



**CINÉTICA DE ESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ÁCIDOS GRASOS  
POLIINSATURADOS N-3 A GLICEROL: MECANISMO PING-PONG  
MULTI-SUSTRATO MULTI-PRODUCTO**

**KINETICS OF THE ENZYMATIC ESTERIFICATION OF N-3 POLYUNSATURATED  
FATTY ACIDS TO GLYCEROL: MULTI-SUBSTRATE MULTI-PRODUCT  
PING-PONG MECHANISM**

C. Correa-Leyva<sup>1</sup>, A. Tejada-Mansir<sup>1</sup>, A.R. Martín-García<sup>1</sup>, H.S. García<sup>2</sup>, J.A. Noriega-Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias de la Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia. Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, col. Centro. Hermosillo, Son. México. 83000.

<sup>2</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. M. A. de Quevedo 2779, Veracruz, Ver. 91897 México.

Recibido Febrero 23, 2017; Accepted July 4, 2017

### Resumen

En este trabajo se utilizó una lipasa de *Candida antarctica* para la producción de mono-, di- y tri-acilglicérols para la esterificación directa de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 al glicerol. Se preparó un concentrado de AGPI n-3 (81.5% w/w) por hidrólisis química del aceite de sardina seguido de un tratamiento con urea. Las reacciones de esterificación se realizaron colocando una proporción de 2.62 mol AGPI n-3/mol glicerol en frascos de vidrio completamente sellados, agitados continuamente, manteniendo la temperatura constante (55°C). Las muestras se extrajeron a diferentes tiempos y se analizó el contenido de acilglicérols por medio de HPLC-ELSD. Se desarrolló un modelo cinético basado en un mecanismo de ping-pong multi-sustrato multi-producto para interpretar los datos experimentales. Se estimaron los parámetros del modelo mediante regresión no-lineal sin restricciones en una plataforma MATLAB® (R2014a), con un coeficiente de determinación ( $R^2 > 0.9$ ). El modelo obtenido puede ayudar al diseño y escalamiento de reactores para reacciones de esterificación enzimática.

**Palabras clave:** mecanismo ping-pong, acilglicérols, parámetros cinéticos, esterificación de AGPI, optimización.

### Abstract

In this work, a lipase from *Candida antarctica* was used for the production of mono-, di- and tri- acylglycerols for the direct esterification of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) to glycerol. A concentrate of PUFA n-3 (81.5% w/w) was prepared by chemical hydrolysis of sardine oil followed by treatment with urea. Esterification reactions were conducted using a ratio of 2.62 mol n-3 PUFA/mol glycerol in sealed glass jars, continuously agitated at constant temperature (55°C). Samples were taken at different times and the content of acylglycerols were analyzed by HPLC-ELSD. A kinetic model was developed based on a multi-substrate multi-product ping-pong mechanism to interpret the experimental data. The parameters of the model were estimated by nonlinear regression without restrictions on a MATLAB® platform (R2014a), with a coefficient of determination ( $R^2 > 0.9$ ). The model obtained can aid in the design and scaling of reactors for enzymatic esterification reactions.

**Keywords:** ping-pong mechanism, acylglycerols, kinetic parameters, PUFA esterification, optimization.

## 1 Introducción

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 son considerados esenciales debido a que las enzimas presentes del cuerpo humano y de los animales no pueden introducir dobles ligaduras en las posiciones anteriores al carbono nueve, contando a partir del grupo metilo terminal, por tanto únicamente puede obtenerlos mediante la dieta (Hernández

y col., 2016). La importancia biológica de los AGPI n-3 radica en que forman parte de las membranas celulares e intervienen en los procesos de formación del cerebro y de la retina en los fetos; además en la producción de eicosanoides, que son reguladoras de la inflamación, fiebre, trombosis y dilatación (Makrides y col., 1996; Mathew, 2002). Además, el consumo AGPI n-3 se ha relacionado con la prevención de enfermedades coronarias, neuromusculares, inmunológicas, alérgicas y cáncer

\* Autor para la correspondencia. E-mail: janoriega@guayacan.uson.mx  
Tel. 526622592105

(Harris, 2009; Piñeiro y col., 2013; Castellanos y Rodríguez, 2015). El estudio de todos los beneficios de los AGPI n-3 ha motivado la investigación que enfocada a la producción acilgliceroles que contengan estos ácidos grasos para usos farmacéuticos y nutraceuticos (Young, 2003). Una forma de producir acilgliceridos que contengan AGPI n-3 es por medio de la esterificación de los AGPI a glicerol catalizada por lipasa (Onofre y col., 2010; Noriega y col., 2013; Baeza y col., 2014). Las lipasas pueden hidrolizar lípidos en medio acuoso, además pueden catalizar la unión de un ácido graso a glicerol en un medio virtualmente anhidro (Valenzuela y col., 2002; Huesca y col., 2005), por ello, resulta conveniente retirar el agua presente en la reacción para evitar la hidrólisis de los acilgliceroles estructurados formados. Eliminando el agua del proceso se evita la reversibilidad de la reacción enzimática, se disminuyen las variables presentes en el sistema y el número de parámetros a determinar del modelo.

Hay varias enzimas como las lipasas, hidrolasas, transferasas y oxidoreductasas cuyo comportamiento en la reacción se ha descrito con el mecanismo ping pong y están atrayendo la atención para las aplicaciones industriales (Cornish, 2012). En todo proceso bioquímico es importante establecer modelos matemáticos que expliquen su comportamiento y que permitan entender los fenómenos presentes. Esto constituye una herramienta que facilita el diseño y escalamiento de los procesos con el fin de mejorar la productividad y los recursos económicos (Bornadel y col., 2013; Cuevas y col., 2015). Los modelos que se establezcan deben de ser confiables y tienen que describir lo mejor posible el fenómeno que se presenta para generar buenas predicciones (Simonin y Bouté, 2016), sin embargo, los parámetros de los modelos bioquímicos tienden a ser excesivos y esto ocasiona que lleguen a ser menos precisos al momento de su determinación. Por ello es conveniente disminuir las variables que compliquen la descripción y modelación del proceso con el fin de aumentar la precisión y la veracidad de los resultados (Al-Haque y col., 2012).

En el presente trabajo se propone un modelo para la cinética de formación de mono-, di- y tri-acilgliceroles, en reactor por lotes, por esterificación directa de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-

3 al glicerol catalizada por una lipasa de *Candida antarctica*.

## 2 Fundamento teórico

Se estableció un mecanismo ping-pong multi-sustrato multi-producto para la reacción de esterificación enzimática sin disolventes, catalizada por una lipasa, para la formación de acilgliceroles estructurados de acuerdo a las siguientes consideraciones (Fig. 1): (a) la molécula de glicerol presenta tres grupos alcoholes donde cada uno puede actuar como un nucleófilo, conduciendo a la formación de mono-, di- y tri-acilgliceroles y agua como subproducto, (b) mediante mallas moleculares se elimina el agua producida en la reacción para evitar que la lipasa hidrolice a los acilgliceroles y disminuir la reversibilidad de la reacción, favoreciendo la generación de los mono-, di- y tri-acilgliceroles. Se considera que los efectos reversibles de la reacción son insignificantes, (c) los efectos no enzimáticos de la reacción no se consideran en el modelo, debido a que estos son despreciables con respecto al efecto enzimático, (d) se obtuvo un concentrado de AGPI n-3 a partir del aceite de sardina, este concentrado contiene principalmente ácido eicosapentanoico (C20:5) y ácido docosaheptaenoico (C22:6), y otros ácidos grasos en menor cantidad. Para disminuir el número de variables en la reacción, se consideró el aceite tratado como un sustrato general (AGPI) y a partir de este se determinarían sus parámetros cinéticos y, (e) para determinar la velocidad de reacción de cada compuesto se consideró que la concentración de enzima es mucho menor que la concentración de los sustratos, por lo que la variación con el tiempo de la concentración de los diferentes compuestos en los que se encuentre la enzima tiende a cero.

La ecuación de velocidad de reacción de los diferentes compuestos a partir de las consideraciones mencionadas se obtuvo conforme a la metodología empleada por Bornadel y col. (2013). La velocidad de reacción de los AGPI n-3 se encuentra representada en la Ec (1):

$$V_{AGPI} = \frac{-\left(\frac{V_1^* C_{AGPI} C_G}{K_{mG}^*} + \frac{V_2^* C_{AGPI} C_{mAG}}{K_{mmAG}^*} + \frac{V_3^* C_{AGPI} C_{dAG}}{K_{mdAG}^*}\right)}{C_{AGPI} + \frac{K_{m1AGPI}^* C_G}{K_{mG}^*} + \frac{K_{m3AGPI}^* C_{dAG}}{K_{dAG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_G}{K_{mG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_{mAG}}{K_{mmAG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_{dAG}}{K_{mdAG}^*}} \quad (1)$$

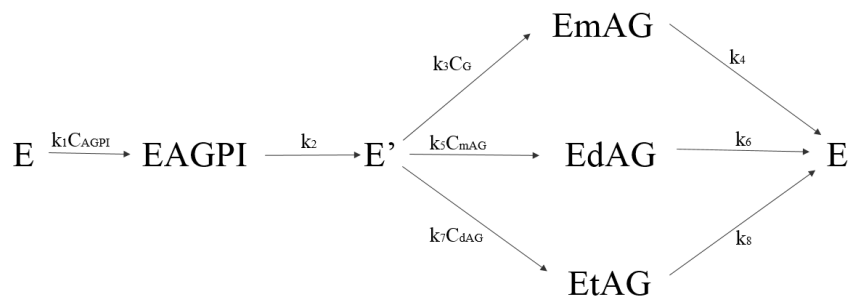


Fig. 1. Esquema del mecanismo para la reacción de esterificación enzimática de AGPI y glicerol para la formación de mono- (mAG), di- (dAG) y tri- acilglicerol (tAG) sin considerar los efectos reversibles causados por el agua.

Tabla 1. Simplificación de los parámetros cinéticos de la reacción de esterificación enzimática basados en el mecanismo ping-pong multi-sustrato multi-producto.

$V_1^*$	$V_2^*$	$V_3^*$	$K_{m1AGPI}^*$	$K_{m2AGPI}^*$	$K_{m3AGPI}^*$	$K_{mG}^*$	$K_{mAG}^*$	$K_{dAG}^*$
$\frac{k_2 k_4 C_{E,tot}}{k_2 + k_4}$	$\frac{k_2 k_6 C_{E,tot}}{k_2 + k_6}$	$\frac{k_2 k_8 C_{E,tot}}{k_2 + k_8}$	$\frac{k_2 k_4}{k_1 (K_2 + k_4)}$	$\frac{k_2 k_6}{k_1 (K_2 + k_6)}$	$\frac{k_2 k_8}{k_1 (K_2 + k_8)}$	$\frac{k_2 k_4}{k_3 (K_2 + k_4)}$	$\frac{k_2 k_6}{k_3 (K_2 + k_6)}$	$\frac{k_2 k_8}{k_3 (K_2 + k_8)}$

Tabla 2. Ecuaciones de velocidad simplificadas del modelo cinético para la reacción entre el AGPI y glicerol para la formación de mono-, di- y tri- acilglicerol.

Variable	X	Y	Z	D
Definición	$\frac{V_1^* C_{AGPI} C_G}{K_{mG}^*}$	$\frac{V_2^* C_{AGPI} C_{mAG}}{K_{mmAG}^*}$	$\frac{V_3^* C_{AGPI} C_{dAG}}{K_{mdAG}^*}$	$C_{AGPI} + \frac{K_{m1AGPI}^* C_G}{K_{mG}^*} + \frac{K_{m2AGPI}^* C_{mAG}}{K_{mmAG}^*} + \frac{K_{m3AGPI}^* C_{dAG}}{K_{mdAG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_G}{K_{mG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_{mAG}}{K_{mmAG}^*} + \frac{C_{AGPI} C_{dAG}}{K_{mdAG}^*}$
Variable	$V_G$	$V_{mAG}$	$V_{dAG}$	$V_{tAG}$
Definición	$-\frac{X}{D}$	$\frac{X-Y}{D}$	$\frac{Y-Z}{D}$	$\frac{Z}{D}$

Las constantes de Michaelis ( $K_m^*$ ) en la ecuación tienen un asterisco debido a que no se consideran los efectos reversibles ocasionados por el agua, por lo que son diferentes a las utilizadas por Cleland (1963). En la Tabla 1 se muestran los parámetros a determinar en el modelo cinético.

En la Tabla 2 se plasman las ecuaciones de velocidad de reacción del glicerol, los mono- di- y tri-acilglicerol. Los parámetros cinéticos que se requieren determinar son las velocidades máximas de reacción ( $V^*$ ) y las constantes de Michaelis aparentes de cada uno de los compuestos ( $K_m^*$ ). Estos parámetros consideran las constantes de velocidad de las reacciones ( $k$ ) y los efectos de inhibición ( $K$ ) de las reacciones enzimáticas.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Reactivos

En la experimentación se utilizó glicerol grado alimenticio (J. T. Baker); mallas moleculares (Sigma, 1.6 mm y 4 Å de diámetro de poro); terbutilhidroquinona (TBHQ, Química Dresen); y nitrógeno de ultra alta pureza (99.999%). Se utilizó la enzima NV-435 de *Candida antarctica* (Novo Nordisk Dinamarca) inmovilizada en resina acrílica macroporosa. Los solventes grado cromatográfico (Fisher, Sigma-Aldrich), fueron sometidos a filtración (0.45 μm) y desgasificación antes de ser utilizados.

### 3.2 Aislamiento y concentración de AGPI

Para la obtención de concentrados de AGPI del aceite de sardina se utilizó el procedimiento descrito por Gámez Meza y col. (2003). Se pesaron 100 g de aceite de sardina previamente refinado (Noriega y col., 2009) y 0.02 g de TBHQ como antioxidante, los cuales fueron saponificados con 200 mL de KOH 7 M en etanol al 70%, calentando a reflujo por espacio de una hora. La fase acuosa fue acidificada a pH 1.0 con HCl para posteriormente extraer los ácidos grasos libres (AGL) por medio de hexano (200 mL x 2 veces). La materia saponificable se extrajo en agua destilada (240 mL) y la insaponificable en hexano (200 mL) la cual fue descartada. En un matraz se mezclaron los AGL con urea en etanol al 95% (100 mL), y se calentaron hasta que la mezcla se tornó a un color claro homogéneo. La mezcla fue transferida a tubos de centrifuga y enfriada rápidamente en baño de agua con hielo (4°C, 8 h). Los cristales formados se separaron por centrifugación a 6000xg (15 min, 0°C). El sobrenadante se transfirió a un embudo de separación y se acidificó (pH=4) para después extraer los AGPI n-3 con una mezcla de hexano:agua en proporción 1:1 agitando por 30 min. Finalmente, la fase orgánica (hexano) se evaporó en un rotavapor (40 rpm, 40°C, vacío 25 mmHg).

### 3.3 Esterificación enzimática

La esterificación enzimática se realizó en frascos de vidrio (10 mL) con tapón de rosca colocados sobre placas de agitación (220 rpm), dentro de una incubadora a 55°C por 12 h de reacción. Dentro de cada frasco, se colocaron 1000 mg de los AGL y glicerol en una relación 2.62 mol AGPI/ mol glicerol. Después de agitar la mezcla de reactantes por 5 min, se adicionaron 50 mg de enzima (5% p/p) para iniciar la reacción de esterificación de los AGL al glicerol. Para eliminar el agua producida, se agregaron 20% (p/p de reactantes) de mallas moleculares después de transcurrir 45 min de reacción (Noriega y col., 2013). Para el seguimiento de la reacción, se tomaron muestras (10 µL) a diferentes tiempos de reacción (t=0, 0.25, 0.5, 0.7, 1.5, 2.75, 4.0, 5.75, 8.75 y 10.8 h). Las corridas experimentales a las condiciones establecidas anteriormente se efectuaron por triplicado.

### 3.4 Análisis de acilglicérols

Los acilglicéridos formados fueron extraídos de las muestras agregando 5 mL de una mezcla de

cloroformo:metanol (2:1). Alícuotas de 1 mL de esta solución fueron transferidas a tubos de 13x100 con tapón de rosca. Los solventes fueron evaporados utilizando nitrógeno y el material no evaporado fue resuspendido en 1 mL de hexano:2-propanol (90:10) para el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de luz láser (ELSD).

Se utilizó una columna Lichrosorb Si60 (Supelco, Inc; 250 x 4.6 mm, 50 µm de tamaño de partícula) en un equipo de HPLC Varian 9012, con un detector ELSD 500 (Evaporative Light Scattering Detector; Alltech). La temperatura de la columna fue mantenida a 40°C utilizando una chaqueta para columna (Altech) conectada a un baño con recirculación de agua (Thermomix 1420; B. Braun). El volumen de inyección fue de 10 µL. El sistema de solventes fue hexano y una mezcla de hexano:2 propanol-acetato de etilo (80:10:10) con 0.1% de una solución de ácido fórmico al 10% en 2- propanol. El programa de solventes para la elución de la columna fue el utilizado por Noriega (2013). Para la cuantificación de los AGL, mono-, di- y tri- acilglicérols, se utilizó una curva estándar de cromatografía empleando una mezcla de estándares de lípidos (1787 Sigma-Aldrich). La concentración de glicerol se calculó mediante un balance de masa en base a la estequiometría considerando las concentraciones molares (M) de los mono-, di- y tri-acilglicérols obtenidas en el análisis por HPCL-ELSD mediante la ec. (2).

$$M_G = M_{OG} - (M_{mAG} + M_{dAG} + M_{tAG}) \quad (2)$$

### 3.5 Estimación de los parámetros cinéticos

Los datos experimentales fueron analizados por medio del ajuste al modelo ping-pong multi-sustrato multi-producto (ecuaciones de la Tabla 2) en el programa de computo MATLAB® (R2014a), para lo cual se desarrollaron los correspondientes códigos de programación. Los parámetros del modelo cinéticos se estimaron mediante un método de regresión no-lineal sin restricciones. Se realizaron iteraciones de los parámetros de forma continua hasta que la suma de los errores cuadrados entre el modelo y los datos experimentales fuera el mínimo. El análisis de la regresión a los datos de la reacción bajo las condiciones experimentales fue validado por el coeficiente de determinación (R cuadrada).

## 4 Resultados y discusión

Se efectuó la síntesis enzimática de mono- di- y triacilglicérolos estructurados con AGPI con la lipasa *Candida antarctica* (5% p/p). La reacción se realizó entre los AGL y el glicerol (relación molar 2.62:1) libre de disolventes con la finalidad de obtener datos experimentales para ajustar el modelo. Los datos de la concentración molar de los productos y reactivos experimentales obtenidos del análisis de las muestras durante el transcurso de la reacción se muestran en la Tabla 3. Estos datos fueron utilizados para realizar el ajuste por medio de los modelos establecidos para cada uno de los componentes involucrados en la reacción. Los valores de los parámetros calculados por el programa se presentan en la Tabla 4. Se puede observar que las velocidades máximas ( $V^*$ ) de formación de mAG y dAG del mismo orden (709.3 y 997.6 mM respectivamente), sin embargo, las constantes de Michaelis ( $K_m^*$ ) para la formación de mAG son menores, lo que indica que la reacción favorece la generación de los mAG. La  $K_m^*$  del dAG es pequeña, pero la  $V^*$  para la generación de tAG es la menor, lo que limita la rápida formación de estos.

El ajuste de los modelos a los datos experimentales se muestra en la Figura 2, donde se observa que el primer producto que se generó a las 0.25 h fueron los monoacilglicérols (mAG), seguidos de los diacilglicérols (dAG) y finalmente los triacilglicérols (tAG), los cuales aparecen después de 0.5 h. El glicerol (G) presente en el reactor se consume completamente alrededor de las 2.75 h. Al terminarse el glicerol, la velocidad de reacción

del AGL disminuye considerablemente debido a que se formó la máxima cantidad de mAG posibles y la reacción continuó con la generación de dAG y tAG, tal como lo propone el mecanismo de reacción. En los datos experimentales se puede apreciar que la concentración de mAG a tiempos mayores de 2.75 h presenta cambios relativamente pequeños. Esto podría haber ocurrido debido a que las mallas moleculares que se añadieron para retirar el agua de la reacción empezaron a perder eficiencia con el paso del tiempo. Esto es razonable considerando que conforme transcurre la reacción de esterificación, las mallas aumentan su humedad. El agua presente en el sistema provoca que la lipasa hidrolice a los acilglicérols generando un efecto de reversibilidad (Valenzuela y col. 2002). La disminución en la concentración de mAG ocurre a la formación consecutiva de dAG y de la misma forma continua la formación de tAG. Durante las 10.8 h de experimentación se alcanzó una esterificación global del 64%, sin embargo, al extender el tiempo de reacción se podría alcanzar un mayor grado de esterificación. Los acilglicérols estructurados obtenidos en esta investigación (mAG, dAG y tAG) contienen concentraciones elevadas de AGPI-n3, los cuales pueden ser útiles para investigar su actividad biológica frente a diversas enfermedades, pudiendo encontrar aplicación en la industria farmacéutica.

La modelación del glicerol y los AGPI presentaron los mejores ajustes con coeficiente de determinación de 0.99 y 0.96 respectivamente. Los mAG, dAG y tAG también presentaron un buen ajuste con un coeficiente de determinación de 0.89, 0.94 y 0.95, respectivamente (Fig. 2).

Tabla 3. Datos experimentales de la concentración molar y porcentaje en mol de los productos y reactivos en la reacción de esterificación enzimática de los AGPI al glicerol durante un período de 10.8 h.

Tiempo (h)	AGPI (%)	AGPI (M)	G (%)	G (M)	mAG (%)	mAG (M)	dAG (%)	dAG (M)	tAG (%)	tAG (M)
0	72.37	2.62	27.62	1	0	0	0	0	0	0
0.25	70.75	2.28	24.62	0.796	4.42	0.143	0	0	0.196	0.006
0.5	69.02	2.22	20.91	0.675	8.71	0.281	1.04	0.033	0.3	0.009
0.7	67.76	2.1	18.11	0.562	12.11	0.375	1.48	0.046	0.509	0.015
1.5	63.63	1.74	8.39	0.23	22.99	0.632	4.02	0.11	0.956	0.026
2.75	55.18	1.27	0	0	34.17	0.791	8.74	0.202	1.89	0.043
4	49.02	1.05	0	0	36.27	0.78	11.54	0.248	3.151	0.067
5.75	47	0.98	0	0	34.05	0.712	14.18	0.296	4.756	0.099
8.75	41.99	0.79	0	0	32.25	0.613	15.39	0.292	10.361	0.197
10.8	48.19	0.94	0	0	28.16	0.55	12.36	0.241	11.267	0.22

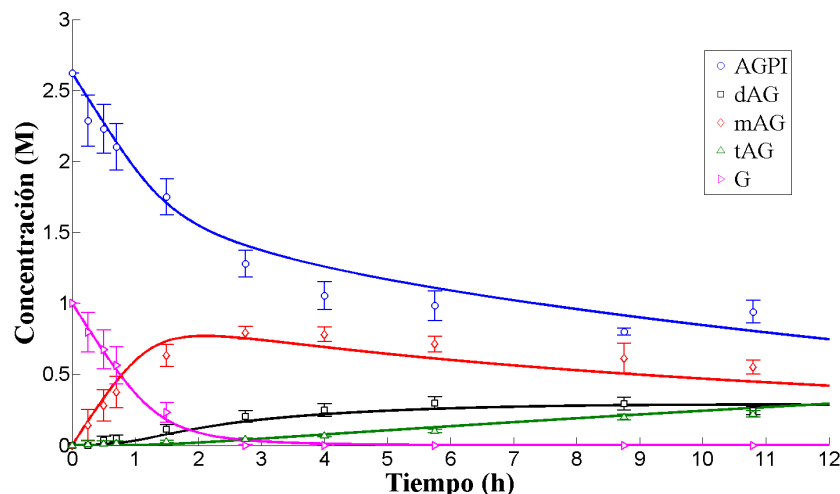


Fig. 2. Datos experimentales (símbolos) y perfil de las concentraciones molares de AGPI, mAG, dAG tAG y G obtenidos con el modelo (líneas solidas).

Tabla 4. Parámetros cinéticos determinados para la reacción de esterificación de AGPI al glicerol.

Parámetro	Valor estimado	Unidades
$V_1^*$	709.3	mM h <sup>-1</sup>
$V_2^*$	997.6	mM h <sup>-1</sup>
$V_3^*$	58.2	mM h <sup>-1</sup>
$K_{m1AGPI}^*$	0.01	mM
$K_{m2AGPI}^*$	1.5	mM
$K_{m3AGPI}^*$	1000	mM
$K_{mG}^*$	13.1	mM
$K_{mmAG}^*$	179.8	mM
$K_{mdAG}^*$	6.7	mM

## Conclusiones

Se estableció un modelo cinético basado en el mecanismo de ping-pong multi-sustrato multi-producto para la reacción de esterificación enzimática de glicerol y AGPI para la formación de acilglicérol que es de utilidad para describir el comportamiento de la reacción. Con el fin de disminuir las variables del proceso se eliminó el término de generación de agua en la reacción de esterificación lo cual fue posible añadiendo mallas moleculares al frasco de reacción. Con las consideraciones establecidas se desarrolló un modelo que contiene un total de 9 parámetros que fueron determinados en este trabajo mediante un ajuste de los datos experimentales a los modelos

propuestos para cada componente de la reacción. En general se obtuvo una buena regresión a los datos experimentales por el modelo ( $R^2 > 0.9$ ). El modelo obtenido puede ayudar a predecir la concentración de los productos de interés (mAG, dAG y tAG) a diferentes tiempos experimentales en reacciones de esterificación enzimática de glicerol y AGPI. Además puede ser una buena base para el diseño y escalamiento de reactores para este tipo de reacciones.

## Nomenclatura

E	enzima libre
EAGPI	complejo enzimático enzima-ácido graso poliinsaturado
E'	complejo enzimático acil-enzima
EmAG	complejo enzimático enzima-monoacilglicérol
EdAG	complejo enzimático enzima-diacilglicérol
EtAG	complejo enzimático enzima-triacilglicérol
k	constante de velocidad, M <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
K	constante de Inhibición, M
$K_m$ o $K_m^*$	constante de Michaelis, M
M	molaridad, M
v	velocidad de reacción, M h <sup>-1</sup>
V o $V^*$	velocidad máxima, M h <sup>-1</sup>
<i>Subíndices</i>	
AGPI	ácidos grasos poliinsaturados
G	glicerol
mAG	monoacilglicérol

dAG diacilglicerol  
 tAG triacilglicerol  
 1,2,3, etc consecutivos de la reacción

complexation. *Food Research International* 36, 721-727.

## Referencias

- Al-Haque, N., Santacoloma, P.A., Neto, W., Tufvesson, P., Gani, R., Woodley, J.M. (2012). A robust methodology for kinetic model parameter estimation for biocatalytic reactions. *Biotechnology Progress* 28, 1186-1196.
- Baeza Jiménez, R., Lopez Martínez L.X., García, H.S. (2014). Biocatalytic modification of food lipids: reactions and applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 29-47.
- Bornadel, A., Orellana Akerman, C., Adlercreutz, P., Hatti Kaul, R. (2013). Kinetic modeling of lipase-catalyzed esterification reaction between oleic acid and trimethylolpropane: a simplified model for multi-substrate multi-product ping-pong mechanisms. *Biotechnology Progress* 29, 1422-1429.
- Castellanos, T.L., Rodríguez, D.M. (2015). El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Revista Chilena de Nutrición* 42, 90-95.
- Cleland, W.W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 67, 104-137.
- Cornish Bowden, A. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 4th Ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Cuevas-Ortiz, F.A., Neria-Gonzales, M.I., Aguilar-Lopez, R. (2015). Nonlinear observer for switched systems: application to batch bioreactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 137-147.
- Gámez Meza, N., Noriega Rodríguez, J.A., Medina Juárez, L.A., Ortega García, J., Monroy Rivera, J., Toro Vázquez, F. J., García, H.S., Angulo Guerrero, O. (2003). Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Research International* 36, 721-727.
- Makrides, M., Neumann, M.A., Gibson, A.R. (1996). Is dietary docosahexaenoic acid essential for term infants? *Lipids* 31, 115-119.
- Harris, W.S. (2009). The omega-3 index: from biomarker to risk marker to risk factor. *Current Atherosclerosis Reports* 11, 411-417.
- Hernandez Rodas, M.C., Morales, P.J., Valenzuela, B.R., Morales, I.G., Valenzuela, B.A. (2016). Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 en la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista Chilena de Nutrición* 43, 196-205.
- Huesca Toral, A., Lopez Hernandez, A., Angulo Guerrero J. O., Hill, Jr. C.G., García, H.S. (2005). Síntesis de triacilglicéridos ricos en ácido linoleico conjugado (CLA) mediante esterificación enzimática en un medio libre de solvente. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 75-87.
- Mathews, C.K., Van Holdeck, K.E., Ahern, K.G. (2002). *Bioquímica de Mathews*. Editorial Pearson Addison Wesley. Tercera Edición. Madrid, España. Pp. 353-395, 701-788.
- Noriega Rodríguez, J. A., Carrillo Perez, E., Gámez Meza, N., Medina Juárez L.A., Baeza Jiménez, R., García H.S. (2013). Optimization of the lipase catalyzed production of structured acylglycerols with polyunsaturated fatty acids isolated from sardine oil. *Journal of Food Research* 2, 97-105.
- Noriega Rodríguez, J.A., Ortega García, J., Angulo Guerrero, O., García, H.S., Medina Juárez, L.A., Gamez Meza N. (2009). Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA Journal of Food* 7, 173-179.
- Onofre Sestiaga, A., Márquez Beltrán, C., Lugo Sepúlveda, R.E., García Nogales, J.J., Noriega Rodríguez, J.A. (2010). Esterificación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados aislados del aceite de canola. *Invurnus* 5, 23-28.
- Piñeiro Corrales, G., Lago Rivero, N. Culebras Fernández, J.M. (2013). Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención

de enfermedades cardiovasculares. *Revisión. Nutrición Hospitalaria* 28, 1-5.

Simonin, J.P., Bouté, J. (2016). Intraparticle diffusion-adsorption model to describe liquid/solid adsorption kinetics. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 161-173.

Valenzuela, B.A., Sanhueza, C.J., Nieto, K.S. (2002).

Structured lipids in nutrition: a technology for the development of novelty products. *Revista Chilena de Nutrición* 29, 106-115.

Young, J. (2003). Introduction, En *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*, ed. by Gunstone Frank D., Oily Press, Bridgwater Eng. pp.1-23.