvieron los siguientes datos: Áreas= 21550761  
mM= 3,044325 mg/ml= 1,4073.

### Porcentaje de hidrólisis

Por último, para conocer el porcentaje de la hidrólisis en función del área resultante de la medida se sigue el siguiente procedimiento: Al área se le restó el t<sub>0</sub>, en el caso de que haya, se multiplicó por la dilución a la que se encuentran las muestras, es decir x16, a continuación el valor resultante se multiplicó por la concentración (mM) de la recta patrón (3,044325 mM) y se dividió por el área de la recta patrón (21550761); de esta forma se obtuvo la concentración (mM) del área obtenida y para concluir se calculó el porcentaje conociendo que el 100% es 104,39 mM.

<b>Rend (% mM)</b>		<b>Rend (% mg/ml)</b>	
<b>Vreacc</b>	<b>5 mL</b>	<b>Vreacc</b>	<b>5 mL</b>
<b>gr</b>	0,276	<b>gr</b>	0,276
<b>M</b>	0,0537	<b>mg</b>	276,6
<b>mM</b>	53,70	<b>mg/ml</b>	55,32
<b>72%</b>	38,66	<b>72%</b>	39,83
<b>90%</b>	34,79	<b>90%</b>	35,84
<b>x3 mM</b>	104,39	<b>x3 mM</b>	107,54
<b>Patrón</b>	<b>áreas</b>	<b>mM</b>	<b>mg/ml</b>
<b>DHA</b>	21550761	3,044325	1,4073

Tabla 3: Tabla resumen de los datos empleados para calcular el porcentaje de hidrólisis a partir de las áreas obtenidas por el HPLC.

## 10. Estudio de estabilidad

Se estudió la estabilidad de las enzimas que habían destacado en la hidrólisis (EVERSA, PALA, NOVO, TLL) y TLL Comercial. La reacción se realizó en las condiciones normales de hidrólisis; es decir: 5 ml de tampón fosfato a pH6 100mM, 4,7 ml de Hexano y 100 mg de enzima. Se mantuvieron en agitación con ayuda de los rodillos giratorios.

El protocolo empleado para la medida de la actividad enzimática es el mismo del apartado 4 (Ensayos espectrofotométricos de actividad enzimática). Con la diferencia de que la punta empleada para pipetear debe ser cortada para poder coger derivado.

La medida de la estabilidad se realizó con ayuda del espectrofotómetro UV-VIS a longitud de onda de 348 nm. Se tomó como 100% de actividad el t0 y se fueron calculando los porcentajes de actividad a las diferentes horas.

## Resultados y Discusión

### 1. Determinación de la concentración de proteína

El método Bradford se ha empleado para conocer la concentración de proteína presente en las disoluciones enzimáticas. Con ayuda de la recta BSA estándar ( $y = 0,3714x$ ). (Anexo 1) se han obtenido los siguientes resultados:

Enzima	Concentración de proteínas (mg de proteína /ml disolución enzimática)
TLL	33,92
QLOW	5,70
CALB	10,77
LECI	24,36
PALA	16,00
EVERSA	30,00
NOVO	38,34

Tabla 4: Resultados obtenidos por Bradford, representa la carga enzimática de las disoluciones.

Las disoluciones comerciales que presentan más concentración de proteínas son NOVO y en segundo lugar TLL.

## 2. Inmovilización enzimática

Se ha realizado la inmovilización de todas las enzimas mediante la adsorción hidrofóbica en el soporte Inmunobeads-C18.

Los resultados de la inmovilización se recogen en la siguiente tabla:

<b>Enzima</b>	<b>% de inmovilización</b>	<b>Mg de enzima/g de soporte</b>
NOVO	75%	150 mg/g
QLOW	65%	130 mg/g
TLL	90%	180 mg/g
EVERSA	62,5%	125 mg/g
CALB	81,5%	163 mg/g
LECI	70%	140 mg/g
PALA	100%	200mg/g

Tabla 5: Resultados de la inmovilización de las diferentes enzimas.

De la tabla 5 se puede deducir que las enzimas con mayor porcentaje inmovilizado son: TLL con un resultado del 90% dando lugar a 180 mg de enzima en cada gramo de soporte y PALA consiguiendo un rendimiento del 100% es decir se ha inmovilizado 200mg/g soporte.

## 3. Reacción de hidrólisis enzimática a temperatura ambiente

Se realizó la hidrólisis del aceite anchoveta con las siete enzimas previamente inmovilizadas, por adsorción hidrofóbica en el soporte C18, para comprobar que enzima presenta mayor actividad catalítica, es decir, con la que se obtiene la hidrólisis completa

y por tanto el 100% del DHA, obteniéndose mayor cantidad de ácido a menores tiempos de reacción.

### **TLC**

Se realizó un análisis cualitativo simplemente observando la TLC revelada, permitiendo ver cómo va aumentando la concentración de ácido conforme avanza la reacción (representado en la imagen 3). Con ayuda del programa Just TLC se ha realizado un análisis cuantitativo al analizar la formación de ácido.

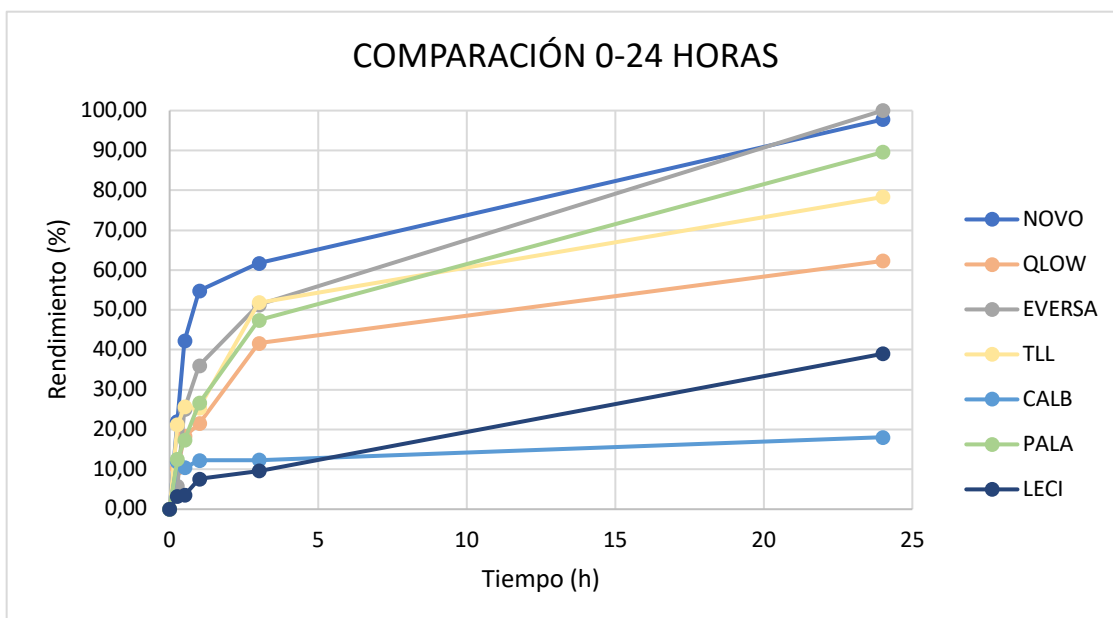
Para poder realizar una comparación de los datos obtenidos por el programa, estos se han transformado a porcentaje de producción de ácido, tomando como 100% el valor obtenido por EVERSA a las 48 horas de reacción, ya que ha sido el mayor valor obtenido. A las 48 horas de reacción el dato es de 297,98.

Se han realizado principalmente dos comparaciones, la primera de ellas cogiendo los siguientes tiempos de reacción: 0h, 0'25h, 0'5h, 1h, 3h y 24h. La segunda teniendo en cuenta estos tiempos: 0h, 0'25h, 3h, 24h, 48h y 72h.

1. Tiempo: 0h, 0'25h, 0'5h, 1h, 3h y 24h. Para poder cuantificar el inicio de la reacción. Se obtuvieron los siguientes datos:

<b>HORAS</b>	<b>NOVO</b>	<b>QLOW</b>	<b>EVERSA</b>	<b>TLL</b>	<b>CALB</b>	<b>PALA</b>	<b>LECI</b>
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	22,00	10,27	5,75	21,15	11,92	12,51	3,28
0,5	42,21	18,26	25,11	25,64	10,37	17,31	3,48
1	54,84	21,46	36,04	25,43	12,26	26,64	7,56
3	61,72	41,65	51,28	51,84	12,35	47,39	9,59
24	97,75	62,28	100,00	78,31	18,06	89,55	38,98

Tabla 6: Datos en porcentaje de hidrólisis a las diferentes horas de la reacción, realizado con Just TLC.



Gráfica 1: Representación de la producción de ácido DHA en porcentajes a las diferentes horas de reacción, realizado con Just TLC.

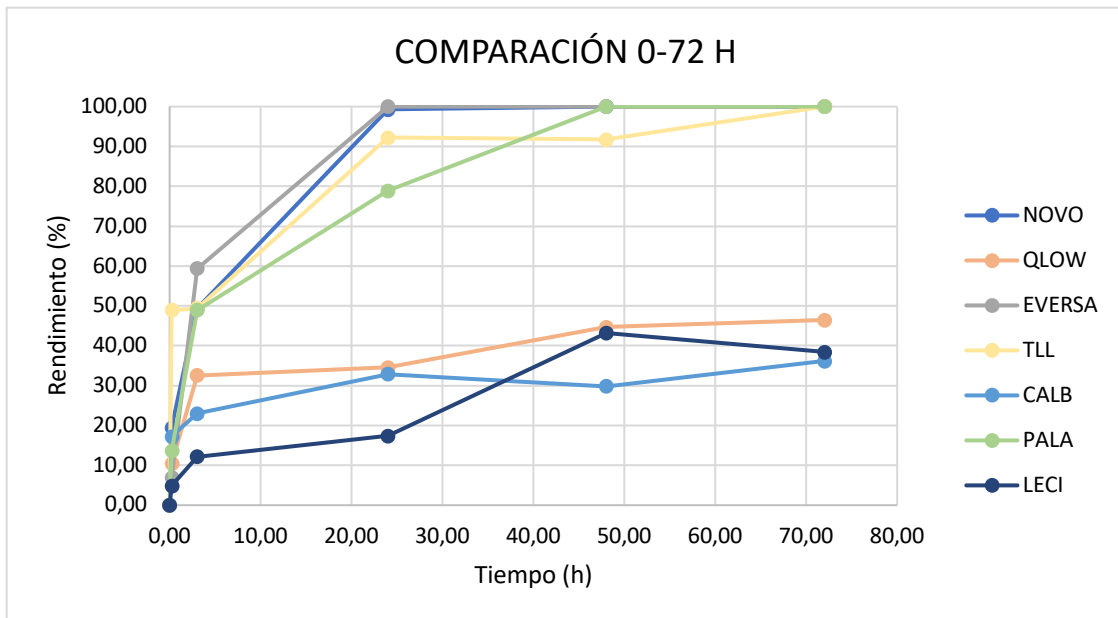
Tras analizar los resultados de la TLC se puede confirmar que la enzima que produce el 100% de ácido a las 24 horas de la reacción es EVERSA, quedándose NOVO en la producción de un 97,75% de DHA.

2. Tiempo: 0h, 0'25h, 3h, 24h, 48h y 72h. Para poder conocer el avance de la hidrólisis enzimática. Los datos fueron:

HORAS	NOVO	QLOW	EVERSA	TLL	CALB	PALA	LECI
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	19,47	10,50	6,98	48,91	17,26	13,57	4,84
3	49,34	32,54	59,36	49,42	22,98	48,95	12,13
24	99,27	34,55	100,00	92,20	32,87	78,84	17,41
48	100,00	44,70	100,00	91,74	29,85	100,00	43,19
72	100,00	46,47	100,00	100,00	36,20	100,00	38,40

Tabla 7: Datos en porcentaje de hidrólisis a las diferentes horas de la reacción, datos obtenidos a partir de Just TLC.





Gráfica 2: Representación de la producción de ácido en porcentaje a las diferentes horas de reacción, datos obtenidos a partir de Just TLC.

Al observar la gráfica de los resultados se aprecia que el comportamiento de las enzimas permite dividir las en dos grupos bien diferenciados. Desde el punto de vista del objetivo del proyecto, interesa el grupo formado por: TLL, NOVO, PALA y EVERSA ya que llegan a la producción de 100% de ácido, quedándose el resto de las enzimas por debajo del 50%.

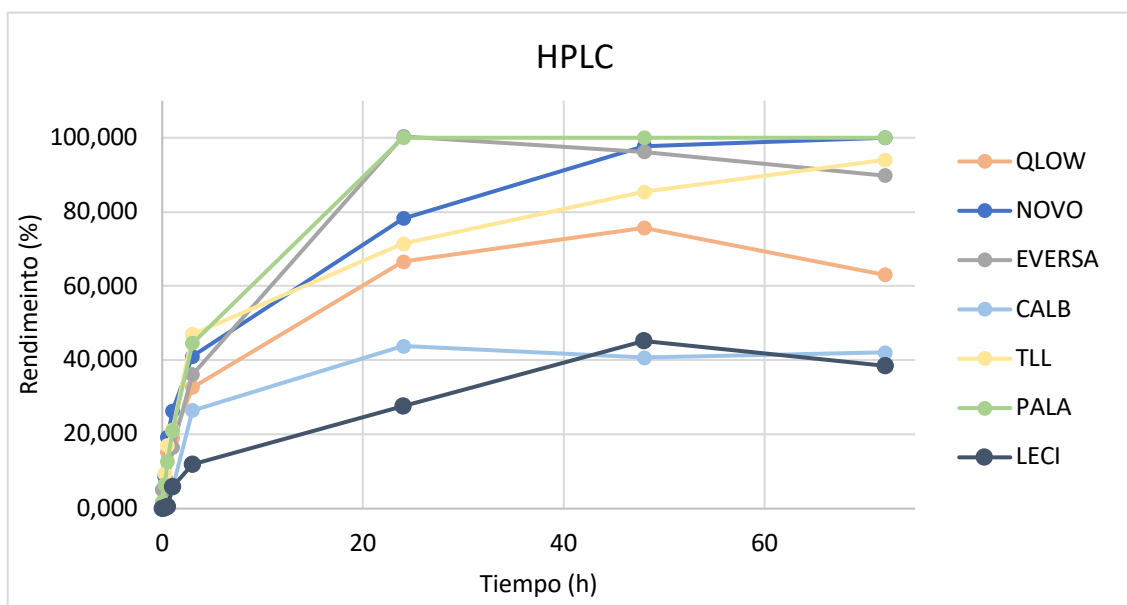
Se puede relacionar la especificidad de la enzima con su porcentaje de hidrólisis, considerándose que las enzimas que no superan el 66% de hidrólisis, poseen especificidad solo por las posiciones externas sn-1 y sn-3 del triglicérido, sin llegar a hidrolizar la posición sn-2. Esto justifica los dos grupos de enzimas observados en la gráfica 2, siendo el grupo de interés el formado por las enzimas que hidrolizan más del 66%, debido a que presentan especificidad por las 3 posiciones del triglicérido obtienen un rendimiento del 100% de DHA, cumpliendo el objetivo final: Liberar todo el DHA presente en el aceite de anchoveta.(16)

### HPLC

Se han analizado las muestras tomadas de cada enzima en el HPLC para poder conocer los porcentajes de hidrólisis de las diferentes enzimas y sus velocidades iniciales. Los datos obtenidos son los siguientes:

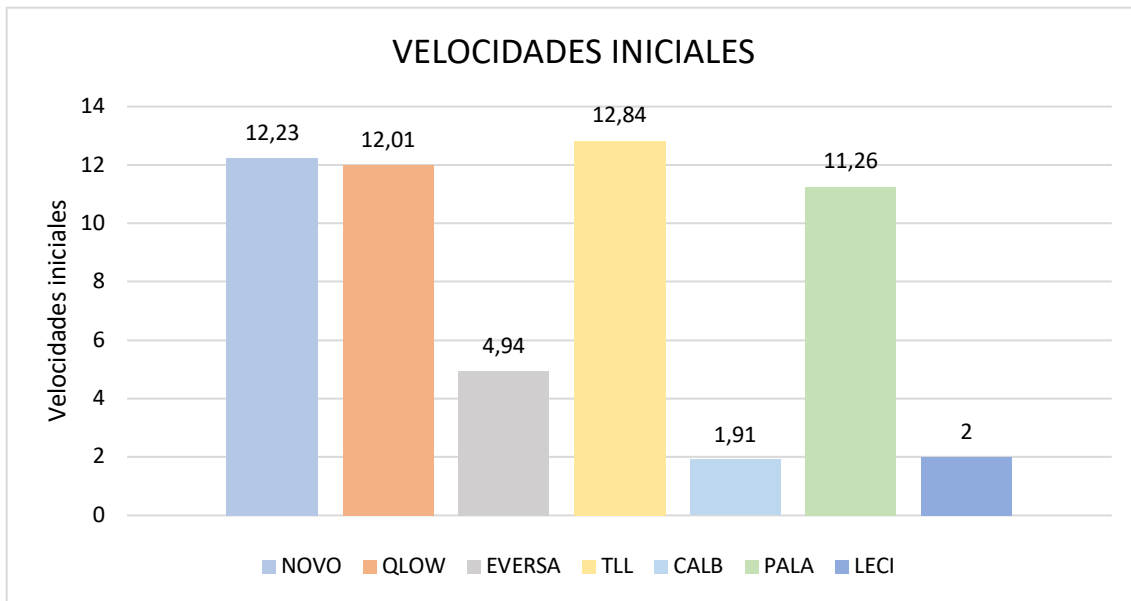
HORAS	NOVO	QLOW	EVERSA	TLL	CALB	PALA	LECI
0	0,00	0,00	5,10	0,00	0,00	1,79	0,00
0,25	8,84	8,76	0,00	9,36	0,00	6,43	1,77
0,50	19,20	15,29	7,20	16,98	0,68	12,70	3,01
1	26,39	19,07	16,51	21,20	5,58	21,04	5,84
3	41,05	32,67	36,12	46,98	26,44	44,61	11,96
24	78,21	66,60	100	71,46	43,86	100,00	27,64
48	97,73	75,69	100	85,43	40,68	100,00	46,09
72	100,00	63,10	100	94,05	42,06	100,00	38,46
<b>Vo</b>	<b>12,13</b>	<b>12,01</b>	<b>4,94</b>	<b>12,84</b>	<b>1,91</b>	<b>11,26</b>	<b>2,00</b>

Tabla 8: Datos en porcentaje de hidrólisis a las diferentes horas de la reacción, realizado con HPLC.



Gráfica 3: Representación de la producción de ácido en porcentaje a las diferentes horas de reacción, realizado con HPLC.

Del análisis mediante HPLC se puede determinar que las enzimas que mejor hidrolizan el aceite de anchoveta son: PALA, EVERS y NOVO, resultados que corroboran los obtenidos previamente por TLC, concluyendo que las enzimas que hidrolizan el 100% del ácido a tiempos cortos son: PALA, NOVO y EVERS, descartando TLL ya que según el análisis por HPLC no llega a producir la hidrólisis completa del ácido.



Gráfica 4: Representación las velocidades iniciales de cada enzima.

A la vista de los datos de velocidades iniciales y el porcentaje de hidrólisis obtenidos experimentalmente se puede deducir que:

- TLL es la más rápida, a pesar de que su hidrólisis no llega al 100% sus valores son muy próximos.
- EVERSA se trata de TLL modificada, su velocidad inicial es muy lenta, pero llega al 100% en 24 horas.
- NOVO es otra de las enzimas con la velocidad inicial alta y llega a hidrolizar el 100% del ácido a las 72 horas de reacción. Sus resultados son análogos a los obtenidos con PALA.
- QLOW presenta también una velocidad inicial alta pero no superó el 75% de la formación de DHA, por lo cual no sería buena candidata para liberar todo el DHA presente en el aceite.

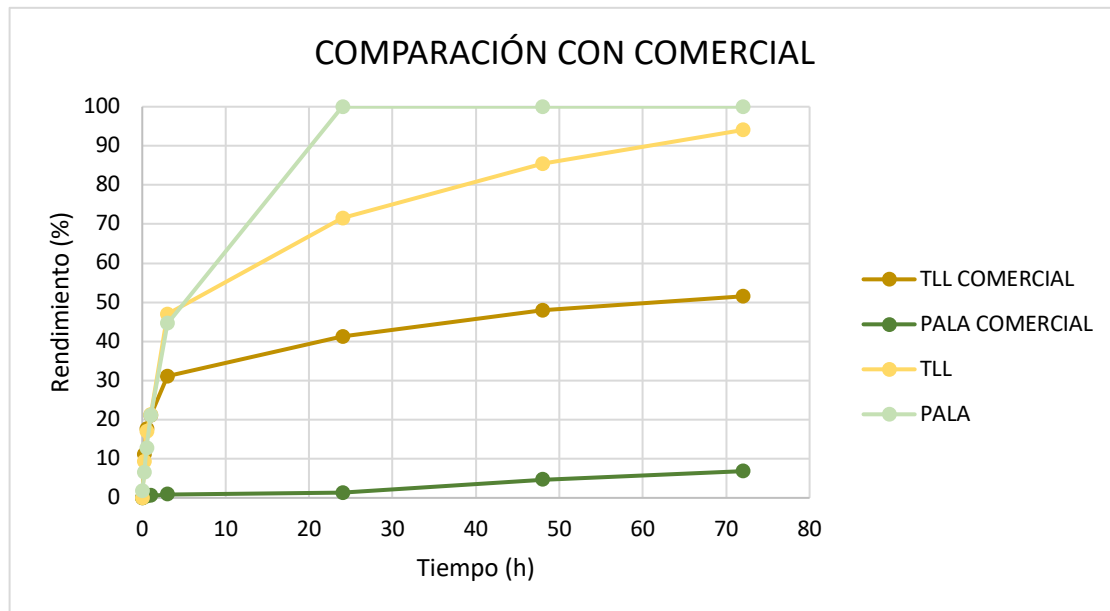
#### 4. Comparación de las enzimas inmovilizadas con las enzimas comerciales

Se ha realizado la hidrólisis del aceite de anchoveta con TLL y PALA Comerciales, para poder compararlas con TLL y PALA inmovilizadas en el laboratorio.

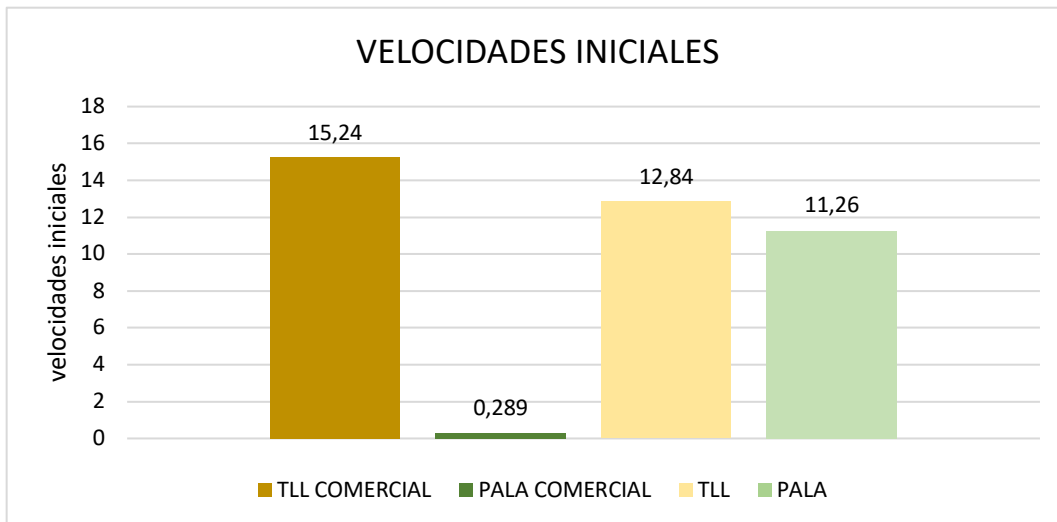
Se obtuvieron los siguientes resultados:

TIEMPO	TLL COMERCIAL	PALA COMERCIAL	TLL	PALA
0	0,00	0	0,00	1,79
0,25	11,11	0,30	9,36	6,43
0,50	17,55	0,42	16,98	12,70
1	21,09	0,54	21,20	21,04
3	31,08	0,90	46,98	44,61
24	41,23	1,33	71,46	100,00
48	47,92	4,68	85,43	100,00
72	51,53	6,83	94,05	100,00
<b>Vo</b>	<b>15,24</b>	<b>0,289</b>	<b>12,84</b>	<b>11,26</b>

Tabla 9: Datos en porcentaje de hidrólisis a las diferentes horas de la reacción, realizado con HPLC.



Gráfica 5: Comparación de las enzimas inmovilizadas en el laboratorio con las comerciales en la reacción de hidrólisis, realizado con HPLC.



Gráfica 6: Representación las velocidades iniciales de las enzimas inmovilizadas en el laboratorio frente a las comerciales.

Comparando las enzimas comerciales con las enzimas inmovilizadas en el laboratorio podemos deducir que:

- Observando TLL y TLL Comercial se puede deducir que TLL Comercial es una enzima cuya velocidad inicial es muy elevada, pero se frena su actividad probablemente debido a que no es estable en las condiciones de hidrólisis, llegando a producir tan solo la mitad del DHA posible.
- Comparando PALA y PALA Comercial se ve como PALA Comercial tiene mucha menos actividad, no supera el 10% de formación de DHA en 72 horas, mientras que PALA a las 24 horas ya ha hidrolizado el 100% del aceite de anchoveta. Por lo tanto, PALA Comercial es la enzima que peor hidroliza el aceite de anchoveta, se corrobora con los porcentajes de hidrólisis y con la velocidad inicial.
- Estos resultados nos demuestran como la estrategia de inmovilización es clave para modular la actividad de una misma enzima.

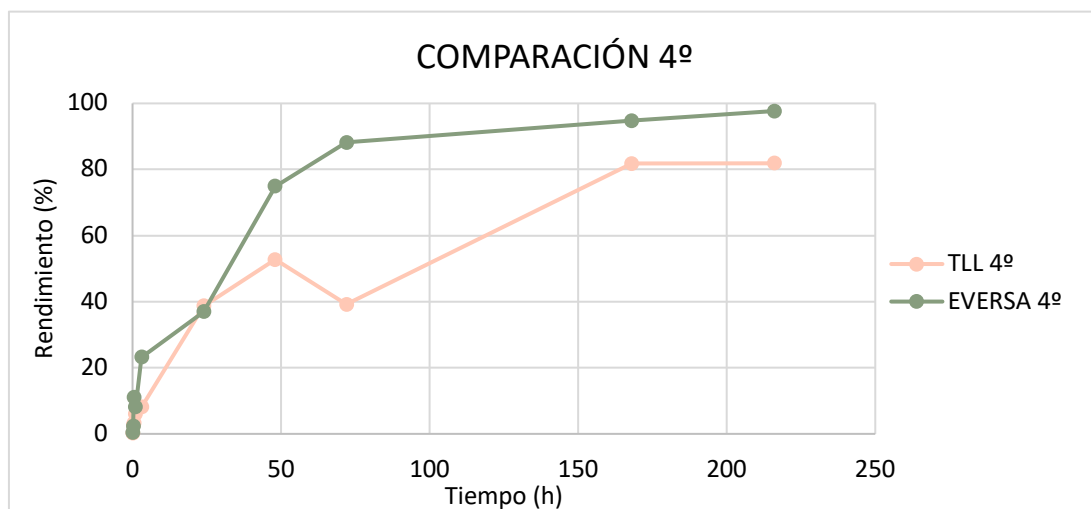
## 5. Reacción de hidrólisis enzimática a 4°C

Posterior al análisis de la hidrólisis de las enzimas a temperatura ambiente, se decidió comprobar si la temperatura afecta a las enzimas, en concreto TLL y EVERSA.

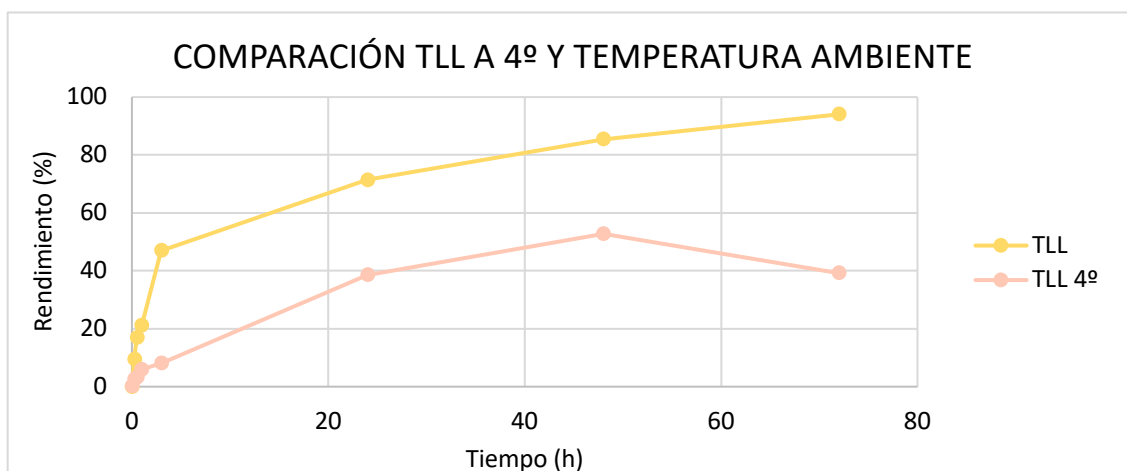
Se han analizado las muestras en el HPLC para conocer los porcentajes de hidrólisis de TLL y EVERSA a 4°C y sus velocidades iniciales. Los datos obtenidos son los siguientes:

HORAS	TLL 4°C	EVERSA 4°C
0	0,21	0,32
0,25	2,72	2,40
0,5	3,37	10,97
1	5,99	8,15
3	8,07	23,15
24	38,64	36,94
48	52,77	74,91
72	39,20	88,14
168	81,75	94,71
216	81,87	97,69
<b>Vo</b>	<b>0,95</b>	<b>2,91</b>

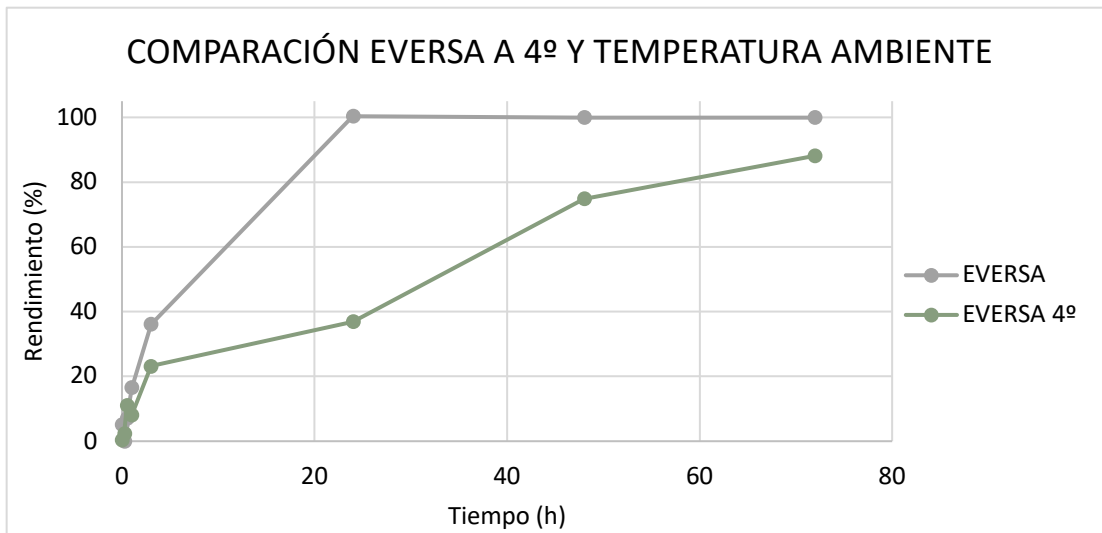
Tabla 10: Datos de TLL y EVERSA a 4°C, realizado con HPLC.



Gráfica 7: Comparación de la reacción de hidrólisis a 4°C de TLL y EVERSA, realizado con HPLC.



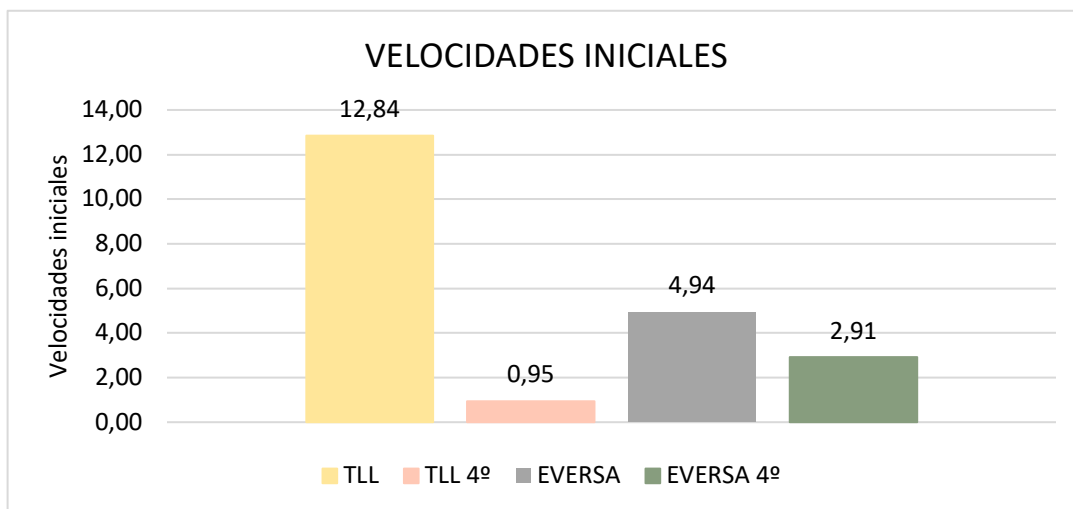
Gráfica 8: Comparación de TLL a 4°C de reacción y a temperatura ambiente, realizado con HPLC.



Gráfica 9: Comparación de EVERSA a temperatura ambiente y a 4°C, realizado con HPLC.

Al observar las gráficas (7, 8 y 9) podemos deducir:

- A tiempos corto de reacción, durante la primera hora, TLL y EVERSA tienen comportamientos muy similares entre ellas, siendo a partir de la hora cuando sus comportamientos se diferencian, asemejándose a los obtenidos a temperatura ambiente.
- Ambas enzimas sufren ralentización de la reacción de hidrólisis a 4°C.
- EVERSA a 4°C y TLL a temperatura ambiente tienen comportamientos muy similares en cuanto a la hidrólisis.



Gráfica 10: Representación de las velocidades iniciales de TLL y EVERSA a 4°C y a temperatura ambiente.

Comparando las velocidades iniciales podemos observar que la temperatura de 4°C ralentiza más a TLL, llegando a reducirse unas 13 veces, mientras que EVERSA solo reduce su velocidad inicial a la mitad. Por lo tanto, a TLL le afecta más las bajas temperaturas que a EVERSA.

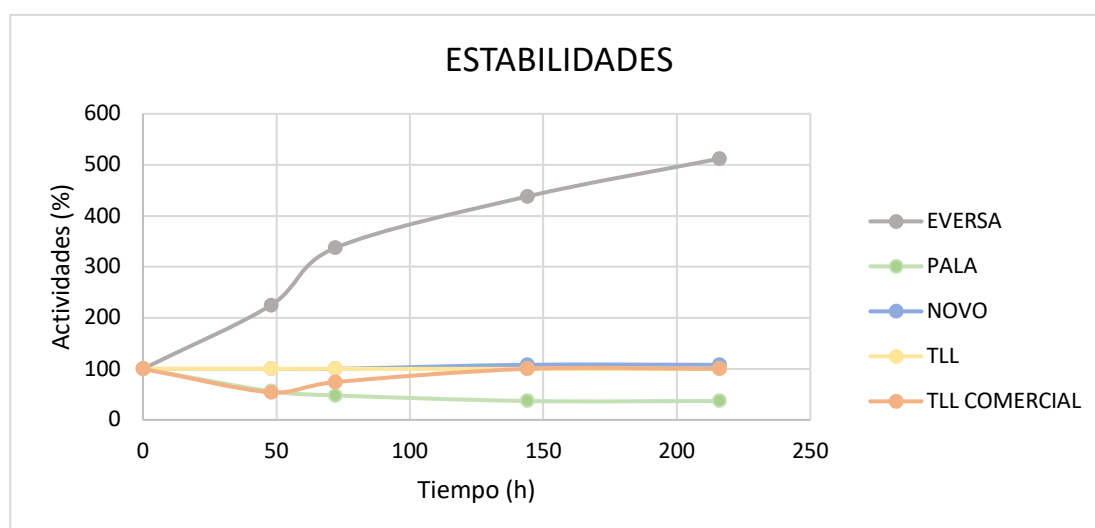
## 6. Estudio de estabilidad

Se estudió la estabilidad de EVERSA, PALA, NOVO y TLL para comprobar si se mantiene la actividad de dichas enzimas en las condiciones normales de hidrólisis y con el paso del tiempo. También se decidió estudiar la estabilidad de la TLL Comercial para comprobar si sufre inactivación.

La medida de las estabildades no es muy reproducible debido a su dependencia con la cantidad de derivado pipeteado. Teniendo en cuenta esta dificultad los datos obtenidos son los siguientes:

HORAS	EVERSA	PALA	NOVO	TLL	TLL COMERCIAL
0	100	100	100	100	100
48	225	56	194	235	54
72	337	48	100	100	74
144	438	37	100	100	100
216	512	37	100	100	100

Tabla 11: Datos de las estabildades de las enzimas a diferentes horas.



Gráfica 11: Representación de las estabildades de las enzimas con el paso del tiempo.



Según los datos obtenidos podemos deducir que:

- EVERSA se hiperactiva, se debe al hexano, ya que enseguida la enzima sube a la interfase produciéndose el contacto con el hexano, mientras que las demás permanecen más tiempo en la fase acuosa.
- PALA pierde actividad, se puede deber a que las condiciones de hidrólisis no son del todo favorables. También cabe destacar que es la enzima que más tarda en subir a la interfase por lo tanto no se encuentra tanto tiempo en contacto con el hexano.
- TLL y NOVO son estables en las condiciones normales de reacción.
- TLL Comercial tras una pérdida de actividad, se estabiliza llegando a adquirir su actividad normal, por lo tanto, se descarta la inactivación de TLL Comercial.

## **7. Sostenibilidad**

La hidrólisis del aceite de anchoveta se produce para obtener DHA, sustrato para posteriormente desarrollar un fosfolípido estructurado. Se parte de un subproducto de la industria pesquera, evitando la pesca con la única finalidad de obtener el aceite, contribuyendo al aprovechamiento de recursos.(11,28)

El estudio de la hidrólisis enzimática es un paso muy importante, en cuanto a sostenibilidad, debido a la sustitución de procesos químicos. Los procesos químicos se realizan a altas temperaturas y con disolventes produciéndose un alto coste energético. El uso de enzimas es una alternativa más sostenible al emplear condiciones más suaves, utilizando menos productos químicos y reutilizando residuos.

## **Conclusiones**

Tras realizar el trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

- Al estudiar las diferentes cinéticas enzimáticas se puede deducir que las más óptimas para la producción de DHA son PALA, NOVO y EVERSA, al liberar el 100% de DHA presente en el aceite de anchoveta.
- Al comparar las enzimas inmovilizadas en el laboratorio y las comerciales, se puede afirmar que las enzimas inmovilizadas por adsorción hidrofóbica en el

soporte C18 realizan mejor la reacción de hidrólisis. Siendo TLL 2 veces mejor y PALA 17 veces.

- Al realizar el análisis de la reacción de hidrólisis por TLC y por HPLC se puede confirmar que ambos métodos son válidos al dar valores muy similares.
- Al estudiar las hidrólisis a 4°C con TLL y EVERSA se concluye que a ambas enzimas les afecta la temperatura, ralentizando la reacción, afectando más a TLL al reducir su velocidad inicial 13 veces.
- Realizando el estudio de las estabilidades en las condiciones normales de hidrólisis se observa que: NOVO, TLL y TLL Comercial se mantienen estables, PALA es inestable al perder actividad y EVERSA se hiperactiva en dichas condiciones.

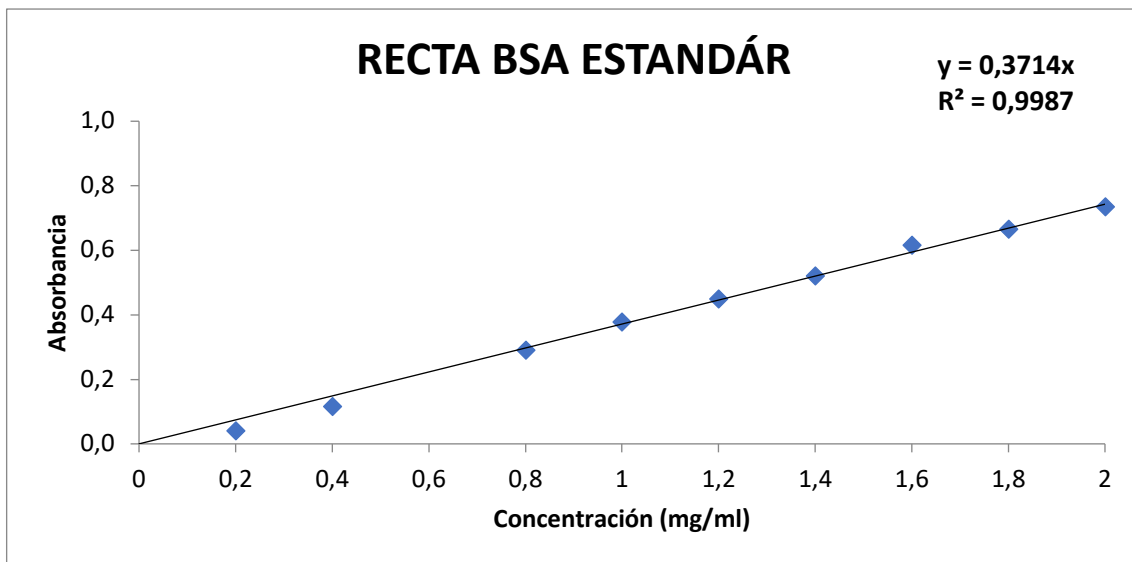
## Bibliografía

1. Yepes TA. Dieta saludable. 2019.
2. Valenzuela A, Valenzuela R, Sanhueza J, Morales G, Dirigir L. Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? Functional foods, nutraceuticals and foshu: are we going to a novel food concept? Vol. 41, Rev Chil Nutr. 2014.
3. Moreno-Perez S, Luna P, Señorans J, Rocha-Martin J, Guisan JM, Fernandez-Lorente G. Enzymatic transesterification in a solvent-free system: synthesis of sn-2 docosahexaenoyl monoacylglycerol. Vol. 36, Biocatalysis and Biotransformation. Taylor and Francis Ltd; 2018 May.
4. Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT, Carballido JR. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Vol. 11, Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2010 Jan.
5. Chen B, McClements DJ, Decker EA. Design of foods with bioactive lipids for improved health. Vol. 4, Annual Review of Food Science and Technology. 2013 Feb.
6. Parmentier M, al Sayed Mahmoud C, Linder M, Fanni J. Polar lipids: n-3 PUFA carriers for membranes and brain: Nutritional interest and emerging processes. Vol. 14, OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides. 2007 May.
7. Innis SM. Dietary (n-3) Fatty Acids and Brain Development 1,2. The Journal of Nutrition Recent Advances in Nutritional Sciences. 2007.
8. Adolfo LR. DHA y funcionamiento cerebral: ¿Cuáles son los beneficios? 2011.
9. Fisheries and Aquaculture - List of Species for Fishery Statistics Purposes - *Engraulis ringens* [Internet]. [cited 2022 May 2]. Available from: <https://www.fao.org/fishery/en/species/2917/en>
10. Franquez E. Caracterización de EPA y DHA en Aceite de Sardina (*Strangomera bentincki*) y Anchoveta (*Engraulis ringens*) de Captura Artesanal en la XIV Región. 2017.

11. Blanco M, Sotelo C G, And Pérez-Martín CMJ. Towards sustainable and efficient use of fishery resources; present and future trends. 2007.
12. Valenzuela A, Valenzuela R, Sanhueza J, de la Barra F, Morales G. Fosfolípidos de origen marino: una nueva alternativa para la suplementación con ácidos grasos omega-3 Phospholipids from marine origin: a new alternative for supplementing omega-3 fatty acids. 2014.
13. Thies F, Pillon C, Moliere P, Lagarde M, Lecerf J. Preferential incorporation of m-2 1ysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain [Internet]. 1994. Available from: [www.physiology.org/journal/ajpregu](http://www.physiology.org/journal/ajpregu)
14. Thiès F, Delachambre C, Bentejac M, Lagarde M, Lecerf J. Unsaturated Fatty Acids Esterified in 2...g Rat Brain than the Unesterified Form. 1992.
15. García JT, Agüero SD. Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. Vol. 31, Nutricion Hospitalaria. Grupo Aula Medica S.A.; 2015.
16. Xu x. Production of specific-structured triacylglycerolsby lipase-catalyzed reactions: a review. 2000.
17. Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. Vol. 93, Chemistry and Physics of Lipids. 1998.
18. Carrasco-López C, Godoy C, de las Rivas B, Fernández-Lorente G, Palomo JM, Guisán JM, et al. Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. Vol. 284, Journal of Biological Chemistry. 2009 Feb.
19. Gupta N, Lee FS, Farinas ET. Laboratory evolution of laccase for substrate specificity. Vol. 62, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2010.
20. Arroyo DM. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Vol. 39. 1998.
21. Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Ferná Ndez-Lafuente R, Huguet J, Guisá JM. A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports. Vol. 58, Biotechnol Bioeng. 1998.

22. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Vol. 40, *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier; 2007 May.
23. Casas-Godoy L, Duquesne S, Bordes F, Sandoval G, Marty A. Lipases: An overview. Vol. 861, *Methods in Molecular Biology*. 2012.
24. Wanionok NE, Susana D, del Valle M. Prospección biotecnológica de lipasas y peptidasas provenientes de látex de plantas. 2017.
25. Novozymes. Lipases for biocatalysis for smarter chemical synthesis. 2010.
26. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Vol. 72, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 1976.
27. Andrés-Sanz D, Fresan C, Fernández-Lorente G, Rocha-Martín J, Guisán JM. Stabilization of lecitase ultra<sup>®</sup> by immobilization and fixation of bimolecular aggregates. Release of omega-3 fatty acids by enzymatic hydrolysis of krill oil. Vol. 11, *Catalysts*. MDPI; 2021 Sep.
28. Asquer C, Cappai G, de Gioannis G, Muntoni A, Piredda M, Spiga D. Biomass ash reutilisation as an additive in the composting process of organic fraction of municipal solid waste. Vol. 69, *Waste Management*. Elsevier Ltd; 2017 Nov.

## Anexos:



Anexo 1: Recta BSA estándar. Se realizou una recta patrón con diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA).