

EVALUACIÓN DE LA ENZIMA LIPOZYME TL IM EN REACCIONES DE  
TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA PARA OBTENCIÓN DE GRASAS  
ESPECIALES

LUIS FERNANDO JÁCOME REYES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2004

EVALUACIÓN DE LA ENZIMA LIPOZYME TL IM EN REACCIONES DE  
TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA PARA OBTENCIÓN DE GRASAS  
ESPECIALES

LUIS FERNANDO JÁCOME REYES

Trabajo de grado presentado como requisito  
parcial para optar al título de Químico

Directora  
Janeth Aidé Perea V.  
Química, MSc. Doctora en Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2004

## ***DEDICATORIA***

A mi madre, Alba Reyes Márquez y padre, Lino Jácome Arenas por su gran esfuerzo de cada día impulsados por el sueño de que sus hijos alcancen sus objetivos y que sin su ayuda no hubiera alcanzado esta meta; y los logros siguientes de mi vida serán el culto a su trabajo abnegado. Fue ese esfuerzo y su amor inagotable que me motivaron a seguir adelante a pesar de las adversidades que se presentaron, y que en esos momentos difíciles para mí, siempre estuvieron presentes en mi corazón aunque la distancia fuera grande.

A mis hermanas Yolima y Yohana por haberme regalado a mis dos hijos (Los Alejandro).

A mi amiga Dalgi escudera fiel, hermana adoptiva, que aunque la vida no nos unió por sangre, el destino se encargó de atarnos por la misma sed de un mundo mejor.

A Carmen Tarazona, motor de la facultad de ciencias, belleza y bondad inagotables que me hicieron creer en los ángeles, convirtiéndose en mi madre putativa.

A Linda Roa, por darme ánimos y estar conmigo en los momentos difíciles.

A mis compañeros del Centro Estudiantil de la Facultad de Ciencias (CEFAC), Andrea, Edgar, Camilo, Martha, Nubia, y demás.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la doctora Aidé Perea Villamil por su profesionalismo su calidad humana..

Al ingeniero Cristian Mantilla por su gran colaboración.

A Nelson Moreno por su gran colaboración.

Al Centro de Investigación en Ciencias y Tecnología (CICTA).

A C.I. Santandereana de Aceites (SACEITES) por aportar los sustratos y el catalizador utilizados en esta investigación.

## **RESUMEN**

**TITULO:** EVALUACIÓN DE LA ENZIMA LIPOZYME TL IM EN REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS ESPECIALES

**AUTOR:** JÁCOME REYES, Luis Fernando <sup>1</sup>

**PALABRAS CLAVES:** Equivalentes de la manteca de cacao (CBE), fraccionamiento de grasas vegetales, interesterificación, contenido de grasa sólida (SFC), perfil de fusión, chocolates, confitería, oleína de palma (OP), triacilglicéridos (TAGs), manteca de cacao (MC), hidrogenado total de soya (HTS), diseño experimental (DE), aceite de palma (AP), Fracción dos (F2).

### **CONTENIDO:**

Esta investigación se pretendió obtener un equivalente de la manteca de cacao (CBE) que son más estables económicamente, a partir de la OP que presenta una concentración de TAGs POP y POO adecuada por poseer ácido oleico en la posición central del glicerol como los TAGs de la MC, POS y SOS. Se incorporó ácido esteárico en la posición 1 y 3 de los TAGs de la OP, siendo el HTS seleccionado como la principal fuente de este ácido, utilizando una enzima 1,3-específica inmovilizada en gel de sílice (Lipozyme TL IM), por medio de una reacción de transesterificación con una condiciones de temperatura (70°C), agitación mecánica (400 rpm), cantidad de enzima (10,5%), relación p/p de OP/HTS (1:1) y 5 horas de reacción condiciones optimizadas encontradas usando un DE, obteniéndose una grasa producto la cual se fraccio con solventes y la fracción dos (F2) con un rendimiento del 24,3% presentó una concentración de POS y SOS cercana a la MC, pero una composición en POP baja, haciendo que tenga un menor contenido de sólidos grasos en el rango de 0 a 30°C, aún cuando funde igual a la MC en el rango de 30 a 40°C. La presencia de estos últimos en la fracción 1 y 3, indicó que el proceso de filtración a nivel de laboratorio no fue eficiente, concluyendo que esta etapa llevada a nivel industrial puede enriquecer la F2 y obtener un equivalente con propiedades de cristalización y de fusión similar a la MC.

El monitoreo de los principales TAGs en el tiempo de la reacción, determinó que 2 horas es suficiente para producir las concentraciones máximas de los TAGs POS y SOS, lo cual es ventajoso para llevar la reacción en procesos continuos.

Lipozyme TL IM es una enzima con alto potencial en la elaboración de grasas especiales por su estabilidad y costo.

---

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias/Química/Janeth Aidé Perea Villamil

## **ABSTRACT**

**TITLE:** EVALUATION OF THE TL IM LIPOZYME ENZYME IN REACTION OF ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION TO OBTAIN SPECIAL FATS

**AUTHOR:** JÁCOME REYES, Luis Fernando

**KEY WORDS:** Cocoa butter Equivalents (CBE), Vegetable fat fractioning, In teresterification, Solid Fat Content (SFC), Fussion Profile, Chocolates, Oleine palm (OP), thriacylglycerids (TAGs), Cocoa Butter (CB), Soja total hydrogenated (STH), experimental design (ED), Palm Oil (PO), Fraction two (F2)

### **CONTENT:**

This research aimed to obtain a cocoa butter equivalent (CBE) which are economically more stable when produced from Palm oil (PO) which presents an adequate concentration of TAGs, POP and POO since they have olei acid at the central position of glicerol as TAGs of MC, POS and SOS. Stearic acid was incorporated at positions 1 and 3 in TAGs of PO, being STH selected as the main source of the acid by using an enzyme 1,3-specific immobilized in silice gel (Lipozyme TL IM) through transesterification reaction at a temperature condition (70°C), mechanical shaking (400rpm), enzyme quantity (10,5%), relation p/p of PO/STH(1:1) and 5 hour-reaction of found optimized conditions using a DE obtaining a fat product which was fractionated with solvents and fraction 2 (F2) with 24.3% performance presented a concentration of SOS and POS close to MC but a low composition in POP making it have a lower content of fatt solids ranking between 0 and 30°C even though it melts as the MC does between 30 and 40°C. The presence of the latter in fraction 1 and 3 indicated that filtration process was not efficient in laboratoty work concluding that this phase can be enrichen F2 when taken to industrial level and obtainan equivalent with crystalization and fussion properties similar to MC

Monitoring of the main TAGs on the reaction time detrmind that two hours are enough to produce maximal concentrations of TAGs, POS and SOS which is advantageous to take the reaction in cuntinuous processes.

Lipozyme TL IM is an enzyme with a high potential in the making of special fats due to its stability and costs.

## *TABLA DE CONTENIDO*

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1. MARCO TEORICO	
1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS ACEITES VEGETALES	4
1.1.1 Propiedades físicas	6
1.2. ACEITES VEGETALES	12
1.2.1 Aceites de palma (AP)	13
1.2.2 Aceite de soya (AS)	16
1.2..3 Manteca de cacao (MC)	16
1.3 GRASAS ESPECIALES	20
1.3.1 Producción de grasas especiales	22
1.3.1.1 Preparación de equivalentes de la manteca de cacao (CBE`s)	32
2. METODOLOGÍA	38
2.1. MATERIALES Y REACTIVOS	38
2.2 PROCEDIMIENTO	39
2.2.1 Reacción general de transesterificación	39
2.2.2 Selección del sustrato	39

2.2.3 Optimización de las condiciones de reacción	40
2.2.4 Evaluación de la concentración de los principales TAG`s en el tiempo	41
2.2.5 Fraccionamiento de las grasas producto de la transesterificación	41
2.2.6 Estabilidad operacional de la enzima	42
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS	42
2.3.1 Índice de acidez (%A)	42
2.3.2 Actividad lipolitica	43
2.3.3 Composición en ácidos grasos	43
2.3.4 Composición en acilgliceridos	44
2.3.5 Determinación de los perfiles de fusión y contenido de grasa sólida	45
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN Y DE LA MANTECA DE CACAO	47
3.2. REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA	49
3.2.1 Determinación de la actividad hidrolitica de la enzima	49
3.2.2 Selección del sustrato	50
3.2.2.1 Reacción de transesterificación enzimatica de la OP y EE	50
3.2.2.2 Reacción de transesterificación enzimatica de la OP e HTP	52

3.2.2.3	Reacción de transesterificación enzimática de la OP e HTS	53
3.2.3	Estudio de las condiciones óptimas de la racción de transesterificación	55
3.2.4	Evaluación de la concentración de los principales TAG's en el tiempo de reacción	65
3.2.5	Fraccionamiento y caracterización de la grasa producto de reacción.	70
3.2.6	Estabilidad operacional de la enzima	75
4.	CONCLUSIONES	79
5.	RECOMENDACIONES	81
	ANEXOS	
	BIBLIOGRAFÍA	90

*LISTA DE TABLAS*

	pág.
Tabla 1. Punto de fusión (medidos por DSC) de TAG`s y sus formas polimorfitas	8
Tabla 2. Composición en ácidos grasos (% área) del aceite de palma y sus fracciones, aceite de soya y la manteca de cacao.	17
Tabla 3. Composición en ACG`s (% área) del aceite de palma y sus fracciones, aceite de soya y la manteca de cacao.	18
Tabla 4. Características de las formas polimórficas de las manteca de cacao	19
Tabla 5. Composición en (%) <b>A</b> ) Ácidos grasos <b>B</b> ) acilgliceridos de aceites vegetales hidrogenados totalmente.	26
Tabla 6. Variables de estudio con sus niveles y sus respectivos códigos.	40
Tabla 7. Puntos del diseño experimental	41
Tabla 8. Concentración (mg/mL) en metil ésteres de los patrones.	
Tabla 9. Concentración (mg/mL) de los patrones de triacilglicéridos.	45
Tabla 10. <b>A</b> ) Composición en ácidos grasos (% área) de la OP, EE, HTP, HTS y la MC y <b>B</b> ) composición en acilglicéridos (% área) de la OP, HTP, HTS y la MC.	48
Tabla 11. Composición en ACG`s (% área) de la mezcla inicial,grasa producto y variación neta de los ACG`s de la reacción de transterificación de la OP y EE.	51
Tabla 12. Composición en ACG`s (% área) de la mezcla inicial, grasa producto y variación neta de ACG`s de las reacciones de transesterificación de OP e http catalizada por Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM respectivamente.	53
Tabla 13. Composición en ACG`s (% área) de la mezcla inicial, producto de reacción y variación neta de ACG`s de la reacción de transesterificación de la OP y HTS	54
Tabla 14. Arreglos y respuestas del diseño experimental.	56
Tabla 15. Coeficientes de regresión del modelo polinomial predicho para las	

respuestas experimentales.	57
Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) la variable respuesta ( $\Sigma$ POS y SOS).	60
Tabla 17. Valores de la ( $\Sigma$ (POS +SOS) estimados y experimentales.	64
Tabla 18. Condiciones óptimas para el sistema OP – HTS con Lipozyme TL IM como catalizador.	65
Tabla 19. Variaciones de las concentraciones de los principales triglicéridos de la reacción, producción neta, velocidades de formación y desaparición en la primera hora de reacción.	66
Tabla 20. <b>A)</b> Composición en ácidos grasos (%) <b>B)</b> composición en acilglicéridos (%) del producto de reacción, sus fracciones y la manteca de cacao.	71

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de una molécula de TAG	5
Figura 2. . Formas polimórficas de los cristales de triacilglicéridos	9
Figura 3. Curvas de fusión de margarina, “shortening”, aceite de soya y manteca de cacao.	7
Figura 4. Palma africana de aceite ( <i>Elaeis guineensis</i> )	9
Figura 5. <b>A)</b> Racimo de fruto de la palma africana. <b>B)</b> Fruto de la palma africana.	15
Figura 6. Oleína de palma y estearina de palma.	16
Figura 7. Grasas de palma y soya totalmente hidrogenadas.	24
Figura 8. Esquema general de la reacción de interesterificación enzimática.	27
Figura 9. Microorganismo <i>Thermomyces lanuginosus</i> <b>B)</b> Enzima del <i>Thermomyces lanuginosus</i> inmovilizada en gel de sílice, nombre comercial Lipozyme TL IM	32
Figura 10. Contenido de sólidos grasos de diferentes CBE en función de la temperatura (Karlshamns, 2001).	34
Figura 11. Montaje empleado para efectuar la reacción de transesterificación enzimática	39
Figura 12. Actividad hidrolítica de Lipozyme TL IM (a 70 °C) sobre oleína de palma.	50
Figura 13. Contenido de TAG`s POS y SOS en las grasas producto de las diferentes reacciones de transesterificación enzimática.	55
Figura 14. Efectos de las variables sobre Y	59
<b>Figura 15.</b> Diagrama de Pareto de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables de estudio sobre la variable de respuesta.	59

Figura 16. <b>A)</b> Superficie de respuesta tridimensional <b>B)</b> mapa de contorno (dimensional) de las variables $X_1$ y $X_2$ en la producción de los triacilglicéridos POS y SOS.	62
Figura 17. <b>A)</b> Superficie de respuesta tridimensional <b>B)</b> mapa de contorno (dimensional) de las variables $X_2$ y $X_3$ en la producción de los triacilglicéridos POS y SOS.	63
Figura 18. Variación de la concentración de los TAG's en el tiempo de reacción de transesterificación <b>A)</b> insaturados y <b>B)</b> Saturados.	67
Figura 19. Variación de la acidez con respecto al tiempo de reacción	69
Figura 20. Perfiles de contenido de grasa sólida de F1, F2, F3 y de la MC.	73
Figura 21. Composición (% área) de los triacilglicéridos POS y SOS en la mezcla inicial, producto y fracciones de la reacción de transesterificación y la manteca de cacao.	
Figura 22. Comportamiento de fusión de un equivalente comercial, la fracción dos y la manteca de cacao.	75
Figura 23. Estabilidad operacional de la enzima Lipozyme TL IM a 70 °C	
76 Figura 24. Variación del índice de acidez con el uso de la enzima	77
Figura 25. Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de metil ésteres	83
Figura 26. Perfil cromatográfico de una mezcla patrón de triacilglicéridos	84
Figura 27. Perfil cromatográfico de acilglicéridos de la oleína de palma	85
Figura 28. Perfil cromatográfico de acilglicéridos de la manteca de cacao.	86
Figura 29. Perfil cromatográfico de acilglicéridos del HTS	87
Figura 30. Perfil cromatográfico de acilglicéridos del HTP	88
Figura 31. Perfil cromatográfico de acilglicéridos de la grasa producto de la reacción de transesterificación de la OP e HTS con Lipozyme TL IM, llevada a cabo en las condiciones óptimas.	89

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

ACG`s	Acilgliceridos
AE	Ácido esteárico
AEC	Ácido esteárico comercial
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoléico
C18:3	Ácido linolénico
CBE	Equivalente de la manteca de cacao
CBS	Sustituto de la manteca de cacao
CG	Cromatografía gaseosa
CICTA	Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología en Alimentos
DAG	Diacilglicérido
DAG`s	Diacilglicéridos
DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
EE	Estearato de etilo
AG	Ácido graso
AGL	Ácidos grasos libres
HTP	Hidrogenado total de palma
HTS	Hidrogenado total de soya
IA	Índice de acidez
LLL	sn-1,2,3-trilinooleoil glicerol (trilinoleina)
LLLn	sn-1,2-linooleoil-3-linolenioil glycerol

LOP	sn-1-linoleoil-2-oleoil-3-palmitoil glicerol
MAG	Monoacilglicerido
MAG's	Monoacilgliceridos
MC	Manteca de cacao
MI	Mezcla inicial de reacción
NC	Número de carbonos
OLL	sn-1-oleoil-2,3-dilinoleil glycerol
OLLn	sn-1-oleoil-2-linoleoil-3-linolenioil glycerol
OLO	sn-1-oleoil-2-linoleoil-3-oleoil glycerol
OOO	sn -1,2,3-trioleil glycerol (triestearina)
OP	Oleína de palma
POL	sn-1-palmitoil-2-oleíl-3-linoleoil glicerol
POL	sn-1-palmitoil-2-oleíl-3-linoleoil glicerol
POO	sn-1-palmitoil-2,3-dioleoíl glicerol
POP	sn-1-palmitoil-2-oleíl-3-palmitoil glicerol
POS	sn-1-palmitoil-2-oleíl-3-estearoil glicerol
PPL	sn-1,2-dipalmitoil-3-linoleoil glicerol
PPP	sn-1,2,3-tripalmitoil glicerol (Tripalmitina)
PPS	sn-1,2-dipalmitoil-3-estearoil glycerol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SOO	sn-1-estearoil-2,3-oleoil glicerol
SOS	sn-1-estearoil-2-oleoíl-3-estearoil glicerol
SPS	sn-1-estearoil-2-palmitoil-3-estearoil glicerol
SSS	sn-1,2,3-Triestearoil glicerol
TAG	Triacilglicérido
TAG'S	Tracilglicéridos

## *INTRODUCCIÓN*

La diversidad de productos que se pueden obtener a partir de las grasas y aceites, y el desarrollo de la Oleoquímica han acrecentado el interés de la química y la biotecnología en estos compuestos, principalmente porque son obtenidos de fuentes renovables (aceites vegetales) producidas en muchos países del mundo.

Adicionalmente, la aplicación limitada que tienen los aceites vegetales en su forma natural, ha generado el desarrollo de investigaciones tendientes a mejorar las propiedades de los aceites vegetales, de forma que puedan obtenerse productos con propiedades físicas y químicas deseables, las cuales dependen de la composición en ácidos grasos y triacilglicéridos estructurados que le dan el valor nutricional y comercial al producto final.

Estas propiedades se pueden promover físicamente fraccionando el aceite, o químicamente por hidrogenación o interesterificación con catalizadores químicos y recientemente con catalizadores enzimáticos

Entre las más promisorias rutas de interés industrial están la hidrólisis, la síntesis de ésteres, y las reacciones de interesterificación de lípidos catalizadas por lipasas. Con estas enzimas, se puede trabajar en condiciones de temperatura y presiones moderadas obteniéndose velocidades de reacción mayores que las obtenidas en las reacciones no enzimáticas (Malcata, 1990).

Las lipasas 1,3-específicas son utilizadas para la obtención de grasas conocidas como “grasas especiales”, las cuales tienen un perfil de fusión característico que les permite tener una amplia aplicación en la industria de alimentos, ya sea como equivalentes de la manteca de cacao, sustitutos de la manteca de cacao, grasas base para margarinas y “*shortenings*” o como lípidos estructurados con gran aplicación en nutrición enteral, entre otras.

Los compuestos mencionados se pueden obtener a partir de aceites vegetales económicos, mediante reacciones de interesterificación química o interesterificación enzimática, en este último caso mediante reacciones de acidólisis o reacciones de transesterificación, en las cuales se reordenan los ácidos grasos de sus triacilgliceridos, para mejorar sus propiedades funcionales y por lo tanto, su aplicación como ingredientes en los alimentos (Eliott, 1991).

Dentro de las grasas especiales, los equivalentes de la manteca de cacao han adquirido gran relevancia al convertirse en compuestos que pueden reemplazar parcialmente la manteca de cacao. Esta última es una grasa muy utilizada en la industria de chocolatería y confitería debido a su punto de fusión, que es apropiado para derretirse por el calor proporcionado por la boca humana. Sin embargo, su alto costo ha inducido la investigación para su obtención por vías alternativas.

En el Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander, con la colaboración de la empresa Santandereana de Aceites (C.I. SACEITES S.A) se han evaluado diferentes rutas para la obtención de los equivalentes de la manteca de cacao, utilizando reacciones de interesterificación con Lipozyme IM de *Mucor mihei* como catalizador. Por acidólisis se obtuvo el equivalente de la manteca de cacao, al emplear como sustratos oleína de palma y ácido Esteárico, pero con un índice de acidez alto (35%) que limita su aplicación a nivel industrial. Por transesterificación, al emplear como sustratos oleína de palma con aceite de palma totalmente hidrogenado, aún cuando se logró reducir apreciablemente el nivel de acidez, las grasas obtenidas no presentaron las características de los equivalentes de la manteca de cacao. Al contrario, se comportaron como reemplazantes de la manteca de cacao, por lo cual, fueron utilizadas en la elaboración de grasas para rellenos de chocolate (Arango y col., 2004).

Con base en los resultados mencionados y dada la importancia de obtener los equivalentes de la manteca de cacao, en éste trabajo se evalúa otra ruta, en la cual se aplica una reacción de transesterificación utilizando como sustratos oleína de palma mezclada con estearato de

etilo ó hidrogenado de aceite de palma ó hidrogenado de aceite de soya, usando como catalizador la lipasa comercial Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus*, enzima que ha salido recientemente al mercado y que presenta una mayor actividad hidrolítica que la enzima Lipozyme RM IM de *Rhizomucor mihei* utilizada hasta el momento.

## ***1. MARCO TEÓRICO***

### ***1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS ACEITES Y GRASAS***

Los aceites y las grasas se clasifican químicamente dentro del grupo de los lípidos. Son insolubles en agua y solubles en la mayoría de los solventes orgánicos. Son menos densos que el agua y a temperatura ambiente varían de consistencia desde líquidos a sólidos. Cuando presentan un estado sólido, se les denominan grasas y cuando son líquidos, aceites.

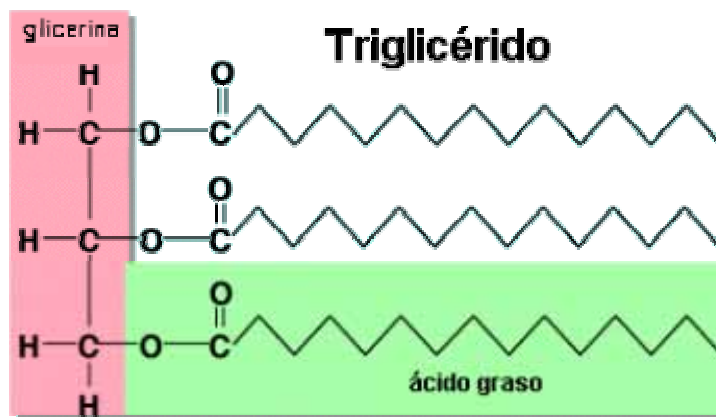
Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos contribuyendo a la textura y en general a las propiedades sensoriales del producto, sirviendo además de vehículo de las vitaminas liposolubles.

Las principales fuentes de las grasas y aceites son los tejidos animales y las semillas oleaginosas, ya que las frutas y las hortalizas presentan normalmente muy bajas concentraciones, con algunas excepciones como el aguacate, las aceitunas y algunos tipos de nueces. Las grasas y aceites se presentan comercialmente de distintas formas, siendo las más frecuentes la mantequilla, los aceites para freír, los de aliñar y las mantecas para panadería y pastelería. Los aceites para guisar o los de aderezar se obtienen a partir de los de algodón, palma, soya, maíz, cacahuete, oliva, girasol, etc., los cuales se acostumbran a someter a procesos previos de refinado, decoloración y desodorización a fin de mejorar determinadas propiedades y aumentar su estabilidad (Fennema, 1982; Baduit, 1993; Ziller, 2000).

Aunque las grasas y aceites se clasifican en un solo grupo, según sus características, es posible establecer cinco subgrupos bien diferenciados: primero, el de las grasas lácteas; segundo, el de las láuricas; tercero, aquel que se distingue por su elevado contenido de ácidos oleico y linoleico; cuarto, el de grasas ricas en ácido linoléico y, quinto y último, el de las grasas de origen animal procedentes de tejidos adiposos (Fennema, 1982).

Las grasas y aceites son principalmente *triésteres* de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triacilglicéridos (TAG's) (Figura 1). Los ácidos grasos predominantes poseen cadenas alifáticas saturadas e insaturadas con un número par de átomos de carbono y un radical carboxilo. La longitud de la cadena y su organización en la estructura del glicerol varía ampliamente, aunque la mayoría de los aceites comestibles contienen entre 16 y 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos que forman los TAG's varían de un aceite a otro. Las grasas como los aceites son una combinación de ácidos grasos ya sea saturados (C14:0, 16:0 etc.) y no saturados (C18:1, 18:2, 18:3). No existe ninguna grasa natural que sea únicamente saturada o no saturada (Arishima, 1991; Ziller, 1994).

**Figura 1.** Estructura química de una molécula de TAG



Los TAG's normalmente representan más del 95% en peso de los aceites alimentarios, sin embargo también se presentan componentes minoritarios como monoacilglicéridos (MAG's), diacilglicéridos (DAG's), ácidos grasos libres (AGL), fosfátidos, carotenoides y vitaminas. Los mono y diacilglicéridos son ésteres de uno o dos ácidos grasos y glicerol. Son importantes agentes emulsificantes y se emplean frecuentemente en los alimentos. Los AGL son ácidos no esterificados presentes en el aceite. Algunos aceites no refinados presentan un alto contenido en AGL, los cuales generalmente se eliminan en el proceso de refinado (Ziller, 1994)

Algunas grasas como el sebo, los aceites de palma y de coco tienen concentraciones más altas de ácidos grasos saturados cuando se los compara con otros aceites. Ellos son mencionados como grasas saturadas, a pesar de que contienen ácidos grasos no saturados.

### ***1.1.1 Propiedades físicas.***

La composición en acilglicéridos (monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos) determinan las propiedades físicas de las grasas y aceites como el contenido de sólidos (cristales de TAG`s) presentes a una temperatura dada, punto de fusión de los TAG`s presentes en la grasa y forma polimórfica (habito cristalino) de los TAG`s constituyentes, las cuales a su vez determinan las propiedades funcionales de extensibilidad, plasticidad y consistencias de las grasas.

➤ ***El punto de fusión.*** El punto de fusión de grasas y aceites que se usa para caracterizarlas depende tanto de la composición en AG como de la posición que éstos ocupan en la molécula de TAG`s y está relacionado con sus propiedades físicas, tales como dureza y comportamiento térmico. La presencia de ácidos grasos de cadena corta, ó no saturados, tiende a bajar el punto de fusión de la molécula y por lo tanto, a hacerla líquida a temperatura ordinaria; ésto explica por que los aceites (líquidos) tienen menos TAG`s de ácidos grasos saturados que las grasas sólidas (sólidas). Por otro lado, los isómeros de AG y la posición de los éstos en relación con el glicerol influyen sobre el punto de fusión de los TAG`s.

Solamente las grasas constituidas por muy pocas clases de TAG`s tienen una temperatura de fusión bien definida. A medida que aumenta el número de estos ésteres, el punto de fusión se convierte verdaderamente en un intervalo de temperatura, ya que cada TAG`s tiene el suyo propio. Esto es una constante física de cada grasa que es preciso conocer, sobre todo en el caso de las que se emplean para elaborar alimentos. En la fabricación de chocolates se requieren lípidos con un punto de fusión ligeramente menor que la temperatura del cuerpo humano para que pueda derretirse suavemente en la boca en un

intervalo de temperatura lo más pequeño posible como ocurre con la manteca de cacao (Tieko, 1999).

En el aceite de palma cerca del 85% de los ácidos grasos insaturados se encuentran ubicados en la posición central de los ACG's, dando como resultado un aceite semisólido a temperatura ambiente, mientras que la manteca de cacao en la cual aproximadamente el 82% de los TAG's son 2-oleil-disaturados es sólida y frágil a esta misma temperatura (Md.Ali y Dimick, 1994 ; Dimick, 1996)

Los TAG's tienen múltiples puntos de fusión, lo que se atribuye a un fenómeno conocido como *polimorfismo*, que consiste en la existencia de diferentes estructuras cristalinas para una misma sustancia. También se podría decir que es un fenómeno mediante el cual las grasas cambian de tipo de cristal hasta llegar al que es termodinámicamente más estable. El polimorfismo se observa en el estado sólido sin que exista fusión del lípido. Las principales formas polimórficas de las grasas son  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$  en orden creciente de estabilidad. Estas morfologías influyen directamente en las propiedades importantes de la grasas, tales como punto de fusión, contenido de sólidos, plasticidad y fragilidad.

Las transformaciones polimórficas dependen de diversos factores, pero principalmente de la velocidad de enfriamiento y de la temperatura final. Por ejemplo, si la triestearina (SSS) se enfría después de su fusión, cristaliza en la forma  $\alpha$  la menos densa y de punto de fusión más bajo (54,7 °C). Si esta forma se enfría posteriormente, las cadenas se van empaquetando más estrechamente aumentando la densidad y produciendo una transición gradual a la forma  $\beta'$  con punto de fusión medio (64,0 °C). Si se calienta la forma  $\beta'$  hasta su fusión, se produce una rápida transformación a la forma  $\beta$ , la cual es más estable de punto de fusión más alto (73,0 °C) y mayor densidad. En la Tabla 1 se muestran los puntos de fusión (medidos por DSC) de TAG's y sus formas polimórficas (Grall, 1992; Wong, 1995; Lai, 1998; Loisel, 1998; Seriburi, 1998).

**Tabla 1.** Punto de fusión (medidos por DSC) de TAG's y sus formas polimórficas.

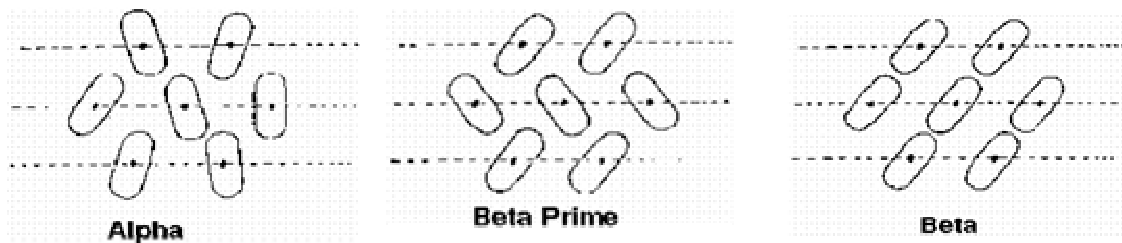
TAG's	P <sub>f</sub> (°C) de la forma polimórfica		
	$\alpha$	$\beta'$	$\beta$
OOO	-32,0	-12,0	4,5-5,7
MMM	32,8	45,0	58,5
PPP	44,7	56,6	66,4
SSS	55,0	63,2	73,5
POP	15,4-15,5	25,9-26,9	36,4
POS	18,8-19,0	29,7-30,7	39,0
SOS	23,2-24,5	36,3-36,8	40,8
PSO	26,3	40,2	--
SPO	25,3	40,2	--

Tomado de Moreno, 2001

La composición de ácidos grasos de la molécula de TAG determina en parte el hábito cristalino de una grasa particular. Los TAG's con una composición uniforme de AG tienden a formar cristales  $\beta$ . Las grasas de composición mixta tienden a formar cristales  $\beta'$ . Por ejemplo, el aceite de soya contiene menos de un 10% de ácido palmítico; según se hidrógena, aumenta la proporción de triacilglicéridos que pueden ordenarse de la forma adecuada para formar cristales  $\beta$ .

La interesterificación convierte normalmente una grasa de tipo  $\beta'$  en  $\beta$ . Por lo tanto, el proceso de hidrogenación y de interesterificación puede controlarse para modificar químicamente los TAG's, produciendo grasas y aceites con diferentes propiedades de fusión y hábitos cristalinos para satisfacer la demanda para una amplia variedad de usos alimenticios. En el proceso industrial, la forma polimórfica de una grasa o una mezcla tiene una gran importancia práctica. En la Figura 2 representan las diferentes formas polimórficas (Sato, 1989).

**Figura 2.** Formas polimórficas de los cristales de triacilglicéridos

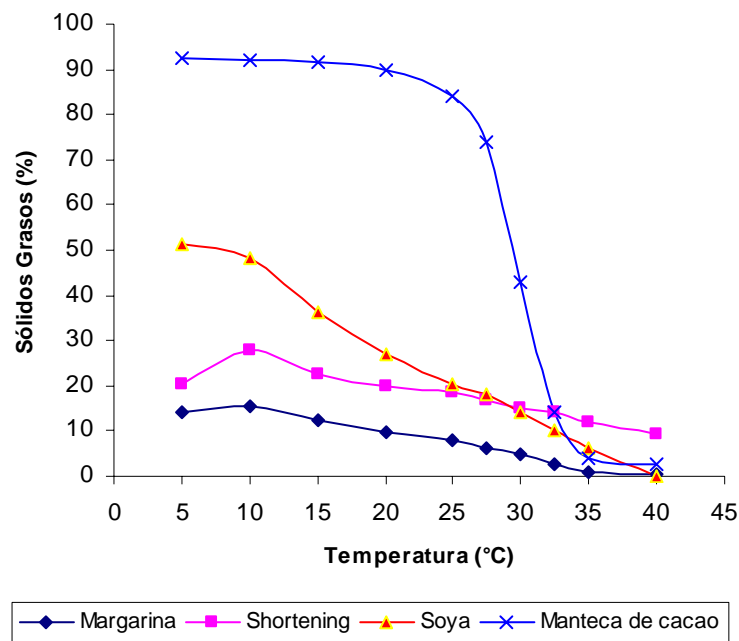


Entre las grasas que cristalizan en la forma  $\beta$  se encuentra el aceite de soya, cacahuete, maíz, oliva, coco, cártamo, y manteca de cacao. Por otro lado, los aceites de semillas de algodón, palma y colza, la grasa de la leche, el sebo, y las mantecas modificadas tienden a producir cristales  $\beta'$ , que persisten durante mucho tiempo. En la producción de “shortening”, margarinas y productos de panadería, los cristales  $\beta'$  son deseables puesto que ayudan a la incorporación de gran cantidad de aire en forma de pequeñas burbujas, dando lugar a productos con mayor plasticidad y cremosidad (de Man, 1989).

Se ha estudiado el comportamiento de polimorfismo de TAG's complejos que son formados por interesterificación de TAG's simples, tales como la trioleína y triestearina. Esos TAG's son escogidos como un sistema modelo para aceites vegetales con posible aplicación en la manufactura de margarinas (Seriburi, 1998).

➤ *El contenido de grasa sólida (SFC) o curvas de fusión de las grasas.* Dan información para la manufactura de margarinas, “shortening” y grasas especiales sobre como ellas funden en la boca durante la masticación. Si la grasa funde en un rango de temperaturas estrecho, la pendiente de la curva de fusión es elevada. En la Figura 3, se observa el comportamiento de fusión de: margarina, “shortening”, aceite de soya y manteca de cacao (Mills, 1981; Fenema, 1993; Md.Ali, 1994; Wong, 1995).

**Figura 3.** Curvas de fusión de margarina, “shortening”, aceite de soya y manteca de cacao.



Tomado de Mills, 1981

El porcentaje de grasa sólida en el intervalo de 20-25 °C determina la dureza de la grasa o sistema graso evaluado. El porcentaje de sólidos entre 25-30 °C es indicativo de la resistencia térmica del producto y determina la estabilidad del producto frente al calor. La pendiente de la curva de sólidos entre 27.5-32.0 °C es una medida de la velocidad con que se derrite la grasa en la boca y se relaciona estrechamente con la sensación de frescura que se percibe al fundirse. Por último, el porcentaje de sólidos que existe entre los 35-40 °C, representa la sensación de serosidad que deja la grasa en la boca. Idealmente deben tener 0% de sólidos a 40 °C (Jorge, 2001; Seriburi, 1998).

Entre las técnicas para la determinación de SFC en grasas y aceites está la Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Cebula, 1992).

**La Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)**, es un sofisticado instrumento para la medida y caracterización de las propiedades térmicas de materiales. Cuando una transición

tal como una fusión o cristalización ocurre en el material de muestra, tiene lugar una reacción endotérmica (fusión) o exotérmica (cristalización) es registrado como un pico en el termograma. Esta técnica permite conocer la cantidad de energía intercambiada durante el calentamiento o enfriamiento a un nivel microscópico. Estos cambios de energía se reflejan a partir de los cambios en la capacidad calorífica y cambios de fase de los materiales calentados o enfriados. Es aceptado generalmente que el área parcial ( $A_i$ ) bajo el pico de fusión es equivalente al porcentaje de grasa sólida que permanece a la temperatura seleccionada. La técnica de DSC esta cada día más disponible a escala industrial y también en el ámbito de laboratorios de investigación (Cebula, 1992; MdAli, 1994; Che, 1995; Jorge, 2001).

***La Resonancia Magnética Nuclear de Pulsos (RMN)***, ha sido el método tradicionalmente empleado para medir el Contenido de Grasa Sólida (SFC). Se basa en las diferencias en los tiempos de relajación spin-spin  $\tau_2$  de los núcleos de hidrógeno en los estados sólido y líquido, con la suposición de que las diferencias en el contenido de protones de las grasas sólidas y líquidas son despreciables (como usualmente ocurre en las grasas naturales). El decaimiento de la magnetización después de un pulso de  $90^\circ$  permite la estimación directa del contenido de grasa sólida a una temperatura, pero se necesita un factor de corrección (el “factor  $-f$ ”) ya que la señal sólo puede medirse unos  $10 \mu\text{s}$  después del pulso (Schrader, 1992).

Un aspecto esencial de la industria manufacturera de grasas y aceites comestibles es la habilidad para medir las propiedades físicas de los materiales. Es importante hacer esto en una forma sensitiva y reproducible. Las propiedades físicas de mayor interés son la cristalización y el fenómeno de fusión que abarcan el contenido de grasa sólida y el comportamiento del polimorfismo (Cebula, 1992)

➤ ***Plasticidad.*** Una grasa puede considerarse como una masa de cristales entrecruzados (fase sólida) que alberga a una fase líquida. La plasticidad de una grasa depende de la existencia de una proporción adecuada entre la fase líquida y la fase sólida. Es

imprescindible que exista un equilibrio entre estas dos fases de tal forma que los sólidos se deslicen y fluyan cuando se aplique una fuerza externa que sea superior a las fuerzas de unión de la masa sólida. La grasa recupera la consistencia original después de que cese la fuerza exterior. El rango de temperatura en el que la grasa mantiene esta característica plástica (plasticidad) se denomina rango plástico<sup>2</sup>. Si la grasa tiene una proporción de sólidos demasiado pequeña fundirá, mientras que si el contenido de sólidos es demasiado alto, se volverá quebradiza. Se dice que una grasa tiene un amplio rango plástico cuando la diferencia de temperatura entre el comienzo y el final de la fusión es grande. En la práctica, el porcentaje de sólidos en las grasas comestibles está situado entre el 10 y 30%, y este es llamado el rango plástico de las grasas, (ver Figura 3).

La margarina tiene hasta un 30 % como máximo de sólidos a baja temperatura, haciéndola menos quebradiza. Comparada con las grasas plásticas, la margarina presenta una pendiente más pronunciada a temperaturas elevadas en su curva de fusión, por lo que funde más fácilmente en la boca.

## ***1.2 ACEITES VEGETALES***

Los frutos o semillas ricas en grasas y aceites, son sometidas a un proceso de prensado o son tratados con solventes para obtener los denominados “aceites crudos”, los cuales contienen niveles variados de sustancias no TAG`s, entre los que se encuentran: ácidos grasos libres, MAG`s y DAG`s, fosfátidos, esteroides, alcoholes grasos, tocoferoles, clorofilas y vitaminas (Badui, 1993; Stier, 1997; Ziller, 2000).

Entre los aceites vegetales empleados en este estudio se resaltan el aceite de palma y sus fracciones, aceite de soya y la manteca de cacao por lo cual a continuación se profundiza en ellos

---

<sup>2</sup> Rango de temperatura = diferencia entre la temperatura a 15% SFC y 35%, que define el rango de temperatura en la cual la grasa es plástica.

**1.2.1 Aceite de palma (AP).** Es un género de las plantas palmáceas de la cual se reconocen dos especies diferentes: la *Elaeis guineensis* (origen africano) y la *Elaeis oleifera* (origen americano). Desde el punto de vista comercial la *Elaeis guineensis* es la más importante y se conoce comúnmente como “palma africana” (Figura 4). Su origen se ubica en el golfo de Guinea en el África occidental y de ahí su nombre científico. La palma es una planta heliófila que no tolera ambientes muy boscosos, por el contrario crece en zonas deforestadas o perturbadas y en grandes plantaciones. Actualmente constituye el cultivo de mayor crecimiento en las regiones tropicales (Evanss, 1991).

Generalmente se presentan cuatro (4) ó seis (6) variedades de la *Elaeis guineensis*: *Albescens*, *Dura*, *Pisifera*, *Nigrescens*, *Tenera* y *Virescens*. La variedad cultivada en casi todas las plantaciones del mundo es el híbrido *Tenera*, (cruce entre *Dura* y *Pisifera*) del cual se obtiene el más alto rendimiento de aceite por hectárea de todos los cultivos de oleaginosas (4,5 ton de aceite/ Ha) (Mazzani, 1963).

El aceite de palma obtenido de la pulpa o mesocarpio del fruto de la palma africana (ver Figuras 5A y 5B), es de color amarillo rojizo, por lo cual al producto recién extraído se le denomina “aceite crudo de palma”. Este color rojizo es debido a la presencia de altos contenido de sustancias carotenoídeas, que alcanzan niveles de 500-1000 mg/L, y son precursores de la vitamina A, además de ser antioxidantes, al igual que los tocoferoles. Cuando el aceite es refinado estos compuestos son eliminados, debido a las altas temperaturas que el proceso requiere.

**Figura 4.** Palma africana de aceite (*Elaeis guineensis*)



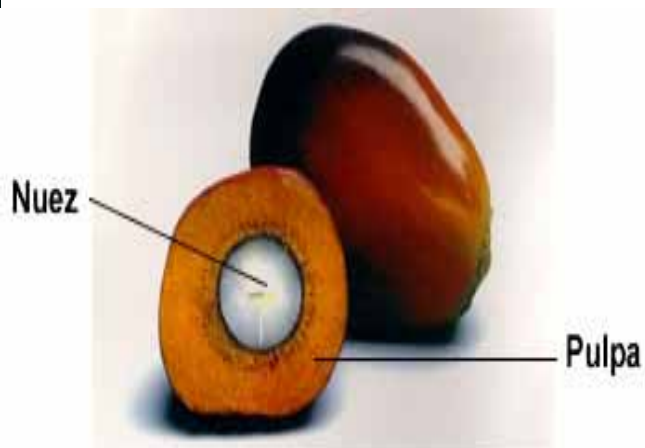
El mesocarpio contiene el 49% del aceite de palma y la semilla o nuez el 50% de aceite de nuez o palmiste. La semilla representa aproximadamente entre el 5 y el 12% del racimo del fruto de la palma africana y está disponible a una tasa de 10,0-13,0% con respecto al peso del aceite de la pulpa, por consiguiente constituye un subproducto importante del proceso de extracción del aceite de palma (Choo, 1988; Fedepalma, 1996).

**Figura 5. A)** Racimo de fruto de la palma africana. **B)** Fruto de la palma africana.

**A)**



**B)**



El aceite de palma es una grasa semisólida que contiene principalmente ácido palmítico (44,0 %), oleico (39,2%), y linoléico (10,1%), los componentes más comunes de todas las grasas como puede verse en la Tabla 2. Por fraccionamiento del aceite crudo se produce una fracción líquida, la oleína de palma (OP) rica en ácidos grasos insaturados y una fracción sólida, la estearina de palma (EP) rica en ácidos grasos saturados (Figura.6). La OP es usada como aceite para freído y la EP puede ser usada como un sólido componente de margarinas y de “shortening” (Hong, 1989; Che, 1995; Kaki, 1997).

Al igual que la manteca de cacao, el aceite de palma y su oleína están formados principalmente por 2- oleoil-glicerol. De ahí, que éste aceite se identifique como fuente importante para el desarrollo de sustitutos de la manteca de cacao, pues contiene 1,3-dipalmitoil-2-oleil-glicerol (POP) y 1-palmitoil-2,3-dioleil-glicerol (POO) como TAG's predominantemente, que le dan un punto de fusión de 23 °C.

La fracción media del aceite de palma también es un sustrato conveniente para la producción de los equivalentes de la manteca de cacao, por que es de bajo costo y tiene una adecuada composición de TAG's (Tabla 3) (Chang, 1990; Mojovic, 1993).

**Figura 6.** Oleína de palma y estearina de palma.



**1.2.2. Aceite de soya (AS).** Es obtenido de las semillas de la leguminosa *Soja max*, es el aceite de mayor producción en el mundo. El aceite crudo de buena calidad tiene un color ámbar claro que después de la refinación alcalina es reducido a un color amarillo claro. Es bajo en grasa saturada (15,0%) y alto en grasa insaturada (61,0% poliinsaturado, 24,0% monoinsaturado). El aceite de soya incluye dos ácidos esenciales, linoléico y linolénico los cuales no son producidos en el cuerpo humano.

Pertenece a los aceites ricos en ácido oleico (24,0%) y linoléico (54,0%) y bajo contenido de ácido palmítico (12,0%), como se observa en la Tabla 2, lo que hace que este aceite sea muy susceptible a la autooxidación. Es una materia prima muy importante para la fabricación de margarinas. Su composición en TAG se presenta en la Tabla 3 (Perkins, 1987; Trost, 1989).

**1.2.3. Manteca de cacao (MC).** Es la grasa vegetal extraída de la semilla o almendra de la planta tropical *Theobroma cacao*. Se encuentra localizada en los cotiledones (50-58%) y se considera un producto secundario de la fabricación de cacao. Tiene color amarillo débil y huele ligeramente a cacao. Es una grasa relativamente simple; más del 95% de ella está constituida por TAG's principalmente del tipo saturado-insaturado-saturado, sobresaliendo tres ácidos grasos en la composición de los mismos: los ácidos palmítico, esteárico y el oleico.

La distribución posicional de estos ácidos en la manteca de cacao exhibe una característica distintiva: prácticamente todo el ácido oleico se encuentra esterificado en la posición intermedia, mientras que los dos ácidos grasos saturados se ubican en las posiciones extremas. De este modo tres TAG`s simétricos y semejantes entre sí forman más del 80% de la manteca de cacao: 2-oleodipalmitina (POP), 2-oleodiestearina (SOS) y 2-oleopalmitoestearina (POS). TAGs Poliinsaturados y trisaturados corresponden alrededor del 13 y 3%, respectivamente, del contenido de TAGs, (Tabla 3) (Chang, 1990; Rousset, 1996; Belitz, 1997; Loisel, 1998; Buchgraber, 2000).

**Tabla 2.** Composición en ácidos grasos (% área) del aceite de palma y sus fracciones, aceite de soya y la manteca de cacao.

Ácidos grasos	Nº de átomos de Carbono	Aceite de Palma	Oleína de Palma	Estearina de Palma	Aceite de Soya	Manteca de Cacao <sup>a</sup>
Láurico	C12:0	0,2	0,2	0,1 – 0,6	--	--
Mirístico	C14:0	1,1	1,0	1,1 – 1,9	--	--
Palmítico	C16:0	44,0	39,8	47,2 – 73,8	12	24,8
Esteárico	C18:0	4,5	4,4	4,4 - 5,6	5	37,1
Oleico	C18:1	39,2	42,5	15,6 – 37,0	24	33,2
Linoleico	C18:2	10,1	11,2	3,2 – 9,8	54	2,6
Linolenico	C18:3	0,4	0,4	0,1 – 0,6	8	--
Araquidonico	C20:0	0,4	0,4	0,1 – 0,6	--	1,1
<i>I. de yodo</i>		53,0	57,5	41,5	120-141	34,5
<i>Pto.Fusión(°C)</i>		38-45	18,2	46,7	--	35,5

Tomado de: Berger, 1986 ; Chang, 1992; Shukla, 1997.

**Tabla 3.** Composición en ACG's (% área) del aceite de palma y sus fracciones, aceite de soya y la manteca de cacao.

NC	TAG	Aceite de palma				AS	MC
		AP	FM	OP	EP		
46	MPP/MOM	1,0	0,8	0,3	1,9	--	--
48	PPP	7,0	3,0	0,5	22,1	--	--
	MOP	2,0	2,0	1,9	1,7	--	--
50	MLP	0,5	0,1	0,5	0,3	--	--
	PPS	1,5	3,8	n.d.	n.d.	--	--
	POP	31,8	63,2	31,2	30,0	--	19,83
	PLP	9,2	6,2	10,1	7,1	--	--
52	PSS	0,3	n.d.	n.d.	0,4	--	0,54
	POS	5,6	13,0	5,9	4,4	--	37,60
54	POO/PLS	22,,5	5,0	27,6	16,3	--	2,90
	PLO	8,2	0,8	9,8	5,5	9,0	--
	PLL	1,6	n.d.	2,0	1,0	--	--
	SSS	--	--	--	--	--	--
	SOS	0,6	3,3	0,6	0,4	--	20,10
	SOO/SLS	2,4	0,9	2,8	1,5	--	2,70
	OOO/SLO	3,9	0,5	4,8	2,6	--	0,90
	OLO	1,3	n.d.	1,6	0,8	6,0	--
	OLL	0,3	n.d.	0,3	n.d.	15,0	--
	OLLn	--	--	--	--	6,0	--
	LLL	--	--	--	--	19,0	--
	LLLn	--	--	--	--	10,0	--
	DAG	10,2	nd	nd	nd.	nd	5,23

Tomado de: Sassamo, 1993. Moreno, 2001. AP: aceite de palma; FM: fracción media; OP: oleína de palma; EP: estearina de palma; AS: aceite de soya; MC: manteca de cacao. nd: no detectado

Los ácidos grasos y la composición en TAG's juegan un papel determinante en las características de cristalización y fusión de la manteca de cacao que hace que tenga un comportamiento térmico y estructural similar a la de un componente puro. Este comportamiento, no es simple ya que la mayoría de los TAG's que la componen muestran un polimorfismo complejo que guarda una estrecha relación con las características físicas y organolépticas de los productos finales.

El polimorfismo o formas de cristalización de la manteca de cacao es determinante en la industria de confitería especialmente para la manufactura del chocolate, debido a que es la principal grasa constituyente. Para solidificar el chocolate en la forma polimórfica

deseable, es necesario un tratamiento de temperatura cuidadoso porque el polimorfismo de la manteca de cacao es complicado, y además su fenómeno de cristalización no es fácilmente controlado.

En la MC se presenta un caso especial de polimorfismo que produce cristales con puntos de fusión desde 23° hasta 36 °C, (Tabla 4), favoreciendo su uso en la elaboración de chocolate, puesto que funde a temperaturas cercanas a la del cuerpo humano y al ingerirla se licua en la boca ya que el rango de fusión, oscila en un rango muy estrecho (32°- 35 °C), como se observa en la Figura 3. La forma  $\alpha$  es rápida y fácil de obtener, pero es inestable, tiene un punto de fusión de 23 °C. Sus cristales evolucionan espontáneamente hacia una forma más organizada, por tanto más densa y con punto de fusión más alto (26-28 °C), es decir la forma  $\beta'$  (Koyano, 1990).

**Tabla 4.** Características de las formas polimórficas de las manteca de cacao

Forma	Punto de Fusión (°C)	Calor Latente de Fusión (J/g)
$\alpha$	23.5	79,4
$\beta'$	26-28	117,0
$\beta$	34-36	150,5

Tomado de Dimick, 1991

Los cristales  $\beta$  en cambio, corresponden a la organización más densa posible de este tipo de moléculas y presentan el punto de fusión más alto, 34-36 °C. Las formas  $\beta'$  y  $\beta$  poseen calores latentes de fusión altos debido al apretado empaquetamiento intermolecular de los TAG's, lo que las hace más estable, sin embargo requieren más tiempo para su formación.

La forma  $\beta$  es la estructura deseada, puesto que es la responsable del aspecto brillante de las coberturas o base de chocolates; se obtiene por un templado adecuado, ésto es, calentando o manteniendo la cobertura parcialmente cristalizada a 32 °C antes del moldeado, enfriándola después rápidamente y almacenándola a 16 °C. Un templado inadecuado o un almacenamiento a altas temperaturas dan lugar al desarrollo de “floreamiento del

chocolate”, proceso en el que se depositan pequeños cristales de grasa en la superficie haciendo que éste tome un color superficial blanquecino o grisáceo (Fennema, 1982; Aronhime, 1988; Badui, 1993; Shukla, 1997).

La MC es el más costoso constituyente de las formulaciones de chocolate, como también es el más importante componente. El chocolate contiene aproximadamente el 30 % de MC. La grasa es responsable del brillo, dureza, estabilidad al calor, sensación en la boca y liberación del aroma. Esta grasa sin embargo presenta algunas desventajas por su baja tolerancia a la grasa de la leche, baja estabilidad a elevadas temperaturas y tendencia al florecimiento. La manteca de cacao también se utiliza en la manufactura de cosméticos (Tramper, 1985; Chaiseri, 1985; Shukla, 1997).

### ***1.3 GRASAS ESPECIALES (GE)***

Son grasas a las que le han modificado sus propiedades originales mediante procedimientos físicos, químicos ó enzimáticos, con el fin de mejorar sus características organolépticas y/o nutricionales y su funcionalidad para hacerlas apropiadas en la fabricación de alimentos.

Se busca que las grasas tengan cierta tendencia a la cristalización, un determinado punto de fusión, propiedades de untuosidad y estabilidad ante la oxidación y la hidrólisis. A éste tipo de grasas también pertenecen los lípidos estructurados (Marangoni, 1993)

Entre las grasas especiales se encuentran los aceites para ensaladas, grasas base para la fabricación de “shortening” y margarinas, y grasas sustitutas o reemplazantes de la manteca de cacao. Éstas últimas, se manufacturan por vías alternativas debido a la escasez y a las fluctuaciones del precio del cacao.

➤ ***Las margarinas*** son utilizadas directamente para untar ó para cocinar. Se preparan mezclando determinadas grasas o aceites con otros ingredientes tales como derivados lácteos, sal, aromatizantes y vitaminas A y D. Se obtiene así un producto con un contenido

graso próximo al 80%. En su elaboración se emplean principalmente aceites vegetales, aunque también se recurre a determinadas grasas de origen animal, en ambos casos, pueden ser grasas hidrogenadas, mezclas de grasas hidrogenadas, mezclas de grasas hidrogenadas y sin hidrogenar. Se confeccionan margarinas especiales aumentando los índices de ácidos grasos poliinsaturados, con objeto de corresponder a las investigaciones médicas que las aconsejan a personas aquejadas de arteriosclerosis (Lai, 1998).

➤ **Los “shortening”** comerciales son grasas plásticas semisólidas, con emulsionantes o sin ellos. La plasticidad diferencia a estas grasas de otras. Al principio se fabricaban a partir de mantecas o sebos, pero la hidrogenación de aceites vegetales o de sus mezclas ofrece productos muy adecuados que reúnen las cualidades necesarias para el horno. Las principales grasas y aceites utilizados en la elaboración de “shortening” son el algodón, aceite de palma, hidrogenado de palma, soja, sebo y manteca de cerdo, aunque las grasas no naturales poseen también todas las características deseadas. La Interesterificación encuentra su principal aplicación en la manufactura de los “shortening” (Fenema, 1982; Hong, 1989)

➤ **Sustitutos de la manteca de cacao**, se clasifican en tres grupos:

- **Equivalentes, extensores (CBE’s) y mejoradores (CBM) de la MC.** Son grasas que pueden ser mezcladas con la MC en todas las proporciones sin alterar las propiedades de fusión y las propiedades reológicas de los productos debido a que son ciento por ciento compatibles, al tener los mismos ácidos grasos y los TAG’s simétricos monoinsaturados como la manteca de cacao. Las principales ventajas de la incorporación de CBEs son: a) la reducción de los costos de producción de los chocolates por que los CBE’s son más económicos que la MC; b) estabilizan la influencia de fluctuación de los precios de la MC; c) mejoran la tolerancia a la grasas de la leche; d) incrementan la resistencia de almacenamiento a altas temperaturas; y e) controlan el florecimiento (Berger, 1986; Shukla, 1997).

- **Reemplazante ó sustitutos de la manteca de cacao no láurico (CBR).** Son grasas que pueden ser mezcladas con la MC solo a un limitado grado sin alterar significativamente las propiedades de fusión, propiedades reológicas, y de procesamiento. Los CBR pueden presentar mejor resistencia al calor y mejor comportamiento de fusión que la propia manteca de cacao (Kawahara, 1993).

- **Los sustitutos de la manteca de cacao tipo láurico (CBS).** Estas grasas son incompatibles con la MC debido a su composición en TAG`s, pero tienen propiedades físicas semejantes a ellas. Son preparadas principalmente de aceite de palmiste, que posee un estrecho rango de fusión. Sin embargo presentan dos desventajas, primero, el aceite de palmiste es un material de partida muy costoso.; segundo, los productos láuricos dan un desagradable olor jabonoso muy rápidamente en presencia de levaduras o mohos (Berger, 1986).

**1.3.1 Producción de grasas especiales.** Dentro de los procesos utilizados para la obtención de grasas especiales se encuentra el fraccionamiento con o sin solvente, la hidrogenación total o parcial, y el proceso de interesterificación química o enzimática. La combinación de estos procesos extiende la utilidad de grasas y aceites comestibles. La hidrogenación modifica la estructura de los ácidos grasos por introducción de hidrógeno en los dobles enlaces, y por consiguiente los TAG`s se vuelven más estables frente a la oxidación; mientras que la interesterificación modifica sólo la estructura de los TAG`s, generando cambios de comportamiento durante la cristalización (Bloomer, 1990; Konishil, 1993; Mojovic, 1993; Potter, 1995; Moussata, 1998).

La interesterificación de mezclas de aceites vegetales y la hidrogenación se han convertido en importantes procesos para la modificación de las propiedades físicas y funcionales de los aceites. Por ejemplo, el mezclado del aceite de girasol rico en ácido oleico en diferentes proporciones con aceites vegetales poliinsaturados ha sido usado para preparar aceites comestibles estables (Moussata, 1998).

➤ **El fraccionamiento** de grasas y aceites es un proceso de cristalización fraccionada para separar componentes no deseados de una grasa o enriquecerla en TAG's deseados. El procedimiento consiste en enfriar la grasa con suficiente lentitud como para que los TAG's de alto punto de fusión cristalicen de la forma más selectiva posible, es decir, sin formación de cristales mixtos de TAG de elevado y bajo punto de fusión. Los cristales se separan por filtración o se lavan con una disolución de un tensoactivo (Moreno, 2001).

El fraccionamiento se puede realizar por tres procedimientos diferentes: **a)** cristalización en seco, que consiste en el enfriamiento controlado de la grasa fundida hasta formar una fase sólida (de alto punto de fusión) que puede ser separada por filtración de la fase líquida remanente (de bajo punto de fusión). Si el fraccionamiento se realiza en forma gradual con condiciones de siembra específicos y bajo un perfecto control computarizado, los diferentes tipos de TAG's se cristalizaran en forma sucesiva y selectiva de acuerdo con sus características físicas; **b)** enfriamiento controlado de la grasa disuelta en un solvente orgánico (generalmente hexano o acetona) hasta formar cristales que pueden ser separados por filtración de la solución remanente; **c)** agregado de una solución acuosa que contienen un surfactante y un electrolito, a la grasa parcialmente cristalizada por enfriamiento controlado, formando así una emulsión de la fase sólida, la que se puede separar de la grasa líquida remanente por centrifugación (Grompone, 1992)

➤ **La hidrogenación** es un proceso desarrollado a comienzos de 1900, adiciona hidrógeno al doble enlace de los ácidos grasos insaturados, haciéndolos menos insaturados. Tiene dos beneficios importantes: primero, los aceites cambian su viscosidad pasando de un aceite líquido a un aceite de forma semi-sólida, la cual es más deseable para productos como margarinas y “shortenings”. Algunas veces el proceso es llamado “endurecimiento”. El grado de dureza es controlado por la cantidad de hidrógeno adicionado. Una completa hidrogenación de aceites vegetales da lugar a una grasa saturada, muy dura y quebradiza (Figura 7). El segundo beneficio de la hidrogenación es que ésta hace que la grasa sea menos susceptible a las reacciones de oxidación. Esto es especialmente importante para grasas usadas en freído prolongado. En el proceso de oxidación, el oxígeno del aire

reacciona con el doble enlace del AG insaturado, formando compuestos que imparten características de sabor y olor indeseables (Hong, 1989; Potter, 1995; Moussata, 1998).

**Figura 7.** Grasas de palma y soya totalmente hidrogenadas.



Durante el proceso de hidrogenación algunas posiciones “cís” de los AG son convertidas a “trans”, de esta forma, las margarinas o “shortening” obtenidos en estos procesos pueden contener entre 20 y 40 % de su total de AG en forma “trans”. Los ácidos grasos “trans” contribuyen a que la grasa no sea tan dura y a la estabilidad oxidativa de las grasas hidrogenadas; sin embargo, varias investigaciones los han relacionado con el aumento del colesterol en la sangre y su incidencia en muertes relacionadas con enfermedades coronarias (Scientific Status, 1986; Dunlap, 1995; Kis-Etherton, 1995; Seriburi, 1998).

Los aceites pueden ser parcial o totalmente hidrogenados, dependiendo del grado de dureza que se desee impartir a la grasa. Los aceites hidrogenados totalmente, también llamados grasas duras ó estearinas, son usados en la fabricación de “shortening”, margarinas para panadería y aceites de fritura.

En la industria de “shortening”, las grasas duras son también referidas como “plastificantes” y su principal objetivo es extender el rango plástico. La adición de grasas duras afecta el valor del índice de grasa sólida de los aceites base para “shortenings” más a altas temperaturas que a bajas temperaturas, por causa del alto punto de fusión de las grasas duras (deMan, 1989).

En las Tablas 5A y 5B se presenta la composición en AG y la composición en ACG's de algunos aceites hidrogenados totalmente. Debido a que el contenido de AG del aceite de palma, algodón y soya consiste principalmente de AG de 16 y 18 carbonos, se concluye que los TAG's de 48 y 54 carbonos ( $C_{48}$ ,  $C_{54}$ ) en la Tabla 5B consisten principalmente de PPP y SSS. En el aceite de palma hidrogenado los TAG's de 50 átomos de carbonos consisten principalmente de PSP con pequeñas cantidades de PPS y SPP.

El aceite de palma contiene un alto porcentaje de POP (31,6 %) el cual se convierte en PSP (40,0%) después de la hidrogenación. Los TAG's de 52 átomos de carbono son principalmente de tipo SSP ó PSS cuya concentración es de 41.9% para este aceite (deMan, 1989).

El TAG's SSS (54), es el mayor componente de los aceites presentados en la tabla, siendo el aceite de soya quien muestra el mayor contenido con un 66,7 %, seguido por el aceite de algodón, colza y palma con 40,5, 28,3 y 10,7 %, respectivamente.

Según la Tabla 5A, estos aceites son una rica fuente de ácido esteárico, con un 88,6 % para el aceite de soya, debido a que este presenta alto contenido de ácidos grasos insaturados, oleico (24%), linoleico (54 %) y linolenico (8%) que al ser hidrogenados se convierten en ácido esteárico (deMan, 1989).

**Tabla 5.** Composición en (%) **A)** Ácidos grasos **B)** acilgliceridos de aceites vegetales hidrogenados totalmente.

A)

Ácido Graso	N° de carbonos	Grasa hidrogenada (Grasas duras)			
		Soya	Colza	Algodón	Palma
Láurico	12:0	--	0,3	--	0,4
Mirístico	14:0	Trazas	0,2	0,7	1,1
Palmítico	16:0	10,6	6,3	22,3	42,6
Esteárico	18:0	88,6	48,1	76,2	54,3
LinOléico	18:1	Trazas	4,4	Trazas	0,8
Araquidónico	20:0	0,6	6,7	0,4	0,5
Vehémico	22:0	0,3	34,0	0,1	--

DeMan, 1989

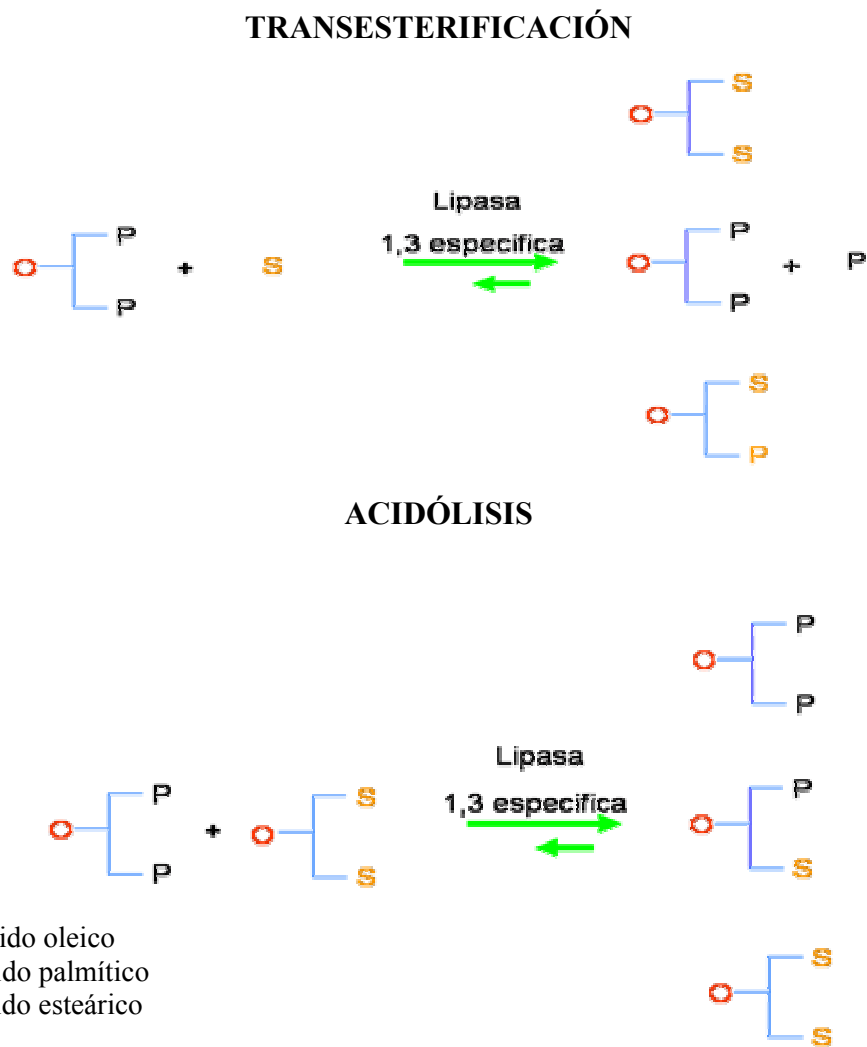
B)

N° de carbonos	Grasas hidrogenadas totalmente			
	Soya	Colza	Algodón	Palma
44	--	--	--	--
46	--	--	--	0,5
48	0,2	--	0,9	6,4
50	3,3	1,6	13,6	40,0
52	27,6	11,6	43,5	41,9
54	66,7	28,3	40,5	10,7
56	1,7	6,7	1,3	0,4
58	0,5	6,8	--	--
60	--	12,3	--	--
62	--	31,9	--	--
64	--	0,8	--	--
<b>Mono</b>	0,4	0,5	0,3	0,9
<b>Di</b>	3,6	3,7	5,8	8,2

DeMan, 1989

➤ **La interesterificación** es un término frecuentemente usado para describir reacciones en las que intercambian los grupos acilo entre un éster y un ácido, **acidólisis**; un éster y un alcohol, **alcohólisis**; o un éster con otro éster, **transesterificación**. La última reacción es la que tiene más importancia en la interesterificación de las grasas (conocida también como randomización) e implica el intercambio de esteres en una misma molécula de TAG's (intraesterificación) y el intercambio entre distintas moléculas (interesterificación) (Figura 8).

**Figura 8.** Esquema general de la reacción de interesterificación enzimática.



La interesterificación de grasas es de interés comercial para la producción de margarinas, “shortening” y otras grasas especiales como los CBS`s (Chang, 1990).

En la interesterificación hay un reacomodamiento de los AG en las moléculas de TAG`s alterando las propiedades físicas iniciales de los aceites y permitiendo la formación de nuevos productos. La misma se aplica en forma directa sobre los aceites y las grasas derivados de manera natural o sobre los aceites hidrogenados o fraccionados, para cambiar el perfil de fusión, para mejorar la compatibilidad de los diferentes TAG`s en el estado sólido, para mejorar la plasticidad del sólido resultante cambiando las propiedades de recristalización y para combinar las propiedades de diferentes mezclas de grasas y aceites (Ergan, 1991; Kellens, 1997; Moussata, 1998).

Las reacciones de interesterificación pueden ser realizadas en ausencia de solvente, pero en muchos casos es necesario adicionarlo para asegurar que los reactivos y los productos sean completamente disueltos en la fase acuosa inmisible. Varios solventes inmiscibles con agua pueden ser usados, pero el n-hexano es preferido para la extracción y procesamiento de aceites y grasas (Tramper, 1985).

El proceso de interesterificación puede ser catalizado mediante un agente químico o mediante la utilización de un biocatalizador (Kellens, 1997).

- ***Interesterificación química.*** Este proceso se efectúa a temperaturas de 200 °C durante periodos largos, o usando catalizadores metálicos alcalinos como sodio, potasio, y sus aleaciones o los alquilatos de los metales alcalinos como el metóxido y etóxido de sodio, los cuales actúan a bajas temperaturas, promoviendo la migración no controlada y aleatoria de los ácidos grasos en los acilglicérols.

- ***Interesterificación enzimática.*** En este caso se emplean enzimas como catalizadores siendo las más utilizadas para este propósito las lipasas 1,3-específicas principalmente en

forma inmovilizada. Las ventajas de este proceso sobre la interesterificación química, se basan en la selectividad y en el uso de condiciones suaves de reacción (temperaturas moderadas y pH próximo a la neutralidad), además de los tiempos cortos de proceso y la escasa formación de subproductos (Posorske, 1988).

*Las lipasas* son catalizadores biológicos que hidrolizan los TAG's a DAG's, MAG's, ácidos grasos, y glicerol. Tienen peso molecular elevado, poseen muchos centros quirales y suelen contener numerosos grupos ácidos y básicos. Son frecuentemente llamadas triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3) y tienen muchas características en común con otras enzimas como las proteasas, no obstante su propiedad característica es la capacidad de actuar sobre lípidos en la interfase lípido/agua. Su número de clasificación, EC 3.1.1.3, indica que pertenece al grupo de las hidrolasas (3), la subclase de enzima, que hidroliza enlaces éster (1), de tipo carboxílico (1) y cuya acción es hidrolizar triacilgliceridos (3) (Malcata, 1990; Fomuso, 1998; Karra, 1998).

Las lipasas catalizan reacciones de hidrólisis, esterificación, acidólisis, alcoholisis y transesterificación de un amplio rango de sustratos, razón por la cual han recibido mucha atención como biocatalizadores para una variedad de procesos. Por ejemplo en la producción de grasas especiales como CBS's, sustitutos de grasa de leche humana, producción de compuestos enantioméricamente puros, así como en la producción de sabores y fragancias (Basheer, 1995).

Se encuentran tanto en plantas, animales y microorganismos como en fluidos biológicos, células, semillas y varios otros tejidos. Las lipasas tienen una estructura tridimensional globular, están formadas generalmente por una sola cadena polipeptídica, y sólo logran ser activas cuando los polímeros desarrollan una conformación que le permite establecer su centro activo. El sitio activo es aquella porción de la proteína que participa directamente en la unión y la transformación del sustrato; esta integrado casi siempre por una triada de aminoácidos vecinales (Valenzuela, 1994; Badui, 1996).

En términos de la selectividad hacia el sustrato, las lipasas usualmente pueden ser clasificadas dentro de tres grupos. Primero, las lipasas sn-1,3-específicas que actúan en las posiciones 1 y 3 del TAG (Figura 8), producidas por microorganismos como *Aspergillus niger*, *Mucor jaranicus*, *Rhizomuchor miehei*, y varios *Rhizopus*. Éste grupo de enzimas es importante en la síntesis de lípidos estructurados y de los CBS's. La síntesis de éstos compuestos no podría ser posible con la catálisis química no específica o con lipasas no específicas. En segundo lugar, están las lipasas no específicas que actúan de manera aleatoria sobre las tres posiciones del TAG, por ejemplo, lipasas de *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, y *Stafilococcus aureus* (Foglia, 1993; Marangoni, 1993; Nagodawithan, 1993; Fomuso, 1998).

El tercer tipo de lipasas cataliza la liberación de un tipo de ácido graso particular de la molécula del TAG, como lo hace la lipasa producida por *Geotrichum candium* que posee una marcada especificidad por la hidrólisis de ésteres que contengan ácidos grasos de cadena larga con un enlace doble "cis" en el carbono 9, como el caso del ácido oleico.

La forma como estas enzimas se utilizan puede variar entre enzima soluble o enzima inmovilizada. Estas últimas pueden ser definidas como aquellas cuyo movimiento libre ha sido restringido de alguna manera. Una de las principales ventajas de la inmovilización es fijar la enzima, así como retenerla en procesos continuos incrementando su utilización. Las enzimas se pueden inmovilizar sobre tierras diatomáceas, perlita o sílica gel, soportes que tienen un área superficial grande y una adecuada retención de agua para la activación de la enzima (Hultin, 1983; Macrae, 1983; Foglia, 1993; Fomuso, 1998).

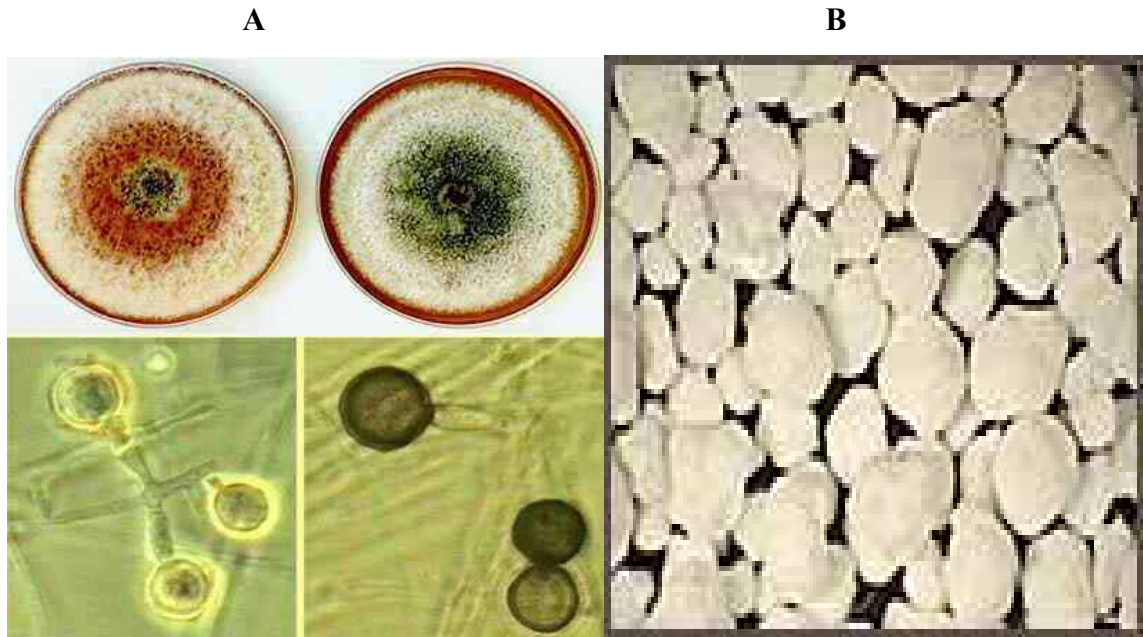
En aplicaciones prácticas la posibilidad de reúso de la enzima es importante por razones de economía del proceso; de éste modo la inmovilización de las lipasas es necesaria para facilitar la recuperación de la enzima para el reúso y para usarla en procesos continuos. La inmovilización para uso en sistemas no acuosos puede ser hecho simplemente por el mezclado con una solución acuosa de la enzima con un adecuado material de soporte y

removiendo el agua a presión reducida. Después se adicionan pequeñas cantidades de agua para la activación de la enzima (Blomer, 1990).

Dentro de las enzimas más recientemente producidas a nivel comercial se encuentra la Lipozyme TL IM (enzima utilizada como catalizador en esta investigación), que es una preparación granulada grado alimentario producida por fermentación sumergida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus* (Figura 9A). Se encuentra inmovilizada en gel de sílice (Figura 9B), tiene una densidad de 1.5 g/mL, diámetro de partícula de 0.3 -1.0 mm, y un contenido de agua de 5% p/p. Lipozyme TL IM es más activa en el rango de temperatura 55-70 °C. Para ensayos iniciales de interesterificación, se recomienda usar concentraciones de 6 a 10 %p/p, para tiempos de reacción de 2 a 6 horas y temperaturas de 60-70 °C. Es estable mecánicamente en forma granular para uso en procesos discontinuos y en procesos continuos. Sin embargo Lipozyme TL IM debe usarse en medio no acuoso debido a que los gránulos se pueden desintegrar en agua. Esta enzima corresponde a una lipasa microbiana 1,3-específica.

Las triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3) pueden ser usadas de varias maneras en la modificación de triacilglicéridos. En medio acuoso con un sustrato de triacilglicérido emulsificado, donde la hidrólisis es la reacción dominante, y en un medio orgánico donde las reacciones de esterificación e interesterificación pueden convertirse en predominantes (Blomer, 1990).

**Figura 9.** A) Microorganismo *Thermomyces lanuginosus* B) Enzima del *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada en gel de sílice, nombre comercial Lipozyme TL IM



#### ***1.3.1.1 Preparación de equivalentes de la manteca de cacao (CBE`s)***

Una aplicación de la interesterificación catalizada por lipasas es la preparación de los CBE`S cuyo principal componente es el triacilglicérido 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-gliceril (POP), el cual puede ser convertido a 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoil-glicerol (POS) y 1,3-diestearoil-2-oleoil-glicerol (SOS) por reacciones de interesterificación. Normalmente los materiales de partida utilizados son las fracciones de palma, especialmente la oleína y la fracción media, y el objetivo de la reacción es la introducción de más estearato dentro de los triacilgliceridos en forma de ácido esteárico o triestearina (SSS). El resultado es una grasa con una composición en TAG`s similar a la MC la cual puede ser usada como CBE en el chocolate y en la industria de la confitería (Bloomer, 1990; Chang, 1990; Mojovic, 1993).

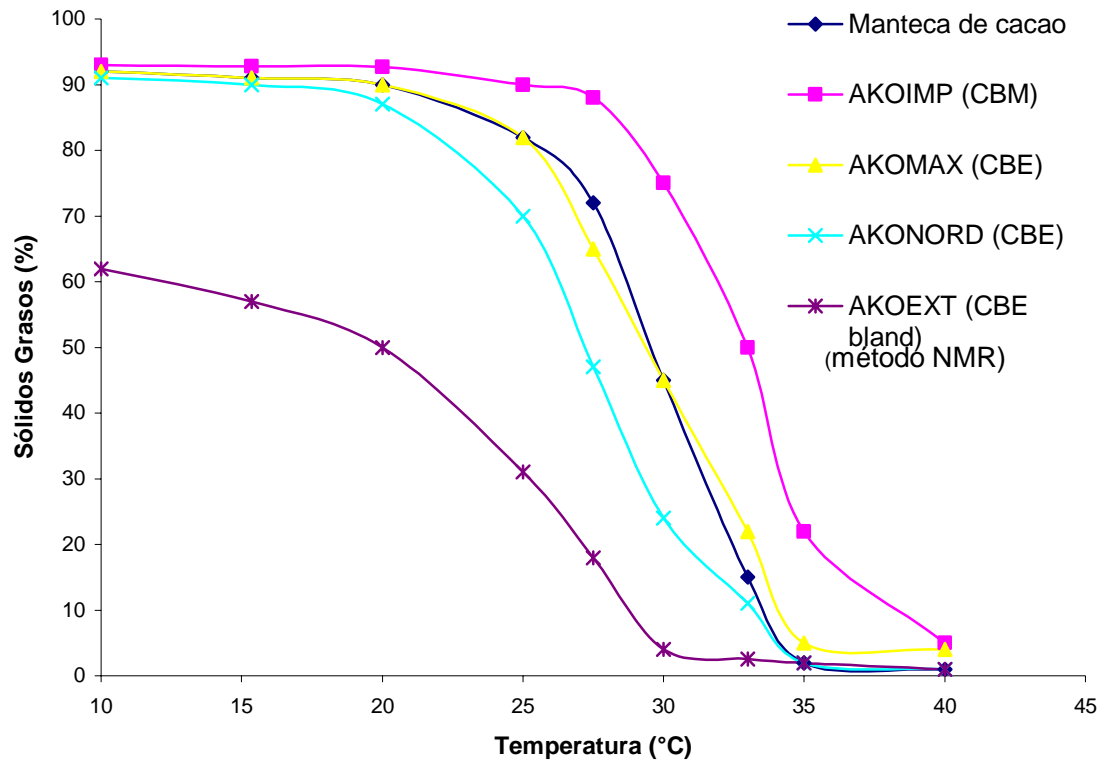
Dos productos basados en oleína de palma fueron hechos en el año 1986 en Malasia. El primero, KEMFAT 440 es recomendado para rellenos y caramelos. El segundo, KEMFAT

550, puede tolerar contenidos de manteca de cacao superiores a 25% y es aconsejable para productos que contienen también grasa láctea o para cubiertas oscuras de confites, (Berger, 1986).

Los CBE's producidos actualmente, normalmente se componen de un 50% de aceite de *karité*, un 30 % de aceite de palma y un 20 % de aceite de *illipé*. Estos CBE's son aproximadamente un 20 % más baratos que la manteca de cacao. A escala industrial, Karlshamns AB, una empresa escandinava líder mundial en producción de grasas especiales, produce de esta forma los CBE's AKOIMP, AKOMAX, AKONORD, y AKOEXT, de los cuales AKOMAX exhibe el mismo comportamiento térmico de la manteca de cacao, mientras que AKOIMP presenta una curva de derretimiento similar pero a mayor temperatura, empleándose como mejorador (CBM) de las mantecas blandas. Por el contrario, AKOEXT es un CBE blando que se emplea en recetas con poca grasa láctea. Sus curvas de derretimiento o curvas SFC se presentan en la Figura 10 (Karlshamns, 2001).

Estos productos también pueden obtenerse por interesterificación usando lipasas 1,3-específicas como lo revelan los estudios reportados por Chang y col. (1990) quienes interesterificaron aceite de oliva con aceite de semilla de algodón hidrogenado, con lipasa del hongo *Mucor miehei*, durante 4 horas, a 70 °C y obtuvieron un rendimiento de 19 % basado en el peso de los aceites.

**Figura 10.** Contenido de sólidos grasos de diferentes CBE en función de la temperatura (Karlshamns, 2001).



Sridhar y col., (1991) interesterificaron una variedad de mango como sustituto de la manteca de cacao, utilizando la enzima del hongo *Mukor miehei* inmovilizada en resina de intercambio iónico microparticulada. A pesar de conseguir aumentar la cantidad de ácido palmítico en el sustrato, no lograron conseguir un comportamiento de fusión similar al de la manteca de cacao.

En 1992 Chong y col., llevaron a cabo la incorporación de ácido esteárico en la oleína de palma en una reacción libre de solvente utilizando la enzima 1,3 específica Lipozyme IM20. La incorporación del estearoil en la oleína de palma produjo un aumento de un 39 % de los triacilglicéridos, POP, POS y SOS principales TAG's de la manteca de cacao. Una combinación de etapas de fraccionamiento que involucró la remoción previa de los ácidos

grasos libres del producto por destilación al vacío, seguido por una cristalización fraccionada de los triacilgliceridos en hexano y/o acetona, dio una grasa, cuya composición en triacilgliceridos y perfiles de fusión fueron comparables a la manteca de cacao. En esta reacción el equivalente de la manteca de cacao fue de aproximadamente 25 % del peso inicial de aceite de palma.

Mediante reacción de acidólisis de una fracción media de aceite de palma con ácido esteárico en medio de n-hexano y usando la lipasa de *Rhizopus arrhizus*, Mojovic y col., (1993) obtuvieron un producto con características similares a la manteca de cacao. De acuerdo con estos autores, la adición de lecitina de soya eleva significativamente la conversión del sustrato. Tal hecho fue atribuido al efecto protector que ejerce la lecitina sobre la enzima contra el solvente apolar.

Con este mismo tipo de reacción, Tanaka y col., (1994) estudiaron la producción de grasas similares a la manteca de cacao utilizando como sustratos aceite de oliva y ácido esteárico o ácido palmítico en presencia de solventes orgánicos y usando la lipasa inmovilizada 1,3-específica de *Rhizopus delmar*.

En todos los casos los autores evaluaron la incorporación de ácido esteárico, pero no fueron muy rigurosos en la evaluación de la composición de TAG's, factor que finalmente determina la capacidad de las grasas para actuar como equivalentes de la manteca de cacao.

A nivel nacional Moreno y col., (2001) aplicando una reacción de acidólisis entre la oleína de palma y el ácido esteárico reactivo analítico, produjeron una grasa con composición en ácidos grasos y triacilgliceridos, y una curva de fusión similar a la de la manteca de cacao. En este caso emplearon como catalizador la Lipozyme IM de *Mucor mihei*. Los autores evaluaron además las diferentes condiciones de reacción encontrando como óptimas para la mayor incorporación de ácido esteárico en la oleína de palma las siguientes: cantidad de enzima 150 mg, temperatura de reacción 70°C y nivel de solvente (hexano) 0,7 mL/g de sustrato. El proceso desarrollado permitió una incorporación de ácido esteárico de 40,0% en

un tiempo de reacción de cinco (5) horas. El fraccionamiento de la grasa interesterificada, permitió obtener tres productos grasos (F1A, F2A y F3A) con propiedades físicas y químicas diferentes a las iniciales, con aplicaciones potenciales en la industria de alimentos que permiten nuevos usos al aceite de palma.

La fracción uno resultó ser una grasa altamente saturada con un contenido elevado de diacilglicéridos, con posible aplicación en la elaboración de margarinas para panadería. La fracción dos, presentó una composición en ácidos grasos y acilglicéridos y un comportamiento térmico que le permiten comportarse como la manteca de cacao, por lo cual se podría emplear como un equivalente de ella (CBE). El rendimiento de esta fracción fue del 37% del total de la oleína de palma modificada. La fracción tres, resultó ser una grasa líquida con un nivel elevado ácidos grasos insaturados, principalmente ácido oleico y ácido linoleico.

Posteriormente, Arango y col., (2004) con el ánimo de escalar el proceso y debido a los costos del ácido esteárico reactivo analítico, lo reemplazaron con ácido esteárico comercial, utilizando al igual que en el proyecto anterior la Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei*. Los resultados obtenidos permitieron obtener también un equivalente de manteca de cacao, pero con un rendimiento mucho menor. Adicionalmente se determinó que el índice de acidez al final de la reacción es alto (35%), lo cual no favorece la aplicación de este proceso a nivel industrial, debido a que el costo de remoción de los ácidos grasos es elevado.

Por lo anterior, los mismos autores evaluaron otra ruta para disminuir los niveles de acidez, la transesterificación de la oleína de palma con hidrogenado total de palma, este último como fuente del ácido esteárico necesario para la reacción. Además se establecieron como condiciones óptimas de reacción: relación de sustratos 1.0:0.5 p/p (oleína de palma/hidrogenado total de palma), cantidad de enzima 2,0%, tiempo de reacción 5.0 h, cantidad de agua 5,0% y velocidad de agitación de 300 rpm. Bajo estas condiciones el producto obtenido presentó 17,7% de POP, 12,5% de POS, 3,2% de SOS y un índice de acidez del 4,2 %. Aún cuando se disminuyeron los niveles de acidez, la baja formación de los TAG's

POS y SOS no fue suficiente para producir equivalentes de la manteca de cacao. La evaluación de la cinética de estas reacciones permite suponer que la enzima no está siendo lo suficientemente específica en las posiciones 1,3 y presenta una tendencia hacia la posición 1. Adicionalmente, la Lipasa IM de *Mucor miehei* presentó una actividad hidrolítica alta, por lo cual es de suponer que en ocasiones predomine esta reacción sobre la reacción de transesterificación.

Las grasas obtenidas por Arango y col., (2004) se clasificaron como duras (pf. 48 °C) y presentaron una plasticidad adecuada para productos de panadería.

Paralelamente al desarrollo de estos trabajos NOVOZYME empresa comercializadora de estas enzimas, sacó al mercado una nueva enzima, Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus*, que se caracteriza además de tener mayor actividad hidrolítica, por ser más económica. Por su potencial aplicación en el presente trabajo se utiliza esta enzima para evaluar la obtención de grasas equivalentes de la manteca de cacao a partir de la oleína de palma con sustratos como el estearato de etilo, el hidrogenado total de palma y el hidrogenado total de soya, los tres últimos como fuente de ácido esteárico.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 MATERIALES Y REACTIVOS**

La oleína de palma refinada, el hidrogenado total de palma y el hidrogenado total de soya fueron suministrados por la Empresa Santandereana de Aceites S.A. (SACEITES). La enzima lipasa 1,3-específica de *Thermomyces lanuginosus* en forma inmovilizada (Lipozyme TL IM) se compró a Novozyme. El n-hexano grado analítico y demás reactivos fueron obtenidos de Merck.

El estearato de etilo se sintetizó en el laboratorio utilizando el método descrito a continuación: Se pesaron 200g de ácido esteárico grado comercial y 5 g de sulfato de sodio anhidro, se mezclaron con 250 mL de una solución de ácido sulfúrico concentrado al 2% en etanol absoluto. La mezcla se incubó en un baño termostatado a 65°C por 5 horas con agitación constante de 250 rpm. El producto obtenido se neutralizó con solución acuosa de NaOH 0,5N. La capa superior se separó en un embudo de decantación y se lavó varias veces con agua destilada caliente. Esta capa se calentó a 120°C por 15 minutos y se dejó enfriar determinándose el peso y el porcentaje de acidez del producto por titulación con NaOH 0,1 N.

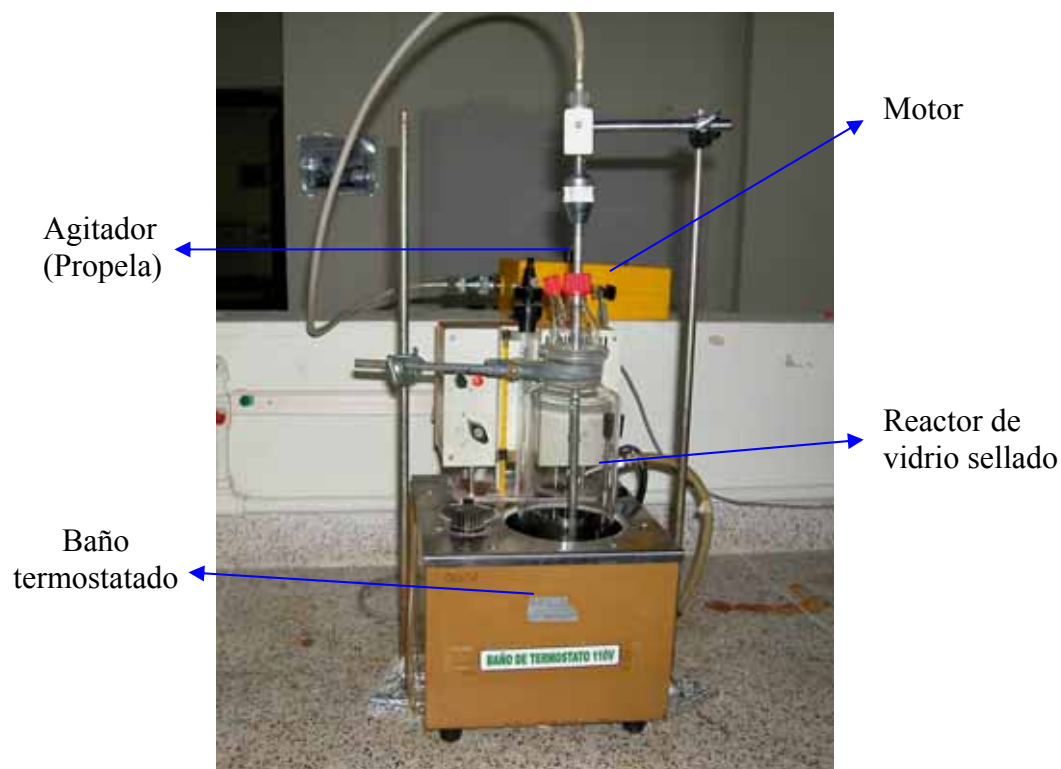
### **2.2 PROCEDIMIENTO**

**2.2.1 Reacción general de transesterificación.** La reacción de transesterificación utilizando como catalizador Lipozyme TL IM, se llevó a cabo en un reactor de vidrio sellado (27 cm. altura x 10 cm. de diámetro), incubando ésta y la mezcla de aceites en un baño termostatado a una temperatura de 70 °C, sin adición de agua y solvente, con una agitación mecánica usando un agitador tipo propela (Figura 11). Al final del tiempo de reacción, la enzima se removió por filtración y la grasa producto se neutralizó con hidróxido de sodio 0.1 N, determinando el porcentaje de índice de acidez (numeral 2.3.1).

Los ácidos grasos libres se extrajeron con n-hexano. La capa inferior que contiene los ácidos grasos libres se separó y descartó, mientras que la parte superior que contiene los acilgliceridos se transfirió a balones Soxhlet con el fin de remover el n-hexano presente en el producto de interesterificación a una temperatura de 45 °C. Al final de la reacción se analizó el producto de reacción en cuanto a su composición en ácidos grasos y acilgliceridos (Namal y col, 1999).

**2.2.2 Selección del sustrato.** Los sustratos evaluados en reacciones de transesterificación enzimática con la oleína de palma catalizadas por Lipozyme TL IM fueron: el estearato de etilo (EE), el hidrogenado total de palma (HTP) y el hidrogenado total de soya (HTS). En este caso, las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo utilizando las condiciones óptimas encontradas por Arango y col., (2004) en la reacción entre oleína de palma y el hidrogenado total de palma con Lipozyme RM IM: relación de sustratos 1:0.5 p/p; cantidad de enzima de 2% de peso combinado de sustratos, agitación mecánica de 300 rpm, 5 horas de reacción, y temperatura 70 °C. Se seleccionó la mezcla de sustratos que originó el producto con mayor contenido de TAG's POS y SOS.

**Figura 11.** Montaje empleado para efectuar la reacción de transesterificación enzimática.



**2.2.3 Optimización de las condiciones de reacción.** Una vez seleccionado el sustrato (hidrogenado total de soya), se procedió a optimizar las condiciones de la reacción de transesterificación enzimática para la producción de equivalentes de la manteca de cacao. Para tal fin se utilizó un software estadístico llamado STATGRAPHICS plus 4.0 para Windows que se basó en la metodología de superficie de respuesta y el uso de análisis de varianza (ANOVA). Se empleó un diseño central compuesto rotatorio de cubo + estrella (CCRD), de tres variables, tres niveles y una replica.

Las variables o factores independientes fueron la cantidad de enzima  $X_1$  (% p/p), relación de sustratos  $X_2$  (p/p) y velocidad de agitación  $X_3$  (rpm); la cantidad de enzima se expresa en porcentaje en peso aditivo de sustratos (Tabla 6). La base de cálculo utilizada fue de 50 g de mezcla de grasas. Se utilizó un reactor de vidrio sellado de 10 cm. de alto y 5 cm. de diámetro. La agitación fue mecánica, con un agitador tipo propela. La temperatura y el tiempo de reacción se fijaron en 70 °C y 5 horas respectivamente. La variable de respuesta se definió como la suma de las concentraciones de los TAG's POS y SOS presente en la grasa producto de reacción. Cada experimento se realizó por duplicado (Tabla 7). Adicionalmente en todos los puntos se determinó el índice de acidez de cada una de las grasas, producto de reacción.

**Tabla 6.** Variables de estudio con sus niveles y sus respectivos códigos

		Código de los niveles		
Símbolo	Variables	-1	0	1
$X_1$	Cantidad de enzima (%P) <sup>a</sup>	3	7	11
$X_2$	Relación de sustratos (p/p) <sup>b</sup>	1	2	3
$X_3$	Agitación (rpm)	200	300	400

**a:** Cantidad de enzima en porcentaje en peso combinado de sustratos. **b:** Relación Oleína de palma/hidrogenado total de soya (p/p), base de cálculo de mezcla 50 g.

**Tabla 7.** Puntos del diseño experimental

No. Exp.	Bloque	NIVELES DE LAS VARIABLES		
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> <sup>a</sup>	X <sub>3</sub>
1	1	-1	1	1
2	1	-1	-1	1
3	1	0	1,68179*	0
4	1	1	1	1
5	1	1	-1	-1
6	1	0	0	0
7	1	0	-1,68179*	0
8	1	1	-1	1
9	1	-1	1	-1
10	1	0	0	0
11	1	0	0	0
12	1	-1	-1	-1
13	1	0	0	-1,68179*
14	1	-1,68179*	0	0
15	1	1,68179*	0	0
16	1	0	0	1,68179*
17	1	1	1	-1

\* Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad; a. Base de calculo 50 g de mezclas de aceites.

**2.2.4 Evaluación de la concentración de los principales TAG's en el tiempo.** Se estudió el avance de la reacción para una mezcla de 200 g. de OP e HTS en las condiciones óptimas, en cuanto a la variación de los principales triacilglicéridos y el índice de acidez en función del tiempo. Para ello se tomaron muestras de 5 mL de la reacción a 0h, 0,25h, 0,75h, 1h, 2h, 3h, 4h, y 5h de reacción. Las muestras obtenidas se trataron como se mencionó en el numeral 2.2.1.

**2.2.5 Fraccionamiento de la grasa producto de la transesterificación.** Obtenidas las condiciones óptimas de reacción de la OP y el HTS con Lipozyme TL IM se validaron los resultados, y el producto obtenido una vez neutralizado se sometió a un proceso de fraccionamiento con solvente utilizando la metodología descrita por Chong y col., (1992). De esta forma, se preparó una solución de acilglicéridos en n-Hexano (1:10 p/v) que se

mantuvo a 4 °C por 24 horas. La grasa precipitada (F1) se filtró, y al filtrado se le evaporó el solvente. El producto obtenido se disolvió en acetona (1:10 p/v) y se enfrió nuevamente por 24 horas, para obtener la segunda fracción de grasa precipitada (F2). El solvente se evaporó nuevamente para producir una tercera fracción de aceite (F3). El producto sin fraccionar y cada una de las fracciones obtenidas se caracterizó en cuanto a contenido de ácidos grasos, contenido de triacilgliceridos y curvas de sólidos.

**2.2.6 Estabilidad operacional de la enzima.** Determinadas las condiciones óptimas de la reacción, se evaluó la estabilidad operacional de la enzima realizando ocho (8) experimentos consecutivos con la misma enzima midiendo al final de cada proceso, el índice de acidez y la composición en acilgliceridos por cromatografía de gases.

La reacción se llevó a cabo en un reactor de vidrio sellado (10 cm. de alto x 5 cm. de diámetro). El peso de la mezcla de OP e HTS fue de 50 g. con una relación 1:1, la cual se homogenizó a una temperatura de 70 °C en un baño termostataado rpm. y luego se adicionó 5.25 g. de Lipozyme TL IM dejando reaccionar por 5 horas con una agitación de 400. Al final del tiempo de reacción, se retiró el producto separando la enzima por filtración, y se utilizó nuevamente en las otras reacciones con las mismas condiciones adicionando nuevamente una mezcla de aceites frescos previamente homogenizados.

## **2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS**

**2.3.1 Índice de acidez (%IA).** Se midió usando la norma AOCS Oficial Method Ca 5<sup>a</sup>-40. Para ello se pesaron entre 3 a 5 gramos de grasa en un erlenmeyer de 250 mL, a los cuales se adicionaron 50 mL de alcohol etílico al 95% neutralizado, y dos gotas de fenofaleina. Se calentó hasta completa disolución, valorando luego con NaOH 0,1N estandarizado, agitando vigorosamente hasta la aparición del color rosado.

Los resultados de esta determinación fueron expresados como porcentaje de ácidos grasos libres, expresado como ácido oleico.

$$\% \text{ ácido oleico: } \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * \text{Peq}_{\text{ácido oleico}}}{10 * W_{\text{Muestra}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$ : Volumen de NaOH gastado en la titulación

$N_{\text{NaOH}}$ : Normalidad del NaOH

Peq: Peso equivalente del ácido oleico

$W_{\text{Muestra}}$ : Peso en gramos de aceite sustrato

10: Factor de multiplicación

**2.3.2 Actividad lipolítica.** La actividad es expresada en IU (unidad internacional), donde 1 IU es definida como la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos grasos libres por minuto. (Mojovic, 1993; Karra-Chaabouni, 1998)

La actividad lipolítica de la enzima se evaluó usando como sustrato oleína de palma (500 mg), emulsionada con 9,5 mL de solución de cloruro de sodio (0,89 % NaCl p/v) y 500 mg de goma arábiga, agitándose durante cinco minutos a temperatura ambiente. De esta emulsión, se tomaron 5,0 mL que se mezclaron con 5 mL de una solución de cloruro de sodio al 0,89%, ajustando el pH a 8,0 por adición de NaOH 10 mM. La mezcla se incubó a 70 °C con agitación constante en presencia de la enzima (10 mg de Lipozyme TL IM). Los ácidos grasos liberados se monitorearon por titulación con NaOH 10 mM en un valorador automático (Moreno, 2001).

**2.3.3 Composición en ácidos grasos.** La evaluación de la composición en ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa de alta resolución. La muestra de aceites se sometió a metilación con KOH metanólico. Se prepararon 10 mL de solución metanólica de KOH 2M. Se pesó 1g de grasa en un tubo de ensayo con tapa y se agregaron 10 mL de n-hexano con agitación. Luego a la mezcla se adicionó 1 mL de la solución de KOH metanólica y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Se centrifugó y de la capa superior se tomaron 100  $\mu\text{L}$ ,

los cuales se aforaron a 1mL con n-hexano. De esta solución se inyectó manualmente 1  $\mu$ L directamente al cromatógrafo de gases.

La determinación cuantitativa de los ácidos grasos se realizó de acuerdo con la norma NTC 5013, utilizando un equipo cromatográfico Agilent HP 6890 Plus con detector de ionización de llama (FID). Se empleó una columna DB-WAX (30m x 0.32mm x 0.25 $\mu$ m) con la siguiente programación de temperatura: 100°C (0 min.) -170°C a 20°C/min., 170°C (2 min.) - 250°C (20 min.) a 10°C/min. Las demás condiciones de trabajo fueron: gas de arrastre Helio a 1mL/min., inyector a 250°C modo split en relación 80:1, FID a 270°C.

Los componentes se identificaron por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de FAMES analizado bajo las mismas condiciones: *Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1 AMP (Tabla 8). La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas, en el cual se suman las áreas de todos los componentes y se indica el porcentaje de área que pertenece a los componentes de interés. En los anexos se muestran el perfil cromatográfico de estos patrones.

**Tabla 8.** Concentración (mg/mL) en metil ésteres de los patrones.

Metil éster del ácido	Concentración patron (mg/mL)					
	A	B	C	D	E	F
<b>Láurico (12:0)</b>	4,10	3,0	2,0	1,0	0,5	0,3
<b>Mirístico (14:0)</b>	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,3
<b>Palmítico (16:0)</b>	5,5	4,1	2,7	1,4	0,7	0,3
<b>Palmitoleico (16:1)</b>	2,5	1,9	1,3	0,6	0,3	0,2
<b>Esteárico (18:0)</b>	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,3
<b>Oleico (18:1)</b>	2,5	1,9	1,3	0,6	0,3	0,2
<b>Linoleico (18:2)</b>	2,5	1,9	1,3	0,6	0,3	0,2
<b>Linolénico (18:3)</b>	2,5	1,9	1,3	0,6	0,3	0,2
<b>Araquidónico (20:0)</b>	4,0	3,0	2,0	1,0	0,5	0,3
<b>Total</b>	31,5	23,6	15,8	7,9	3,9	2,0

**2.3.4 Composición en acilglicéridos.** Los TAG's fueron analizados por cromatografía de gases de alta resolución utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 Plus equipado con un detector de ionización de llama (FID) en combinación con el software

ChemStation. Para la separación se utilizó una columna capilar DB-17 (J&W Scientific) de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno, recubierta por una película de 0,15  $\mu\text{m}$  de espesor de 100 % de plidimetilsiloxano. El volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$  de 1 % (p/v) de aceite en hexano, inyección manual. La elusión de los TAG's se llevo a cabo con una programación de temperatura de 250  $^{\circ}\text{C}$  (1 min) a 360  $^{\circ}\text{C}$  (12 min) a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Gas de arrastre Helio, se aplicó con un flujo de 2 mL/min y una velocidad lineal de 43 mL/min con una relación de split de 50:1; temperatura del detector 365 $^{\circ}\text{C}$ , llama producida por la mezcla de hidrógeno 40 mL/min y aire 350 mL/min. Gas auxiliar nitrógeno, se aplicó con un flujo de 30 mL/min. Temperatura del inyector 360  $^{\circ}\text{C}$ . Para la identificación y cuantificación de los TAG's se realizó a partir de patrones estándar de MMM, PPP, POP, POS, SOS, y SSS de los cuales se prepararon soluciones patrones de diferentes concentraciones (Tabla 9). La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas, en el cual se suman las áreas de todos los componentes y se indica el porcentaje de área que pertenece a los componentes de interés. En los anexos se muestra un perfil cromatográfico de una mezcla de patrones de triacilglicéridos.

**Tabla 9.** Concentración (mg/mL) de los patrones de triacilglicéridos.

TAG		Concentración patron (mg/mL)									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
42	MMM	3,5	2,5	1,8	1,3	0,9	0,6	0,3	0,2	0,1	
48	PPP	3,5	2,5	1,8	1,3	0,9	0,6	0,3	0,2	0,1	
50	POP	10,0	5,0	2,5	1,3	0,6	-	-	-	-	
54	SOS	10,0	5,0	2,5	1,3	0,6	-	-	-	-	
	SSS	5,0	3,8	2,5	1,3	0,6	0,6	0,3	0,2	0,1	

**2.3.5 Determinación de los perfiles de fusión y contenido de grasa sólida (SFC).** Las muestras fueron atemperadas para conseguir que la grasas cristalicen en la forma polimórfica más estable y de mayor punto de fusión (Forma  $\beta$ ), calentándose hasta 100  $^{\circ}\text{C}$ . Luego se dejaron enfriar hasta llegar a la temperatura ambiente (24-25  $^{\circ}\text{C}$ ) con el fin de facilitar la formación de pequeños núcleos cristalinos para darle más consistencia y firmeza a la grasa. Posteriormente, se dejaron reposar durante 24 h para asegurar la formación de los cristales  $\beta$ . Finalmente se efectuó un enfriamiento lento hasta alcanzar los 4  $^{\circ}\text{C}$

almacenándose a esta temperatura por 24 h. El contenido de grasa sólida se determinó siguiendo la Norma Técnica Colombiana 4078 de 1996, utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de pulso.

### **3. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

#### **3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN Y DE LA MANTECA DE CACAO**

En las Tablas 10A y 10B se presenta la composición en ácidos grasos y acilglicéridos respectivamente, expresados en porcentaje de área, de la OP, EE, HTP, HTS y MC utilizados en esta investigación.

La OP esta conformada principalmente por ácido oleico y palmítico que se encuentran en una proporción de 48,50% y 35,30% respectivamente, y dan origen a los TAG's POP (39,84%) y POO (29,33%) triacilglicéridos base para la formación de POS y SOS. El contenido de POS es de 5,30%. Esta grasa no contiene SOS y el contenido de ácido esteárico es sólo de 3,70%; una proporción diez veces menor al contenido en la manteca de cacao. La proporción de mono y diacilglicéridos corresponde a un 6,40%.

El *estearato de etilo (EE)* sintetizado en el laboratorio usando ácido esteárico comercial (AEC), con un rendimiento del 93% presentó una composición en ácido palmítico de 30,70% y de ácido esteárico de 68,80%. La acidez final del EE alcanzó niveles de 3,5%.

El *hidrogenado total de palma (HTP)* contiene 29,00% de ácido palmítico y 59,20% de esteárico distribuidos en los triacilglicéridos, PPP PSP, PSS y SSS, con una concentración de 11,90, 25,60, 35,10 y 15,70% respectivamente. Esta grasa presenta la mayor concentración de PSS, un 10,70% por encima del HTS. Los ácidos grasos insaturados presentes corresponden al 0,94% representados por oleico, linoléico y araquidónico.

**Tabla 10.** A) Composición en ácidos grasos (% área) de la OP, EE, HTP, HTS y la MC y B) composición en acilglicéridos (% área) de la OP, HTP, HTS y la MC.

A)

Ácidos Grasos	No. de Carbonos	Composición (% área)				
		OP	EE	HTP	HTS	MC
<b>Mirístico</b>	14	0,40	--	3,41	0,24	--
<b>Palmítico</b>	16	35,30	30,70	29,00	15,43	27,70
<b>Estearico</b>	18	3,80	68,80	59,20	78,80	37,00
<b>Oleico</b>	18:1	48,50	0,20	0,13	2,30	32,00
<b>Linoleico</b>	18:2	1,80	0,30	0,14	0,50	2,40
<b>Araquidónico</b>	20	--	--	0,70	0,63	--

OP: Oleína de palma; EE: Estearato de etilo; HTP: Hidrogenado total de palma; HTS: Hidrogenado total de soya.

B)

Acilglicéridos	No. de Carbonos	OP	HTP	HTS	MC
<b>MAG</b>	--	0,50	--	--	3,80
<b>DAG</b>	--	5,90	--	--	5,23
<b>PPP</b>	48	0,50	11,90	0,70	0,23
<b>PSP</b>	50	--	25,60	3,30	--
<b>POP</b>	50	34,84	1,40	--	19,83
<b>PSS</b>	52	--	35,10	24,42	0,54
<b>POS</b>	52	5,30	0,80	0,52	37,60
<b>POO</b>	52	29,33	--	0,40	2,90
<b>SSS</b>	54	--	15,70	57,71	--
<b>SOS</b>	54	--	--	--	20,10
<b>SOO</b>	54	1,91	--	--	2,70
<b>OOO</b>	54	2,70	--	--	0,90

OP: Oleína de palma; HTP: Hidrogenado total de palma; HTS: Hidrogenado total de soya. MC: Manteca de cacao.

El hidrogenado total de soya (HTS) contiene 78,80% de ácido esteárico y 15,43% de palmítico. Esta grasa presenta mayor contenido de ácido esteárico que el HTP, convirtiéndose en una fuente importante de él si se tiene en cuenta que la triesteárina (SSS) esta presente en una concentración de 57,71%, es decir 15,70% más que el HTP. Este TAG es importante considerando que la enzima es 1,3 específica. El PSS es el segundo triacilglicérido en importancia debido a su concentración de 24,42%, seguido por el PSP con un 3.30%.

La manteca de cacao (MC) es una grasa dura a temperatura ambiente y esta constituida principalmente por ácido palmítico (27,70%), esteárico (37,00%) y oleico (32,00%). Sus principales TAG's son el POP, POS y SOS con concentraciones de 19,83 %, 37,60% y 20,10 % respectivamente. Además presenta una composición en monoacilglicéridos de 3,80 % y diacilglicéridos de 5,23 %.

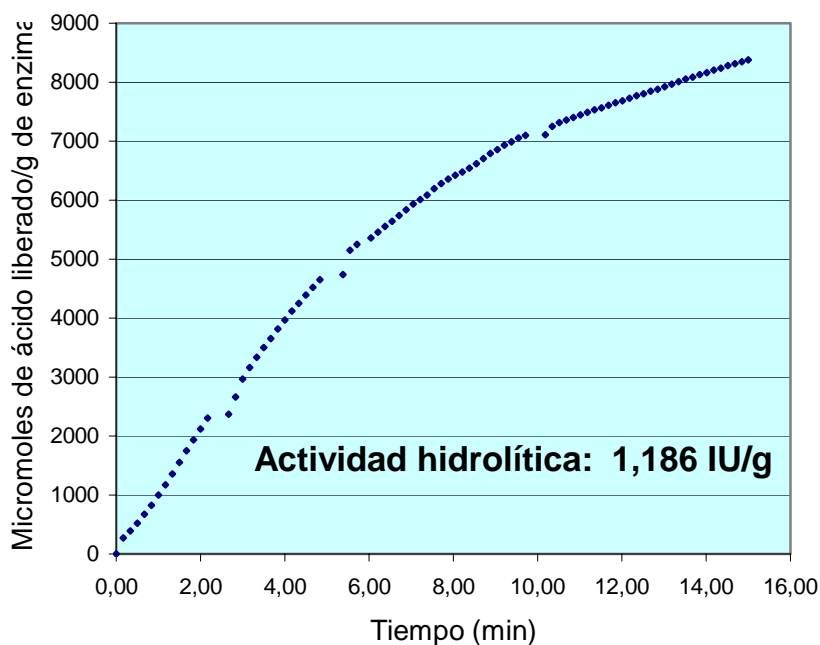
Las composiciones en ácidos grasos y en ACG's encontrados para las diferentes grasas utilizadas en esta investigación coinciden con las reportadas en la bibliografía, como puede verse al evaluar las Tablas 3 y 4.

En el anexo 1, se muestran los perfiles cromatográficos de los acilglicéridos componentes de los sustratos, la MC y grasas producto de reacción del presente estudio.

### ***3.2 REACCION DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA***

***3.2.1 Determinación de la actividad hidrolítica de la Lipozyme TL IM.*** En la Figura 12, se muestra la evaluación de la liberación de los ácidos grasos por unidad de tiempo (min) producto de la hidrólisis con Lipozyme TL IM. Para el cálculo se empleó una regresión polinómica con un coeficiente de correlación de 0.9988, adecuado para obtener la pendiente de la tangente a la curva en el tiempo cero, cuyo valor representa la actividad obteniendo un valor de 1.186 IU, valor 6 veces superior al encontrado para la Lipozyme RM IM estudiada en el CICTA con 189 IU (Moreno, 2002; Arango, 2004)

**Figura 12.** Actividad hidrolítica de Lipozyme TL IM (a 70 °C) sobre oleína de palma.



**3.2.2 Selección del sustrato.** Se escogieron tres sustratos para estudio, el estearato de etilo (EE), el hidrogenado total de palma (HTP) y el hidrogenado total de soya (HTS); cada uno de ellos se mezcló independientemente con la OP en reacciones de transesterificación con Lipozyme TL IM en las condiciones seleccionadas en el apartado 2.2.2. Se pretendía seleccionar la mejor fuente de ácido esteárico para la formación de los TGA's POS y SOS, principales componentes de la manteca de cacao. A continuación se muestran los resultados obtenidos en los tres casos.

**3.2.2.1 Reacción de transesterificación enzimática de la OP y EE.** En la Tabla 11, se muestra la composición en TAG's de la mezcla inicial, la grasa producto y variación neta de los TAG's de la reacción. Las principales diferencias se presentaron en los TAG's POP y POO que presentaron una disminución neta de 6,43 y 4,96%, quedando en la grasa producto de reacción 3,40 y 3,10%, respectivamente. Estos triacilglicéridos se encuentran en mayor proporción en la mezcla inicial, lo que favorece su interacción con la enzima y el estearato de etilo. Sin embargo, solo una parte de estos TAG's se convirtieron en POS

(0,40%) y SOS (0,50%), el resto sirvió para la formación de MAG's y DAG's productos de la hidrólisis. Esta misma hidrólisis generó una acidez en la grasa producto de 3.5 %.

**Tabla 11.** Composición en ACG's (% área) de la mezcla inicial, grasa producto y variación neta de los ACG's de la reacción de transesterificación de la OP y EE.

ACG's	Mezcla inicial	Grasa producto	Variación neta
<b>MAG</b>	0,32	0,70	0,40
<b>DAG</b>	2,91	6,73	3,82
<b>MPP</b>	--	2,20	2,20
<b>PPP</b>	0,53	0,22	-0,31
<b>PSP</b>	--	2,82	2,82
<b>POP</b>	9,83	3,40	-6,50
<b>PLP</b>	2,90	0,90	-2,02
<b>PSS</b>	--	1,30	1,30
<b>POS</b>	2,70	3,10	0,40
<b>POO</b>	8,40	3,44	-4,91
<b>PLS</b>	--	0,61	0,61
<b>PLO</b>	2,60	1,50	-1,13
<b>PLL</b>	0,41	--	-0,41
<b>SSS</b>	--	0,22	0,22
<b>SOS</b>	0,20	0,70	0,52
<b>SOO</b>	0,70	1,30	0,60
<b>OOO</b>	0,90	0,80	-0,10
<b>Esteres</b>	68,20	62,01	-6,20

La incorporación del estearato de etilo o de palmitato de etilo en otros TAG's produjo la formación de TAG's que no existían en la mezcla inicial de grasas, entre los que se encuentran el PLS (0,61%), PSP (2,82 %), PSS (1,30 %) y SSS (0,22 %).

Al final de la reacción el contenido de estearato de etilo fue de 62,01%, lo cual significa que su incorporación en los TGA's de la oleína de palma fue tan sólo del 6,20%, rendimiento muy bajo para el objetivo propuesto de incorporar la mayor cantidad posible de ácido esteárico para tener un buen rendimiento en POS y SOS. Una posible causa de esta situación, puede ser el hecho de tener también palmitato de etilo en la mezcla de reacción, por lo que podría presentarse una competencia a la hora de incorporar el ácido

graso al triacilglicérido. No se ensayó el ácido esteárico reactivo analítico porque en un estudio anterior (Moreno, 2001) encontró que su alto costo, no favorece su aplicación.

Adicionalmente, la separación de la mezcla de la reacción del estearato y el palmitato de etilo que no reaccionan, sólo es posible realizarla por destilación al vacío (Chong y col., 1992) y tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial, resulta ser un proceso costoso. Por las razones mencionadas se descartó el estearato de etilo como fuente de ácido esteárico.

**3.2.2.2 Reacción de transesterificación enzimática de la OP e HTP.** En la Tabla 12, se muestra la composición en ACG's (% área), de la grasa mezcla inicial, grasa transesterificada o producto y variación de neta de los ACG's de la reacción de transesterificación enzimática de la OP y el HTP. En ésta Tabla, también se relacionan los datos obtenidos por Arango y col. (2004), para los mismos sustratos pero utilizando como catalizador Lipozyme RM IM.

Se observa que en los dos casos, la composición en ACG's de los productos interesterificados es similar, lo cual permite suponer que independientemente de la enzima que se utilice, la reacción de transesterificación ocurre de forma similar, así estas presenten diferentes valores de actividad hidrolítica y requieran condiciones de reacción diferentes como es el caso de la presencia de agua que se requiere para Lipozyme RM IM.

Las principales variaciones de los TAG's, ocurrieron en aquellos cuya concentración en la mezcla inicial es la más alta, como es el caso de los TAG's provenientes del HTP, PSS y SSS y del POP y POO provenientes de la OP. El PSS, TAG mayoritario en la mezcla inicial (17,43 %), disminuyó al final de la reacción en un 33% y el SSS 60%; mientras que las concentraciones de POP y el POO disminuyeron en 20,9% y 53,4%. Lo anterior, generó la formación de POS y de SOS que presentaron incrementos en su composición de 416% y 1.073%.

**Tabla 12.** Composición en ACG's (% área) de la mezcla inicial, grasa producto y variación neta de ACG's de las reacciones de transesterificación de OP e HTP catalizada por Lipozyme TL IM y Lipozyme RM IM respectivamente.

ACG's	Catalizada con Lipozyme TL IM			Catalizada con Lipozyme RM IM <sup>a</sup>		
	Mezcla inicial	Grasa producto	Variación neta	Mezcla inicial	Grasa producto	Variación neta
MAG	0,50	1,84	1,34	0,80	3,90	3,10
DAG	3,80	10,10	6,30	1,04	8,50	7,50
PPP	5,50	8,00	2,50	5,24	5,60	0,36
PSP	12,70	14,10	1,40	13,22	11,60	-1,62
POP	14,83	11,73	-3,1	16,72	10,84	-5,88
PLP	3,80	1,90	-1,90	3,62	1,90	-1,72
PSS	17,43	11,70	-5,73	19,64	11,10	-8,54
<b>POS</b>	<b>2,50</b>	<b>12,90</b>	<b>10,40</b>	<b>3,00</b>	<b>12,70</b>	<b>9,70</b>
POO	13,03	6,10	-7,00	15,80	6,10	-9,70
PLS	--	2,20	2,20	1,50	2,42	0,92
PLO	4,30	1,93	-2,37	3,90	1,52	-2,38
SSS	7,90	3,20	-4,70	9,90	3,24	-6,66
<b>SOS</b>	<b>0,30</b>	<b>3,52</b>	<b>3,22</b>	<b>0,40</b>	<b>3,50</b>	<b>3,10</b>
SOO	0,90	2,20	1,30	1,60	2,10	0,50
OOO	0,60	0,30	-0,30	2,71	0,20	-2,51

a. Datos reportaos por Arango y col. (2004).

3.2.2.3 *Reacción de transesterificación enzimática de la OP e HTS.* Para esta reacción al igual que para la anterior, las mayores variaciones en la composición de los ACG's. ocurrieron en los mismos TAG's (Tabla 13). Sin embargo, la concentración de SSS (19,82%) en la mezcla inicial de OP e HTS es aproximadamente el doble de la contenida en la mezcla OP e HTP (7,90%).

La concentración de PSS disminuyó 5,31%, la de SSS 80,32%, la de POP 47,13% y la de POO 52,20%, mientras que la formación de POS y de SOS se incrementó en 339% y la de SOS en 1.180%. En este caso es de resaltar la formación de PSP cuya concentración se incremento de 1.64% en la mezcla inicial a 9.70%, debido a que se produce a partir de PSS y SSS, al intercambiar uno o dos ácidos esteáricos de las posiciones 1 y 3 de éstos, por ácido palmítico proveniente de otros TAG's.

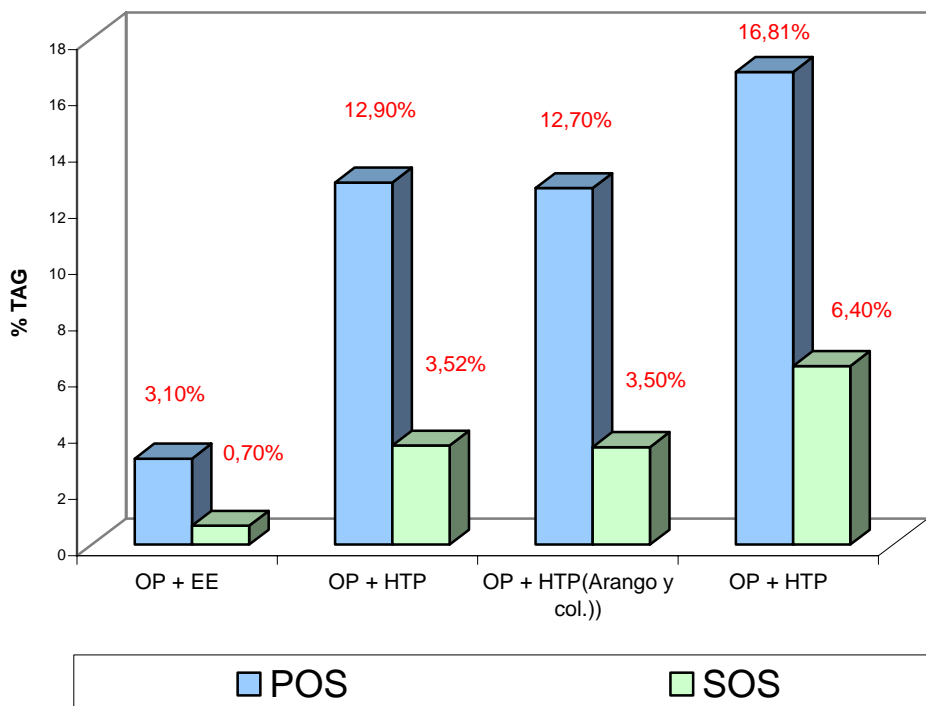
**Tabla 13.** Composición en ACG`s (% área) de la mezcla inicial, producto de reacción y variación neta de ACG`s de la reacción de transesterificación de la OP y HTS

ACG`s	Mezcla inicial	Producto Final	Variación neta
<b>MAG</b>	0,43	3,60	3,17
<b>DAG</b>	3,70	8,00	4,30
<b>MPP</b>	0,40	0,50	0,10
<b>PPP</b>	0,44	3,71	3,30
<b>MOP</b>	1,31	1,02	-0,30
<b>MLP</b>	0,20	--	-0,20
<b>PSP</b>	1,64	9,70	8,06
<b>POP</b>	22,81	12,10	-10,71
<b>PLP</b>	5,40	2,40	-3,00
<b>PSS</b>	10,31	9,80	-0,51
<b>POS</b>	3,84	16,81	13,00
<b>POO</b>	19,30	6,22	-13,10
<b>PLS</b>	--	2,84	2,84
<b>PLO</b>	4,80	2,73	-2,10
<b>PLL</b>	0,60	--	-0,60
<b>SSS</b>	19,82	3,90	-15,92
<b>SOS</b>	0,50	6,40	5,90
<b>SOO</b>	1,40	5,50	4,10
<b>OOO</b>	2,50	1,80	-0,70
<b>SLO</b>	--	1,50	1,50

En la grasa transesterificada se observa la formación de TAG`s como son el PLS (2,84%), SOO (4,10%) y SLO (1,50%). La producción de monoacilglicéridos y diacilglicéridos fue de 3,17 y 4,30% respectivamente, que indican la presencia de ácidos grasos libres que le proporcionaron un índice de acidez de 4,3 %.

En la Figura 13, se muestra una gráfica de barras que representa la producción de POS y SOS para cada una de las reacciones anteriores, incluyendo lo reportado por Arango y col., (2004). Se observa, que la mayor proporción de POS y SOS en los productos finales de reacción se obtienen a partir de la mezcla OP e HTS. Por esta razón, se escogió ésta mezcla como sustrato de análisis para la producción de equivalentes de la manteca de cacao.

**Figura 13.** Contenido de TAG's POS y SOS en las grasas producto de las diferentes reacciones de transesterificación enzimática



### 3.2.3 Estudio de las condiciones óptimas de la reacción de transesterificación.

Seleccionado el sustrato, el HTS, se procedió a determinar las condiciones óptimas de la reacción de transesterificación en las cuales se obtiene mayor producción de los TAG's POS y SOS en la grasa producto de reacción. En la Tabla 14, se presentan los puntos del diseño factorial propuesto por el diseño experimental, donde se muestran las condiciones experimentales producto de las combinaciones entre las variables y sus niveles. Además se tabulan los resultados obtenidos para la variable respuesta **Y experimental (Y<sub>ex</sub>)** y la **Y estimada (Y<sub>e</sub>)** definidas como la suma de las concentración de los TAG's POS y SOS en la grasa producto de cada reacción.

**Tabla 14.** Arreglos y respuestas del diseño experimental.

Puntos diseño	Niveles de las variables			Valor experimental	Valor estimado	% IA <sup>f</sup>
	(X <sub>1</sub> ) <sup>a</sup>	(X <sub>2</sub> ) <sup>b</sup>	(X <sub>3</sub> ) <sup>c</sup>	Y <sub>ex</sub> <sup>d</sup>	Y <sub>e</sub> <sup>e</sup>	
1	3	3	400	16,50 ± 0,83	15,73	2,2
2	3	1	400	20,10 ± 0,90	20,22	1,9
3	7	4*	300	12,70 ± 0,50	13,80	4,2
4	11	3	400	18,42 ± 0,40	17,00	5,4
5	11	1	200	24,23 ± 0,60	24,01	6,0
6	7	2	300	23,01 ± 0,50	22,80	3,9
7	7	0,3*	300	22,20 ± 0,40	22,43	5,6
8	11	1	400	25,84 ± 0,50	25,20	4,3
9	3	3	200	14,22 ± 0,73	15,50	4,2
10	7	2	300	23,50 ± 0,92	22,80	4,4
11	7	2	300	22,20 ± 0,71	22,80	4,1
12	3	1	200	19,10 ± 0,80	17,06	1,6
13	7	2	132*	20,60 ± 1,00	21,40	4,0
14	0,3*	2	300	12,20 ± 0,84	15,50	1,2
15	14*	2	300	20,93 ± 0,82	22,00	8,1
16	7	2	468*	22,10 ± 0,70	22,61	
17	11	3	200	19,32 ± 0,22	18,20	5,1

\*Puntos adicionales necesarios para la condición de rotabilidad; **a**: cantidad de enzima en porcentaje en peso combinado de sustratos **b**: relación oleína de palma/hidrogenado total de soya (p/p) base de cálculo 50 g; **c**: velocidad de agitación (rpm); **d**: suma total de los porcentajes de los triacilglicéridos POS y SOS ± la desviación estándar de dos mediciones; **e**: valores estimados por la ecuación polinómica 3. **f**: índice de acidez expresado como ácido oleico.

Con base en los resultados obtenidos y usando el sistema estadístico STATGRAPHICS se desarrolló el modelo matemático que describe la mejor relación entre las variables independientes y la variable respuesta. Las ecuaciones más comunes son de primer orden, pero la que se ajustó mejor a los valores experimentales de la Tabla 14, fue un modelo de segundo orden polinomial que tiene la siguiente forma:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{(Ecuación 2)}$$

donde **k** indica el número de factores y  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{ij}$  son los coeficientes de regresión predichos para el intercepto con la ordenada, los términos lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente,  $X_i$  y  $X_j$  son las variables independientes (Floros, 1988).

Los coeficientes de regresión son determinados por regresión múltiple por el método de mínimos cuadrados, a partir de los valores experimentales dados anteriormente. Los valores de estos coeficientes son calculados automáticamente por el software estadístico y los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Coeficientes de regresión del modelo polinomial predicho para las respuestas experimentales

Término	Efectos	Coefficiente	Valor
Intercepto		$\beta_0$	22,8030
	$X_1$	$\beta_1$	1,92105
Lineal	$X_2$	$\beta_2$	-2,5782
	$X_3$	$\beta_3$	0,3599
Cuadrático	$X_1 * X_1$	$\beta_{11}$	-1,4433
	$X_2 * X_2$	$\beta_{22}$	-1,6652
	$X_3 * X_3$	$\beta_{33}$	-0,2828
Interacciones	$X_1 * X_2$	$\beta_{12}$	-0,6787
	$X_1 * X_3$	$\beta_{13}$	-0,1275
	$X_2 * X_3$	$\beta_{23}$	-0,3437

El modelo cuadrático de mínimos cuadrados que mejor describió el comportamiento de los triacilglicéridos POS y SOS (Y) fué:

$$Y = 22,8030 + 1,92105 X_1 - 2,5782 X_2 + 0,3599 X_3 - 1,4433X_1^2 - 0,6787 X_1X_2 - 0,1275 X_1X_3 - 1,6652X_2^2 - 0,3437 X_2X_3 - 0,2828X_3^2 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Al observar las magnitudes y el signo de los coeficientes de regresión es evidente que la relación de sustratos ( $X_2$ ) es el efecto dominante, y presenta un fuerte efecto negativo sobre la variable de respuesta (inversamente proporcional), lo que quiere decir que un aumento en la relación de sustratos disminuye la síntesis de los TAG's POS y SOS en la grasa transesterificada a una razón de 2,5782% por unidad de relación de sustratos. Luego una relación de sustratos adecuada, es aquella donde exista mayor o igual cantidad de HTS que

de OP en la reacción, lo cual puede explicarse porque hay mayor concentración de TAG's di y trisaturados (PSS y SSS) en la mezcla de reacción, que son los principales donadores de ácido esteárico, elevando la posibilidad de intercambio de éstos, con los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de los 2-oleoglicéridos provenientes de la OP, formando los TAG's POS y SOS.

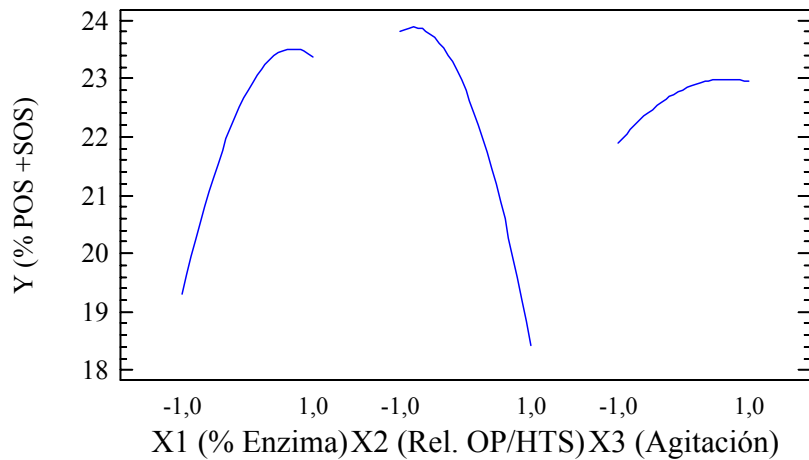
El siguiente efecto en grado de importancia es la concentración de enzima, que al aumentar afecta positivamente la variable respuesta, a una velocidad de 1,92% por unidad de enzima, ya que al haber mayor cantidad de moléculas de ella en el medio de reacción, aumenta la probabilidad de interacción de las moléculas de TAG's con el catalizador. La cantidad de enzima en el medio de reacción tiene un límite, debido a que un exceso hará que parte del catalizador no interactúe con las moléculas de sustratos, y a partir de éste no habrá aumentos de importancia en la producción de los TAG's POS y SOS.

Para el caso de la velocidad de agitación, aunque presenta una relación directa con la variable respuesta, el valor del coeficiente estimado es pequeño, 0,3599, y una variación en los niveles escogidos no altera apreciablemente la respuesta. Esto no quiere decir que la agitación no sea importante en la reacción, puesto que es uno de los factores que ayuda a que haya mayor interacción entre las moléculas de TAG's y el catalizador. Lo anterior indica que los niveles escogidos están en el rango de agitación óptima.

Los términos cuadráticos de la enzima y de la relación de sustratos contribuyen negativamente en la respuesta, teniendo mayor importancia este último. Las interacciones entre las variables no tienen un efecto marcado.

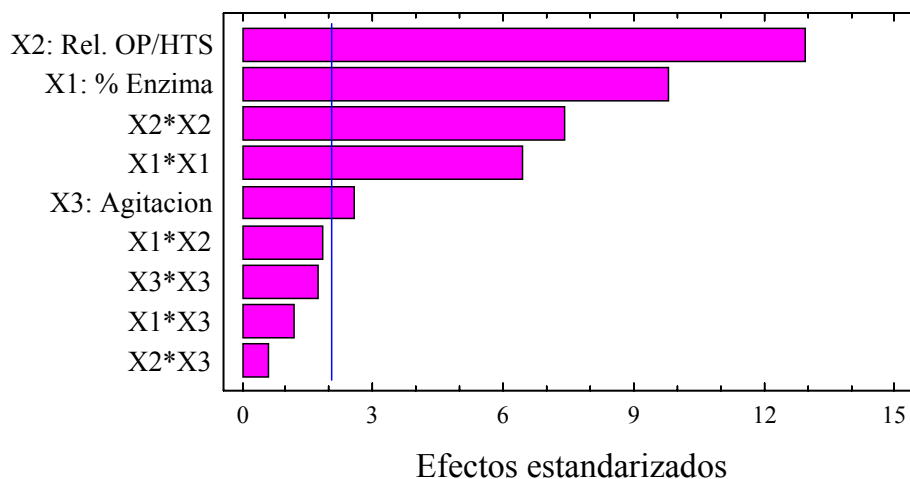
En la Figura 14, se muestran los principales efectos con su influencia negativa o positiva en la producción de los TAG's POS y SOS, donde la pendiente de las curvas indica la intensidad y la rapidez con que afectan la variable respuesta.

**Figura 14.** Efectos de las variables sobre Y



Una mejor visualización de los efectos estimados sobre la variable respuesta se observa en el diagrama de Pareto (Figura 15), en donde cada efecto se muestra en orden creciente de magnitud; la longitud de las barras es proporcional a su correspondiente magnitud del coeficiente, y aquellas que sobrepasan la línea vertical representan los efectos significativos en un 95 % de confianza.

**Figura 15.** Diagrama de Pareto de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables de estudio sobre la variable de respuesta.



Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de las tres variables estudiadas por el modelo de superficie de respuesta se presentan en la Tabla 16. Se encontró que el modelo matemático postulado describe adecuadamente el sistema, con una 93.56 % de correlación entre los datos experimentales y los ajustados.

**Tabla 16.** Análisis de varianza (ANOVA) la variable respuesta ( $\Sigma$  POS y SOS).

Término	Efectos	DF	SS	MS	F	P
Lineal	X <sub>1</sub>	1	100,8	100,8	65,06	0,0000
	X <sub>2</sub>	1	181,559	181,559	117,18	0,0000
	X <sub>3</sub>	1	3,53834	3,53834	2,28	0,1438
Cuadrático	X <sub>1</sub> * X <sub>1</sub>	1	46,9721	46,9721	30,32	0,0000
	X <sub>2</sub> * X <sub>2</sub>	1	7,37122	7,37122	4,76	0,0392
	X <sub>3</sub> * X <sub>3</sub>	1	0,2601	0,2601	0,17	0,6856
Interacción	X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	1	62,5217	62,5217	40,35	0,0000
	X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>	1	1,89063	1,89063	1,22	0,2803
	X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>	1	1,80357	1,80357	1,16	0,2913
	Residual	24	37,1848	37,1848	--	--

Coefficiente de correlación ( $R^2$ ): 0,9119

**DF:** grados de libertad. **SS:** suma de cuadrados. **MS:** promedio de cuadrados.; **F:** valor F. **P:** nivel de significancia.

Los valores de distribución F reportados en la Tabla 16, de los puntos porcentuales para un grado de libertad en el numerador y 24 (efecto residual) en el denominador para un nivel de significancia del 5% es de:  $F_{0,05,1,24} = 4,30$  (Mongomery, 1996). Todos los efectos de las variables estimadas que estén por encima de este valor tienen un efecto significativo en la variable de respuesta, siendo el más importante, el de más alto valor.

La última columna de la Tabla 16 muestra los valores P para cada cociente F. Los efectos que tengan un valor menor al 5% de significancia ( $P < 0.05$ ) son los que tienen mayor relevancia en la variabilidad de la respuesta y de menor error, esto quiere decir que los valores estimados por el software presentan un 95 % de confiabilidad. Teniendo en cuenta lo anterior, los términos que presentan los mayores efectos son los lineales y cuadráticos para la cantidad de enzima ( $X_1$ ), y relación de sustratos ( $X_2$ ) siendo el de mayor importancia este último, confirmando lo dicho anteriormente.

Las Figuras 16 y 17 muestran las gráficas de superficie de respuesta tridimensional y mapas de contorno del modelo matemático (Ecuación polinómica 3), en ellas se observan los efectos de las diferentes variables al moverse en sus respectivos niveles sobre la variable de respuesta orientando hacia la zona de las condiciones experimentales óptimas donde se obtiene una mayor formación de los TAG's POS y SOS. Cada contorno corresponde a una altura particular de la superficie de respuesta, o sea a los valores esperados obtenidos por la Ecuación polinómica 3. La gráfica de contorno es útil para estudiar los niveles de las variables que dan como resultado cambios en la forma o en la altura de la superficie de respuesta (Mongomery, 1996).

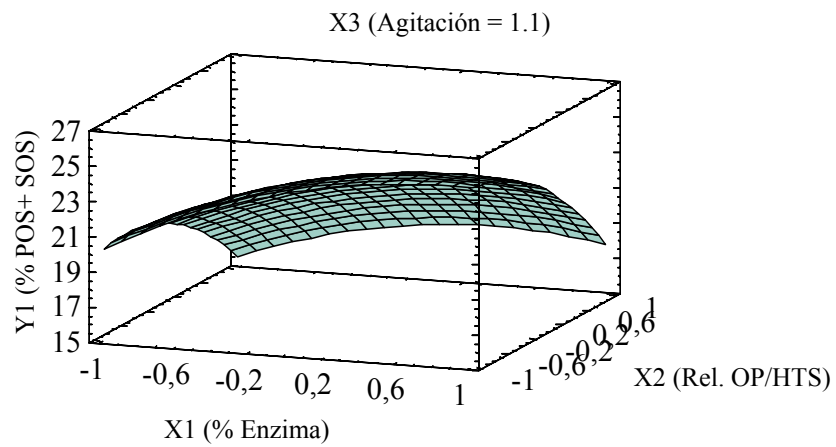
Para el caso de la cantidad de enzima y la relación de sustratos las mejores condiciones se obtienen cuando la cantidad de enzima ( $X_1$ ) se aproxima al código de nivel 1 y la relación de sustratos al código del nivel -1, lo que corresponde a una cantidad de enzima alrededor de un 11 % de peso aditivo de sustratos y una relación 1:1 (p/p) de sustratos, respectivamente, tal como se aprecia en el mapa de contorno de la Figura 16B donde la flecha apunta hacia la región óptima.

Como se indicó anteriormente en el análisis de varianza, la agitación no produce un efecto marcado sobre respuesta, como se ve en la gráfica de superficie de respuesta de la Figura 17B. El mapa de contorno indica que la región óptima se obtiene cuando el código del nivel de la agitación se encuentra en 1 y para la relación de sustratos en -1, lo que corresponde que los valores óptimos están alrededor de 400 rpm y una relación de sustratos 1:1, respectivamente.

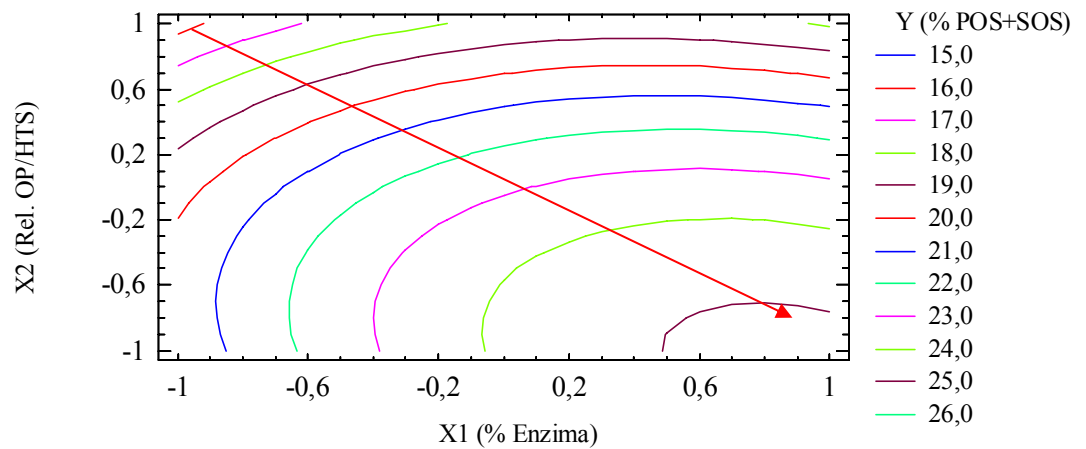
El modelo matemático, presentado en la Ecuación polinómica 3, predice que la mayor producción de los triacilglicéridos de interés se obtiene cuando la reacción de transesterificación enzimática se realiza con las variables evaluadas en los siguientes niveles:  $X_1 = 0,90$ ;  $X_2 = -1,10$  y  $X_3 = 1,10$  que corresponden a 10,50% de enzima, una relación de sustratos 1:1 (p/p) y velocidad de agitación 400 rpm.

**Figura 16.** **A)** Superficie de respuesta tridimensional **B)** mapa de contorno (dimensional) de las variables  $X_1$  y  $X_2$  en la producción de lo triacilgliceridos POS y SOS.

**A)**

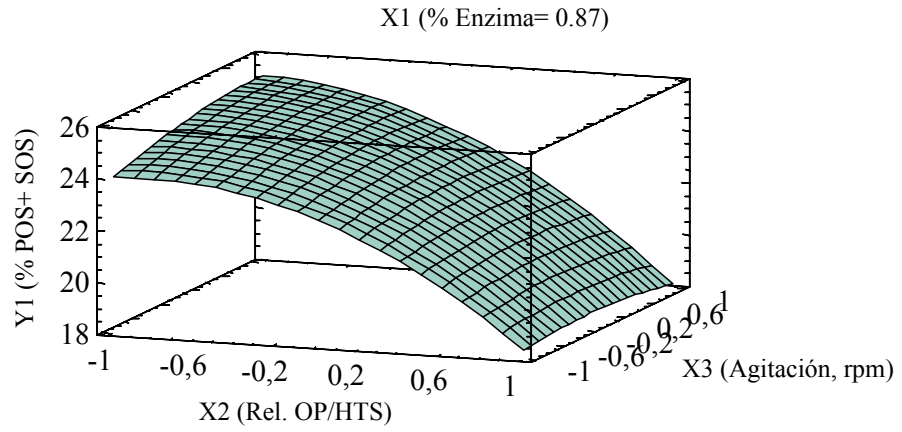


**B)**

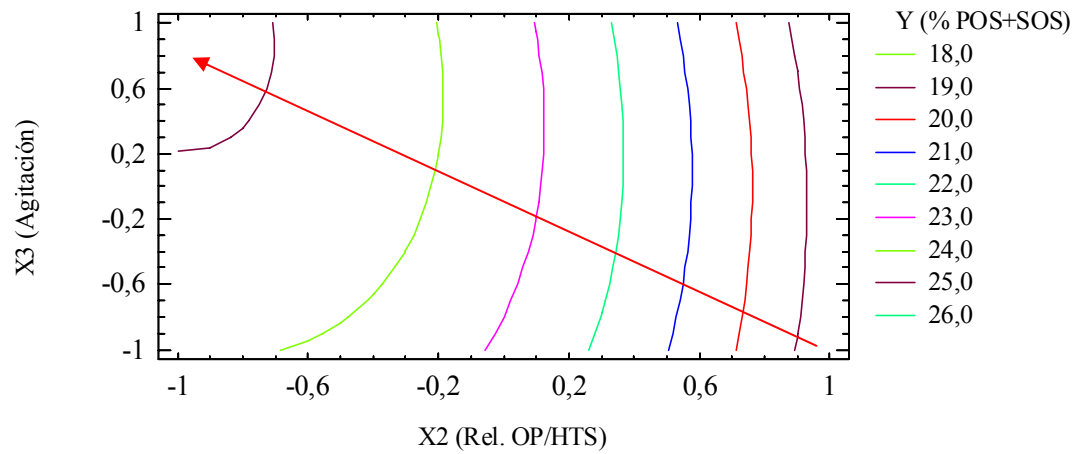


**Figura 17.** **A)** Superficie de respuesta tridimensional **B)** mapa de contorno (dimensional) de las variables  $X_2$  y  $X_3$  en la producción de lo triacilgliceridos POS y SOS.

**A)**



**B)**



Para la validación del modelo se realizó un experimento independiente, en las condiciones predichas como óptimas y los valores obtenidos se compararon con los valores estimados, los cuales obtuvieron sustituyendo los valores óptimos de las variables en la Ecuación 3. La verificación de los resultados (Tabla 17) revela que los resultados experimentales y los estimados son cercanos y reproducibles. Así el valor estimado para la  $\Sigma$  (POS +SOS) fue de 25,30% y el valor experimental 26,32%.

**Tabla 17.** Valores de la ( $\Sigma$  (POS +SOS) estimados y experimentales.

Valor de las variables independientes			Estimado <sup>b</sup>	Experimental <sup>c</sup>	
Enzima (g)	Rel. PO/HTS <sup>a</sup> (g/g)	Agitación (rpm)	% POS + SOS	% POS+ SOS <sup>c</sup>	%A <sup>d</sup>
5,24	25/25	400	25,20	26,32 ± 0.5	4,5

**a.** Base de cálculo para la mezcla de reacción 50 g; **b.** Valor estimado usando el modelo polinomial; **c.** Promedio ± SD de determinaciones de dos experimentos. **d.** Porcentaje de índice de acidez.

En la Tabla 18, se relacionan las condiciones óptimas encontradas para la reacción de transesterificación de la OP y HTS con Lipozyme TL IM. No es posible comparar estas condiciones, con otros trabajos, debido a que no se encontraron en la bibliografía reportes científicos, en los cuales se utilice esta mezcla de sustratos, ni esta enzima como catalizador, para el tipo de reacción desarrollado en esta investigación.

**Tabla 18.** Condiciones óptimas para el sistema OP – HTS con Lipozyme TL IM como catalizador.

Variable	OP + HTS
<b>Temperatura (°C)</b>	<b>70</b>
<b>Tiempo de reacción (h)</b>	<b>5,0</b>
<b>Cantidad de enzima</b> (% con respecto al peso combinado de aceites)	<b>10,50</b>
<b>Relación de sustratos (p/p)</b>	<b>1/1</b>
<b>Velocidad de agitación (rpm)</b>	<b>400</b>
<b>Cantidad de agua (%p)</b>	<b>--</b>
<b>Actividad hidrolítica (UI)</b>	<b>1.186</b>
<b>Producción de TAG`s (% POS + SOS)</b>	<b>26</b>
<b>Porcentaje de acidez (% A) grasa producto</b>	<b>4,5</b>

De otra parte, el índice de acidez (%IA) de las grasas producto de la transesterificación enzimática para cada una de los experimentos del diseño experimental, se observó que estos oscilaron entre 1,2% y 8.1%, valores que fueron obtenidos en los experimentos 14 y 15, que corresponden a aquellos en los cuales se emplearon la menor y la mayor concentración de enzima (0,3% y 14%), lo que indica que la acidez y la concentración de enzima son directamente proporcionales (Tabla 14), situación que debe considerarse con especial atención si se tiene en cuenta que a altas concentraciones de enzima, también es donde se alcanza la mayor formación e SOS y POS. A nivel industrial es deseable tener una alta concentración de POS y SOS pero con una baja acidez; razón por la cual es necesario hacer un balance entre estos dos parámetros. Sin embargo, lo deseado industrialmente es que la acidez de las grasas sea baja, y como se observa en la Tabla 14, los experimentos en los cuales se emplean concentraciones altas de enzima son las que tienen mayor rendimiento en la producción de los TAG`s POS y SOS en las grasas producto. Por lo tanto es necesario establecer un equilibrio entre estos dos parámetros. En este caso, en las condiciones de reacción seleccionadas el IA fue de 4,5%, valor moderado para trabajar en condiciones industriales.

#### **3.2.4 Evaluación de la variación de los principales TAG`s en el tiempo de reacción.**

Determinadas las condiciones óptimas de la reacción de transesterificación enzimática entre

la OP e HTS con Lipozyme TL IM, se realizó un seguimiento del comportamiento de la concentración de los principales TAG's con respecto al tiempo. Las Figuras 18A y 18B muestran que los principales cambios ocurrieron en los TAG's POO, POP, SSS y PSS, que son los de mayor concentración en la mezcla inicial de reacción presentando la más alta probabilidad de interacción entre sus moléculas. Estos TAG's disminuyen a medida que transcurre el tiempo, principalmente durante la primera hora de reacción, para luego mantenerse constante debido probablemente a que la enzima tiene su mayor actividad catalítica en este intervalo de tiempo.

Simultáneamente los principales TAG's que se formaron fueron el POS, SOS, SOO y PPS aumentando su concentración en el tiempo. Estos presentan una alta velocidad de formación y un máximo de producción en la primera hora de reacción, tiempo en el cual se alcanza el equilibrio. A partir de este momento la concentración de estos TAG's se mantiene constante en el tiempo, razón por la cual se puede establecer que una hora de reacción es suficiente para alcanzar los mayores valores de POS y SOS. En la Tabla 19, se registran las variaciones netas de los principales TAG's de la reacción de transesterificación de la OP e HTS, sus velocidades de formación y desaparición en una hora de reacción, tiempo en el cual se alcanza el equilibrio.

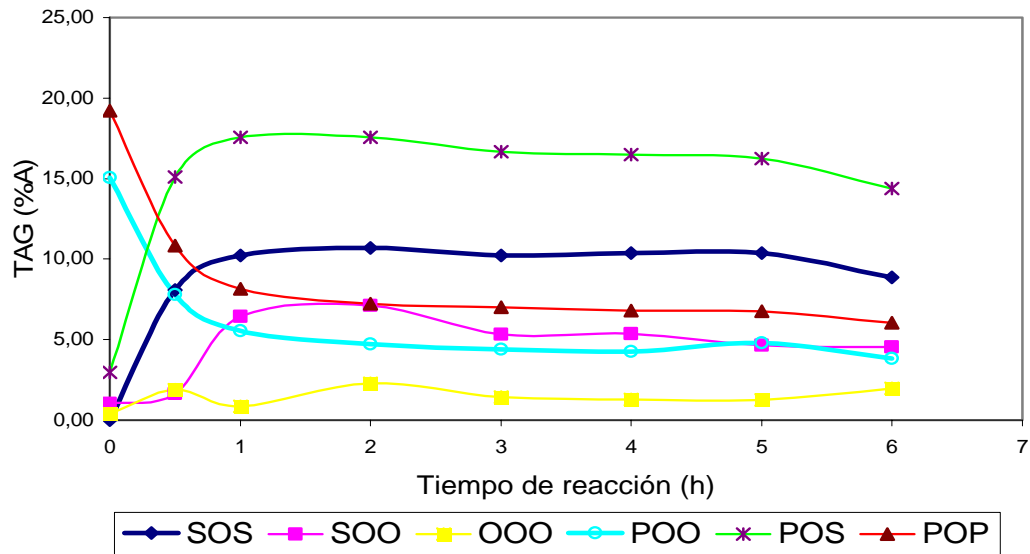
**Tabla 19.** Variaciones de las concentraciones de los principales triglicéridos de la reacción, producción neta, velocidades de formación y desaparición en la primera hora de reacción.

TAG (%)	Tiempo 0 h	Tiempo 1 h	Diferencia neta (%)	Velocidad (%TAG/h)
POP <sup>a</sup>	19,22	8,15	-11,07	-11,07
POO <sup>a</sup>	15,07	5,56	-9,51	-9,51
SSS <sup>a</sup>	28,44	8,80	-19,64	-19,64
PSS <sup>a</sup>	19,40	17,47	-1,93	-1,93
PPS <sup>b</sup>	3,58	11,61	8,03	8,03
POS <sup>b</sup>	2,96	17,56	14,60	14,60
SOS <sup>b</sup>	0,00	10,23	10,23	10,23
SOO <sup>b</sup>	1,05	6,45	5,40	5,40

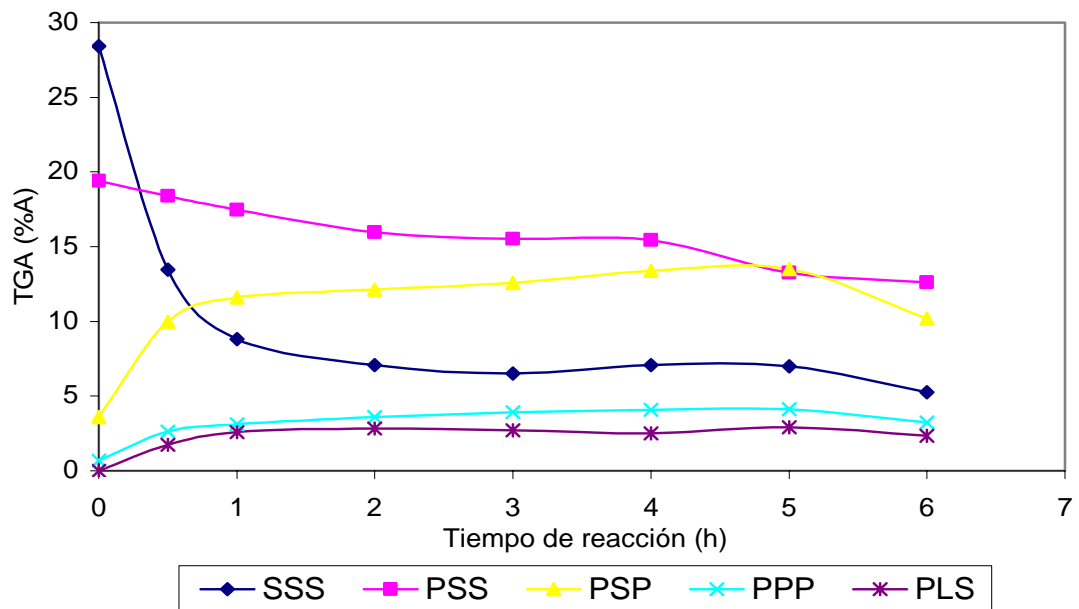
**a.** TAG's que disminuyen su concentración en el tiempo. **b.** TAG's que aumentan su concentración en el tiempo.

**Figura 18.** Variación de la concentración de los TAG's en el tiempo de reacción de transesterificación **A)** insaturados y **B)** Saturados.

**A)**

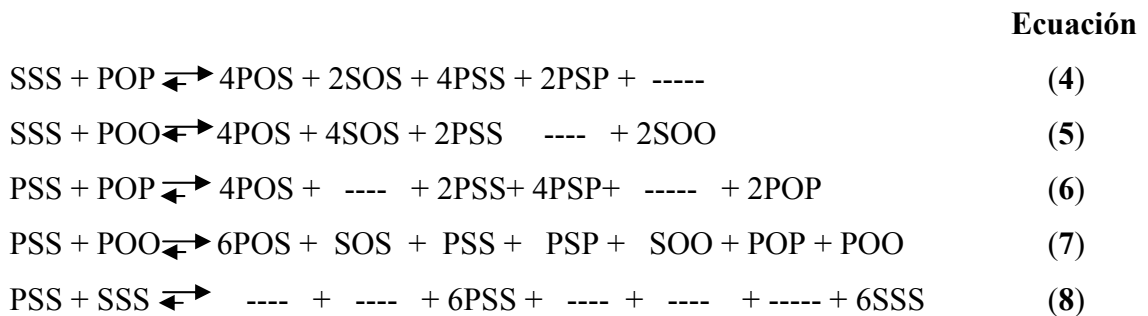


**B)**



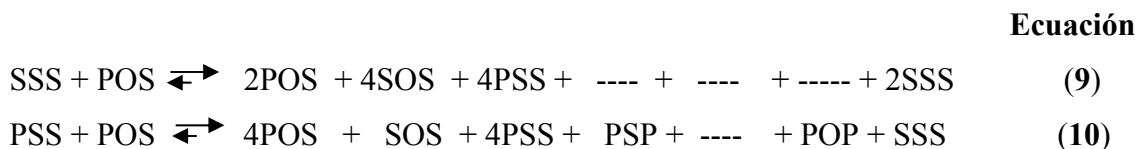
La producción de los TAG's POS y SOS proviene del intercambio de los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de la molécula de glicerol, entre los triacilglicéridos POP, POO provenientes de la OP, y PSS, SSS provenientes del HTS.

Las siguientes ecuaciones registran las posibles interacciones de estos TAG's e intercambio de sus ácidos grasos como también la probabilidad de formación de los productos, teniendo en cuenta la especificidad de la enzima.



Las ecuaciones 4-8 señalan que la probabilidad de formación del POS es mayor que la de SOS, coincidiendo con los resultado reportado en la Tabla 19, donde la producción de POS fue de un 4,37% superior al del SOS, ya que para formar el POS, la enzima necesita incorporar un molécula de ácido esteárico en una de las dos pociones de los TAG's POP y POO; mientras que para el SOS necesita que se incorpore un ácido esteárico y luego el otro. Esto indica que la enzima no hidroliza las posiciones 1 y 3 al mismo tiempo, pues si fuera así se formaría mayor cantidad de SOS.

El POS sufre una leve disminución al servir como base para la producción de SOS, como lo muestran las ecuaciones 9 y 10.



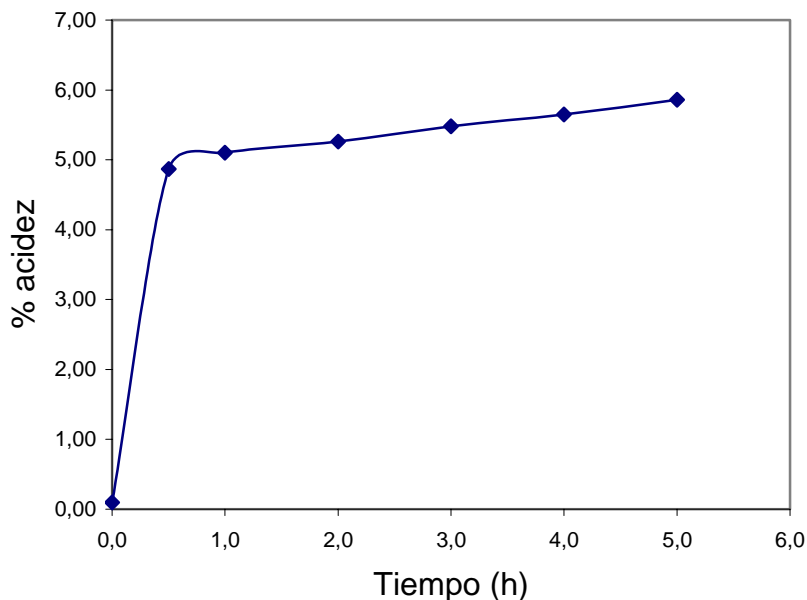
Se esperaría que el PSS disminuyera su concentración como lo hace el SSS, pero su concentración que en la mezcla inicial es de 19,40% disminuye tan solo 1,93% en la primera hora de reacción. Esto es debido probablemente a que este triacilglicérido

desaparece al aportar el ácido esteárico y al mismo tiempo se forma como subproducto de la transesterificación del SSS.

En las ecuaciones anteriores se observa que el PSP es un subproducto tanto de PSS como del SSS, aumentando su concentración en el tiempo.

El índice de acidez también varía con el tiempo de reacción. En la Figura 19, se observa el comportamiento de este parámetro. Su aumento es debido a que la reacción de transesterificación no es completa, lo que significa que en el medio de reacción se encontraran ácidos grasos libres que elevan la acidez. La mayor variación del índice de acidez ocurre en los primeros 30 minutos, donde alcanza valores de 4,87%, para luego disminuir, lo que indica que la enzima tiene su mayor actividad hidrolítica en este lapso de tiempo.

**Figura 19.** Variación de la acidez con respecto al tiempo de reacción



**3.2.5 Fraccionamiento y caracterización de la grasa producto de reacción.** El producto de la reacción de transesterificación enzimática de la OP e HTS con Lipozyme TL IM previamente neutralizado, fue sometido a un proceso de fraccionamiento y sus fracciones caracterizadas en cuanto a contenido de ácidos grasos y triacilglicéridos. En las Tabla 20A y 20B se relacionan los resultados obtenidos.

*Fracción uno o estearina (F1):* es la grasa con mayor rendimiento representando el 40,13% del total de la grasa transesterificada. Es obtenida por el fraccionamiento de esta con hexano a 4°C. Esta fracción presenta el rango de fusión más elevado, debido a que en ella predominan los TAG's SSS (16,26%), PSS (35,21%), PPP (6,40%), PPS (25,07%) que representan el 82,94% del total de la fracción. Las concentraciones de ácido esteárico y ácido palmítico son las más altas con un 57,3% y 32,11% respectivamente, comparadas con las otras dos fracciones. El comportamiento de fusión de esta grasa indica que a 40 °C el contenido de grasa sólida es de aproximadamente del 90% (Figura 20), por lo cual, se puede utilizar como grasa base para la fabricación de margarinas y “shortening”.

*Fracción dos ó fracción media (F2):* es la fracción que presentó el menor rendimiento con un 24,27%. Tiene un punto de fusión intermedio y es sólida a temperatura ambiente. La composición en ácidos grasos es similar a la MC con una concentración de 21,31% para palmítico, 38% para esteárico y 30,95% para el oleico, siendo el ácido esteárico superior en un 8 %.

Esta constituida principalmente por los TAG's POP (9,20%), POS (27,13%), y SOS (20,70%), que representan el 57,03 % del total de los TAG's. La concentración de POP y de POS es 10,44% y 10,63% menor que la MC respectivamente, mientras que la concentración de SOS en la F2 es 0,6% superior. Sin embargo, su composición en TAG's es la más similar a la de la MC.

**Tabla 20.** A) Composición en ácidos grasos (%) B) composición en acilglicéridos (%) del producto de reacción, sus fracciones y la manteca de cacao.

**A)**

Ácido graso	OP	MC	MI	PR	F1	F2	F3
Laurico	---	--	0,39	0,26	0,15	0,29	2,16
Mirístico	1,1	--	0,58	0,53	0,52	0,52	0,56
Palmítico	38,0	27,7	25,21	25,77	32,11	21,31	20,73
Estearico	4,7	32,0	43,87	43,62	57,3	38,00	29,46
Oleico	44,9	37,0	24,12	23,25	5,86	30,95	36,19
Linoleíco	10,8	0,4	5,05	5,74	1,2	7,02	9,03
Araquidónico	--	0,9	0,47	0,50	0,62	0,45	0,35

OP: oleína de palma; MI: mezcla Inicial; PR: producto de reacción; F1: fracción uno1; F2: fracción media; F3: fracción 3.

**B)**

ACG	OP	MC	MI	PR	F1	F2	F3
MAG	0,5	3,80	0,90	12,56	--	0,16	0,43
DAG	5,88	5,23	0,47	--	3,03	1,76	5,28
DES	--	--	--	0,57	0,60	0,68	0,48
PPP	0,5	0,23	0,69	3,46	6,40	2,02	0,71
MOP	--	--	1,06	0,58	0,00	0,82	1,24
PSP	--	--	3,58	11,87	25,07	4,10	0,77
POP	34,84	19,83	19,22	6,42	1,41	9,20	12,53
PLP	--	--	3,01	1,18	0,23	1,76	2,68
PSS	--	0,23	19,40	14,87	35,21	3,80	0,00
POS	5,29	37,57	2,96	16,29	4,87	27,13	26,83
POO	29,33	2,88	15,07	3,86	0,39	5,52	9,08
PLS	--	--	--	3,19	0,70	4,94	6,02
PLO	--	--	2,72	1,42	0,00	2,10	3,77
SSS	--	--	28,44	6,04	16,26	1,44	0,00
SOS	--	20,10	--	10,33	4,12	20,70	13,30
SOO	1,91	2,69	1,05	4,87	0,53	7,45	11,48
OOO	2,70	0,85	0,39	1,34	0,47	3,14	2,66
DES	--	--	--	1,13	0,46	3,30	1,62
DES	--	--	--	--	--	--	4,40
<b>% R</b>				<b>100</b>	<b>40.13</b>	<b>24.27</b>	<b>32.71</b>

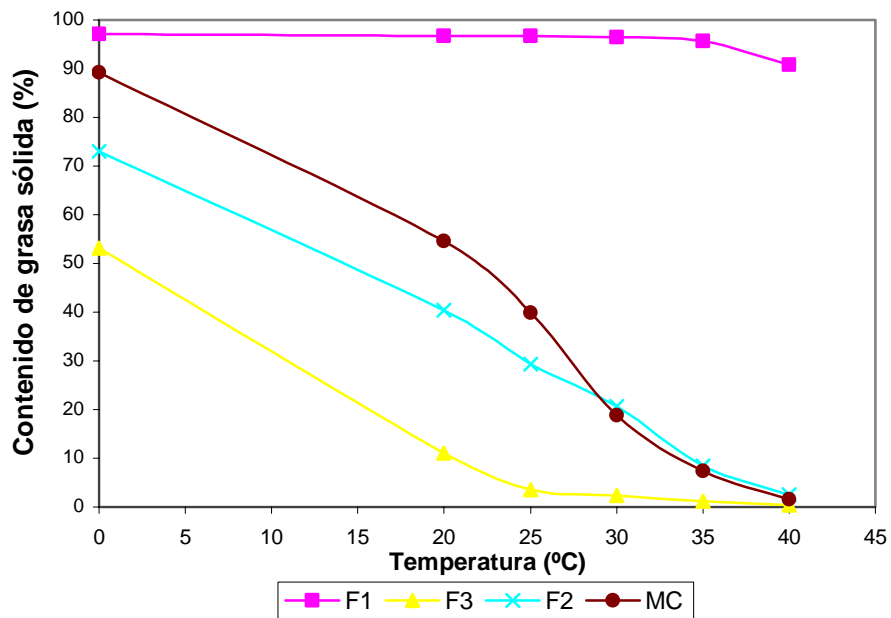
OP: oleína de palma ; MC: manteca de Cacao MI: mezcla inicial (OP/HTS); PR: producto de reacción; F1: fracción uno (estearina); F2: Fracción dos (media); F3: Fracción tres (oleína); % R: porcentaje de rendimiento (%p/p).

Estas diferencias entre la fracción 2 y la manteca de cacao se reflejan en las curvas de sólidos (Figura 20), en donde se aprecia que el contenido de sólidos en el rango de temperaturas de 0 °C a 30 °C es más bajo que en la manteca de cacao, sin embargo, presenta la misma pendiente, lo que la hace una grasa más blanda; mientras que en el rango de temperatura de 30 a 40 °C su comportamiento de fusión es igual al de la MC, permitiendo que funda en la boca humana de la misma forma. Ésta fracción presenta un rango plástico de 9,5 °C.

*Fracción tres (F3):* el rendimiento de esta fracción fue de 32,71%. Es la fracción de menor punto de fusión, es líquida a temperatura ambiente. Al igual que en la fracción anterior presenta como principales TAG`s POP (12,53%), POS (26,83%) y SOS (13,30%). La presencia de estos TAG`s en esta fracción, refleja que el proceso de filtración a nivel de laboratorio no fue muy eficiente. Esta situación se puede mejorar al escalar el proceso a nivel industrial, donde el proceso de cristalización y fraccionamiento en seco es más efectivo (Perea y col., 2004).

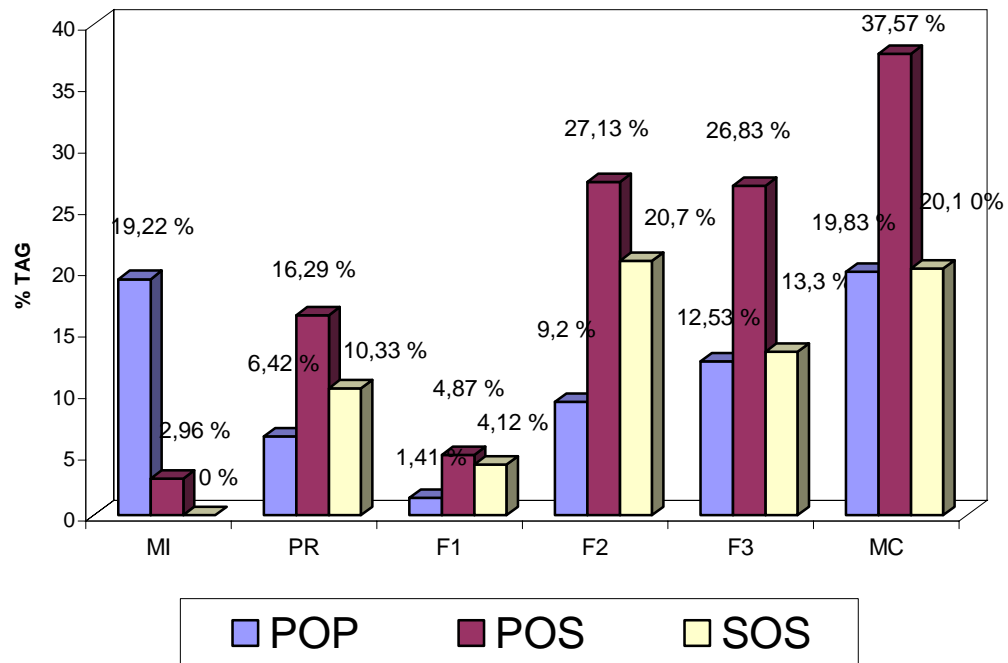
El rango plástico de esta fracción es de 9,5 °C, y por su bajo contenido de grasa sólida entre 30° y 40 °C (Figura 20), esta grasa se puede utilizar en la fabricación de margarinas y “shortening”.

**Figura 20.** Perfiles de contenido de grasa sólida de F1, F2, F3 y de la MC.



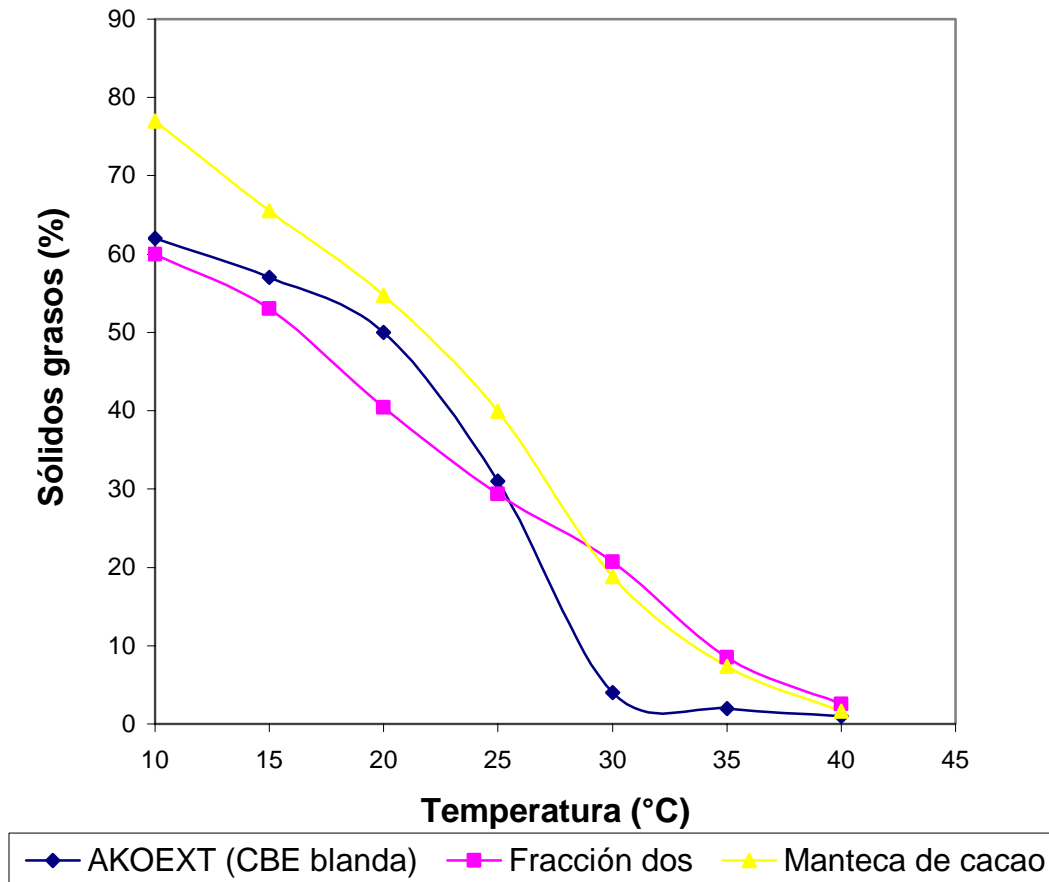
En la Figura 21, se observa una gráfica de barras que representa el porcentaje de área de los TAG's POP, POS y SOS de la MI, PR, F1, F2, F3 y de la MC, donde se observa que la F2 y F3 son las grasas que más acercan a la composición de TAG's de la MC. Como se mencionó anteriormente un mejoramiento del proceso de fraccionamiento, permitirá aumentar el contenido de POP, POS y SOS de la fracción dos y por tanto su rendimiento.

**Figura 21.** Composición (% área) de los triacilglicéridos POS y SOS en la mezcla inicial, producto y fracciones de la reacción de transesterificación y la manteca de cacao.



En la Figura 22, se comparan las curvas de sólidos de la manteca de cacao, de la fracción 2 (F2) y la del producto comercial AKOEXT producido por la empresa Karlshamns por mezclas físicas y considerado un equivalente blando de la manteca de cacao comercial. La fracción 2 aunque presenta un menor contenido de grasa sólida tiene la particularidad de fundir como la manteca de cacao en el rango de temperatura de 30 y 40 °C. Sin embargo en el rango entre 15-25 °C presenta un contenido de sólidos menor en los dos casos, por lo cual es necesario enriquecerla en TAG's de mayor punto de fusión (POP), para aumentar el contenido de sólidos y de ésta forma obtener el equivalente.

**Figura 22.** Comportamiento de fusión de un equivalente comercial, la fracción dos y la manteca de cacao.

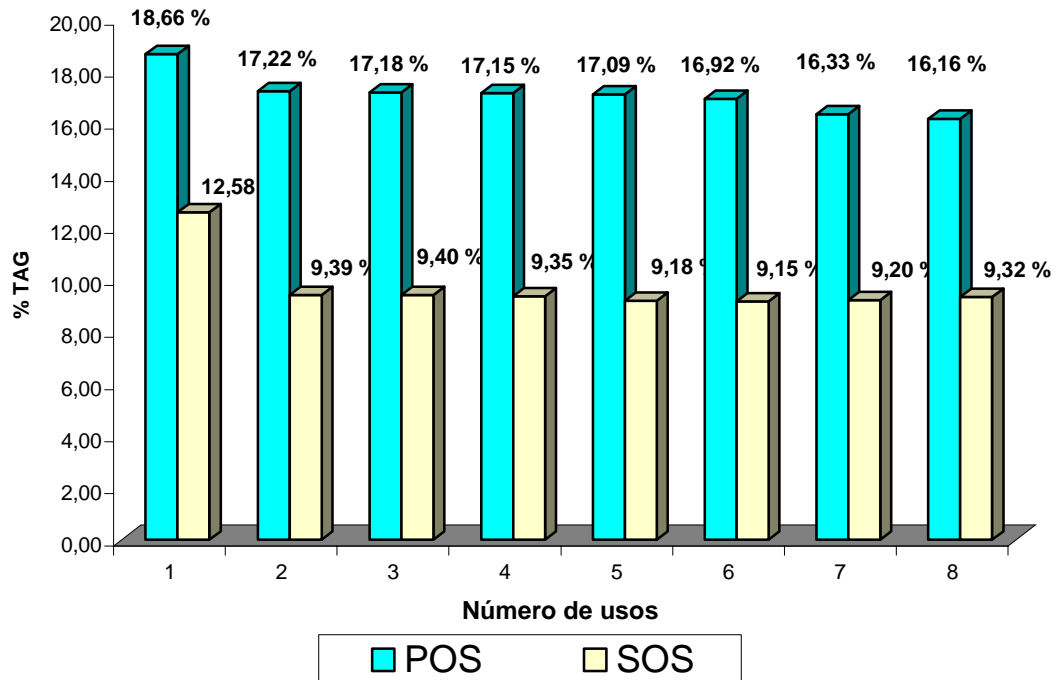


**3.2.6 Estabilidad operacional de la enzima.** El estudio de la estabilidad operacional de la enzima Lipozyme Tl IM es importante desde el punto de vista comercial, influye directamente en los costos de producción. Por esta razón, se realizaron ocho reacciones de transesterificación enzimática de la OP e HTS por lotes, en las condiciones seleccionadas como óptimas, recuperándose la enzima y renovando cada cinco horas (5h) con sustrato fresco.

En la Figura 23, se muestra la variación del contenido de los principales TAG's POS y SOS en cada experimento. Los cambios más bruscos se observan entre el primer y el

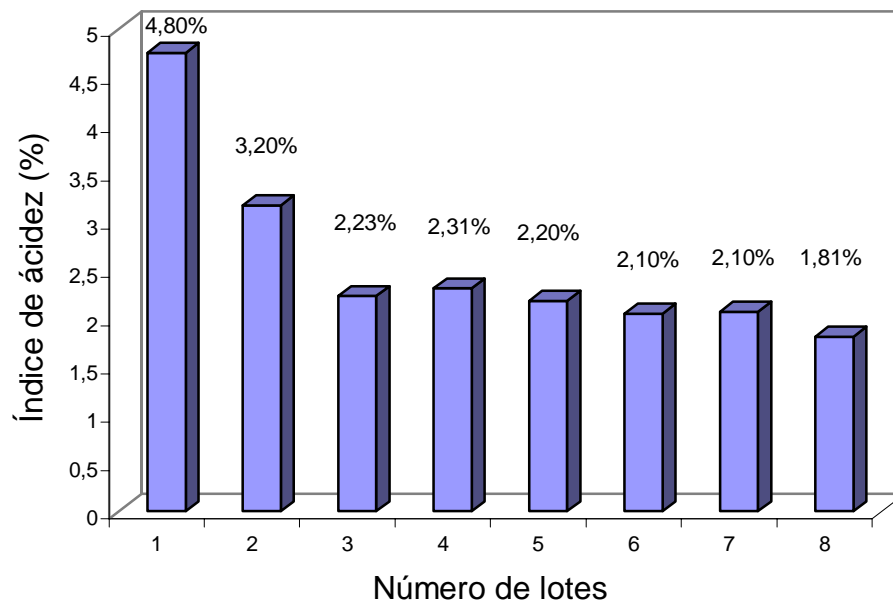
segundo uso, en el cual la disminución de estos triacilgliceridos fué de 7,7% y 18,5% respectivamente. A partir del tercer uso la concentración permanece prácticamente constante.

**Figura 23.** Estabilidad operacional de la enzima Lipozyme TL IM a 70 °C.



En cuanto al índice de acidez, se observó que este también disminuye con el tiempo de uso de la enzima (Figura 24) de 4,80% en el primer lote, hasta 1,81% en el octavo lote. La disminución de la acidez y de la producción de TAG's es indicio de la disminución de su actividad hidrolítica, debido posiblemente a que el agua que contiene la enzima disminuye con la adición del sustrato nuevo.

**Figura 24. Variación del Índice de acidez con el uso de la enzima**



La enzima sin embargo presenta alta estabilidad considerando las condiciones de reacción de temperatura 70 °C, velocidad de agitación 400 rpm y tiempo de reacción 5h. Esta característica de estabilidad operacional y disminución de la acidez en cada reutilización, sumado al tiempo real de una hora de reacción para alcanzar niveles de POS y SOS adecuados, se pueden aprovechar para efectuar la reacción de transesterificación enzimática en procesos continuos, en donde la enzima se encuentre en forma empacada y el sustrato este recirculado durante el tiempo de reacción a una velocidad determinada.

Los proveedores de la enzima sugieren un pretratamiento a la misma que consiste en realizar un primer lote durante 30 minutos que se descarta antes de iniciar los procesos definitivos con el fin de disminuir el índice de acidez en la grasa producto de los siguientes lotes.

Finalmente, los resultados obtenidos de la ejecución de este trabajo permitieron establecer que la ruta de transesterificación para obtener equivalentes de la manteca de cacao a partir de oleína de palma e hidrogenado total de soya en las condiciones seleccionadas y en

presencia de Lipozyme TL IM, puede ser más efectiva que la ruta seguida por Arango y col., (2004) quienes utilizaron oleína de palma e hidrogenado total de palma pero con Lipozyme RM IM como catalizador, debido a que el HTS es mejor fuente de ácido esteárico, la reacción se realiza en ausencia de agua y la Lipozyme TL IM resultó ser más estable y generar menores valores de IA cuando la enzima es reutilizada.

Adicionalmente, la Lipozyme TL IM aún cuando se utiliza en una concentración 5 veces superior, tiene en el mercado un costo 6 veces menor al de la Lipozyme RM IM. En cualquier caso, se requiere continuar los estudios con la Lipozyme TL IM, a escala de planta piloto, para optimizar los procesos de fraccionamiento que podrán llevar a la obtención de una grasa más dura con características similares a la manteca de cacao.

#### **4. CONCLUSIONES**

- Para la reacción de transesterificación se seleccionó el hidrogenado total de soya como fuente de ácido esteárico por permitir la mayor producción de POS y de SOS en los productos transesterificados.
- Las condiciones óptimas seleccionadas para realizar la reacción de transesterificación enzimática de la OP e HTS, aplicando la metodología de superficie de respuesta fueron: cantidad de enzima, 10.50 % de peso combinado de sustratos; relación OP/HTS 1:1 (p/p), velocidad de agitación 400 rpm, a temperatura de 70 °C en un tiempo de reacción de 5 horas. En estas condiciones se obtuvo una grasa con una concentración aproximada de los TAG's POS y SOS de 16,30 y 10,23 % respectivamente y un índice de acidez de 4.5%.
- El monitoreo de la variación de la concentración de los triacilglicéridos que desaparecen y los que se forman con el transcurso de la reacción, permitió establecer que una hora de reacción es suficiente para formar la mayor concentración de los TAG's POS y SOS. Lo anterior, es de vital importancia para llevar a cabo la reacción en procesos continuos.
- El fraccionamiento con solvente de la grasa transesterificada generó tres fracciones (F1, F2 y F3) con propiedades físicas y químicas diferentes a los sustratos de partida (oleína de palma e hidrogenado total de soya) y a la grasa transesterificada. De éstas, la fracción 2 (F2) con un rendimiento del 24,27 %, presentó una composición de los TAG's POS y SOS cercana a la de la manteca de cacao, pero una composición en POP baja, lo que hace que sea blanda en el rango de 0 a 30 °C, aún cuando funde igual a la manteca de cacao en el rango de 30 a 40 °C.
- La fracción tres es una grasa líquida a temperatura ambiente y presentó una composición considerable de los triacilglicéridos POS y SOS indicando que el proceso de filtración a escala de laboratorio no fue eficiente.

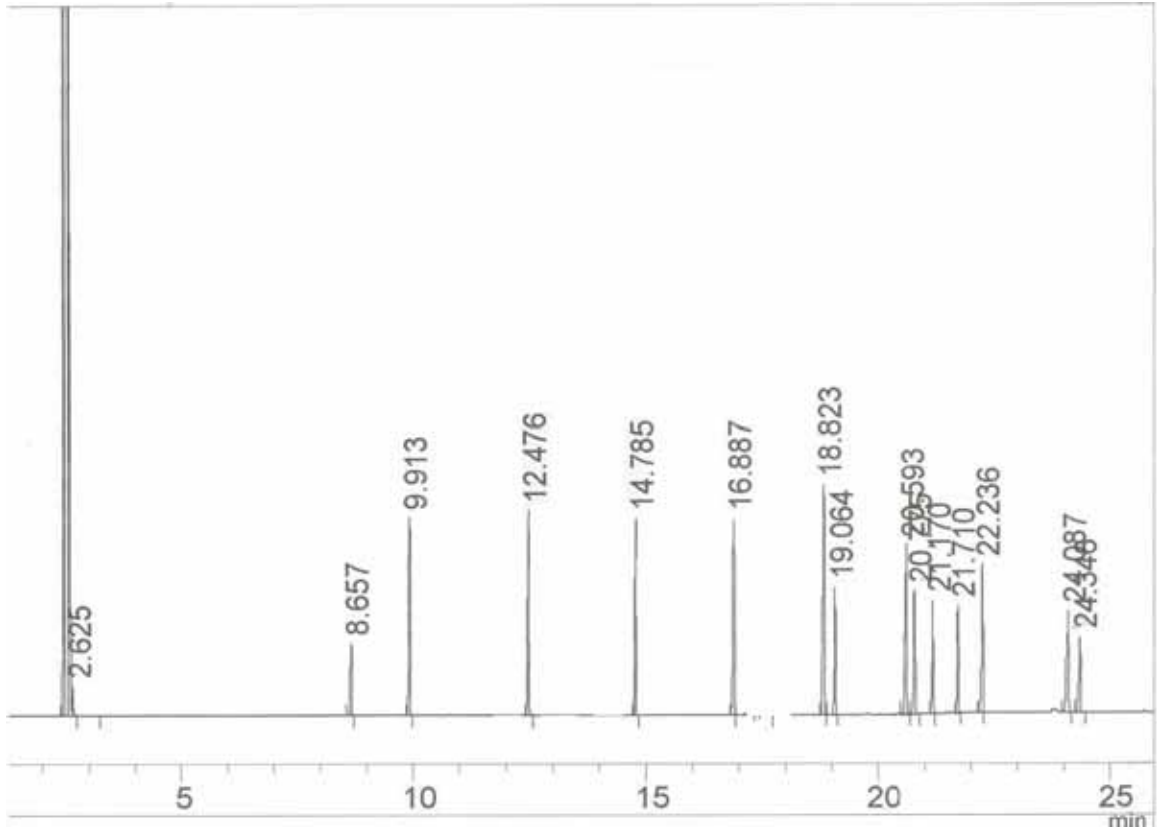
- Los resultados de la estabilidad operacional indicaron que la enzima no presenta pérdida significativa de su actividad, durante ocho usos, por lo cual se puede considerar que es estable.
- La Lipozyme TL IM es una enzima con alto potencial en la obtención de equivalente de la manteca de cacao por su estabilidad y costo.

## ***5. RECOMENDACIONES***

- Escalar el proceso de transesterificación a escala de planta piloto y optimizar las etapas de cristalización y fraccionamiento en seco para enriquecer la fracción 2 en los TGA's POP, POS y SOS.
- Profundizar en el estudio cinético de la reacción para poder escalar el proceso de un sistema en discontinuo a un sistema en continuo, utilizando como Lipasa la Lipozyme TL IM.
- Evaluar la fracción media del aceite de palma como materia prima para las reacciones de transesterificación pero utilizando como enzima la Lipozyme TL IM.

# **Anexos**

**Anexo 1. Perfil cromatográficos de la mezcla de patrones de FAMES y triacilglicéridos.**



**Figura 25.** Perfil cromatográfico de metil ester de ácidos grasos componentes de patrón Cat. N°. 18918-1 AMP.

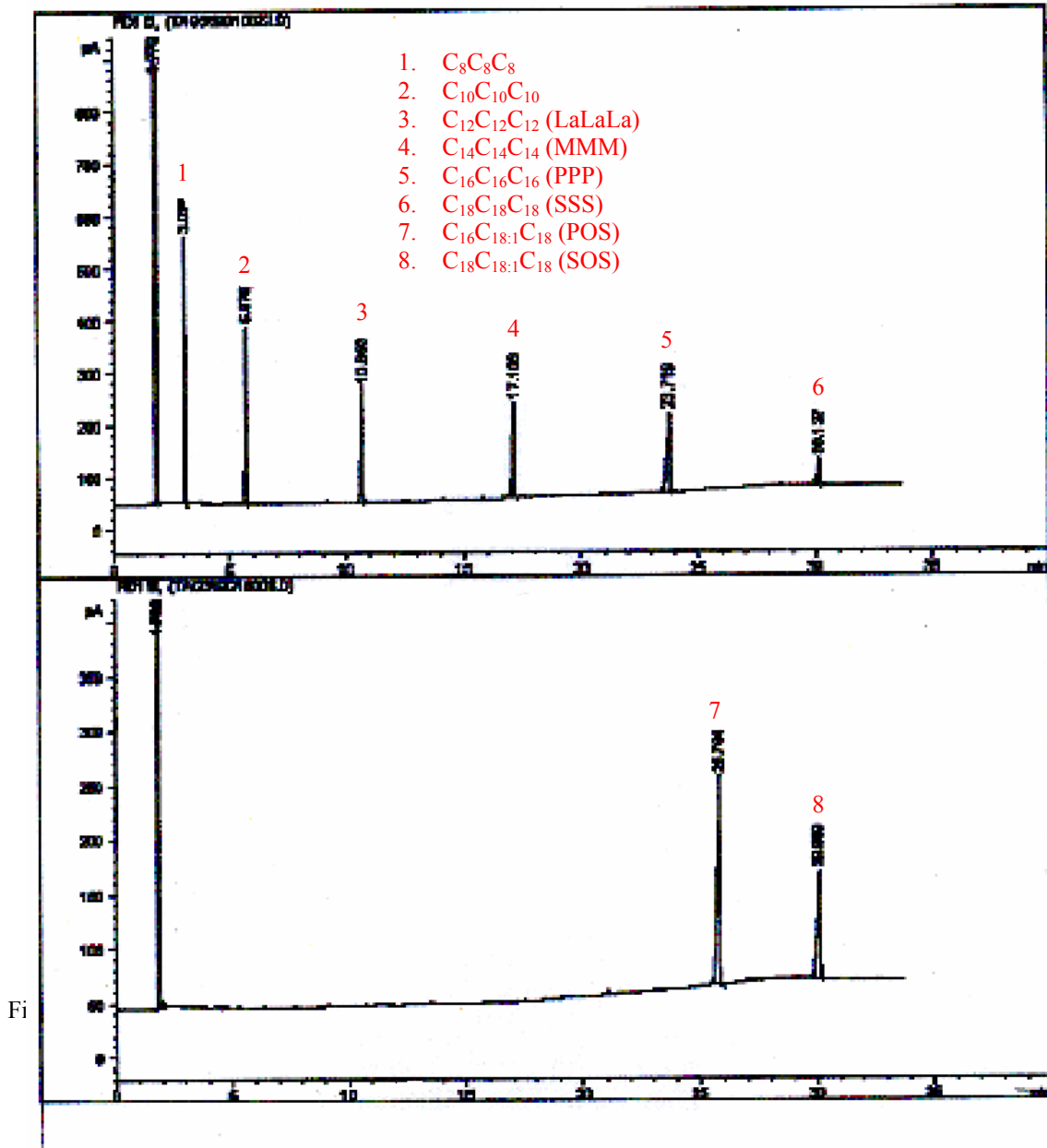
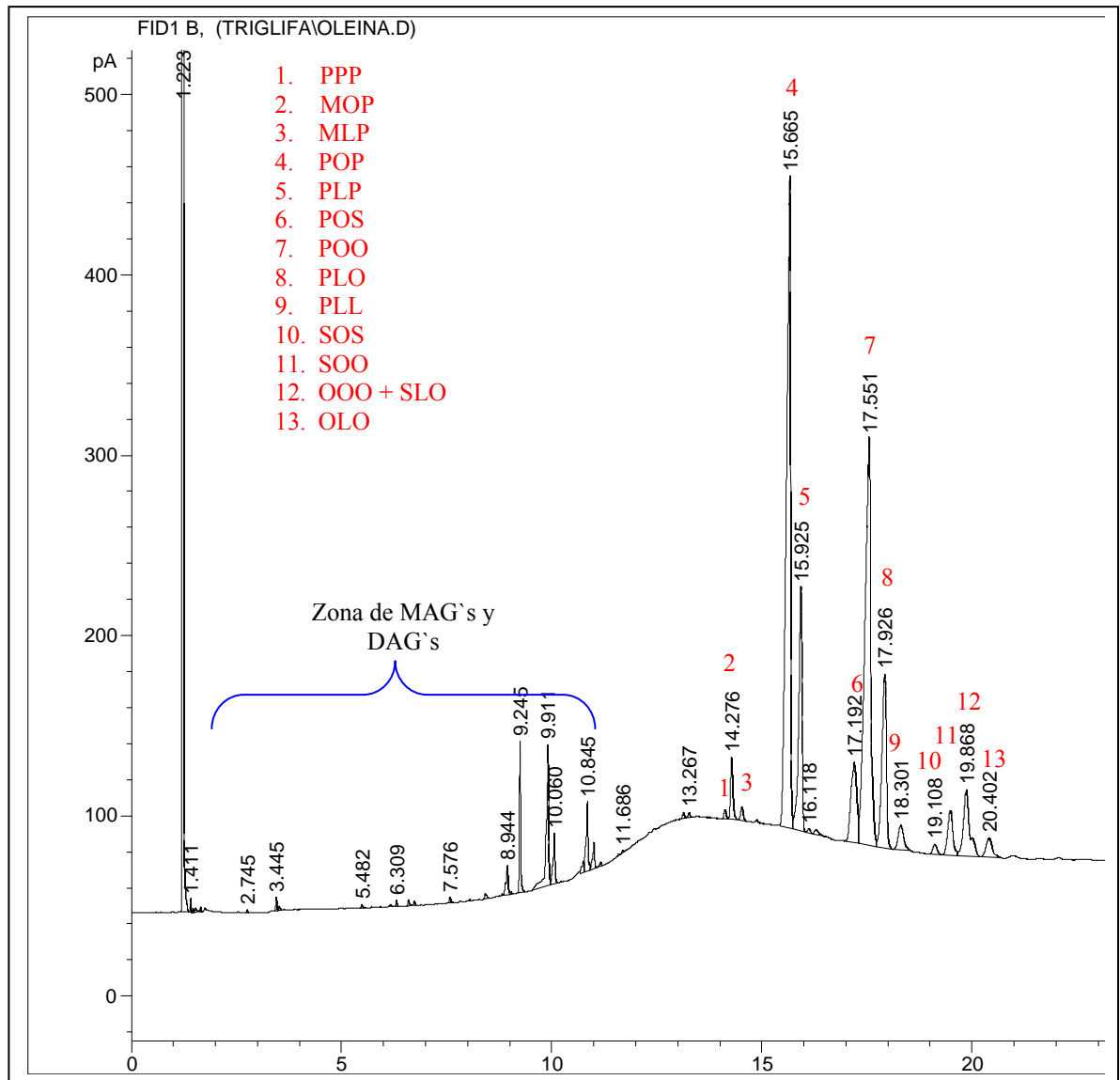


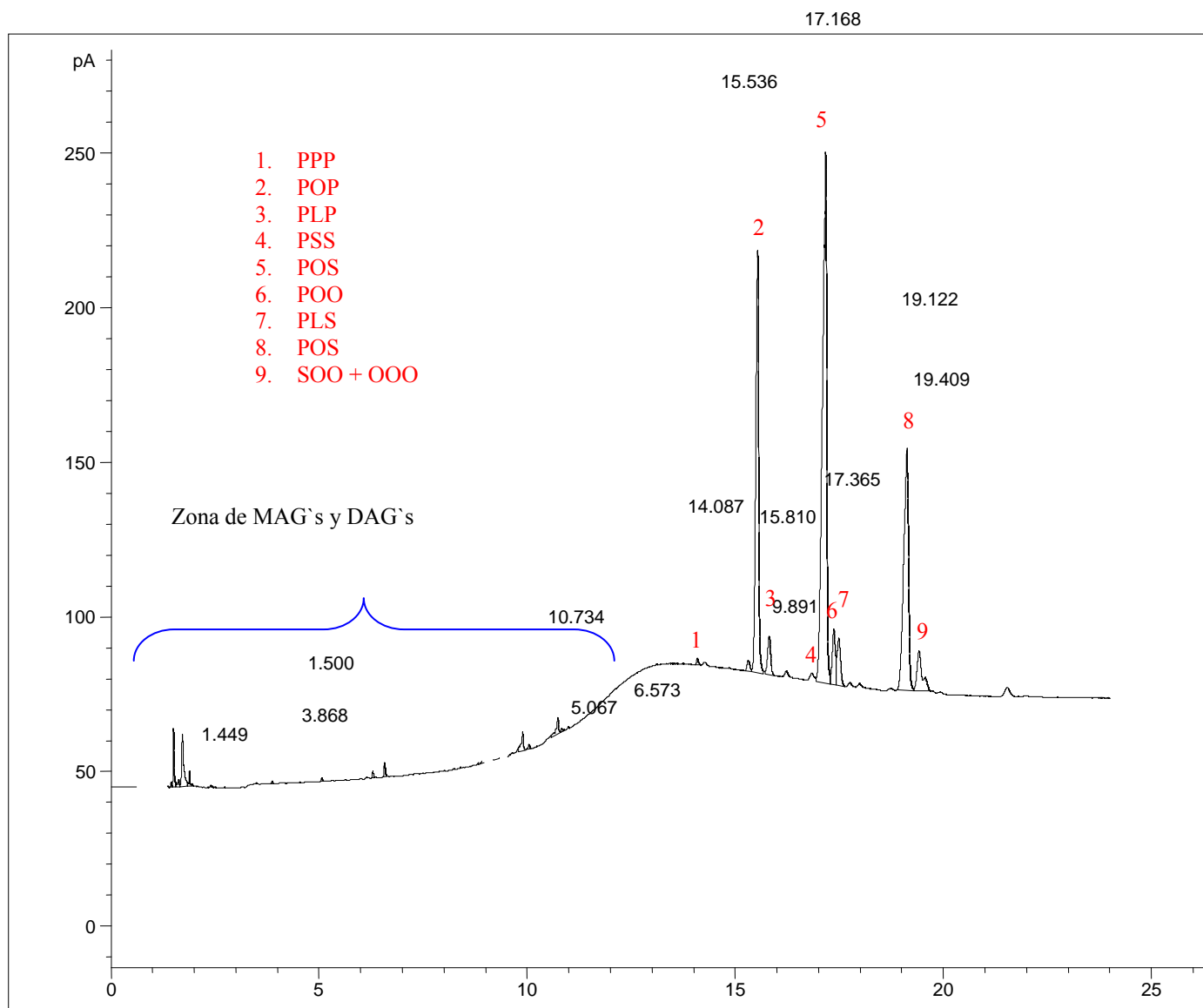
Figura 26. Perfil cromatográfico de una mezcla patrón de triacilgliceridos.

**Anexo 2. Perfil cromatográfico de la composición en ACG's de la OP, HTP, HTS y la MC.**



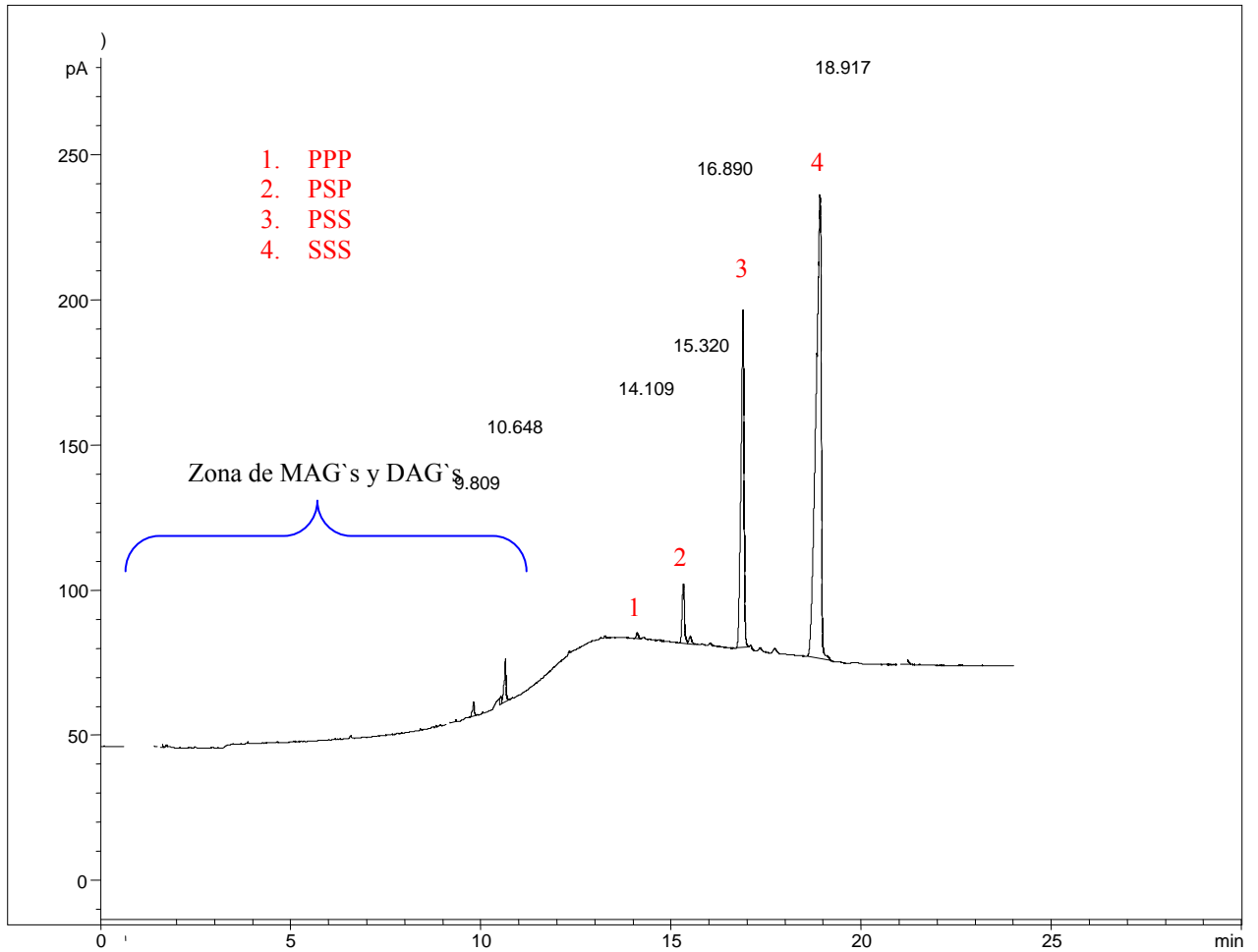
**Figura 27.** Perfil cromatográfico de acilglicéridos de la oleína de palma

En este cromatograma se observa que el POP, el POO son los principales triacilglicéridos de la oleína de palma, que corresponde a los picos 4 y 7.



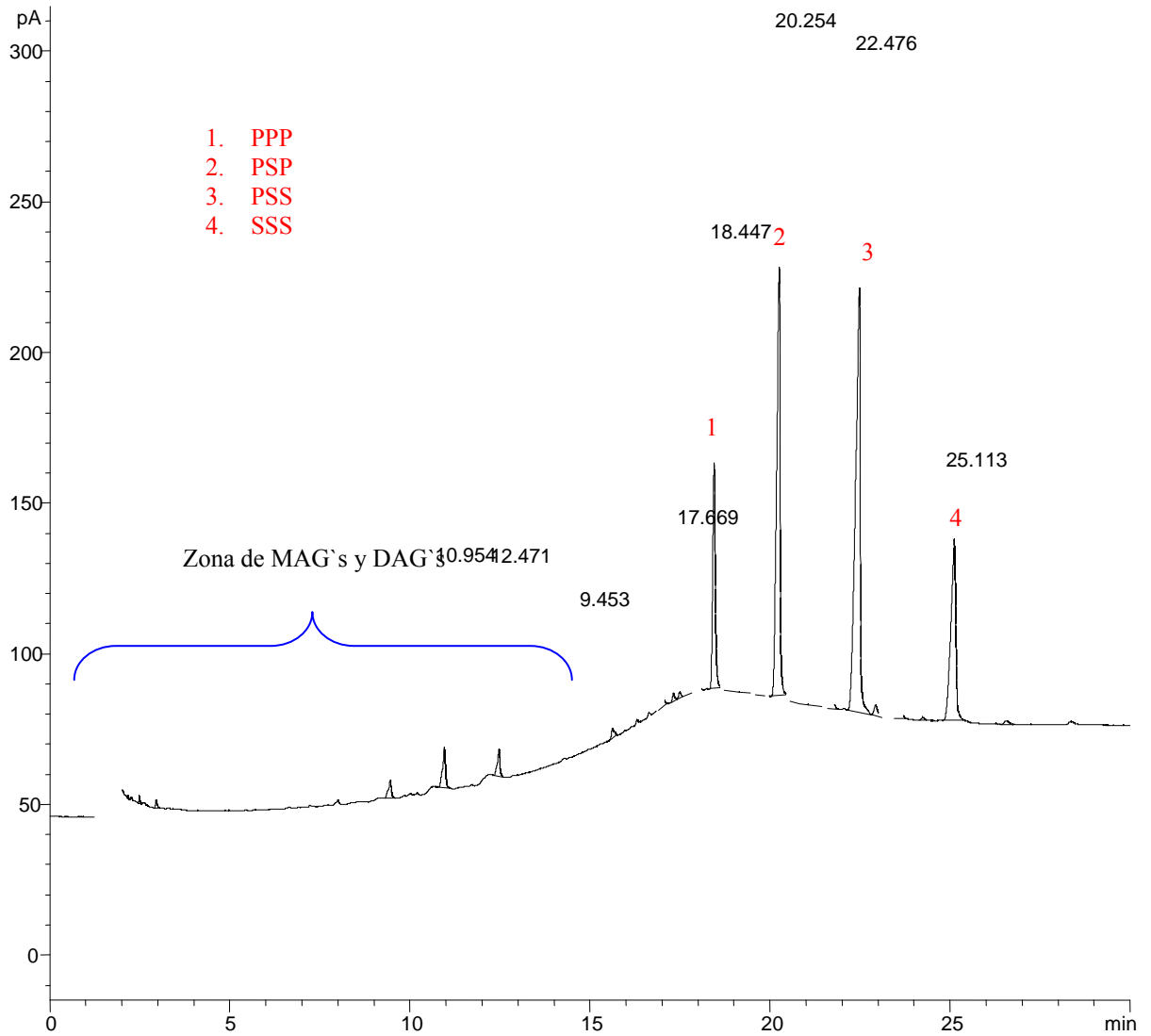
**Figura 28.** Perfil cromatográfico de acilglicéridos de la manteca de cacao.

En la Figura 28, se muestra el perfil cromatográfico de los ACG's de la manteca de cacao, donde se observa que el POP, POS y SOS son sus principales triacilglicéridos que corresponden a los picos 2, 5 y 8 respectivamente.



**Figura 29.** Perfil cromatográfico de acilglicéridos del hidrogenado total de soja (HTS)

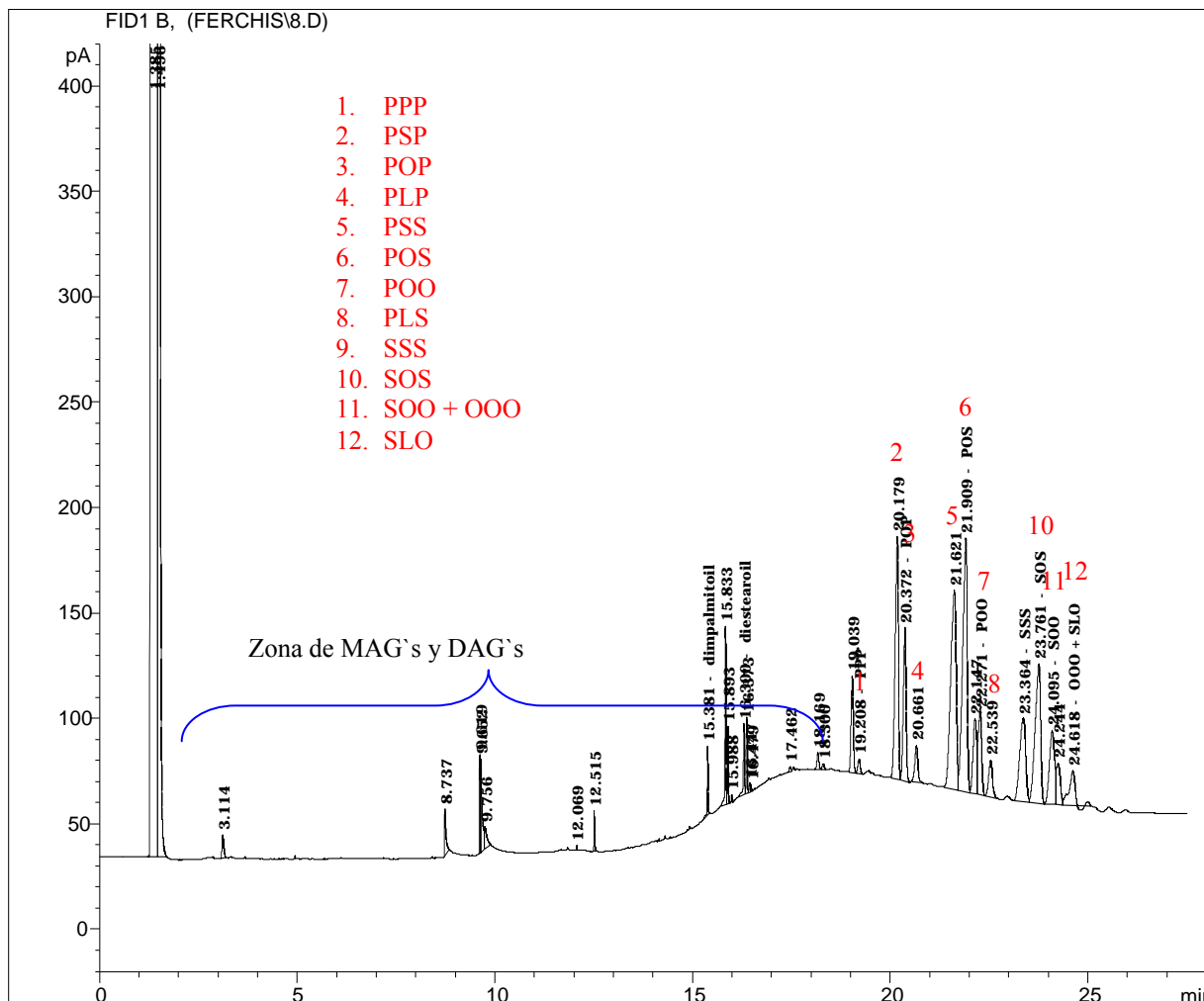
En la Figura 12, se observa que el HTS está compuesto principalmente por los triacilglicéridos PSP, PSS y SSS, que corresponden a los picos 2,3 y 4 respectivamente. La mayor proporción es para el SSS.



**Figura 30.** Perfil cromatográfico de acilglicéridos del hidrogenado total de palma (HTP).

El HTP, esta compuesto principalmente por PPP, PSP, PSS y SSS, como se observa en la Figura 30.

**A3. Perfil cromatográfico de la grasa producto de la transesterificación enzimática de la OP e HTS con Lipozyme TL IM en las condiciones óptimas**



**Figura 31.** Perfil cromatográfico de ACG's de la grasa producto de la reacción de transesterificación entre la OP e HTS con Lipozyme TL IM, llevada a cabo en las condiciones óptimas.

En este cromatograma se observa el incremento de los picos 6 y 10 que corresponden al POS y SOS respectivamente.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ARANGO, Luz María. Producción a Escala de Planta Piloto de Productos Equivalentes de la Manteca de Cacao a Partir de la Oleína de Palma por Interesterificación Enzimática. Tesis de Maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. 2004.
2. ARISHIMA, T; SAGI, N; MORI, H. and SATO, K. Polymorphism of POS. 1. Occurrence and Polymorphic Transformation. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68 No. 10. (October, 1991); p. 710-715.
3. ARONHINE, J.S; SARIG, S. and GARTI, N. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 65. No. 7. (1988); p. 1140-1142.
4. BADUIT DERGAR, Salvador. Química de los alimentos Tercera edición. Alambra Mexicana. México, 1993. Pag. 213-277.
5. BASHEER, S; SNAPE, J.B; MOGI, K. and NAKAJIMA, M. Transesterification Kinetics of Triglycerides for a Modified Lipase in n-Hexane. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 72, No. 2 (1995); p. 231. 237.
6. BASHEER, Sobni., MOGI, Ken-ichi., and NAKAJIMA, Mitsutoshi. Interesterificación Kinetics of Triglycerides and Fatty Acids With Modified Lipase in n.Hexane. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 72. No. 5 (1995); p. 511-518.
7. BELITZ H. D. And GROSCH W. Química de los alimentos. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza (España), 1997. Pág. 175-266.

8. BERGER, Kurt. Palm Oil Products Why y How to Use Them. Food Technology. Vol. 40 No. 9. September. (1986); p. 72-79.
9. BLOOMER, S; ADLERCREUTZ, P and MATTIASON B. Trigliceiride Interesterifictioin by Lipases. 1. Cocoa Butter Equivalents From a Fraction of Palm Oil. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 67 No. 8 , 1990; p. 519-524.
10. BUCHGRABER, Manuela; ULBERTH, Franz and ANKLAM, Elike. Comparision of HPLC and GLC Techniques for the Determination of the Triglyceride Profile of Cocoa Butter. EN: Journal Agricol Food Chemical, Vol. 48. (2000) p.3359-3363.
11. CEBULA D.J. and SMITH K.W. J. Differential Scanning Calorimetry of Confectionery Fats: Part II- Efects of Blends and Minor Components. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68 No. 8. (1992). p. 591-595.
12. CHAISERI, Siree and DIMICK, Paul S. Dynamic Crystallization of Cocoa Butter. 1. Characterization of Simple Lipids in Rapid- and Slow-Nucleating Cocoa Butters and Their Seed Crystals. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 12 (1995) p. 1491-1496.
13. CHANG, M. K., ABRAHAM, G., JOHN, V. T. Production of Cocoa Butter-Like Fat from Interesterificati3n of Vegetable Oils. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 67, No. 11. (Nov. 1990); p. 832-834.
14. CHE MAN, Y. B and SWE, P. Z. Thermal Analysis of Failed-Batch Palm Oil by Differential Scanning Caolrimetry. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 72 No. 12 (1995); p. 1529-1532.

15. CHONG, C.N.; HOH, Y.M. and WANG, C..W. Fractionation procedures for obtaining cocoa butter-like fat from enzymatically interesterified palm olein. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 69 No. 2. (Feb, 1992); p. 137-140.
16. CHOO, Y.M. MA, A.N., YAP, S. C. Carotenos, Vitamina E y Esteroles en Aceites de *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera* y sus Híbridos. EN: PALMAS. Vol. 19, No. 2 (1998); p. 79-85.
17. DEMAN, L, DEMAN, J.M. and BLACKMAN, B. Polymorphic Behavior of Some Fully Hydrogenated Oils and Their Mixtures with Liquid Oil. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. . Vol. 66, No. 12 (1989); p. 1777-1783.
18. DIMICK, P.S.; REDDY, Yella, and ZIEGLER, G.R. Chemical and Termal Characteristics of Milk-Fat fractions Isolated by Melt Crystallization. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 73, No. 12. (1996); p. 1647-1651.
19. DUNLAP, Fraancie G., WHITE, Pamela J., POLLAK, Linda M. And BRUMM, Thomas J. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 72, No. 9 (1995); p. 981-987.
20. ELIOTT, Jerome, M., and, PARKIN, Kirk L. Lipase Mediated Acyl-Exchange Reactions with Butteroil in Anhydrous Media. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68, No. 3 (1991); p. 171-175.
21. ERGAN, F ; TRIANI, M. and ANDRÉ, G. Use of Lipases in Multiphasic Systmes Solely Composed of Substrate. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68, No. 6 (June, 1991); p. 412- 417.
22. EVANS S, R. Notas taxonómicas, etnobotánicas y de nomenclatura sobre la *Elaeis*. En: Palmas. Vol. 12, No. 3 (1991).

23. FEDEPALMA.. EN: La Palma de Aceite. (1996)
24. FENNEMA, Owen R. Introducción a la ciencia de los alimentos. Editorial Reverte, Barcelona (España). 1982. Pág. 163-192.
25. FLOROS, John D and CHINNAN, Manjeet S. Computer Graphics-Assisted Optimization for products and Process Development. EN: Food Technology. February 1988; p. 72-78.
26. FOGLIA, T.A; PETRUSCO. K, and FEAIRHELLER, S.H. Enzimatic Interesterificación of Tallow-Sunflower Oil mixtures. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol.70. (1993); p. 281-285.
27. FOGLIA, Thomas A., PETRUSCO, Kimberly and FEAIRHELLER, Stephen H. Enzymatic Interesterification of Tallow-Sunflower Oil Mixtures. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 70, No. 3. (March 1993); p. 281 – 285.
28. FOMUSO, Lydia B and AKOH, Casimir, C. Structured Lipids: Lipase-Catalyzed Intresterification of Tricaproin and Trilinolein. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 3 (1998). p. 405-410.
29. GRALL D. S. and HARTEL, R.W. Kinetics of Butterfat Crystallization. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 69, No. 8 (August 1992); p. 741-747.
30. GROMPONE, M.A. Propiedades de los aceites vegetales modificados por hidrogenación, interesterificación y fraccionamiento.
31. HONG Y, Peck, DEMAN, J.M. and DEMAN L. Crystallization Characteristics of Hydrogenated Canola Oil as Affected by Addition of Palm Oil. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 66, No. 12. (December, 1989); p. 1792-1795.

32. HONG Y, Peck, DEMAN, J.M. and DEMAN L. Polymorphism of Palm Oil and Oil Products. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 66, No. 5 (1989); p. 693-696.
33. HULTIN, Herbert O. Current and Potential Uses of Immobilized Enzymes. En: Food Technology. (October, 1983); p. 66-82.
34. JORGE, María Cristina; CHIRALT, A; GONZALES, C “y” HARO, M. Caracterización Calorimétrica por DSC de la Manteca de Cacao Cubano. 1er encuentro Latinoamericano de Cacao y Chocolate. Instituto de investigaciones para la Industria Alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia. La Habana –Cuba. 2001.
35. KARRA-CHAABOUNI, Maha; PULVIN, Sylviane; TOURAUD, Didier and THOMAS, Daniel. Parameters Affecting the Synthesis of Geranyl Butyrate by Esterase 30.000 from *Mucor miehei*. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 9. (1998) . p. 1201-1206.
36. KARLSHAMNS. Tercer Congreso Nacional de la Alimentación y Nutrición. Asociación para la Ciencia y la Tecnología de los Alimentos de Cuba. Cuba, 2001.
37. KAWAHARA, Y. Progress in fats oils food technology. En: Food Technology. Vol. 4. No. 6. (Jun, 1993); p. 663-667.
38. KELLENS, Marc. Desarrollos en la Tecnología de Modificación de Grasas “Interesterificación de grasas y aceites”. En: Aceites y Grasas. 1997. Pág. 401-421.

39. KONISHI, Hiroaki, NEFF, William and MOUNTS, Timothy L. Chemical Interesterification with Regioselectivity for Edible Oils. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 70 No. 4 (April, 1993); p. 411-415.
40. KOYANO, T; HACHIYA, I.; ARISHIMA, T. ; SAGI, N and SATO, K. Polymorphism of POS. II. Kinetics of Melt Crystallization. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68, No. 10 (October 1990); p. 716-718.
41. KRIS-ETHERTON, P.M., and NICOLOSI, R.J. Trans Fatty Acid and Coronary Heart Disease Risk, edited by KRIS-ETHERTON, P.M., and NICOLOSI, R.J. Washington D.C., 1995, Pág. 17.
42. LAI, O. M; GHAZALI, H. M. and CHONG, C. L. Physical Properties of Pseudomonas and Rhizomucor miehei Lipase-Catalyzed Transesterified Blends of Palm Stearin:Palm Kernel Olein. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 8. (1998); p. 953-959.
43. LOISEL, C; KELLER, G; LECQ, G; BOURGAUX, C and OLLIVON, M. Phase Transition and Polymorphism of Cocoa Butter. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 4. (1998); p. 425-428.
44. MACRAE, A. R. Lipase Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 60, No. 2 (February, 1983); p. 291-300.
45. MALCATA, F. Xavier; REYES, Hector; GARCIA, Hugo; HILL, Charles "y" AMUNDSON, Clyde. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils A Review. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 67, No. 12 (December 1990); p. 890-910.

46. MARANGONI, Alejandro G; MCCURDY, Robert D and BROWN, Eric D. Enzymatic Interesterificación of Triolein with Tripalmitin in Canola Lecithin\_Hexane Reverse Micelles. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 70, No. 8. (August, 1993); p. 737-744.
47. MAZZANI, B. Plantas oleaginosas. Barcelona: Salvat, 1963. p. 433.
48. MD.ALI A. R. and DIMICK, P.S. Termal Análisis of Palm Mid Fraction, Cocoa Butter and Milk Fat blends by Differential Scanning Calorimetry. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 71, No. 3. (March, 1994); p. 299-302.
49. MILLS, B. L. and VAN DE VOORT, F. R. Comparison of the Directe and Indirect Wide.Line Nuclear Maganetic Resonance Methods for Determining Solid Fat Content. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. (July, 1981); p. 773-778.
50. MOJOVIC, L., SILER-MARINLOVIC, S., KUKIC, G., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 31. 1993; p. 65-69.
51. MONTGOMERY, D. y RUNGER, G. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. México: McGraw Hill, 1996; p. 687-790
52. MORENO S, Nelson. Búsqueda de Nuevas Alternativas para la Utilización del Aceite de Palma: Producción de Equivalentes de la Manteca de Cacao por Interesterificación Enzimática. Tesis de Maestria. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. 2001.
53. MOUSSATA, Charment O and AKOH, Casimir C. Influence of Lipase-Catalyzed Interesterification on the Oxidative Sabilita of Melon Seed Oil Triacylglycerols. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 9 (1998); p. 1155-1159.

54. NAMAL, S. and SHAHIDI, F. J. *Agric. Food Chem.* 1999. Vol 47. p. 3105-3112.
55. NOGODAWITHAN, Tilak. *Enzymes in Food Processing*. Third Edition. Academic Press. USA. (1993). Pág. 205-217.
56. PERKINS, E.G. and SMICK, Cathysue. Octadecatrienoic Fatty Acid Isomers of Partially Hydrogenated Soybean Oil. EN: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* Vol. 64, No. 8 (August 1987); p. 1150-1154
57. POTTER, Norman N. And HOTCHKISS, Joseph H. *Food Science*. Fifth edición. Chapman y Hall. México. 1995. Pág. 33-378.
58. ROUSSET and RAPPAZ, M. Crystallization Kinetics of the Pure Triacylglycerols Glycerol-1,3-Dipalmitate-2-Oleate, Glycerol-1-Palmitate-2-Oleate-3-Stearate, and Glycerol-1,3-Distearate-2-Oleate. EN: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* Vol. 73, No. 8 (1996); p. 1051-1057.
59. SASSANO, G.J. and JEFFREY, B. S. J. Gas Chromatography of Triacylglycerols in Palm Oil Fractions with Medium- Polarity Wide-Bore Columns. EN: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* Vol. 70, No. 11. (November, 1993); p. 1111-1114.
60. SATO, K; ARISHIMA, T; WANG, Z. H; OJIMA, K; SAGI, N. and MORI, H. Polymorphism of POP and SOS. I. Occurrence and Polymorphic Transformation. EN: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* Vol. 66, No. 5 (May 1989); p. 654-674.
61. SCHRADER, Greg W; BRUCE LITCHFIELD, J and SCHIMIDT, Shelly J. Magnetic Resonance Imaging Applications in the Food Industry. EN: *Food Technology*. December 1992. p. 77-82.

62. Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety y Nutrition. Fats in the Diet: Why and Where?. En: Food Technology. Vol. 40, No. 10. (1986); p. 115- 120.
63. SERIBURI, Vimom and AKOH, Casimir C. Enzymatic Interesterification of Triolein and Tristearin: Chemical Structrue and Differential Scanning Calorimetric Analysis of the Products. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 6. (1998); p. 711-715.
64. SERIBURI, Vimom and AKOH, Casimir C. Enzymatic Transesterificatioin of Triolein an Stearic Acid and Solid Fat content of Their Products. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 75, No. 4 (1998); p. . 511-516.
65. SHUKLA, K.S. Chocolate the Chemistry of Pleasure. En: Food Technology. Vol. 8, No. 2. (February, 1997). p. 152-162.
66. SRIDHAR, R; LAKSHMINARAYAMA, G. and KAIMAL, T. N. B. Modification of Selected Indian Vegetable Fats into Cocoa Butter Substitutes by Lipase-Catalyzed Ester Interchange. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 68, No. 10. (1991); p. 1041-1042.
67. STIER, Richard F. Alimentos Procesados. En: Revista Internacional de alimentos. Vol. 16, No. 10. Octubre (1997); p. 2-10.
68. TANAKA, Y; HIRANO, J and FUNADA, T. Síntesis of Docosahexaenoic Acid-rich triglyceride with imobilized *Cromobacterium viscosum* Lipase. EN: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 71, No. 3. (1994); p. 331-334.
69. TIEKO, R. and APARCIDA L. En: Grasas y Aceites.. Vol. 50, No. 1. (1999); p. 16-22.

70. TRAMPER, J, VAN DER PLAS, H; LINKO, P. Biocatalysts in Organic Síntesis. Elseiver. 1<sup>a</sup> ed. New York. 1985. p. 195-208.
71. TROST, Vernon W. Characterization of Corn Oil, Soybean Oil and Sunflowerseed Oil Nonpolar Material. En: J. Am. Oil. Chem. Soc. Vol. 66, No. 3. (1989); p. 325-333.
72. VALENZUELA, Alfonso., and NIETO Susana. Biotechnology of Lipids: The Use of Lipases For the Structural Modification of Fats and Oils. En: Grasas y Aceites. Vol. 45, Fasc. 5. (1994); p. 337-343.
73. WONG, Dominic W. Química de los Alimentos: Mecanismos y teoría. Editorial Acribia. Zaragoza (España). 1995. Pág. 1-48.
74. ZILLER, Steve. En: Grasas y aceites alimentarios. Acribia, 1994.
75. ZILLER, Steve. Grasas y Aceites Alimentarios. Parte 1 y parte 2. En: Aceites y grasas. Diciembre, 2000. p. 506-512.