

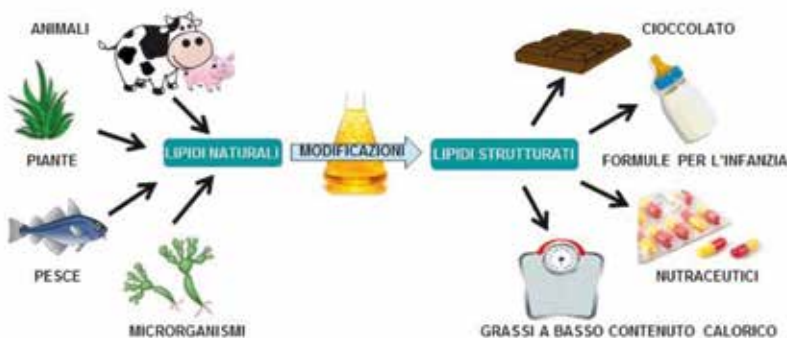
# SINTESI DI LIPIDI STRUTTURATI

LA SINTESI DI LIPIDI STRUTTURATI RAPPRESENTA UN EFFICACE STRUMENTO PER LA MODIFICAZIONE DELLA COMPOSIZIONE IN ACIDI GRASSI DI LIPIDI NATURALI CON LO SCOPO DI MIGLIORARNE LA QUALITÀ, IN PARTICOLARE GLI ASPETTI NUTRIZIONALI E SALUTISTICI, LA STABILITÀ OSSIDATIVA E LE PROPRIETÀ FUNZIONALI

Qualità e sicurezza degli alimenti rappresentano fondamentali obiettivi per le autorità sanitarie e politiche e rientrano tra le priorità riportate nel documento strategico della manifestazione universale Expo 2015 [1].

Negli ultimi decenni sono aumentate le evidenze scientifiche a sostegno dello stretto legame tra alimentazione e salute; già nel 1965 era nota la relazione tra la tipologia degli acidi grassi assunti con la dieta ed i livelli plasmatici di colesterolo, che possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo delle patologie cardiovascolari [2]. La qualità dei lipidi assunti con la dieta dipende strettamente dai profili qualitativi e quantitativi degli acidi grassi esterificati nelle molecole lipidiche e rappresenta un importante modulatore di numerose patologie diffuse nei Paesi industrializzati, tra le quali obesità, diabete, dislipidemie, aterosclerosi ed ipertensione [3]. Organismi di rilievo nazionale [4] ed internazionale [3] hanno dato indicazioni per un'alimentazione in cui l'apporto degli acidi grassi monoinsaturi sia prevalente rispetto a quello dei saturi e dei polinsaturi; questi ultimi, inoltre, devono essere assunti secondo un adeguato rapporto tra acidi grassi polinsaturi della serie n-6 e della serie n-3.

Alla luce di quanto sopra brevemente menzionato, l'interesse della ricerca è stato rivolto allo studio e progettazione di metodi in grado di modificare la composizione in acidi grassi di lipidi di origine naturale per ottenere prodotti dalle migliorate caratteristiche nutrizionali e funzionali. In tale ambito i principali metodi chimici riguardano procedure di idrogenazione, frazionamento ed interesterificazione. Queste ultime reazioni vengono utilizzate per la sintesi di lipidi strutturati [5] e possono

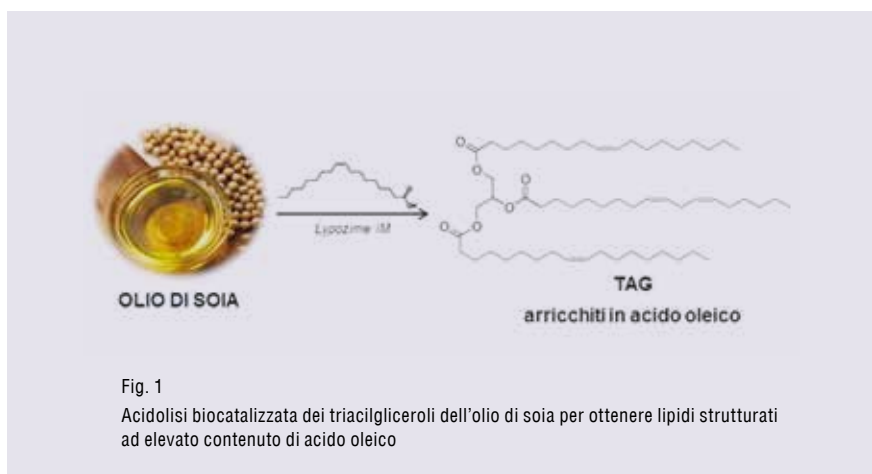


essere condotte utilizzando catalizzatori chimici, che richiedono condizioni di reazione piuttosto drastiche, con la possibile formazione di sottoprodotti, oppure enzimatici, che presentano notevoli vantaggi, quali blande condizioni di reazione, maggiore accettabilità da parte dei consumatori e specificità dell'azione enzimatica. Tale caratteristica assume particolare rilievo se si considerano gli acidi grassi esterificati nelle molecole lipidiche non solo per l'aspetto quali-quantitativo, ma anche per la posizione che essi stessi occupano nello scheletro glicerolico. È noto che durante la digestione dei lipidi della dieta i triacilgliceroli (TAG) vengono idrolizzati a livello dei legami esterei tra il glicerolo e gli acidi grassi nelle posizioni *sn*-1- e *sn*-3-, dando origine a *sn*-2-monoacilgliceroli (MAG). Questi ultimi vengono assorbiti completamente e sintetizzati nuovamente come TAG negli enterociti. Ciò comporta che gli acidi grassi inizialmente esterificati in posizione *sn*-2- abbiano un destino metabolico già stabilito e risultino più efficacemente assorbiti rispetto a quelli esterificati nelle altre due posizioni [6]. Vista l'importanza della distribuzione posizionale degli acidi grassi nelle strutture gliceroliche appare evidente il vantaggio legato

all'utilizzo di particolari enzimi, le lipasi, che possono presentare una specificità posizionale sui substrati glicerolici [7]. Le principali reazioni catalizzate da lipasi che possono essere usate nella modificazione di oli e grassi sono l'idrolisi e l'esterificazione, ma anche l'interesterificazione, la transesterificazione, l'alcolisi e l'acidolisi [8]. Interessanti applicazioni relative alla produzione di lipidi strutturati sono la preparazione di sostituenti del burro di cacao [9], di grassi a basso contenuto calorico [10], di formule per l'infanzia [11] e di alimenti fortificati con acidi grassi polinsaturi della serie n-3 [12].

## Modificazioni di oli vegetali naturali

La modificazione della composizione acidica degli oli viene effettuata per controllare almeno tre aspetti della qualità delle matrici lipidiche: stabilità ossidativa, valore nutrizionale e proprietà funzionali [13]. Diversi studi sono stati condotti per modificare oli vegetali al fine di aumentare il contenuto di uno o più specifici acidi grassi in una o più specifiche posizioni dello scheletro glicerolico [14]. Nel 2004 la lipasi 1,3-regiospecifica da *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM) è stata utilizzata per aumentare il contenuto di acido oleico



(C18:1 n-9) nei TAG di un olio di soia (Fig. 1), valutando anche l'influenza di alcuni parametri di reazione (tempo, temperatura, e carico enzimatico) sulla resa di incorporazione dell'acido oleico [15]. Inoltre la struttura dei nuovi lipidi è stata caratterizzata mediante la valutazione della distribuzione posizionale degli acidi grassi nei TAG, che si può ottenere utilizzando idonee procedure di analisi stereospecifica [16]. Le reazioni condotte per 24 ore, a 30 °C e con carico enzimatico pari a 10% (p/p) portavano ad un elevato grado di incorporazione di acido oleico nell'olio di soia (45%); tale acido grasso risultava incorporato prevalentemente nelle posizioni *sn*-1- e *sn*-3- dei TAG sintetizzati, mentre si osservavano minime modifiche della composizione acidica nella posizione *sn*-2-. Nel 2005 è stato condotto uno studio per valutare l'inserimento dei due isomeri principali dell'acido linoleico coniugato (CLA), il 9*cis*,11*trans*- e il 10*trans*,12*cis*-CLA, nei TAG di un olio extravergine di oliva (EVO) [17]. Nella prima fase della ricerca gli isomeri del CLA sono stati preparati a partire da un olio vegetale ricco di acido linoleico (C18:2 n-6), l'olio di girasole. Poi tali isomeri sono stati impiegati nelle successive reazioni di acidolisi enzimatica con i TAG di olio EVO. Due diverse lipasi immobilizzate sono state testate: il Lipozyme IM ed una lipasi non-regiospecifica da *Candida antarctica*, il Novozym 435. I risultati hanno mostrato che, utilizzando il Lipozyme IM, dopo 24 ore alte percentuali di incorporazione di CLA sono state osservate nelle posizioni *sn*-1- e *sn*-3- dei TAG (37,1% e 46,3% rispettivamente), come atteso sulla base della regiospecificità dell'enzima utilizzato. Il Novozym 435 era meno efficace nel catalizzare l'incorporazione di isomeri del CLA nei TAG

dell'olio ed i risultati dell'analisi stereospecifica hanno mostrato che l'incorporazione non presentava specificità posizionale.

#### Oli a base di diacilgliceroli

Interessanti applicazioni riguardanti la sintesi di nuove matrici lipidiche hanno riguardato la produzione di oli a base di diacilgliceroli (DAG), che si differenziano quindi dai comuni oli vegetali ricchi in TAG. All'inizio del 1999 un'azienda giapponese ha introdotto sul mercato una nuova tipologia di olio a base di DAG [18] e tale prodotto nel 2000 è stato approvato negli USA dalla Food and Drug Administration, che lo ha classificato "Generally Recognized As Safe" (GRAS) e ne ha autorizzato l'uso nel settore alimentare. A livello europeo è stato inserito fra i "novel food", cioè fra quegli alimenti o ingredienti alimentari nuovi per i quali non è dimostrabile un consumo significativo prima del 15 maggio 1997 nell'Unione Europea, data di entrata in vigore del Regolamento (CE) 258/97 [19]. Numerosi studi hanno dimostrato che l'assunzione di olio DAG comporta

un minore accumulo di lipidi nel tessuto adiposo con evidenti vantaggi nella prevenzione e controllo dell'obesità [20], mentre altri studi ne hanno valutato la sicurezza d'uso [21]. La sintesi enzimatica degli oli a base di DAG, prodotti essenzialmente costituiti da *sn*-1,3-DAG, può essere ottenuta per esterificazione del glicerolo con acidi grassi liberi o "donatori acilici" (esteri alchilici e vinilici di acidi grassi), per glicerolisi di oli e grassi naturali, per idrolisi selettiva, o mediante la combinazione di questi metodi [22].

Un olio DAG è stato prodotto a partire da olio EVO [23] mediante sintesi bio-catalizzata realizzata in due fasi, senza isolamento degli intermedi (Fig. 2). In una prima fase l'olio EVO è stato sottoposto alla reazione di etanolisi a 45 °C con la lipasi Novozym 435; la deacilazione degli acilgliceroli dell'EVO avveniva con rese molto elevate, infatti è stato ottenuto un prodotto costituito essenzialmente dagli esteri etilici degli acidi grassi (98%). Successivamente i prodotti della reazione di etanolisi sono stati ri-esterificati testando diverse lipasi e diverse condizioni di reazione. I migliori risultati (70% *sn*-1,3-DAG e 20% TAG) sono stati ottenuti utilizzando la lipasi Lipozyme IM a 12 °C per 144 ore. Più recentemente sono stati riportati in letteratura metodi di preparazione di oli DAG a partire dall'olio di soia [24], di colza [25] o di palma [26].

#### Lipidi strutturati contenenti CLA

Gli isomeri posizionali e geometrici del CLA sono stati oggetto di recenti studi che hanno mostrato numerosi potenziali effetti benefici sulla salute dell'uomo [27]. È aumentato quindi l'interesse nei confronti di TAG strutturati contenenti il CLA in determinate posizioni dello scheletro glicerolico. A tale



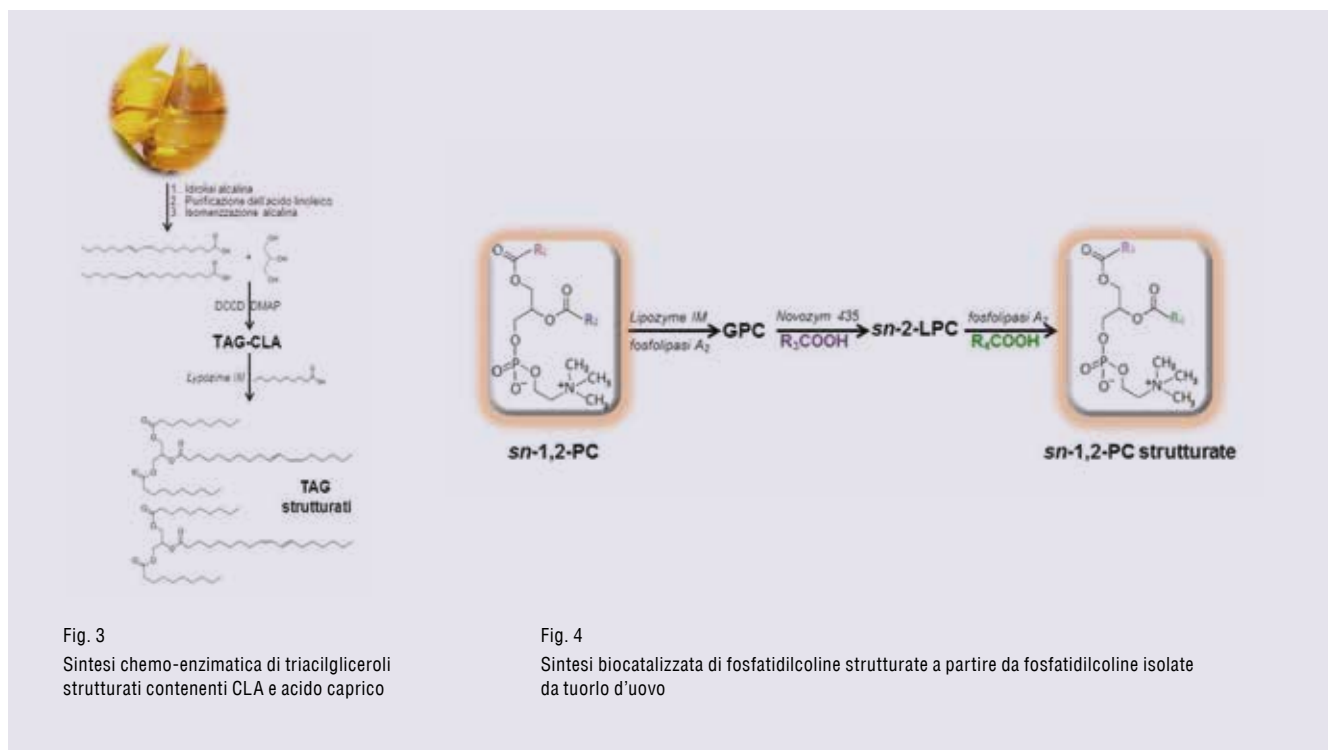


Fig. 3 Sintesi chemo-enzimatica di triacilgliceroli strutturati contenenti CLA e acido caprico

Fig. 4 Sintesi biocatalizzata di fosfatidilcoline strutturate a partire da fosfatidilcoline isolate da tuorlo d'uovo

riguardo fra i numerosi lavori presenti in letteratura è stata riportata l'esterificazione chimica degli isomeri del CLA, prodotti a partire dall'olio di girasole [17], nella posizione *sn-2*- di *sn-1,3*-DAG, prodotti a partire da olio EVO [23]. A tale scopo la reazione è stata condotta per 24 ore in diclorometano a due diverse temperature, rispettivamente 4 e 14 °C, in presenza di *N,N'*-dicicloesilcarbodiimide (DCCD) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) [28]. I risultati hanno mostrato buoni livelli di incorporazione del CLA nei TAG strutturati (37,5% a 4 °C e 39,1% a 14 °C) con un'elevata percentuale di incorporazione (77,0% a 4 °C e 81,5% a 14 °C) degli isomeri del CLA nella posizione *sn-2*-. Nel 2009 la reazione di incorporazione del CLA negli *sn-1,3*-DAG è stata condotta utilizzando una procedura enzimatica (lipasi immobilizzata Lipozyme IM per 96 ore a 40 °C, in presenza di solventi organici, quali esano e isoottano o in condizioni solvent-free) [29]. In generale, nelle condizioni testate sono stati ottenuti TAG strutturati con buoni livelli di isomeri di CLA nella posizione *sn-2*-. La migliore resa in TAG (47,5%) è stata osservata quando la reazione è stata effettuata in isoottano con

un rapporto CLA/*sn-1,3*-DAG 2:1, mentre le reazioni condotte con rapporto CLA/*sn-1,3*-DAG pari a 0,5:1 hanno portato al più basso grado di migrazione acilica.

Poiché le reazioni enzimatiche per la sintesi di lipidi strutturati risentono di numerosi parametri sperimentali, uno studio ulteriore è stato condotto al fine di valutare le migliori condizioni dell'esterificazione enzimatica di *sn-1,3*-DAG con isomeri del CLA, utilizzando il metodo statistico dell'Experimental Design [30].

**MCT: lipidi strutturati con acidi grassi a media catena**

Nel settore dei lipidi strutturati particolare interesse è stato rivolto alle matrici lipidiche caratterizzate dalla presenza di TAG contenenti acidi grassi a catena media (MCT), molto interessanti dal punto di vista fisiologico-nutrizionale in quanto vengono utilizzati dal corpo umano come rapida fonte di energia; tali prodotti vengono attualmente impiegati nel trattamento di pazienti affetti da malassorbimento lipidico [31].

In tale ambito è stata riportata la sintesi enzimatica di TAG strutturati contenenti acido caprico (C10:0) nelle posizioni *sn-1*- e *sn-*

*3*-, e CLA nella posizione *sn-2*-, in modo da produrre lipidi con interessanti applicazioni, come grassi a ridotto contenuto calorico dalle particolari proprietà biologiche [32]. Inizialmente gli isomeri del CLA sono stati preparati dall'olio di girasole mediante una prima reazione di idrolisi alcalina, una successiva fase di purificazione dell'acido linoleico con urea ed infine un'isomerizzazione dell'acido linoleico a CLA mediante idrossido di potassio in *n*-butanolo (Fig. 3). La procedura messa a punto ha portato alla totale conversione dell'acido linoleico a CLA, con la principale formazione (93%) degli isomeri *9cis,11trans*- e *10trans,12cis*-, e piccole percentuali di altri isomeri del CLA. TAG omogenei contenenti CLA (TAG-CLA) sono stati sintetizzati mediante esterificazione chimica del glicerolo con CLA (*9cis,11trans*- e il *10trans,12cis*-), in presenza di DCCD e DMAP. Successivamente reazioni di acidolisi del TAG-CLA con l'acido caprico sono state condotte in esano a 55 °C (Fig. 3); la resa media della reazione di acidolisi era del 65% dopo 96 ore. La migliore incorporazione di acido caprico nei TAG-CLA è stata ottenuta con il Lipozyme IM (56,6%). I risultati dell'analisi strutturale effettuata sui



TAG ottenuti hanno mostrato che sia il Novozym 435 sia il Lipozyme IM portavano ad alte incorporazioni (61,8%) di acido caprico nelle posizioni *sn*-1(3)-, anche se l'utilizzo di Lipozyme IM consentiva di ottenere anche il più alto contenuto % di CLA in posizione *sn*-2- (73,2%).

### Fosfolipidi strutturati

Sempre nell'ambito dei lipidi strutturati, la sintesi di lipidi polari, quali fosfolipidi e lisofosfolipidi con struttura molecolare ben definita offre grandi opportunità nella ricerca a livello delle membrane e delle lipoproteine, nella tecnologia dei liposomi e presenta possibili applicazioni nei settori farmaceutico, alimentare e cosmetico [33].

In tale ambito è stata studiata la deacilazione enzimatica delle fosfatidilcoline (*sn*-1,2-PC), isolate da tuorlo d'uovo, per ottenere glicerolo-3-fosfolina (GPC) [34], composto che rappresenta un utile intermedio per la sintesi di *sn*-1,2-PC strutturate, dopo ri-acilazione delle due *sn*-posizioni dello scheletro glicerico (Fig. 4).

Elevate percentuali di conversione sono state ottenute utilizzando una lipasi selettiva per la posizione *sn*-1- delle *sn*-1,2-PC (Lipozyme IM), ed un enzima selettivo per la posizione *sn*-2 (fosfolipasi A<sub>2</sub> da pancreas suino). I migliori risultati sono stati ottenuti con la contemporanea aggiunta di Lipozyme IM e fosfolipasi A<sub>2</sub> in un sistema di microemulsione, per 48 ore a 35 °C, con una resa in GPC pari al 94%.

In un lavoro successivo è stata progettata la sintesi di *sn*-1,2-PC strutturate a partire dal GPC, mediante reazioni di acilazione enzimatica [35]. Dopo 22 ore è stata ottenuta la totale conversione del GPC a *sn*-2-lisofosfatidilcoline (*sn*-2-LPC) utilizzando il Novozym 435, lipasi selettiva per la posizione *sn*-1- del GPC. Nel secondo passaggio, l'acilazione della posizione *sn*-2- delle *sn*-2-LPC è stata condotta in dimetilformammide usando la fosfolipasi A<sub>2</sub> suina e condizionando il mezzo di reazione al valore di attività dell'acqua pari a 0,22; è stata così ottenuta una resa del 40%, mentre la stessa reazione di acilazione condotta per via chimica portava a rese migliori (65%).

### Conclusioni

In questo lavoro sono state illustrate numerose applicazioni relative all'utilizzo delle lipasi

nella modificazione di lipidi naturali al fine di migliorarne la qualità. Interessanti prospettive si aprono per le possibili applicazioni dei nuovi lipidi non solo nel settore alimentare ma anche in campo medico e nutraceutico.

### BIBLIOGRAFIA

- [1]Expo 2015, Documento strategico, <http://www.expo2015.org/it>
- [2]A. Keys *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 1986, **124**, 903.
- [3]FAO, Food and Nutrition Paper, 2010, <http://www.fao.org/>
- [4]INRAN, Linee guida per una sana alimentazione italiana, <http://nut.entecra.it/>
- [5]J.P. Kennedy, *Food Technol.*, 1991, **44**, 76.
- [6]D.N. Brindley, *Fats in animal nutrition*, J. Wiseman, London, 1984, 85.
- [7]P. Villeneuve, T.A. Foglia, *INFORM-Biotechnol.*, 1997, **8**, 640.
- [8]D. Martin *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, 2010, **231**, 635.
- [9]F.P. Tchobo *et al.*, *J. Food Lipids*, 2009, **16**, 605.
- [10]W.E. Artz *et al.*, *Modifying lipids for use in food*, CRC press, Cornwall, 2006, 444.
- [11]F. Bar-Yoseph *et al.*, *Prostag. Leukotr. Ess.*, 2013, **89**, 139.
- [12]B. Ganesan *et al.*, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2014, **54**, 98.
- [13]E.B. Cahoon *et al.*, *Oil Crops*, Springer, New York, 2009, 31.
- [14]J.C.J. Bart *et al.*, *Biodiesel science and technology - From soil to oil*, CRC press, Cornwall, 2010, 62.
- [15]L. Cossignani *et al.*, *J. Chrom. A*, 2004, **1052**, 167.
- [16]P. Damiani *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, **71**, 1157.
- [17]L. Cossignani *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, **220**, 267.
- [18]FDA, Gras Notice 000056:Diacylglycerol oil, <http://www.fda.gov/>
- [19]Regolamento (CE) 258/97 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 gennaio 1997 sui nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari.
- [20]S.K. Lo *et al.*, *Food Bioprocess Technol.*, 2008, **1**, 223.
- [21]O. Morita, M.G. Soni, *Food Chem. Toxicol.*, 2009, **47**, 9.
- [22]X. Xu, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000, **102**, 287.
- [23]F. Blasi *et al.*, *Enz. Microb. Technol.*, 2007, **41**, 727.
- [24]W. Wang *et al.*, *Enz. Microb. Technol.*, 2011, **49**, 192.
- [25]K. Saitou *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2012, **89**, 1231.
- [26]J.A. Awadallak *et al.*, *Ultrason. Sonochem.*, 2013, **20**, 1002.
- [27]R.P. Jutzeler van Wijlen, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2011, **113**, 1077.
- [28]F. Blasi *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2008, **85**, 613.
- [29]S. Maurelli *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2009, **86**, 127.
- [30]F. Blasi *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2009, **86**, 531.
- [31]H. Mu, C.E. Høy, *Lipids*, 2000, **35**, 83.
- [32]S. Maurelli *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2009, **89**, 2595.
- [33]X. Li *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 15244.
- [34]F. Blasi *et al.*, *Enz. Microb. Technol.*, 2006, **39**, 1405.
- [35]F. Blasi *et al.*, *It. J. Food Sci.*, 2008, **20**, 39.

### Synthesis of Structured Lipids

The synthesis of structured lipids is an effective tool for the modification of fatty acid composition of natural lipids with the purpose to improve their quality, therefore the nutritional and health aspects, the oxidative stability and the functional properties.

LINA COSSIGNANI, FRANCESCA BLASI

DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

LINA.COSSIGNANI@UNIPG.IT