

Aceites Vegetales Enriquecidos en Diglicéridos Mediante Glicerólisis Enzimática Empleando la
Enzima Comercial Lipura Flex

Erika Yuliana López Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar al título de Ingeniero Químico

Modalidad Investigación

Director

Javier Camilo Martínez Alvarado

Mgtr. Ingeniería Química

Codirector

Crisostomo Barajas Ferreira

Mgtr. Ingeniería Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de ingeniería Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A Dios y a la Virgencita María, por concederme la gracia de cumplir el gran sueño: convertirme en Ingeniera Química. Gracias por ser mi refugio, mi guía y mi más constante compañía en aquellas noches difíciles de desvelo e incertidumbre.

A mi madre, Dora Nelcy Rodríguez, cuya infinita ternura, amor incondicional y admirable berraquera transformaron mis miedos en fortaleza. Su vida ha sido el espejo y el ejemplo supremo que me inspiró a seguir adelante, sin importar cuán empinado fuese el camino.

A mi padre, Oswaldo López, por la sabiduría de sus consejos, su dirección oportuna y ese amor paterno que siempre me infundió el perrengue y la determinación necesarios para no desfallecer y culminar con éxito mi carrera.

Al amor de mi vida, Cristhian Durán, por ser refugio, guía y calma; gracias por caminar a mi lado, por tus palabras que siempre encuentran la forma de guiarme, por brindarme tu amor y por ser una de las razones que hacen aún más especial todo lo que dejó mi paso por la UIS.

A mis hermanos, Jenith Lorena López y Diego Leandro López, por su apoyo incondicional en cada etapa de este proceso, por sus palabras de aliento y de orientación en los momentos clave, por ser un ejemplo para mi vida.

A mis amados sobrinos, Thomas Santos, Jerónimo López y Juan José Santos, por ser mi fuente inagotable de alegría y la motivación más dulce para superarme cada día, con la firme ilusión de construir un ejemplo digno que los inspire en sus propios caminos.

A mi Dulce, mi fiel compañera de cuatro patas, que con su lealtad incondicional llenó de calidez mis jornadas más largas de estudio en un momento de mi carrera.

Agradecimientos

A la compañía Alianza Team, por abrirme generosamente las puertas de su organización y brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación. Gracias por ser el escenario fundamental para la culminación exitosa de mi carrera profesional.

A mi director, Javier Martínez, por ser un faro y un guía excepcional en este camino. Su nobleza, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de todo el proceso no solo hicieron posible la realización de este trabajo, sino que me dejaron una profunda enseñanza humana y profesional que siempre llevaré conmigo.

A mi codirector, Crisóstomo Barajas, por impulsarme constantemente a ir más allá de mis propios límites y por enseñarme a ver mi potencial. Agradezco profundamente su guía constante, su ejemplo de sabiduría y, de manera muy especial, aquellas largas charlas compartidas que enriquecieron mi mente y fortalecieron mi confianza.

A Rolando Acosta, por haber creído en mi potencial desde el primer momento, brindándome el respaldo y el voto de confianza necesarios para asumir y sacar adelante este gran reto.

A Paola Acevedo, por su valiosa disposición y generosidad al apoyarme, aportando su profundo conocimiento y experiencia para enriquecer cada etapa de este análisis.

Contenido

Introducción	10
1. Objetivos.....	17
2. Estado del Arte	18
3. Metodología.....	20
Fase 1: Revisión Bibliográfica	21
Fase 2: Validación de métodos analíticos	22
Procedimiento:.....	22
Metodología GC-FID:	24
Metodología HPLC:	24
Fase 3: Reacción Enzimática.....	25
Diseño experimental	25
Configuración de la Reacción Enzimática.....	26
Protocolo de Muestreo	28
Métodos de Caracterización y Cuantificación de Muestras	28
4. Resultados y discusión.....	32
Validación Analítica y Calibración Cromatográfica.....	32
Tratamiento y Evaluación Estadística de los Datos Cinéticos	38
5. Conclusiones	44
Referencias Bibliográficas	45

Lista de Tablas

Tabla 1. Soluciones de calibración para realizar la curva de calibración para cada compuesto...	23
Tabla 2. Protocolo del montaje de la reacción de glicerólisis enzimática.	27
Tabla 3. Procedimiento de extracción líquido-líquido.....	28

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de la migración acílica.	14
Figura 2. Algoritmo metodológico	20
Figura 3. Montaje de la cinetica de la reacción de glicerolisis enzimatica.	27
Figura 4. Preparación de muestras ácidos grasos libres con la normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.....	29
Figura 5. Preparación de muestras de triacilgliceroles con la normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.....	29
Figura 6. Preparación de mono y diacilgliceroles mediante normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86	30
Figura 7. Determinación de picos sn-1,2 y sn1,3 mediante las normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.....	30
Figura 8. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di esteárico	32
Figura 9. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono palmitina.....	33
Figura 10. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Mirístico	33
Figura 11. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Láurico	33
Figura 12. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Esteárico	34
Figura 13. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di palmitina	34
Figura 14. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di Laurico	34
Figura 15. Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di Mirístico.....	35

Figura 16. Cromatograma mediante detector de ionización de llama GC-FID con método AOCS Cd 11b-91.....	36
Figura 17. Cromatograma de los picos sn-1,3 DAG y sn-1,2 DAG respectivamente.	37
Figura18. Contenido de DAGs a temperaturas de 50° C, 60° C y 70° C.	39
Figura 19. Grafica del comportamiento de la Selectividad en el isómero sn-1,3 DAG.	39
Figura 20. Perfil cinético de la conversión de triglicéridos TAGs%.	40
Figura 21. Contenido de ácidos grasos al inicio y final de la glicerolisis enzimática	42
Figura 22. Composición de trigliceridos al inicio y final de la glicerolisis enzimática.....	43

Resumen

Título: Aceites Vegetales Enriquecidos en Diglicéridos Mediante Glicerólisis Enzimática Empleando la Enzima Comercial Lipura Flex¹

Autor: Erika Yuliana López Rodríguez²

Palabras Clave: Glicerólisis libre de solventes, enzima Lipura Flex, lípidos estructurados, diacilgliceroles, regioselectividad, migración acílica.

Descripción:

La demanda de diacilgliceroles (DAG) como lípidos estructurados de alto valor funcional y nutricional ha impulsado el desarrollo de bioprocesos sostenibles para reemplazar la síntesis química tradicional.

La glicerólisis enzimática libre de solventes se posiciona como una de la ruta viable bajo la tendencia de "etiqueta limpia" (clean label); sin embargo, enfrenta severas limitaciones de transferencia de masa debido a la inmiscibilidad de los reactivos y al riesgo termodinámico de la migración acílica.

El presente trabajo de investigación evaluó el efecto del régimen térmico (50 °C, 60 °C y 70 °C) en la glicerólisis de aceite de girasol de alto contenido oleico (HOSO) catalizada por la enzima inmovilizada regioselectiva Lipura Flex.

Para superar las limitaciones de los métodos de cuantificación convencionales, donde las altas temperaturas del inyector en la cromatografía de gases inducen una migración acílica artificial que altera la distribución real de la muestra, se desarrolló y validó un método analítico robusto.

Este acopla la Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama GC-FID, para determinar la conversión y Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC-RID para cuantificar la selectividad isomérica exacta sin inducir degradación térmica en el análisis. El monitoreo cinético de 24 horas demostró que operar a 70 °C minimiza probablemente la viscosidad del medio heterogéneo y mitiga la resistencia difusional, alcanzando la mayor conversión de 75% triacilgliceroles. Simultáneamente, a esta temperatura se logró incrementar la proporción relativa del isómero de mayor valor metabólico y conservarlo, alcanzando una selectividad máxima del 83 % hacia el isómero *sn*-1,3 (DAG). De este modo, se demostró que, bajo las condiciones estudiadas, este punto representa la condición operativa óptima para maximizar el rendimiento antes de que el régimen térmico o un tiempo de residencia prolongado detonen la migración acílica espontánea dentro del reactor, comprometiendo la pureza del bioproducto.

Adicionalmente, el perfil cromatográfico confirmó una alta estabilidad del sistema, manteniendo inalterado el contenido de ácido oleico del 80 %. Este primer estudio con Lipura Flex aporta las bases de ingeniería y los parámetros de control necesarios para el escalamiento industrial de un bioproceso altamente eficiente y alineado con los principios de la química verde.

¹ Trabajo de grado.

² Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Javier Camilo Martínez Alvarado, Mgtr. Ingeniería Química. Codirector: Crisostomo Barajas Ferreira, Mgtr. Ingeniería Química.

Abstract

Title: Vegetable Oils Enriched in Diglycerides by Enzymatic Glycerolysis Using the Commercial Enzyme Lipura Flex³

Author: Erika Yuliana López Rodríguez⁴

Keywords: Solvent-free glycerolysis, Lipura Flex enzyme, structured lipids, diacylglycerols, regioselectivity, acyl migration

Description:

The demand for diacylglycerols (DAGs) structured lipids with high functional and nutritional value has driven the development of sustainable bioprocesses to replace traditional chemical synthesis.

Solvent-free enzymatic glycerolysis stands out as a viable pathway aligned with the "clean label" trend; however, it faces mass transfer limitations due to reactant immiscibility and the thermodynamic risk of acyl migration.

This research evaluated the effect of temperature (50 °C, 60 °C, and 70 °C) on the glycerolysis of high-oleic sunflower oil (HOSO) catalyzed by the immobilized, regioselective enzyme Lipura Flex.

To overcome the limitations of conventional quantification methods where high gas chromatography injector temperatures induce artificial acyl migration that alters the sample's true composition a robust analytical method was developed and validated.

This method couples gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) to determine conversion, and high-performance liquid chromatography with a refractive index detector (HPLC-RID) to quantify exact isomeric selectivity without inducing thermal degradation during analysis. Kinetic monitoring over 24 hours demonstrated that operating at 70 °C likely minimizes the viscosity of the heterogeneous medium and mitigates diffusional resistance, achieving the highest conversion rate (75% triacylglycerol conversion). Simultaneously, this temperature allowed for increasing and preserving the proportion of the isomer with the highest metabolic value, reaching a maximum selectivity of 83% for the sn-1,3 isomer (DAG). Thus, the study demonstrates that, under the conditions tested, this temperature represents the optimal operating point for maximizing yield before thermal conditions or prolonged residence times trigger spontaneous acyl migration within the reactor, thereby compromising the bioproduct's purity.

Furthermore, the chromatographic profile confirms the system's high stability, maintaining the 80% oleic acid content unchanged. This initial study with Lipura Flex provides the engineering foundations and control parameters necessary for the industrial scale-up of a highly efficient bioprocess aligned with green chemistry principles.

³ Degree work.

⁴ Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Javier Camilo Martínez Alvarado, M.Sc. Chemical Engineering. Co-director: Crisostomo Barajas Ferreira, M.Sc. Chemical Engineering.

Introducción

Los lípidos son macronutrientes esenciales que cumplen funciones biológicas críticas, entre ellas estructurar membranas celulares, transportar vitaminas liposolubles y aportar ácidos grasos esenciales. Más allá de su rol nutricional, son componentes estructurales clave en una amplia variedad de productos alimentarios, cosméticos y nutracéuticos, donde determinan atributos sensoriales y funcionales como textura, untabilidad, cristalización, estabilidad oxidativa y comportamiento interfacial.

La fracción mayoritaria de los aceites vegetales corresponde a triglicéridos (TAGs), pero estos presentan limitaciones intrínsecas para aplicaciones avanzadas, ya que la distribución natural de los ácidos grasos en el esqueleto del glicerol no siempre se ajusta a los requerimientos funcionales o nutricionales que demandan los productos modernos.

Como respuesta a este doble desafío tecnológico y nutricional, Wang et al. (2021) destaca que los diacilgliceroles (DAG) constituyen una familia de lípidos estructurados de alto interés para la industria alimentaria debido a sus notables propiedades funcionales y beneficios metabólicos.

A diferencia de las formulaciones comerciales convencionales, donde los diacilgliceroles son incorporados como aditivos químicos sintéticos, la glicerólisis enzimática propuesta en este trabajo permite su generación de manera natural e in situ dentro de la propia matriz oleosa, ofreciendo una alternativa tecnológica directamente alineada con la tendencia de etiqueta limpia (clean label).

Tradicionalmente, la producción industrial de (DAG) se ha realizado mediante procesos químicos que requieren altas temperaturas y catalizadores inorgánicos. Según Li et al. (2022), esta ruta convencional no solo promueve la oxidación lipídica y la generación de subproductos no deseados, sino que obliga a clasificar comercialmente al producto final como un aditivo alimentario sintético.

De acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2017), cuando las mezclas de mono y diacilglicerol se incorporan comercialmente en las formulaciones como agentes emulsificantes, son reguladas como aditivos alimentarios y deben identificarse obligatoriamente bajo la nomenclatura de números E, específicamente como el aditivo E471.

En consecuencia, tal como indican Asioli et al. (2017), la necesidad de declarar este ingrediente bajo dicha etiqueta representa una barrera crítica frente a la creciente demanda global por productos “*clean label*” (etiqueta limpia) y libres de aditivos percibidos como artificiales.

La síntesis de aceites enriquecidos en (DAGs) puede realizarse por varias vías como la hidrólisis parcial, esterificación, transesterificación y glicerólisis, siendo la glicerólisis enzimática la ruta más selectiva y sostenible. En este proceso, los (TAGs) reaccionan con glicerol en presencia de una lipasa, generando mono y diacilglicerol en proporciones controladas y con bajos niveles de ácidos grasos libres.

El uso de lipasas regioselectivas sn-1,3, generalmente inmovilizadas sobre soportes poliméricos, permite obtener mezclas enriquecidas en el isómero sn-1,3 DAG bajo condiciones suaves de temperatura, sin solventes orgánicos y con la posibilidad de reutilizar el biocatalizador. Estas características hacen que la ruta enzimática sea compatible con tendencias actuales de clean-label y procesos de bajo impacto ambiental.

La síntesis enzimática vía glicerólisis ofrece una alternativa sostenible, natural y altamente selectiva. Sin embargo, la viabilidad de este bioproceso depende críticamente de la naturaleza de la matriz lipídica. El principal desafío tecnológico de la glicerólisis libre de solventes radica en las profundas diferencias químicas de los reactivos. Desde una perspectiva estructural, el glicerol es una molécula provista de tres grupos hidroxilo (-OH) que forman una red de puentes de hidrógeno.

Con una configuración hidrofílica y una alta viscosidad intrínseca, haciéndolo inmiscible con los triglicéridos. En consecuencia, como documentan Couto et al. (2020), el sistema opera bajo un régimen bifásico que impone una severa resistencia a la transferencia de masa interfacial, lo cual, según Zheng et al. (2023), limita mecánicamente el acceso de los reactivos al sitio activo de la enzima lipasa.

La mitigación de estas barreras difusionales depende directamente de la matriz lipídica seleccionada. Si bien fuentes convencionales como el aceite de palma RBD son completamente viables y dominan el mercado industrial, Ferreira et al. (2017) y Wang (2011). Su perfil altamente saturado exige temperaturas de operación elevadas, idealmente entre 65 °C y 70 °C. Esto ocasiona que, incluso operando por encima de su punto de fusión, el fluido conserve una alta viscosidad dinámica que frena la dispersión del glicerol.

Por otro lado, matrices alternativas como el aceite de soya RBD resuelven este problema físico; su naturaleza química rica en ácidos grasos poliinsaturados le confiere una excelente fluidez que facilita el mezclado interfacial a temperaturas más bajas 40 °C y 50 °C, pero su alta susceptibilidad a la oxidación lipídica prohíbe el calentamiento prolongado necesario para la estabilidad enzimática.

Sin embargo, esta misma estructura de múltiples dobles enlaces convierte a la soya RBD en un sustrato altamente susceptible a la oxidación lipídica y a la degradación térmica durante el calentamiento prolongado que exige la reacción.

Por otro lado, Zhang et al. (2017) proponen al aceite de girasol alto oleico (HOSO) como el sustrato idóneo. Su composición química monoinsaturada ofrece un equilibrio favorable entre estabilidad oxidativa y propiedades reológicas. garantiza una fluidez favoreciendo la transferencia de masa a temperaturas de operación desde 60 °C y 70 °C, donde su baja viscosidad maximiza la

dispersión interfacial del glicerol sin comprometer la estabilidad oxidativa de la matriz durante ciclos cinéticos extensos. Para vencer la inmiscibilidad del glicerol, y simultáneamente asegura una alta estabilidad oxidativa durante el proceso.

En respuesta a esta necesidad, Li et al. (2024) y Zheng et al. (2023) Señalan que la producción de aceites vegetales enriquecidos en diacilglicerol (DAG) mediante glicerólisis enzimática constituye una de las estrategias más prometedoras. El incremento del contenido de (DAG) confiere al aceite propiedades funcionales, como la capacidad de estabilizar emulsiones y modificar el comportamiento de cristalización, reduciendo la necesidad de incorporar emulsificantes convencionales durante la formulación.

El principal desafío tecnológico que indica, Zhong et al. (2020). Es que al operar con esta matriz en un sistema libre de solventes limita a la transferencia de masa interfacial debido a la inmiscibilidad intrínseca entre el glicerol hidrofílico y el aceite hidrofóbico.

Por lo tanto, el control del régimen térmico y la selección de un biocatalizador regioespecífico como la lipasa inmovilizada Lipura Flex constituyen las variables de diseño fundamentales en esta investigación.

Según plantean Cao et al. (2025), la elevada eficiencia catalítica de la enzima Lipura Flex no se limita únicamente a su carácter hidrofóbico, sino que se fundamenta en el mecanismo bioquímico de activación interfacial. A nivel estructural, se ha demostrado que las lipasas poseen su centro activo protegido por un dominio polipeptídico móvil de naturaleza anfipática, denominado “lid”. En medios homogéneos o predominantemente acuosos, este dominio adopta una conformación cerrada que aísla los residuos hidrofóbicos del sitio activo para evitar interacciones desfavorables con el agua, manteniendo a la proteína en un estado basal inactivo.

Sin embargo, al entrar en contacto con una interfaz hidrofóbica como la fase oleosa, la lipasa experimenta un cambio conformacional drástico que induce el desplazamiento y la apertura de dicho “lid”. Este fenómeno de activación interfacial no solo libera el acceso directo al centro catalítico, sino que expande un espacio hidrofóbico que estabiliza los estados de transición y facilita el acoplamiento de sustratos voluminosos como los triglicéridos, incrementando de forma exponencial la actividad catalítica del sistema.

Por otra parte, de acuerdo con Novonesis (2024), la incorporación de un soporte polimérico de poliestireno/divinilbenceno (DVB) en la formulación de la Lipura Flex optimiza de forma estratégica esta respuesta biocatalítica. Al tratarse de una matriz sintética con una superficie de extrema hidrofobicidad, el soporte emula la interfaz natural de un sustrato lipídico. Esto provoca que las regiones hidrofóbicas que rodean el sitio activo de la lipasa se adsorban fuertemente al polímero, forzando la apertura del “lid” y dejando a la enzima inmovilizada permanentemente en su conformación abierta catalíticamente activa. Dicha fijación interfacial asegura que el centro catalítico permanezca accesible de manera continua para los sustratos a lo largo del tiempo de reacción, maximizando el rendimiento cinético global sin llegar a inducir la desnaturalización de la estructura proteica.

Figura 1.

Diagrama de la migración acílica.



De acuerdo con Compton et al. (2022), la migración acílica representa un desafío termodinámico crítico durante la glicerólisis. Como se ilustra en la Figura 1, los isómeros sn-1,3 (formados inicialmente por la acción de lipasas regio-específicas) presentan una mayor energía libre.

El incremento de la temperatura estimula una isomerización espontánea en la que el grupo éster migra a través de un intermedio cíclico hacia la posición central. Este reordenamiento produce el isómero sn-1,2, el cual es termodinámicamente más estable al poseer una menor configuración de energía libre.

Desde una perspectiva industrial y de diseño de bioprocesos, la ocurrencia de este fenómeno resulta altamente indeseable. En primer lugar, la migración anula el propósito fundamental de emplear un biocatalizador selectivo como la Lipura Flex, ya que destruye el valor nutricional del lípido: mientras que el isómero sn-1,3 DAG posee propiedades metabólicas superiores su ruta de asimilación reduce la acumulación de tejido adiposo, el isómero sn-1,2 DAG es procesado por el cuerpo humano de forma idéntica a un triglicérido convencional.

En segundo lugar, una alta tasa de isomerización evidencia una pérdida del control termodinámico en el reactor, indicando que un régimen térmico excesivo o un tiempo de residencia prolongado han degradado térmicamente la pureza isomérica del bioproducto logrado por la enzima.

En este contexto, el presente trabajo de grado se enmarca en el proyecto doctoral “Lípidos estructurados obtenidos por biocatálisis: diseño, valorización y aplicaciones tecnológicas”, desarrollado en colaboración entre la Universidad Nacional de Colombia y Alianza Team.

La propuesta se enfoca en la síntesis enzimática de aceites vegetales enriquecidos en (DAGs) mediante glicerólisis catalizada por lipasa inmovilizada Lipura Flex, con énfasis en la

cuantificación rigurosa del avance de la reacción, la distribución de especies acilglicerólicas (TAG, DAG, MAG y FFA) y la selectividad posicional sn-1,3/sn-1,2.

Los resultados generados proporcionan información experimental y analítica relevante sobre el desempeño de un biocatalizador escasamente documentado en la literatura científica, constituyendo una línea base para futuras investigaciones enfocadas en la optimización de las condiciones de reacción, la intensificación del proceso y la evaluación funcional de los lípidos obtenidos.

Frente a este panorama, la pregunta que determina el presente trabajo de grado orienta a: ¿Cómo se comporta la glicerólisis enzimática de un aceite vegetal catalizada por Lipura Flex en términos de conversión de triglicéridos (TAG), contenido y selectividad posicional de diacilgliceróles (DAGs) sn-1,3/sn-1,2 y formación de subproductos monoglicéridos (MAG) y ácidos grasos libres (FFA), bajo condiciones de operación térmicas de 50 °C a 70 °C y libres de solventes?

1. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la glicerólisis enzimática de aceite de girasol alto oleico (HOSO) catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada Lipura Flex, bajo condiciones libres de solvente, considerando la conversión de (TAG), la composición acilglicerólica y la selectividad regioisomérica de los (DAG) sn-1,3/sn-1,2.

Objetivos específicos

- Establecer las curvas de calibración y los protocolos analíticos para la cuantificación de especies acilglicerólicas por GC-FID y la determinación de la distribución isomérica (DAG) sn-1,3/sn-1,2 por HPLC-RID, empleando metodologías basadas en estándares comerciales y procedimientos reportados en la literatura.
- Evaluar el efecto de la temperatura de operación de la glicerólisis enzimática sobre la conversión de (TAG), el contenido de (DAG) y la selectividad sn-1,3/sn-1,2 a lo largo del tiempo de reacción.

2. Estado del Arte

La síntesis de lípidos estructurados, como los diacilgliceroles (DAG), mediante rutas biotecnológicas ha ganado gran interés por la necesidad de crear procesos limpios y eficientes. A continuación, se presenta un análisis de los principales avances y retos documentados en la literatura sobre la glicerólisis libre de solventes.

El uso de sistemas libres de solventes para la glicerólisis enzimática fue evaluado por Kristensen et al. (2005), quienes estudiaron el desempeño de diversas lipasas comerciales utilizando aceite de canola. En su investigación, los autores demostraron que el mayor reto de este sistema radica en la naturaleza física del glicerol, el cual tiende a formar una capa aislante alrededor de los soportes enzimáticos hidrofílicos, bloqueando el contacto con la fase oleosa. Al emplear la lipasa inmovilizada Novozym 435, cuyo soporte polimérico es hidrofóbico, lograron superar este impedimento de transferencia de masa, determinando además que no es indispensable emplear un exceso de glicerol en la relación molar para desplazar la reacción. Bajo estas condiciones controladas a 65 °C, el bioproceso requirió de 7 horas para alcanzar su equilibrio cinético, obteniendo un contenido de DAG cercano al 60 %. Este estudio dejó en evidencia cómo las barreras de difusión afectan la velocidad del sistema y resaltó la necesidad de optimizar las variables operativas para acelerar la reacción.

Posteriormente, Zheng *et al.* (2023) buscaron superar estas barreras de mezcla. Sus pruebas determinaron que las condiciones óptimas reportadas exigían subir la temperatura a 65 °C, usar más enzima 6 % y ajustar la relación molar a 1:2. Al analizar el mecanismo, los autores explicaron que este incremento térmico mejora la reacción porque aporta mayor energía cinética a las moléculas y reduce drásticamente la viscosidad de los líquidos; lo que aumenta rápidamente el

área de contacto interfacial y facilita que el aceite y el glicerol puedan entrar juntos al sitio activo de la enzima.

Sin embargo, aunque esta temperatura mejoró significativamente el contacto entre los líquidos, el rendimiento de DAG se estancó entre el 45 % y el 55 %. Según los investigadores, esto ocurrió porque la agitación intensa, lo que produjo la disminución de la eficiencia de la reacción, produciendo un exceso de monogliceroles (MAG) en lugar de (DAG). Su trabajo confirmó que controlar el tiempo y el calor es fundamental para no destruir el biocatalizador.

Aunque estos trabajos mejoraron la producción general, no evaluaron a fondo la calidad nutricional del producto, es decir, su selectividad. En este sentido, Cao *et al.* (2025) comprobaron que usar lipasas similares a la Lipura Flex permite dirigir la reacción hacia el isómero de mayor valor metabólico, el *sn*-1,3 (DAG). Sin embargo, advirtieron sobre un problema crítico conocido como migración acílica. Descubrieron que, si la reacción se calienta demasiado o dura mucho tiempo, la molécula se transforma de forma espontánea en el isómero *sn*-1,2 (DAG), el cual es más estable, pero tiene menor valor nutricional.

Este comportamiento químico dejó en evidencia una falla en los métodos de análisis tradicionales. Autores como Ferreira *et al.* (2017) y Zheng *et al.* (2023) usaron Cromatografía de Gases (GC-FID) para medir sus resultados, un equipo que calienta las muestras a más de 280 °C en su inyector.

Cao *et al.* (2025) demostraron que este calor extremo altera la molécula dentro del mismo equipo, arrojando resultados engañosos. Para solucionarlo, comprobaron que la Cromatografía Líquida (HPLC-RID) es mucho más confiable, ya que opera a menos de 40 °C y logra separar los isómeros *sn*-1,3 y *sn*-1,2 sin dañar la muestra original.

A partir de este recorrido, queda clara la necesidad de construir una solución integral. Por ello, el presente trabajo de grado pretende cubrir estos vacíos evaluando la glicerólisis con la enzima Lipura Flex en aceite de girasol alto oleico (HOSO). El objetivo es determinar la temperatura óptima de operación que maximice la miscibilidad de los reactivos y mitigue las barreras de transferencia de masa, previniendo simultáneamente la migración acílica para preservar la calidad del producto. Asimismo, se busca respaldar estos hallazgos mediante el acoplamiento de las técnicas analíticas GC-FID y HPLC-RID

3. Metodología

El desarrollo experimental del presente trabajo de grado se ejecutó de manera sistemática a través de un diseño secuencial programado para dar cumplimiento a los objetivos específicos del proyecto. El proyecto se estructurará en cuatro etapas secuenciales: (i) revisión bibliográfica, (ii) validación analítica, (iii) reacción de glicerólisis enzimática y (iv) análisis estadístico de los resultados.

Figura 2.

Algoritmo metodológico



Fase 1: Revisión Bibliográfica

En la fase inicial del proyecto, se estableció el marco operativo tomando como referencia las directrices de investigación industrial de la empresa Alianza Team y los lineamientos metodológicos del proyecto doctoral.

Para llevar a cabo las reacciones de glicerólisis enzimática, se empleó como matriz lipídica principal aceite de girasol alto oleico (HOSO), sometido a un proceso de refinación, blanqueo y desodorización (RBD), el cual fue suministrado directamente por la compañía.

De acuerdo con las especificaciones técnicas estandarizadas para esta matriz, el aceite presentó un índice de peróxidos inferior a 1.0 meq O₂/kg, una acidez libre menor al 0.1 % y un contenido de humedad inferior al 0.05 %.

Su perfil lipídico estuvo caracterizado por una alta concentración de ácidos grasos monoinsaturados, siendo el ácido oleico el predominante 80%, seguido por fracciones menores de ácido linoleico 15 %, ácido palmítico 5 % y ácido esteárico 6%.

Como sustrato hidrofílico se utilizó glicerol de grado analítico con una pureza ≥ 99.5 % (Merck, Alemania). La catálisis heterogénea del bioproceso se ejecutó mediante el uso del biocatalizador comercial Lipura Flex (Novonesis), correspondiente a la *lipasa B de Candida antarctica* inmovilizada físicamente sobre un soporte polimérico de poliestireno y divinilbenceno.

Para las posteriores etapas de preparación de muestras y cuantificación analítica del perfil de reacción, se dispuso de reactivos y estándares de alta pureza.

La curva de calibración y la identificación cromatográfica requirieron el uso de tetradecano pureza ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.) como estándar interno, acompañado de patrones comerciales de monoacilgliceroles puros, incluyendo monolaurato (C12:0), monomiristato C14:0, monopalmitina C16:0 y monoestearato C18:0 pureza ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.). De igual

manera, se emplearon estándares de diacilgliceroles como el dilaurato C12:12:0 y la dipalmitina C16:16:0 (pureza $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, EE. UU.).

Finalmente, el acondicionamiento de los analitos y el desarrollo de las fases móviles cromatográficas se llevaron a cabo utilizando solventes de grado HPLC, específicamente hexano e isopropanol acidificado. En conjunto con los agentes derivatizantes necesarios para garantizar la correcta detección y resolución de las especies lipídicas como Piridina, KOH metanólico, BSTFA xilitante, acetato de etilo.

Fase 2: Validación de métodos analíticos

Previo al procesamiento y cuantificación de las muestras obtenidas en los ensayos, se realizó la validación analítica de los instrumentos mediante la construcción de curvas de calibración para mono y diacilgliceroles.

Procedimiento:

Para aceites y grasas que contienen emulsificantes, pesar 50 mg, en un tubo Eppendorf de 2 mL. Seguidamente, se adicionan 300 μL de piridina, 100 μL de ISTD (tetradecano 10 mg/mL) y 200 μL de agente derivatizante. La mezcla se agita por 1 min a 3000 rpm. La reacción de sililación se realiza a 70 °C por 20 min. Es importante que durante la reacción se agite ocasionalmente los tubos. Una vez culmine el tiempo de reacción, se deja enfriar la solución, se toman 50 μL de esta y se aforan a 1 mL con acetato de etilo. El extracto se analiza por GC-FID.

Tabla 1.

Soluciones de calibración para realizar la curva de calibración para cada compuesto.

Punto	Masa del Glicérido	Volumen del glicerido	Volumen de piridina	Volumen del tetradecano	Volumen de BFTBA
Unidad	[mg]	[mL]	[mL]	[mL]	[ul]
0	0	0	0,30		
1	0,25	0,05	0,25		
2	0,50	0,10	0,20	0,10	0,20
3	1	0,0	0,10		
4	1,25	0,25	0,05		

Una vez, se preparen las soluciones de calibración para cada punto Tabla 1. Se analizaron los extractos por GC-FID, para graficar la relación de áreas con respecto a la relación de masa de los estándares con respecto al estándar interno.

$$y = mx + b \quad (\text{Ec.1})$$

$$m = \left[\frac{A_x/A_{istd}}{mg_x/mg_{istd}} \right] \quad (\text{Ec.2})$$

Donde,

A_x : Es el área del estándar de mono o diacilgliceroles

A_{istd} : Es el área del estándar interno tetradecano

mg_x : Es la masa en mg del estándar de mono o diacilgliceroles

mg_{istd} : Es la masa en mg del estándar interno tetradecano

Metodología GC-FID:

De acuerdo a la metodología planteada por Alianza Team se usó el cromatógrafo de gases equipado con un puerto de inyección COC (con la opción *Track Oven* y un volumen de inyección de 1 μL) y un detector FID. La separación se realizó utilizando una columna capilar Restek MXT-65TG (30 m x 250 μm de diámetro interno x 0,1 μm de espesor de película) operando con un flujo constante de 1 mL/min. El programa de temperatura del horno inició a 70 °C, manteniéndose por 4 minutos, seguido de una rampa de calentamiento de 25 °C/min hasta alcanzar los 360 °C, temperatura que se mantuvo durante 9 minutos. Finalmente, el detector FID operó a una temperatura de 350 °C, empleando flujos de 35 mL/min para el H₂, 350 mL/min para el aire y 15 mL/min para el gas *make up* (helio), con una frecuencia de adquisición de señal de 50 Hz/min.

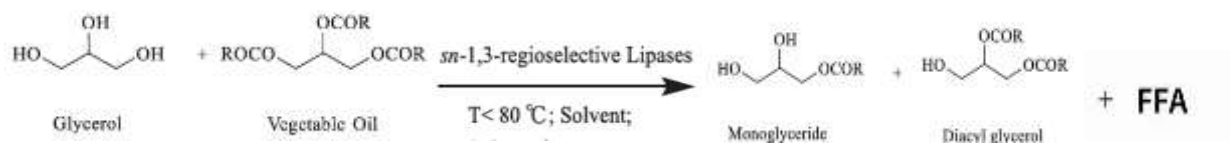
Metodología HPLC:

De acuerdo con Cao et al. (2025). En su metodología para identificar los componentes lipídicos fueron analizados mediante HPLC-RID utilizando una columna Sepax HP-Silica 4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5 μm . Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: temperatura: 30 °C; concentración de la muestra: 25 mg/mL; volumen de inyección: 10 μL ; fase móvil: una solución de n-hexano, isopropanol y ácido metanoico en una proporción de 15:1:0.03 (v/v/v); y velocidad de flujo: 1 mL/min. La composición lipídica relativa de la muestra se calculó mediante el método del área normalizada (%). De esta manera también fueron identificados los componentes lipídicos para este proyecto.

La identificación de los picos correspondientes a los (TAG), los subproductos (MAG, FFA) y la resolución crítica entre los picos de sn-1,3(DAG) y sn-1,2 (DAG) se realizó mediante la

comparación directa de sus tiempos de retención frente a los perfiles de elución de materiales de referencia y estándares puros previamente inyectados.

Fase 3: Reacción Enzimática



Diseño experimental

Se implementó un diseño experimental unifactorial, el cual se encuentra estrictamente alineado y enmarcado dentro del proyecto doctoral titulado “*Lípidos estructurados obtenidos por biocatálisis: diseño, valorización y aplicaciones tecnológicas*”. El único factor independiente evaluado fue la temperatura de operación, estableciendo tres niveles térmicos 50 °C, 60 °C y 70 °C. Las condiciones operacionales y los límites de este diseño se definieron con base en la literatura, tomando como fundamento los criterios, metodologías e hitos reportados por autores clave como Ferreira et al. (2017), Zheng et al. (2023) y Cao et al. (2025).

Con el objetivo de aislar el efecto termodinámico y cinético exclusivo de la temperatura, los demás parámetros operacionales se establecieron como variables controladas a lo largo de todos los ensayos de glicerólisis. Empleando una escala de reacción de 50 g y fijando la matriz lipídica (aceite de girasol alto oleico, HOSO) junto con un contenido de agua inicial rigurosamente estandarizado en 100 ppm, el resto de las condiciones se fijaron bajo los siguientes criterios fenomenológicos:

Se estableció como el punto de equilibrio hidrodinámico óptimo una velocidad de agitación de 400 rpm. Esta velocidad garantiza la energía mecánica necesaria para dispersar el glicerol y vencer la inmiscibilidad de las fases, sin llegar a generar fuerzas de cizallamiento excesivas que pudieran desprender o destruir físicamente el biocatalizador de su soporte polimérico.

Se fijó una dosificación del biocatalizador en 4 % m/m para aportar suficientes sitios activos a la reacción sin inducir limitaciones por transferencia de masa. Cargas enzimáticas superiores tienden a generar aglomeración de las partículas en el medio viscoso, bloqueando el acceso de los sustratos a la lipasa, además de comprometer la viabilidad económica del bioproceso a escala industrial.

La relación molar de aceite:glicerol se fijó en una proporción de 1:5 para garantizar un exceso adecuado del donador de ácidos para desplazar el equilibrio termodinámico hacia la formación de diacilglicerol (DAG), compensando la resistencia difusional en la interfase.

El desempeño del bioproceso frente a los distintos perfiles térmicos se evaluó monitoreando la reacción durante un periodo extendido de 24 horas.

Finalmente, el proceso se cuantificó a través de dos variables dependientes: la conversión global de triglicéridos (TAG, %) y la selectividad posicional hacia el isómero de alto valor nutricional *sn*-1,3 DAG frente a *sn*-1,2 DAG.

Cada tratamiento térmico se ejecutó por duplicado con el fin de evaluar el error experimental, garantizar la reproducibilidad y permitir la validación estadística mediante un Análisis de Varianza ANOVA.

Configuración de la Reacción Enzimática

Las reacciones de glicerólisis se ejecutaron de forma paralela en Erlenmeyer de vidrio de 125 mL utilizando una plancha multiposición de calentamiento y agitación magnética a 400 rpm.

El acondicionamiento y la puesta en marcha de cada ensayo de 50 g se rigieron bajo la siguiente secuencia operativa fija:

Tabla 2.

Protocolo del montaje de la reacción de glicerólisis enzimática.

Hidratación del sustrato	Adición de aceite de girasol alto oleico (HOSO) refinado e incorporación de agua destilada 100 ppm. Homogeneización bajo agitación libre durante 10 minutos.
Humectación de la enzima	Adición del biocatalizador inmovilizado 4 % respecto al aceite. Agitación magnética suave durante 60 minutos.
Equilibrio térmico	Control de la temperatura durante los 60 minutos hasta alcanzar el nivel del tratamiento 50 °C, 60 °C o 70 °C. Según la muestra.
Inicio de reacción	Adición de glicerol analítico e incremento inmediato de la velocidad de agitación a 400 rpm, marcando el tiempo cero del perfil cinético.

Figura 3.

Montaje de la cinetica de la reacción de glicerolisis enzimatica.



Protocolo de Muestreo

El monitoreo cinético contempló la extracción programada de alícuotas a intervalos específicos 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 horas. Con el fin de inactivar de forma inmediata la enzima y preservar la composición intacta de los acilglicéridos. Tabla 3, se aplicó de forma estricta el procedimiento de extracción líquido-líquido:

Tabla 3.

Procedimiento de extracción liquido-liquido.

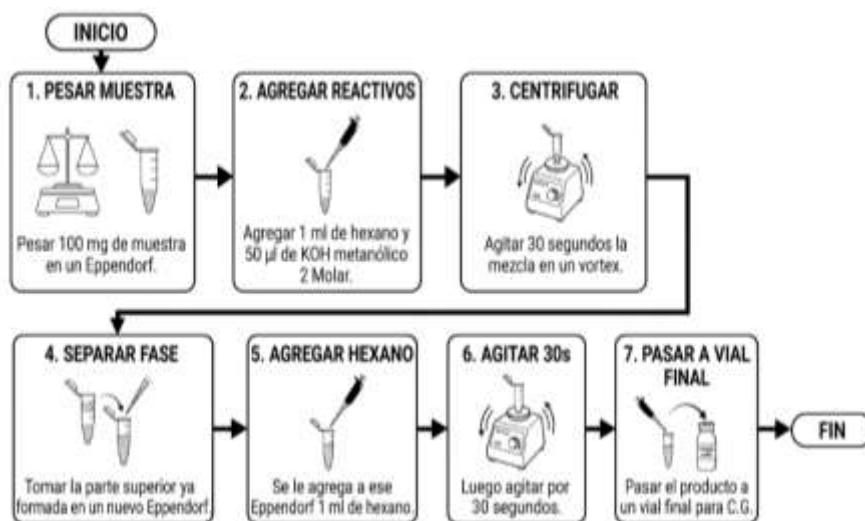
Filtración	Filtrar rápidamente la muestra extraída para remover las partículas del biocatalizador sólido y detener la catálisis
Extracción	Transferir 1 ml de la muestra filtrada a un falcón, adicionar 1 ml de n-hexano, agitar y centrifugar para forzar la separación de fases
Decantación	Recolectar el sobrenadante ya que es la fase orgánica enriquecida en acilglicéridos.
Lavado	Al sobrenadante extraído se le adiciona 1 ml de hexano para garantizar la recuperación de la fase orgánica y conservarla.
Conservación	Evaporar el solvente bajo corriente suave de nitrógeno N_2 Para la caracterización cromatográfica.

Métodos de Caracterización y Cuantificación de Muestras

Para facilitar la elución térmica inalterada de las familias de acilgliceridos a través de la columna de cromatografía sin provocar fenómenos de degradación o pirólisis en el inyector, las muestras del sobrenadante fueron sometidas a una derivatización química mediante silanización para bloquear los grupos hidroxilo (-OH) libres, convirtiéndolos en éteres trimetilsilílicos (TMS). El proceso de acondicionamiento analítico se realizó de acuerdo con el estricto protocolo operativo de Alianza Team, así como con las normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86 de la siguiente manera. A continuación, se evidencia el diagrama del paso a paso:

Figura 4.

Preparación de muestras ácidos grasos libres con la normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.

**Figura 5.**

Preparación de muestras de triacilglicerol con la normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.



Figura 6.

Preparación de mono y diacilglicerol mediante normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86

**Figura 7.**

Determinación de picos sn-1,2 y sn1,3 mediante las normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Ce 5-86.



La cuantificación se realizó por estandarización interna, calculando los factores de respuesta a partir de curvas de calibración descritas en la fase 2, construidas con patrones puros de MAG, DAG y TAG en concentraciones conocidas. La concentración (% m/m) de cada especie se obtuvo por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Especie} = \left(\frac{A_e \times m_{pi} \times F_r}{A_{pi} \times m_{muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

A_e : Área cromatográficas de la especie.

A_{pi} : Área del patrón interno.

F_r : Factor de respuesta para cada especie.

$m_{muestra}$: Masa de la muestra.

La conversión de (TAG%) se puede evidenciar el consumo real del aceite HOSO a lo largo del tiempo. Su evaluación es fundamental para identificar el punto óptimo de operación. La conversión fue calculada de por medio de la siguiente ecuación:

$$x_{TAG}(\%) = \left(\frac{TAG_0 - TAG_t}{TAG_0} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

TAG_0 : Es el valor de triglicéridos en la muestra cero.

TAG_t : Es el valor de triglicéridos de la muestra a calcular.

La selectividad garantiza que el diacilglicerol obtenido se conserve y para fijar el límite de operación antes de que ocurra la migración acílica. La selectividad fue calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$Selectividad_{sn-1,3}\% = \left(\frac{Area_{sn-1,3}}{Area_{sn-1,3} + Area_{sn-1,2}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

4. Resultados y discusión

Validación Analítica y Calibración Cromatográfica

Para garantizar la confiabilidad y la cuantificación exacta de las especies acilglicerólicas durante el monitoreo cinético de la glicerólisis, se realizó inicialmente la puesta a punto y validación del método analítico por Cromatografía de Gases (GC-FID). Este procedimiento permitió establecer la relación matemática directa entre la respuesta del detector (área cromatográfica) y la concentración real de cada analito.

A continuación, se presentan las curvas de calibración. Figuras 8 a 15. Las ecuaciones de regresión lineal obtenidas para cada estándar puro de monoacilgliceroles (MAG) y diacilgliceroles (DAG) utilizados como referencia en el cromatógrafo de gases GC-FID. Figura 16. Los coeficientes de determinación R^2 alcanzados demuestran una linealidad en el rango de trabajo evaluado, lo que valida la precisión del método instrumental antes de proceder con el análisis de las muestras.

Figura 8.

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di esteárico

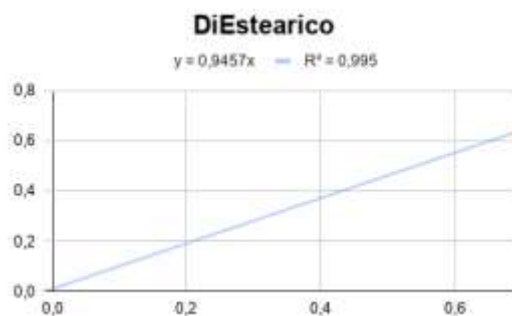
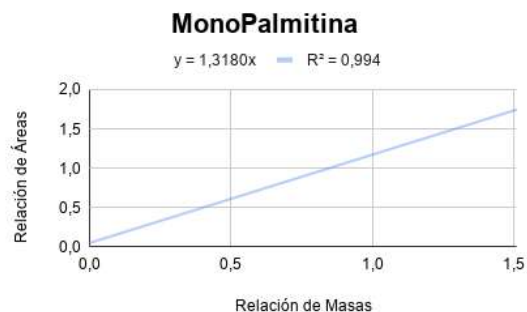


Figura 9.

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono palmitina

**Figura 10.**

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Mirístico

**Figura 11.**

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Láurico



Figura 12.

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Mono Esteárico

**Figura 13.**

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di palmitina

**Figura 14.**

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di Laurico

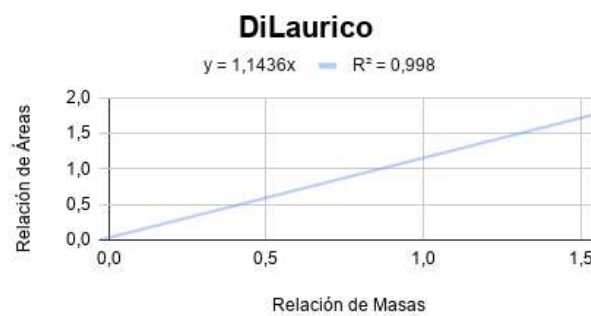
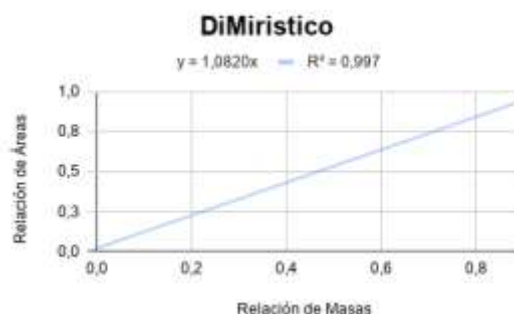


Figura 15.

Gráfica de regresión lineal para el compuesto Di Mirístico

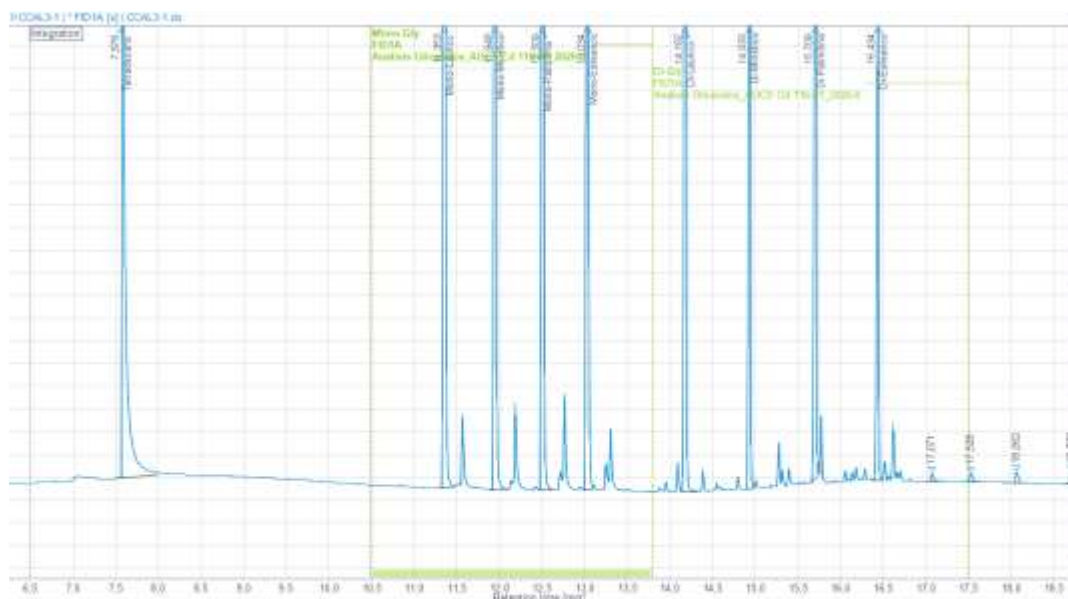


Todas las curvas presentaron coeficientes de determinación R^2 superiores a 0,994. Por lo tanto, desde una perspectiva analítica, la obtención de estos valores confirma una correlación lineal alta entre la concentración de las especies acilglicerólicas y la respuesta del detector de ionización de llama (FID). Este alto grado de ajuste se atribuye al rigor en la preparación de las curvas mediante el método de estandarización interna y a la alta eficiencia del proceso previo de silanización, el cual garantizó la elución completa de los compuestos de interés (MAG y DAG) sin sufrir descomposición térmica en la columna.

Esta linealidad instrumental proporciona que las fluctuaciones observadas en la concentración de los sustratos (TAG) y los productos (MAG y DAG) durante las 24 horas de la reacción corresponden a fenómenos cinéticos y termodinámicos reales del bioproceso, y no a desviaciones o ruido del equipo de medición. En consecuencia, este nivel de precisión instrumental dota confiabilidad y robustez al Análisis de Varianza ANOVA y a las conclusiones extraídas sobre el desempeño del biocatalizador.

Figura 16.

Cromatograma mediante detector de ionización de llama GC-FID con método AOCS Cd 11b-91



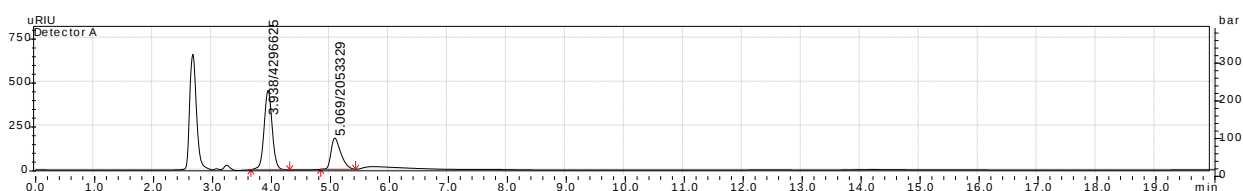
La Figura 16, presenta el cromatograma característico obtenido mediante el detector de ionización de llama GC-FID bajo las condiciones del método AOCS Cd 11b-91. El análisis visual del perfil cromatográfico se distinguen dos ventanas de elución principales, separadas en función del peso molecular y la volatilidad de los compuestos. En primer lugar, entre los minutos 11,0 y 13,5, eluyen los monoglicéridos, identificándose los picos correspondientes a los derivados de los ácidos láurico, mirístico, palmítico y esteárico. Posteriormente, debido a su mayor masa molecular y menor volatilidad, eluyen los diacilgliceroles en una ventana de retención comprendida entre los minutos 14 y 16,5, conservando el mismo orden de elución según la longitud de su cadena carbonada.

Es fundamental destacar la morfología de los picos cromatográficos: se observan señales simétricas este comportamiento, sumado a una línea base estable, confirma el éxito absoluto de la etapa previa de derivatización.

Es precisamente esta alta resolución cromatográfica y la ausencia de solapamiento (coelución) entre los picos, lo que garantizó la integración exacta de las áreas y permitió alcanzar los altos coeficientes de determinación mayores a 0,994 reportados en la calibración, validando la idoneidad del método para cuantificar las muestras reales de la reacción de glicerólisis.

Figura 17.

Cromatograma de los picos sn-1,3 DAG y sn-1,2 DAG respectivamente.



Para cuantificar con exactitud los regioisómeros generados en la reacción, se implementó una metodología analítica mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a un detector de Índice de Refracción (HPLC-RID), operando en fase normal, siguiendo los fundamentos propuestos por Cao *et al.* (2025). A diferencia de la cromatografía de gases, esta técnica opera a condiciones térmicas moderadas, garantizando que la composición isomérica original de la muestra permanezca inalterada y libre de migración acílica inducida por el equipo de medición.

Para garantizar la correcta identificación de las señales cromatográficas, se realizó la inyección de una mezcla de estándares analíticos de alta pureza correspondientes a 1,3-dipalmitina y 1,2-dipalmitina. Figura 17. De acuerdo con los principios de retención en fase normal, la separación física de estos isómeros se rige por sutiles diferencias en su polaridad intrínseca y su configuración espacial.

El isómero *sn*-1,3 DAG posee su grupo hidroxilo libre (-OH) en la posición central (carbono secundario). Al estar flanqueado por dos cadenas de ácidos grasos, este grupo presenta una menor polaridad aparente y una interacción más débil con la fase estacionaria de la columna, eluyendo en primer lugar con un tiempo de retención establecido en 4 minutos. Por el contrario, el isómero *sn*-1,2 DAG posee su grupo hidroxilo en un extremo (carbono primario). Al estar más expuesto, este grupo es más polar y forma puentes de hidrógeno más fuertes con la columna, lo que incrementa su retención y desplaza su elución hasta los 5,5 minutos.

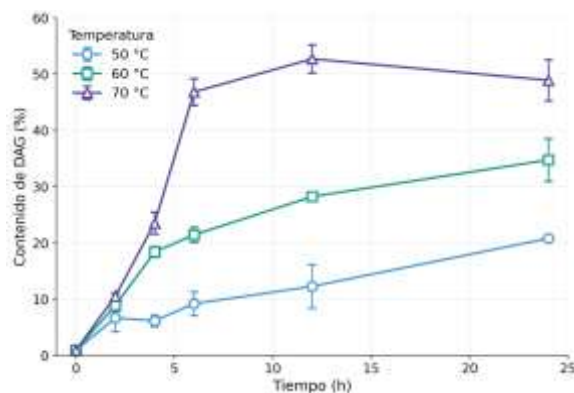
Finalmente, La metodología permitió cuantificar la distribución regioisomérica obtenida durante la reacción, proporcionando evidencia consistente con la regioselectividad reportada para Lipura Flex.

Tratamiento y Evaluación Estadística de los Datos Cinéticos

Las diferencias estadísticas entre los perfiles térmicos se evaluaron mediante un Análisis de Varianza ANOVA. Para identificar de manera específica entre cuáles niveles de temperatura existían diferencias significativas, el análisis se complementó con una prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey. Todas las pruebas estadísticas se ejecutaron estableciendo un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. El procesamiento de los datos, el cálculo de las varianzas y la validación del modelo se llevaron a cabo utilizando el software estadístico GraphPad Prism.

Figura18.

Contenido de DAGs a temperaturas de 50° C, 60° C y 70° C.

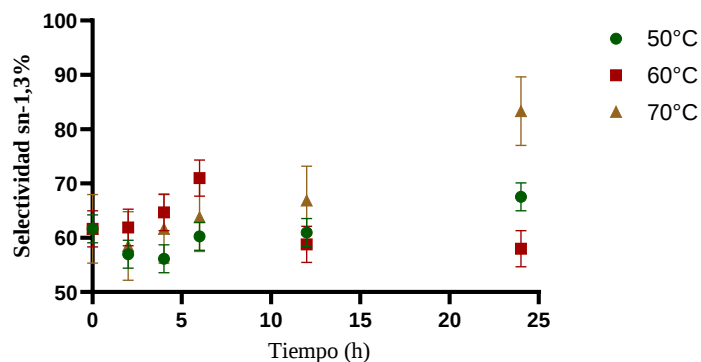


En la gráfica 18, se evidencia que, a una temperatura de 50 °C, la reacción es mucho más lenta, alcanzando una concentración cercana del 21 %. Por otro lado, a una temperatura de 60 °C, el contenido de DAG aumenta de forma continua hasta aproximadamente el 35 % a las 24 h.

Finalmente, a 70 °C, el contenido de DAG alcanza un máximo cercano al 53 % alrededor de las 12 h y luego disminuye ligeramente (debido a una conversión hacia MAG y AGL). A comparación de Guo et al. (2025). Quien requirió de 24 horas para alcanzar el 57% de DAGs.

Figura 19.

Grafica del comportamiento de la Selectividad en el isómero sn-1,3 DAG.

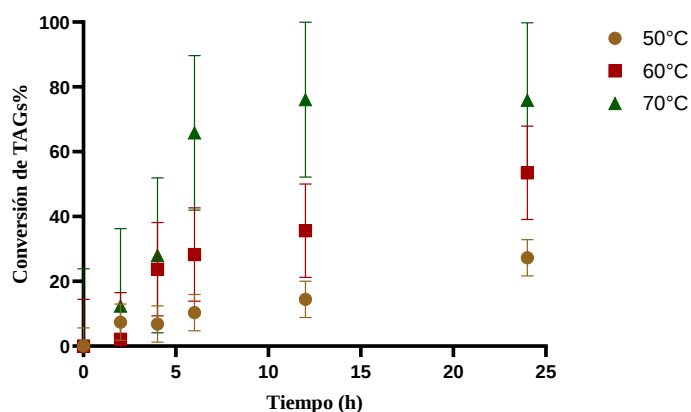


La figura 19, durante las primeras 12 horas de reacción, los tres perfiles térmicos muestran un comportamiento fluctuante pero estable, manteniéndose en un rango del 55 % al 70 %. En esta etapa, es probable que el biocatalizador se encuentra actuando activamente sobre el sustrato dentro de la emulsión en formación, pero el sistema aún no ha acumulado su máxima concentración del isómero sn-1,3.

Sin embargo, a las 24 horas se evidencia una clara divergencia dependiente del nivel térmico. El tratamiento a 70 °C logra conservar el isómero sn-1,3-DAG de manera excepcional, alcanzando una selectividad pico cercana al 83 %, cifra estadísticamente superior a las obtenidas a 50 °C y 60 °C. Este hallazgo es fundamental para el escalado del proceso, ya que confirma que someter el sistema a 70 °C por un periodo de 24 horas establece el límite de operación óptimo. En este punto de control, la cinética enzimática ha maximizado la conversión del reactivo y, simultáneamente, se ha logrado aislar y conservar el sn-1,3-DAG de manera exitosa, marcando el momento idóneo para detener la reacción antes de que el tiempo de residencia prolongado detone una migración acílica.

Figura 20.

Perfil cinético de la conversión de triglicéridos TAGs%.



La Figura 20, presenta el perfil cinético de la conversión de triglicéridos (TAG %) a lo largo de 24 horas de reacción, evaluado bajo tres perfiles térmicos (50 °C, 60 °C y 70 °C). Esta gráfica ilustra la evolución del bioproceso, donde el incremento porcentual en el eje de las ordenadas refleja la transformación progresiva del sustrato original mediante la acción catalítica de la enzima Lipura Flex.

Se observa que, durante las primeras 6 horas de operación, las cinéticas de los tres tratamientos mantienen un comportamiento similar, con conversiones inferiores al 30 % y una superposición en sus barras de desviación. Este periodo inicial corresponde a la etapa de adaptación y formación de la emulsión en el sistema inmiscible. Sin embargo, a partir de las 12 horas, las trayectorias divergen marcadamente, evidenciando una fuerte dependencia termodinámica.

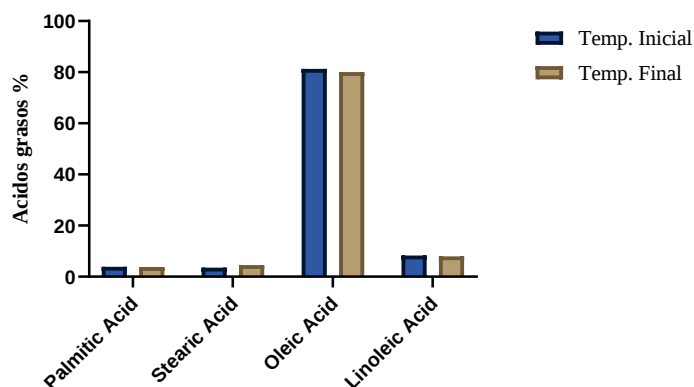
A las 24 horas, el tratamiento a 70 °C exhibe un desempeño cinético mayor, alcanzando una conversión promedio cercana al 75 %, superando ampliamente a los tratamientos de 60 °C y 50 °C. Fenomenológicamente, esta aceleración sostenida a altas temperaturas se atribuye probablemente a la reducción de la viscosidad del medio heterogéneo compuesto por la fase lipídica, el glicerol y el biocatalizador sólido. Al disminuir la viscosidad, se mejora significativamente la hidrodinámica del sistema, reduciendo las resistencias a la transferencia de masa en la interfase y maximizando el contacto entre los reactivos y los sitios activos del biocatalizador.

Finalmente, es imperativo analizar la amplitud de las barras de desviación estándar SD, particularmente en el tratamiento de 70 °C hacia el final de la cinética 12 h y 24 h. Esta variabilidad entre duplicados no responde a errores analíticos, sino a la naturaleza física cambiante del sistema.

A medida que la conversión avanza y se acumulan nuevos productos (DAG y MAG), la emulsión se vuelve más compleja y físicamente inestable, lo que incrementa la dificultad para extraer alícuotas de muestreo perfectamente homogéneas.

Figura 21.

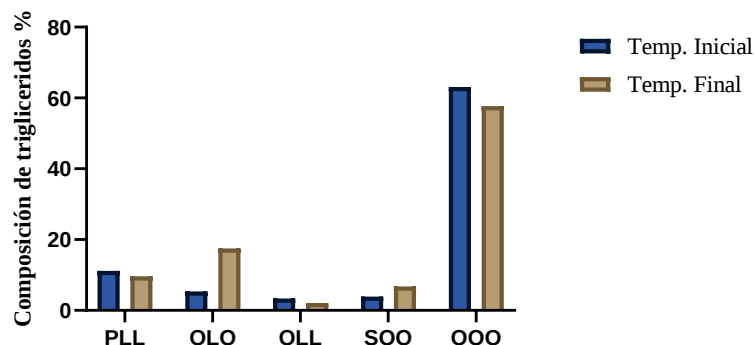
Contenido de ácidos grasos al inicio y final de la glicerólisis enzimática



La Figura 21, compara la composición porcentual de ácidos grasos al inicio y al final del bioproceso, destacando al ácido oleico como el componente mayoritario del 80 %, acompañado de fracciones menores de ácido linoleico, esteárico y palmítico. El hallazgo principal de este perfil es la alta estabilidad química del sistema, ya que la proporción de los ácidos grasos no presentó cambios apreciables tras 24 horas de operación. Esta constancia demuestra que las condiciones térmicas del reactor son idóneas y que la enzima Lipura Flex es altamente específica, actuando únicamente sobre los enlaces éster del glicerol. Al no presentarse reacciones secundarias indeseadas, como la degradación o la oxidación de las cadenas hidrocarbonadas, se garantiza que el producto final conserva intactas su calidad fisicoquímica y el alto valor nutricional aportado por el aceite original.

Figura 22.

Composición de triglicéridos al inicio y final de la glicerólisis enzimática



La Figura 22, ilustra la composición porcentual de las distintas especies de triglicéridos (TAG) presentes en la matriz lipídica al inicio y al final de la glicerólisis. A diferencia de la estabilidad observada en el perfil global de ácidos grasos, la composición de los TAG sí experimenta modificaciones significativas, destacando inicialmente a la trioleína (OOO) como el componente mayoritario del 63 %. Sin embargo, tras 24 horas de reacción, se evidencia una disminución en la concentración, acompañada de un incremento notable en la fracción de OLO (Dioleoil-linoleína), junto con variaciones menores en especies como PLL (Palmitoil-dilinoeína), OLL (Oleoil-dilinoeína) y SOO (Estearoil-dioleína). Este comportamiento dinámico es la prueba directa de la actividad catalítica de la enzima Lipura Flex. A través de los mecanismos de la glicerólisis, el biocatalizador rompe selectivamente los enlaces de los triglicéridos originales y reorganiza los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol, logrando la síntesis efectiva de nuevas especies lipídicas estructuradas sin degradar la composición neta de ácidos grasos del sistema.

5. Conclusiones

El valor diferenciador de la presente investigación radica en que constituye a el primer estudio enfocado en el uso de la enzima Lipura Flex para optimizar el proceso de glicerólisis utilizando aceite de girasol de alto contenido oleico (HOSO).

A diferencia de los antecedentes en la literatura, este trabajo de grado supera las limitaciones metodológicas convencionales mediante el desarrollo y la validación de un método analítico robusto que acopla la cromatografía de gases con detector de ionización de llama GC-FID y la cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción HPLC-RID, permitiendo cuantificar de forma simultánea tanto la conversión de triglicéridos como la regioselectividad de la reacción.

De igual manera, se demostró experimentalmente que el régimen térmico particularmente a la condición óptima de 70 °C, ejerce un control crítico sobre la cinética de consumo de sustrato y sobre el fenómeno de migración acílica dentro de un sistema operado en ausencia total de solventes químicos.

En consecuencia, este estudio no solo aporta al entendimiento fundamental de la biocatálisis de lípidos, sino que genera las bases de ingeniería y los parámetros operativos de control necesarios para el futuro escalamiento industrial de este bioproceso sostenible.

Referencias Bibliográficas

- AOCS (American Oil Chemists' Society). (1986). *Triglycerides by Gas Chromatography*(Norma AOCS Ce 5-86). AOCS Press.
- AOCS (American Oil Chemists' Society). (1991). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS* (Normas AOCS Cd 11-91 y AOCS Cd 11b-91). AOCS Press.
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Naes, T., & Varela, P. (2017). *Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. Food Research International*, 99(1), 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). (2017). *Re-evaluation of mono- and di-glycerides of fatty acids (E 471) as food additive. EFSA Journal*. <https://e-aditivos.com/nocivos>
- Cao, M., Yang, F., Zhang, Y., McClements, D. J., Liu, R., Chang, M., Wang, X., Zhu, Y., Zhang, H., Wei, W., & Wang, X. (2025). *Efficient method of synthesizing sn-2 eicosapentaenoic acid (EPA) monoacylglycerols using circular ethanolysis and glycerolysis. Food Chemistry*, 474, 143047. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143047>
- Compton, D. L., Kenar, J. A., & Evans, K. O. (2022). *Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(6), 571–578.
- Couto, R. O., de Melo, R. R., da Silva, L. V., & de Castro, H. F. (2020). *Enzymatic synthesis of glycerol carbonate in solventless liquid one phase conditions: Role of reaction medium engineering on catalytic performance. Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c02128>

- Ferreira, A. G. M., Egas, A. P. V., Fonseca, L. M. A., Costa, A. C., Abreu, D. C., & Lobo, I. Q. (2017). *The viscosity of glycerol. The Journal of Chemical Thermodynamics*, 113, 162–182. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2017.05.042>
- Kristensen, J. B., Xu, X., & Mu, H. (2005). *Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(5), 329–334. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-005-1074-5>
- Li, L., Wang, Y., Cui, R., Wang, F., & Lan, D. (2022). *Engineering the thermostability of the mono- and diacylglycerol lipase SMG1 for the synthesis of diacylglycerols. Foods*, 11(24), 4069. <https://doi.org/10.3390/foods11244069>
- Li, Y., Zhang, Y., Liu, R., Liu, Z., Goh, K.-L., Zivkovic, V., & Zheng, M. (2024). *Solvent-free synthesis of diacylglycerols via enzymatic glycerolysis between edible oils and glycerol catalyzed by self-made immobilized lipase PS@LXTE-1000. Oil Crop Science*, 9, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2024.05.003>
- Wang, X., He, L., Huang, J., & Zhong, N. (2021). Immobilization of lipases onto the halogen & haloalkanes modified SBA-15: Enzymatic activity and glycerolysis performance study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.111>
- Zheng, J. W., Liang, Y. D., Li, J. X., Lin, S. P., Zhang, Q. Y., Zuo, K. H., Zhong, N. J., & Xu, X. B. (2023). Enzymatic preparation of mono- and diacylglycerols: A review. *Grain & Oil Science and Technology*, 6(4), 185–205. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2023.08.001>