

**TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITES
VEGETALES PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS BASE
PARA LA PRODUCCIÓN DE MARGARINAS Y
SHORTENINGS**

**AUTOR
CARLOS ALBERTO PAREJA URIBE**

**ESCUELA DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
BUCARAMANGA
2004**

**TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITES
VEGETALES PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS BASE
PARA LA PRODUCCIÓN DE MARGARINAS Y
SHORTENINGS**

AUTOR

CARLOS ALBERTO PAREJA URIBE

Tesis para optar el título de magíster en Química

DIRECTOR

**Fernando Martínez, MSc en Química
Docteur en Chimie**

**ESCUELA DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
BUCARAMANGA
2004**

CONTENIDO

	PAG.
INTRODUCCION	18
1. ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA	23
1.1. SHORTENINGS Y MARGARINAS	23
1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS GRASAS Y ACEITES	26
1.2.1. Punto de fusión.	26
1.2.2. Plasticidad.	27
1.2.3. Cristalización.	28
1.2.4. Contenido de grasa sólida (SFC).	29
1.3. CLASES DE SHORTENINGS Y MARGARINAS	31
1.4. PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS BASE PARA MARGARINAS Y SHORTENINGS	36
1.4.1. Procesos Físicos.	36
1.4.2. Procesos Químicos.	37
1.5. LAS LIPASAS	40
1.5.1. Reacciones catalizadas por lipasas	48
1.5.2. Lipasas inmovilizadas	47
1.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA	49
1.6.2. Factores que afectan las velocidades de reacción	51
2. METODOLOGÍA	57
2.1. MATERIAS PRIMAS	57
2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS	57

2.2.1. Actividad Hidrolítica (Lipolítica) de la Enzima	57
2.2.3. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por cromatografía de gases, GC.	59
2.2.4. Identificación y cuantificación de los triglicéridos (TG)	61
2.2.5. Determinación de los Perfiles de Fusión, SFC	63
2.2.6. Determinación del Punto de Fusión	63
2.2.7. Determinación de la consistencia	64
2.2.8. Determinación del cremado	64
2.2.9. Análisis de los productos obtenidos del proceso de transesterificación	65
2.3. MÉTODOS	65
2.3.1. Determinación de las condiciones óptimas de la reacción de transesterificación	65
2.3.2. Transesterificación enzimática de los sistemas Estearina de palma – Aceite de soya, EP/AS, y Aceite de Palma – Aceite de soya, AP/AS.	67
2.3.3. Estabilidad Operacional de la Enzima	70
3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	71
3.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y TRIACILGLICÉRIDOS PRESENTES EN LOS SUBSTRATOS EMPLEADOS.	72
3.1.1. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos como metil ésteres (FAME) por cromatografía de gases.	72
3.1.2. Composición en ácidos grasos del aceite de palma, estearina de palma y aceite de soya.	73
3.1.3. Identificación y cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases.	74

3.1.4. Identificación y cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases.	76
3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN	77
3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la enzima Novosyme	77
3.2.2. Optimización de las condiciones de la reacción de transesterificación	79
3.3. ESTABILIDAD OPERACIONAL DE ENZIMA	123
3.4. CINÉTICA QUÍMICA DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN	127
3.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DEL SISTEMA ESTEARINA DE PALMA Y ACEITE DE SOYA.	132
3.5.1. Caracterización de los productos de transesterificación	132
3.5.2. Características de desempeño de las margarinas obtenidas	137
3.5.3. Identificación de los productos de la transesterificación del sistema aceite de palma y aceite de soya.	141
3.6. ESTUDIO FINANCIERO DEL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA.	143
3.6.1. Estructura de costos para el proceso de transesterificación a escala industrial del sistema estearina de palma/aceite de soya, ep/as.	143
4. CONCLUSIONES	152
5. RECOMENDACIÓN	154
6. BIBLIOGRAFÍA	155
GLOSARIO DE TERMINOS	163
ANEXOS	165

LISTA DE TABLAS

	Pag.
TABLA 1. Composición en ácidos grasos, triacilgliceroles y punto de fusión de algunos shortenings comerciales.	33
TABLA 2. Composición de ácidos grasos y triacilgliceroles y punto de fusión de margarinas comerciales.	35
TABLA 3. Composición (%) en ácidos grasos del aceite de palma, estearina de palma y del aceite de soya.	55
TABLA 4. Composición (% en peso) en triacilgliceroles (TG's) de diferentes aceites y grasas vegetales.	55
TABLA 5. Concentración (mg/mL) en metil ésteres de los patrones	61
TABLA 6. Variables independientes y niveles del diseño experimental para los sistemas a estudiar.	67
TABLA 7. Ecuaciones para la cuantificación de los ácidos grasos patrones por cromatografía de gases.	73
TABLA 8. Composición en ácidos grasos (%) de los aceites vegetales empleados.	74
TABLA 9. Tiempos de retención para la cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases, cromatógrafo Perkin Elmer.	75
TABLA 10. Tiempos retención para la cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases, cromatógrafo HP 6890.	75
TABLA 11. Composición en triacilglicéridos (%) de los aceites vegetales empleados.	77

TABLA 12. Disposiciones y respuestas del diseño de cubo centrado en las caras para el sistema EP/AS	81
TABLA 13. Disposiciones y respuestas del diseño de cubo centrado en las caras para el sistema AP/AS	82
TABLA 14. Coeficientes de regresión del polinomio cuadrático propuesto para la variable de respuesta.	92
TABLA 15. ANOVA de las variables estudiadas para el modelo de superficie de respuesta para el sistema EP/AS	94
TABLA 16. ANOVA de las variables estudiadas para el modelo de superficie de respuesta para el sistema AP/AS	95
TABLA 17. Análisis canónico para el contenido de tripalmitina (PPP) para el sistema EP/AS	96
TABLA 18. Análisis canónico para el contenido de tripalmitina (PPP) para el sistema AP/AS	96
TABLA 19. Condiciones de reacción óptimas para los sistemas	97
Sistemas	97
TABLA 20. Resultados observados en el escalado del sistema EP/AS masa 500 gramos	98
TABLA 21. Resultados observados en el escalado del sistema AP/AS masa 100 gramos	100
TABLA 22. Variación del contenido de grasa sólida del producto	103
TABLA 23. Variación del contenido de grasa sólida del producto	107
TABLA 24. Composición de las grasas bases mencionadas en la literatura	108
TABLA 25. Valores de FFA, DG y TG's de los productos transesterificado en planta piloto y laboratorio.	119
TABLA 26. Constante de desactivación (K_d) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para la enzima empleada	126

TABLA 27. Composición en triacilglicéridos de la materia prima y producto de la transesterificación y sus fracciones (% área).	132
TABLA 28. Composición de las mezclas empleadas para la producción de las margarinas	138
TABLA 29. Composición en triacilglicéridos de la materia prima y del producto de la transesterificación (% área).	141
TABLA 30. Estructura de costos para el proceso de transesterificación (1000 Kg)	146
TABLA 31. Costo de producción de grasas base para fabricación de margarinas y shortenings a partir de estearina de palma y aceite de soya a escala industrial	147
TABLA 32. Estructura de costos para el proceso de transesterificación (1000 Kg)	150
TABLA 33. Costo de producción de grasas base para fabricación de margarinas y shortenings a partir del aceite de palma y aceite de soya a escala industrial	151

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1. Curva de absorción de calor o dilatométrica de la fusión de una grasa	27
FIGURA 2. Formas de cristalizar las grasas	29
FIGURA 3. Contenido de grasa sólida de diferentes margarinas en función de la temperatura. Tomado de Berger (1986)	30
FIGURA 4. Contenido de grasa sólida de tres tipos de margarinas empleadas en repostería. Tomado de Bergel (1986)	31
FIGURA 5. Esquema general de la reacción de transesterificación	41
FIGURA 6. Modelo hipotético de la fijación de la lipasa pancreática sobre la interfase aceite - agua	45
FIGURA 7. Modulación del centro activo de la lipasa por adsorción sobre un soporte hidrófobo.	46
FIGURA 8. Actividad hidrolítica de la enzima (a 70 °C) en los sistemas estudiados.	79
FIGURA 9. Diagrama de Pareto. A: Sistema EP/AS, B: Sistema AP/AS	84
FIGURA 10. Efecto del tiempo y relación de sustratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de transesterificación para el sistema EP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional.	86
FIGURA 11. Efecto del tiempo y relación de sustratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de transesterificación	

para el sistema AP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional,
B: mapa de contorno dimensional. 88

FIGURA 12. Efecto de la cantidad de enzima y relación de
substratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de
transesterificación para el sistema EP/AS. A: Superficie de
respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional. 89

FIGURA 13. Efecto de la cantidad de enzima y relación de
substratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de
transesterificación para el sistema AP/AS. A: Superficie de
respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional. 91

FIGURA 14. Efecto del contenido de agua sobre la actividad
hidrolítica de la enzima para una relación de sustrato 80:20,
empleando una agitación de 200 rpm y cantidad de enzima 0,9%.
(●) Sistema EP/AS, tiempo de reacción 7 horas. (■) Sistema
AP/AS, tiempo de reacción 5 horas 100

FIGURA 15. Efecto de la velocidad de agitación sobre el porcentaje
de disminución del contenido de PPP. Condiciones de reacción:
Relación de sustratos (80% de estearina de palma, 20% de aceite
de soya), tiempo de reacción 7 horas, cantidad de enzima 0,9% y
cantidad de agua 1% en peso con respecto al peso de enzima 101

FIGURA 16. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y
transesterificada del sistema EP/AS. 104

FIGURA 17. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y
transesterificada del sistema EP/AS. 105

FIGURA 18. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y
transesterificada del sistema EP/AS. 105

TABLA 23. Variación del contenido de grasa sólida del producto 107

FIGURA 19. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y
transesterificada del sistema AP/AS. 107

FIGURA 20. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL
– 2 (literatura) y A, B, C y D obtenidas en este estudio. 110

FIGURA 21. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL – 2 (literatura) y F, H, E y G obtenidas en este estudio.	111
FIGURA 22. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL – 2 (literatura) y I, J, K y L obtenidas en este estudio.	111
FIGURA 23. Comparación de los contenidos de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema AP/AS en este trabajo con las grasas reportadas en la literatura.	112
FIGURA 24. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.	115
FIGURA 25. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.	115
FIGURA 26. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.	116
FIGURA 27. Contenidos de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema AP/AS con las grasas bases comerciales.	117
FIGURA 28. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 0,9% de enzima, 10% de agua, 7 horas de reacción.	121
FIGURA 29. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 1% de agua, 5 horas de reacción.	122
FIGURA 30. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 10% de agua, 5 horas de reacción.	122
FIGURA 31. Contenido de grasa sólida del sistema AP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 10% de agua, 5 horas de reacción.	123
FIGURA 32. Producción de FFA por el re-uso de la enzima. (■) 1% de agua y cantidad de enzima 2,1%. (■) 10% de agua y cantidad de enzima 2,1%.	124

FIGURA 35. Gráfica semilogarítmica de la integral de la ecuación de velocidad de primer orden para los sistemas EP/AS y AP/AS.	129
FIGURA 36. Gráfica de Henri – Michaelis – Menten para la transesterificación enzimática del sistema AP/AS.	131
FIGURA 37. Gráfica de Henri – Michaelis – Menten para la transesterificación enzimática del sistema EP/AS.	131
FIGURA 38. Contenido de grasa sólida de la mezcla de estearina de palma y aceite de soya antes y después de la reacción de transesterificación	134
FIGURA 39. Contenido de grasa sólida de la fracción líquida del producto transesterificado y de la oleína de palma.	135
FIGURA 40. Contenido de grasa sólida de la fracción sólida del producto transesterificado y de la Estearina de palma.	138
FIGURA 41. Consistencia de las margarinas obtenidas con el tiempo de almacenamiento	139
FIGURA 42. Poder de cremado de las margarinas producidas	140
FIGURA 43. Contenido de grasa sólida de la mezcla aceite de palma y aceite de soya antes y después de la reacción de transesterificación	143
FIGURA 44. Esquema del proceso de transesterificación sistema EP/AS	144
FIGURA 45. . Esquema del proceso de transesterificación sistema AP/AS	148

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO 1. Perfil cromatográfico de los metil ésteres patrones de ácidos grasos	166
ANEXO 2. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos del Aceite de Palma	167
ANEXO 3. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos de la Estearina de Palma	168
ANEXO 4. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos del Aceite de Soya	169
ANEXO 5. Perfil cromatográfico de la Estearina de Palma empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus.	170
ANEXO 6. Perfil cromatográfico del Aceite de Palma empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus	171
ANEXO 7. Perfil cromatográfico del Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus	172
ANEXO 8. Perfil cromatográfico de la estearina de palma, aceite de palma y aceite de soya empleando el cromatógrafo Pelkin Elmer.	173
ANEXO 9. Perfil cromatográfico del sistema Aceite de Palma – Aceite de Soya transesterificado empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus	175
ANEXO 10. Perfil cromatográfico de la mezcla física del sistema Aceite de Palma – Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus	176

ANEXO 11. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma –
Aceite de Soya transesterificado empleando el cromatógrafo HP
6890 serie Plus 177

ANEXO 12. Perfil cromatográfico de la mezcla física del sistema
Estearina de Palma – Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP
6890 serie Plus 178

TITULO: TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITES VEGETALES PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS BASE PARA LA PRODUCCIÓN DE MARGARINAS Y SHORTENINGS*.

Autor: Carlo Alberto Pareja Uribe**

Palabras Claves: Transesterificación, margarinas, shortenings, *Rhizomucor miehei*, aceite vegetal, aceite de palma, aceite de soya, estearina de palma.

Resumen.

La transesterificación catalizada con lipasa *Rhizomucor miehei* del aceite de palma (AP) y su fracción sólida, la estearina (EP) con el aceite de soya (AS) fue realizada, y los productos obtenidos fueron analizados determinando el contenido de grasa sólida y cromatografía de gas. Ambos sistemas (AP/AS y EP/AS) fueron efectivos para obtener un producto adecuado para la producción de grasas bases para margarinas, shortenings y grasas especiales con aplicación en la industria de chocolatería.

La metodología de Respuesta de Superficie fue usada para obtener el máximo rendimiento de la transesterificación usando la mínima cantidad de enzima posible. Las variables del proceso estudiada fueron la cantidad de enzima (50 – 150 mg), tiempo de reacción (3 – 7 h), relación de aceite de palma/aceite de soya, esterarían de palma/aceite de soya (70:30 – 90:10%), la temperatura de reacción se mantuvo constante a 70°C. Todos los experimentos fueron llevados a cabo al diseño de cubo con cara centrada. Bajo las condiciones óptimas el proceso de transesterificación enzimática pudo reproducirse a nivel de planta piloto (masa total 35 Kg), lográndose obtener un producto adecuado con aplicación en la industria de panadería, chocolatería y en la fabricación de margarinas.

Se estableció que es posible obtener un producto adecuado para la fabricación de margarinas, shortenings, y grasas para la aplicación en la industria de chocolatería, con una cantidad baja de enzima (entre 1 y 2,1%), a 70°C de temperatura y con alto contenido de estearina de palma y aceite de palma (80%), otorgándolo un mayor valor agregado a las materias primas

En este estudio se demostró que mediante la transesterificación enzimática de la estearina de palma y el aceite de palma con el aceite de soya es posible obtener un producto que no presenta ácidos grasos *trans*, debido al no uso de materia prima hidrogenada. Además, la reacción de transesterificación permite aumentar el valor agregado de la estearina de palma para ser usada como materia prima en la preparación de margarinas y rellenos de chocolatería.

* Tesis de grado

** Faculta de Ciencias – Escuela de Química – Maestría en Química. Director: Fernando Martínez.

TITLE: ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF VEGETAL OILS TO GET BASE FATS FOR THE PRODUCTION OF MARGARINES AND SHORTENINGS.* *

AUTHOR: Pareja Uribe, Carlos Alberto**

Keywords: Transesterification, margarines, shortenings, *Rhizomucor miehei*, vegetal oil, palm oil, soybean oil, palm stearine.

SUMMARY

Lipase-catalyzed transesterification of palm oil (PO) and its solid fraction, stearine (PE) with soybean oil (SO), was carried using the lipase *Rhizomucor Miehei*, and the products obtained were analyzed to determine its solid fat contain and by chromatography gas. Both systems (PO/SO and PE/SO) were effective to get an adequate product for the production of bases fats for margarines, shortenings and specials fats with application in the chocolate and bakery industry.

The response surface methodology was used to obtain a maximum yield of transesterification using the minimum amount of enzyme possible. The process variables studied were the amount of enzyme (50 – 150 mg), reaction time (3 – 7 h), and rate of palm oil/soybean oil, palm stearine/soybean oil (70:30 – 90:10 in percentage w/w), the reaction temperature was held constant to 70°C. All experiments were carried out according to the face centered cube design. Under optimum conditions, was carried the process of enzymatic transesterification that was able to be reproduced to the pilot level scale, being able to obtain an adequate product with application for the bakery industry, chocolate and the fabrication of margarines.

It was established that it is possible to obtain an adequate product for the fabrication of margarines, shortenings, and fat for its application to the chocolate industry with a low quantity of enzyme (between 1% and 2.1% w), a 70°C temperature and a high contain of palm stearine and palm oil (80%) giving a higher level of added value to the raw material.

It was demonstrated in this study that through the enzymatic transesterification of the palm stearine and palm oil with soybean oil it is possible to get a product that does not present fat trans acids, due to the not use of hydrogenated raw material. Besides, the reaction of transesterification permitted to increase the added value of the palm stearine as to be used as raw material in the preparation of margarines and chocolate fillings.

* Degree Thesis

** Faculty of Science – School of Chemistry – Master in Chemistry. Director: Fernando Martínez.

INTRODUCCION

El aceite de palma es uno de los aceites vegetales que hoy en día se utiliza ampliamente en la producción de productos comestibles. Sin embargo, últimamente se ha cuestionado su uso, por parte de las autoridades de la salud de los Estados Unidos. Puesto que el contenido de ácidos grasos saturados del aceite de palma es relativamente más alto que otros aceites vegetales en su estado natural, por tal razón, se sostiene que se debe evitar su consumo, como parte de una alimentación prudente, que podría controlar las enfermedades cardíacas.

No obstante, el aceite de palma posee varias características importantes para decidir su incorporación o no a los productos alimenticios. Entre las características más relevantes se tiene: alto contenido de triacilgliceroles saturados, lo cual permite una consistencia necesaria, sin la necesidad de hidrogenar; es muy resistente a la oxidación y por consiguiente, tiene una vida útil prolongada en almacenamiento; su contenido de triacilgliceroles de punto de fusión alto, unido al bajo contenido de sólidos a 10°C, permite una formulación de productos con un amplio intervalo plástico, idóneo para climas calientes y para algunas aplicaciones industriales; y finalmente tiende a cristalizar en pequeños cristales beta prima (β'), propiedad adecuada para algunas aplicaciones, como margarina y shortening.

Debido a las características mencionadas del aceite de palma, se han realizados investigaciones con la finalidad de mejorar sus características físicas tales como perfil de fusión, y plasticidad, y de esta manera obtener productos con propiedades físicas y químicas deseadas en la grasa y aceite. El cambio de la composición de los triacilgliceroles obtenidos durante estos procesos, otorgan propiedades a los productos de tal forma que el valor comercial y nutricional del producto final aumente.

El aceite de palma y sus fracciones se pueden modificar de manera física mediante un fraccionamiento o mediante transesterificación catalítica (Kurashige y col., 1993; Ray y Bhattacharyya, 1995; Lai y col., 1998; Petrauskaite y col., 1998; Noor y Ali, 1998). Mediante estos procesos se pueden obtener grasas bases para la fabricación de grasas especiales: la margarinas y shortenings, debido a las aplicaciones en la industria alimenticia, en sectores como: panadería, pastelería, confitería y heladería.

Las grasas bases normalmente se obtienen de los aceites vegetales hidrogenados. Sin embargo, durante este proceso, se forman isómeros *trans* (Carpenter y col., 1976), los cuales influyen en las características fisicoquímicas del producto final, debido que aumentan los puntos de fusión del producto (Lo y Andel, 1983). Además, según algunos estudios realizados sobre el consumo de los ácidos grasos *trans* han mostrado que estos compuestos pueden tener un efecto adverso en la salud del consumidor, específicamente como coadyudantes en la generación de enfermedades cardíacas coronarias (Cottrell, 1996; Petrauskaite y

col., 1998; Lai y col., 1998; Fomuso y col., 2001). Por lo tanto, se ha recomendado evitar el consumo de productos que contengan grasas hidrogenadas, hasta tal punto que a partir del 2004 la F.D.A (USA) establecerá una norma en la cual todo producto alimenticio de consumo humano en Estados Unidos que contenga grasas debe indicar el porcentaje de ácidos grasos *trans* en su etiqueta.

En este sentido la transesterificación catalítica se constituye en un proceso alterno en la obtención de las grasas bases para la fabricación de grasas especiales. La reacción de transesterificación catalizada por una lipasa, tiene varias ventajas sobre un catalizador químico, entre ellas una mejor actividad y selectividad, y permitiendo realizar la reacción en condiciones suaves de temperatura y presión (Bloomer y col., 1990; Mojovic y col., 1993). Adicionalmente, la existencia de lipasas estereoespecíficas, 1,3, permite mantener los ácidos grasos en la posición 2, generalmente ácidos grasos insaturados esenciales (EFA). Durante la transesterificación al mantener una configuración de tal naturaleza, le otorga una ventaja desde el punto de vista nutricional a la grasa, debido a que los 2 - monoglicérido son los únicos que pueden transportar los diferentes ácidos grasos a través de la pared intestinal. En el caso de un producto graso obtenido por una transesterificación en la cual el catalizador es de naturaleza química presenta una distribución de los ácidos grasos al azar, y desde luego, el producto final presenta deficiencias en los ácidos grasos insaturados esenciales (Roy y Bhattacharyya; 1993).

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se busco nuevas aplicaciones del aceite de palma y su fracción sólida, la estearina mediante la transesterificación enzimática con el aceite de soya empleando la lipasa 1,3 estereoespecífica como la *Rhizomucor Miehei*, para obtener un producto graso libre de ácidos grasos *trans* y emplearlos como grasas base para la preparación de margarinas, shortenings y grasas especiales con aplicación en la industria de chocolatería.

Durante el desarrollo de la investigación se realizó entre otras actividades las siguientes:

1. Caracterización de las materias primas en cuanto a composición en ácidos grasos, triacilgliceroles y actividad hidrolítica de la lipasa;
2. Optimización de las condiciones de reacción de transesterificación de acuerdo al diseño experimental de análisis de superficie de respuesta, evaluando la composición de tripalmitina e índice de acidez;
3. Escalonamiento de la reacción a nivel de laboratorio y planta piloto;
4. Caracterización de los productos obtenidos en cuanto a composición en triacilglicéridos por cromatografía de gases, y determinación del contenido de grasa sólida en función de la temperatura;

5. Evaluación de margarinas y shortenings preparados en cuanto a consistencia, estabilidad al almacenamiento. Igualmente preparación de rellenos para confitería

Este trabajo fue financiado conjuntamente (Proyecto No. 1102 – 07 – 11015) por COLCIENCIAS y la empresa Comercializadora Internacional de Grasas y Aceites- SACEITES S.A., se desarrollo en los laboratorios del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos –CICTA, Centro de Investigación en Catálisis – CICAT, y SACEITES S.A. Los resultados obtenidos fueron presentados en el Symposium International Green Chemistry celebrado en la ciudad de Poitiers, Francia en Mayo de 2003, y en el Congreso Latinoamericano de Palma celebrado en la ciudad de Cartagena en Octubre de 2003, por Fedepalma.

El presente documento consta de los siguientes capítulos: **Capítulo 1. Análisis de la bibliografía:** Se compilan los aspectos fundamentales del proceso de transesterificación enzimática y el estado actual de la investigación en el tema planteado. **Capítulo 2. Metodología:** Se especifica la metodología aplicada para el desarrollo del trabajo de investigación. **Capítulo 3. Análisis de resultados:** Se muestran y analizan los resultados obtenidos en el estudio. **Capítulo 4. Conclusiones y Recomendaciones.** **Capítulo 5. Bibliografía.**

1. ANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA

1.1. SHORTENINGS Y MARGARINAS

La mayoría de los aceites vegetales tienen limitadas aplicaciones en su forma original debido a su composición química específica. Para ampliar sus usos los aceites vegetales son modificados químicamente mediante interesterificación, hidrogenación o fraccionamiento físico. En este sentido, las propiedades de una grasa de aplicación particular se pueden lograr modificando la naturaleza y contenido de los ácidos grasos que constituyen sus triacilglicéridos.

Tradicionalmente, los shortenings y margarinas son obtenidos de aceites líquidos sometidos al proceso de hidrogenación y transesterificación con catalizadores químicos. Los shortenings son grasas plásticas anhidras, mientras que las margarinas se definen como una emulsión plástica del tipo agua en aceite, y se diferencia unas de otras por su contenido de grasa. Estas grasas son usadas para cocinar, freír y como ingredientes en muchos productos tales como ponqué, bizcochos, galletas, pasteles, panes, cremas de relleno, glaseado y confitería. El tipo y cantidad de estas grasas especiales afectan las propiedades físicas de las masas y por ende la calidad de los productos terminados (NorAini et al., 1992).

La función de los shortenings y las margarinas como ingredientes es proporcionar un amplio intervalo plástico a las masas, mejorar la palatabilidad, ayudar en la unión de los ingredientes, incorporar aire durante el mezclado, dar estructura al producto, crear una barrera de humedad y extender la vida media de los productos. Estas propiedades se pueden conseguir induciendo en la estructura del triacilglicerol una relación apropiada de ácidos grasos saturados e insaturados (NorAini et al., 1992; Woerfel, 1995).

Los ácidos grasos insaturados mejoran el aspecto y la consistencia del producto debido a su mayor solubilidad, característica que se manifiesta en una reducción de la tensión superficial, permitiendo la formación de una capa fina de grasa sobre la masa y por consiguiente un aumento de la suavidad del producto, es decir haciendo más crujiente el producto final. Los ácidos grasos saturados, en cambio, debido a su forma de cristalización, fijan las burbujas del gas, induciendo así un aumento del volumen del producto terminado (Quaglia, 1991).

Durante muchos años estas grasas especiales, shortenings y margarinas, fueron obtenidas a partir de la manteca de cerdo y grasas de otros animales (Woerfel, 1995), sin embargo, desde 1947 surgió el uso de grasas y aceites de origen vegetal como materia prima para su producción. Las primeras grasas especiales de consistencia semi-sólida (plásticas), se prepararon mezclando aceite vegetal, particularmente aceite de algodón, soya, maíz, girasol y palma, con ciertas grasas de origen animal. Con el surgimiento del proceso de hidrogenación catalítica, se inició una

nueva etapa en la obtención de estos productos, empleando solamente aceites o grasas de origen vegetal.

Normalmente, la hidrogenación sólo se hace parcialmente, dependiendo de la calidad del producto final. Sin embargo, durante el proceso, parte de los dobles enlaces *cis* son isomerizados a su forma *trans* (TFA's), y se considero durante un tiempo esta reacción lateral como ventajosa, ya que los ácidos grasos *trans* proporcionaban al producto puntos de fusión más altos y una mayor estabilidad que los ácidos grasos *cis* (M. y Holub, 1994).

Sin embargo, investigaciones posteriores han concluido que las enfermedades cardíacas coronarias están relacionadas de forma directa con la presencia de los ácidos grasos *trans* (Cottrell, 1996). Como consecuencia se ha observado una tendencia en la industria de alimentos de reemplazar los aceites parcialmente hidrogenados a través de otras fuentes de grasas con bajos contenidos de TFA's. Además, la F.D.A. (USA) estableció una norma la cual obliga a los fabricantes colocar en los empaques de los alimentos que contienen grasas la concentración de ácidos grasos *trans*, la cual deberá cumplirse a partir del 2004.

Con la finalidad de evitar la formación de estos ácidos *trans*, actualmente, los shortenings y las margarinas para repostería, cubrimiento y panadería se obtienen mediante modificación de la composición de los triacilglicerol de aceites vegetales, empleando la transesterificación química y enzimática. El producto obtenido de esta forma permite modificar el comportamiento de la cristalización,

el cual influye significativamente en las propiedades físicas de la grasa como son: el punto de fusión, el punto de ablandamiento, el contenido de grasa sólida, la plasticidad y la rigidez (Busfiel y Proschogo, 1990), lo cual permite mejorar el aspecto de la consistencia y volumen del producto final. Adicionalmente, al mantener ácidos grasos esenciales en el producto se resaltarían sus propiedades nutricionales (Seriburi y Akoh, 1998), y esto se logra mediante una transesterificación selectiva.

1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS GRASAS Y ACEITES

A continuación se relacionan las propiedades fisicoquímicas que se deben tener en cuenta para la elaboración de un producto que contenga grasas y aceites como materia prima.

1.2.1. Punto de fusión. Las grasas, mezclas complejas, no tienen punto de fusión definido, por lo tanto, es más correcto hablar de un intervalo de fusión (Stier, 1997), que dependen de la composición de la grasa. En la **Figura 1** se representa la fusión de la grasa en función de la temperatura, el punto **A** representa el comienzo de la fusión; por debajo de este punto, la grasa se encuentra totalmente sólida. El punto **B** representa el final de la fusión; por encima de este punto la grasa esta completamente fundida. La curva **AB** representa la fusión gradual de los distintos componentes de la grasa. Una grasa de amplio intervalo plástico es cuando la diferencia de temperatura entre el comienzo y el final de la fusión es amplio. El intervalo plástico de una grasa puede modificarse en

ambos lados de la curva de fusión mediante un proceso físico, como es añadir un componente con un punto de fusión relativamente alto o bajo, y químico mediante la modificación de la composición de triacilgliceroles.

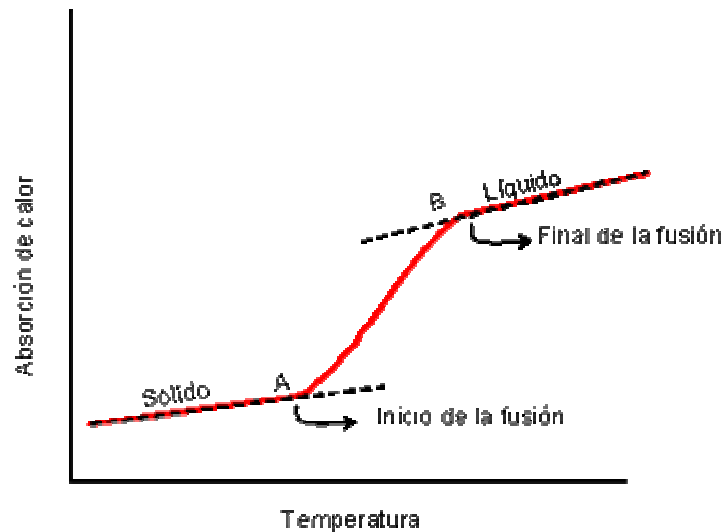


FIGURA 1. Curva de absorción de calor o dilatométrica de la fusión de una grasa

1.2.2. Plasticidad. Es una propiedad relacionada con la suavidad o flexibilidad de la grasa a una temperatura dada. Esta propiedad depende significativamente del grado de insaturación y la disposición de los ácidos grasos en la estructura del triacilglicerol. Por ejemplo, en el aceite de palma su contenido de ácidos grasos saturados es del 50%, obteniéndose un aceite semisólido a temperatura ambiente, mientras que el aceite de soja su contenido de ácidos grasos insaturados es aproximadamente del 85%, su aspecto es líquido a temperatura ambiente.

1.2.3. Cristalización. Los triacilgliceroles pueden cristalizar en tres formas polimórficas asociadas conocidas como α (hexagonal), β' (ortorrómbica), y β (triclínica). Estos términos se refieren a la vista del corte transversal de la celda unidad formada por el empaquetamiento de los triacilgliceroles (**Figura 2**).

La forma cristalina α corresponde a una celda de cristalización tipo hexagonal, que se caracteriza por dar una orientación no definida de sus cadenas carbonadas, permitiéndoles una gran amplitud de movimiento. Es la más inestable frente a la temperatura y sus cristales evolucionan rápidamente hacia una forma más organizada, en consecuencia más densa y con punto de fusión más alto, denominada forma β' , que corresponde a una celda cristalina ortorrómbica, y estos a su vez evolucionan a la forma cristalina β , que corresponde a cristales de celda unidad triclínica, y constituye la forma cristalina más organizada de las moléculas de los triacilgliceroles.

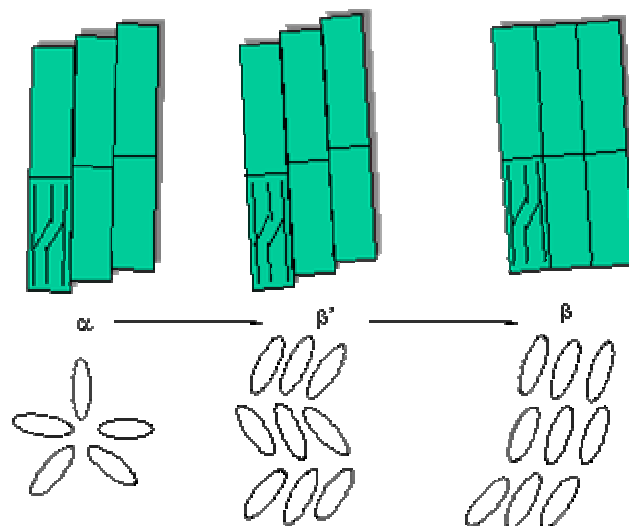


FIGURA 2. Formas de cristalizar las grasas

Cabe destacar que, la fase β sus cristales grandes producen una textura tosca y serosa del producto. En cambio la fase β' sus cristales otorgan una textura suave al producto, permitiendo la incorporación de grandes cantidades de aire que ayudan a la plasticidad y cremosidad requerida en los shortenings y margarinas (Noor et al., 1998).

1.2.4. Contenido de grasa sólida (SFC). Entre las propiedades físicas más empleadas para determinar el uso de los shortenings y margarinas, esta el contenido de grasa sólida (**SFC**) a determinada temperatura.

El método generalmente empleado para determinar el **SFC** es la resonancia magnética nuclear de pulsos (**NMR**). Esta técnica se basa en las diferencias en los tiempos de relajación spin-spin (τ_2) de los núcleos de hidrógeno en los estados sólidos y líquidos, con la hipótesis de que las diferencias en el contenido de protones de las grasas sólidas y líquidas es insignificante, como usualmente ocurre en las grasas naturales. El descenso de la magnetización después de un pulso de 90° permite la determinación directa del contenido de grasa sólida a una temperatura, pero exige un factor de corrección, el *factor f*, ya que la señal sólo puede determinarse unos $10 \mu\text{s}$ después del pulso (Bosin y Marmor, 1968). A pesar de la simplicidad del método se debe seguir un procedimiento apropiado de la muestra antes de realizar su medición.

La **Figura 3**, ilustra los perfiles del contenido de sólidos típicos para diferentes margarinas. El **SFC** entre 4 y 10°C determina la facilidad de extender el producto a temperatura de refrigeración. Un **SFC** no mayor que 32% a 10°C es esencial para una buena esparcibilidad del producto a temperatura de refrigeración. El **SFC** entre 20 a 22°C determina la estabilidad de los productos y resistencia al "oil in out", exudación del aceite a temperatura ambiente; un valor no menor de 10% es esencial para prevenir la exudación. El **SFC** entre 35 a 37°C determina el grosor y facilidad de la grasa de liberar el sabor en la boca, un valor menor del 5% en **SFC** es requerido para que la grasa funda completamente en la boca (Habi y Rahim, 1998).

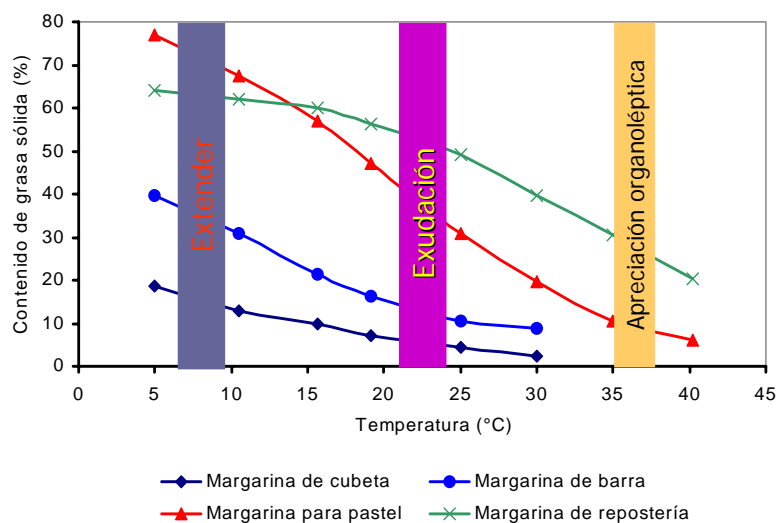


FIGURA 3. Contenido de grasa sólida de diferentes margarinas en función de la temperatura. Tomado de Berger (1986)

En la **Figura 4**, se ilustran los perfiles del contenido de sólidos de tres margarinas comerciales, una de origen Australiano (tipo dura), obtenida principalmente a partir de sebo de res, y las otras dos producidas en Malasia y fabricadas con aceite de palma endurecido y estearina de palma (tipo blanda y media). Se observa que la curva de fusión del producto final varía dependiendo de la materia prima empleada.

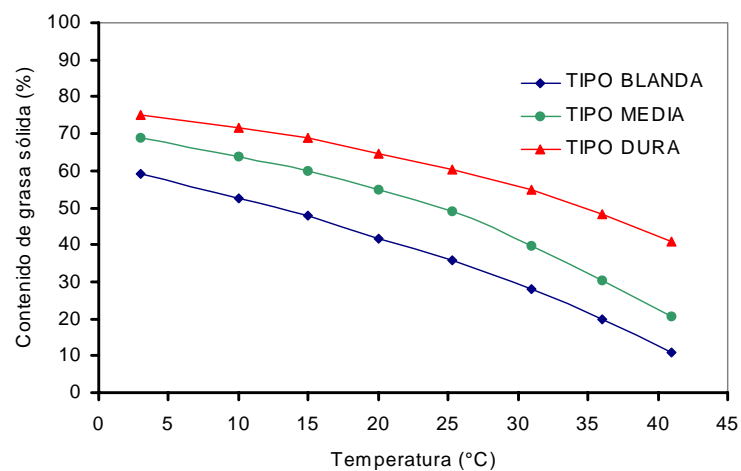


FIGURA 4. Contenido de grasa sólida de tres tipos de margarinas empleadas en repostería. Tomado de Bergel (1986)

1.3. CLASES DE SHORTENINGS Y MARGARINAS

Según la composición y naturaleza de los triacilglicéridos, los shortenings se clasifican en sólidos, líquidos y fluidos. Los sólidos se dividen según el intervalo plástico, si este es estrecho el

shortening será duro y quebradizo a bajas temperaturas, y llegará a ser blando y prácticamente fluido a altas temperaturas.

En el caso de los shortenings fluidos se distinguen de los líquidos, por su contenido de sólidos suspendidos, los cuales pueden ser grasas saturadas o grasas emulsionadas dependiendo, de su aplicación final: freído o horneado. La cantidad de grasa saturada que puede agregarse al aceite base dependerá de la solubilidad de esta. La cantidad de sólidos en suspensión se encuentra normalmente entre 2-10%.

TABLA 1. Composición en ácidos grasos, triacilgliceroles y punto de fusión de algunos shortenings comerciales. ♣

Muestras	A	B	C	D	E	F
Punto de Fusión (°C)	49,5	48,0	45,9	42,3	42,4	42,5
Ácidos Grasos	Composición (% en peso)					
Láurico	0,2	0,1	0,2	Trazas	0,2	0,5
Mirístico	1,2	1,2	1,2	0,3	0,7	0,4
Palmítico	48,6	50,4	47,6	17,3	22,9	18,3
Esteárico	4,8	4,8	3,8	7,2	9,8	8,0
Oleico	36,3	34,6	36,2	41,2	47,4	41,9
Linoleico	8,7	8,1	10,8	33,1	16,9	29,9
Linolénico	Trazas	0,1	0,1	0,8	1,7	1,0
Araquidónico	0,2	0,1	0,1	Trazas	0,4	0,2
Triacilgliceroles	Composición (% en peso)					
C44	0,1	0,1	0,1	-	-	-
C46	1,1	1,3	1,3	-	-	0,4
C48	13,3	16,4	15,0	2,2	2,3	5,0
C50	41,2	40,9	41,7	12,2	5,8	8,2
C52	35,1	32,3	33,5	27,8	27,9	21,5
C54	8,9	8,7	7,8	60,0	63,2	63,9
C56	0,3	0,2	0,4	0,3	0,8	0,4
C58	-	0,1	0,2	0,5	-	0,5

♣ Tomado de Noraini et al. (1992)

En la **Tabla 1**, se muestran las características fisicoquímicas de tres shortenings producidos en los Estados Unidos (A, B y C), y tres producidos en Malasia (D, E y F). Las muestras A, B y C son obtenidas a partir de una mezcla de aceite de palma y estearina de palma, mientras que las muestras D, E y F de una mezcla de aceite de palma y soya. Se puede apreciar el alto contenido de ácidos grasos saturados de los productos A, B y C.

Por su composición, estos shortenings son adecuados para hornear debido a su alta estabilidad térmica proporcionada por los ácidos grasos saturados, asimismo el producto final presentará un mayor volumen es decir serán más esponjosos. En cambio las muestras D, E y F, debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados, son adecuadas para la industria de confitería y repostería (Petrauskaite et al., 1998).

Con respecto a las margarinas, pueden distinguirse tres tipos: margarina de mesa (blandas) que incluyen las distintas categorías de cubeta y de barra; margarina industrial o margarinas para panadería y pastelería (Berger, 1986).

En el caso de las margarinas de mesa, su consistencia a la temperatura de uso es importante, en el caso de las de barra se requiere que sean esparcibles a 15 °C para climas templados y para climas tropicales entre 20 y 25 °C; mientras que las margarinas de cubeta deben ser esparcibles entre 5 y 10 °C. De igual forma, las margarinas para panadería y pastelería deben poseer un contenido de grasa sólida relativamente alto, con la finalidad de mejorar su plasticidad y su resistencia térmica.

TABLA 2. Composición de ácidos grasos y triacilgliceroles y punto de fusión de margarinas comerciales.

Muestras	A ^a ♣	B ^b ♣	C♣	D♠
Punto de Fusión (°C)	39,2	35,4	35,9	35,2
Ácidos Grasos	Composición (% en peso)			
Láurico	6,0	-	5,0	2,6
Mirístico	2,6	0,1	2,2	1,0
Palmitico	33,7	9,6	24,5	12,2
Estearico	4,1	7,5	4,7	4,9
Oleico	33,1	34,7	30,9	20,5
Linoléico	16,8	40,4	26,2	57,0
Linolénico	1,2	6,3	4,1	0,8
Araquidónico	0,3	0,4	0,3	-
Otros	1,2	0,9	1,3	-
Triacilgliceroles	Composición (% en peso)			
C44	3,7	0,1	0,9	19,8
C46	7,3	0,9	0,9	13,1
C48	11,4	2,5	4,1	19,2
C50	24,7	7,5	21,1	15,9
C52	27,6	30,0	29,8	10,5
C54	18,6	58,0	34,5	9,3
C56	0,3	0,5	0,2	0,6
C58	-	0,5	0,1	0,4

♣ Tomado de Idris et al. (1996)

♠ Tomado de deMan et al. (1991)

a. Contiene además 0,5% de Caprilico. También contiene 0,1% de C30, 0,2% de C32, 0,4% de C34, 0,9% de C36, 0,9% de C38, 1,4% de C40 y 2,5% de C42.

b. Contiene además 0,4% de Caprilico. También contiene 0,1% de C30, 0,7% de C32, 1,0% de C34, 2,3% de C36, 2,0% de C38, 1,1% de C40 y 1,1% de C42.

En la **Tabla 2**, se presenta la composición en ácidos grasos, triacilgliceroles y punto de fusión de margarinas producidas en Malasia, a partir de la mezcla de aceite de palma, aceite de palmiste y aceite de soya (muestra A); en Japón, producida de la

mezcla aceite de soya, de palma y de colza (muestra B); en Australia, fabricada de la mezcla de aceites vegetales (muestra C) y en Canadá, producida de la mezcla de aceites de girasol, de palma y de palmíste (muestra D). Todas presentan alto contenido de ácidos grasos insaturados, reflejándose en sus puntos de fusión bajos, característicos de las margarinas de mesa (Bernardini, 1981).

Cabe concluir que, de acuerdo a la aplicación del producto final, las características de las grasas y aceites pueden ser modificadas mediante la alteración de su contenido de ácidos grasos saturados o insaturados.

1.4. PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS BASE PARA MARGARINAS Y SHORTENINGS

Los siguientes procedimientos se han usados para la preparación de grasas bases.

1.4.1. Procesos Físicos. Existen dos formas de producir una grasa base mediante procesos físicos. La primera consiste en mezclar en proporciones adecuadas una grasa y/o aceite de consistencia suave, denominada "*basestock*" con una grasa y/o aceite de consistencia dura "*hardstock*", para obtener la mejor consistencia posible requerida para su empaque y manejo. Las grasas obtenidas por simple proceso de mezclado presentan cierta tendencia a separarse debido a la baja afinidad que presentan los

triacilgliceroles entre sí, y como consecuencia se presenta la exudación de la fase líquida.

La segunda es el proceso de fraccionamiento, en este proceso se obtienen los sólidos (triacilglicéridos totalmente saturados) que existen en un aceite a una cierta temperatura. El método más utilizado es la winterización (Kellens, 1995), en cuyo caso, se separan por cristalización, pequeñas cantidades de los componentes sólidos. Este proceso se realiza enfriando el aceite, cristalizando cuidadosamente los sólidos que existan a esa temperatura, y separando por un método que normalmente es la filtración. Woerfel, (1995) empleando aceite de soya totalmente hidrogenado, y mezclas de aceite de palma y aceite de soya y Kellens (1995) con aceite de soya parcialmente hidrogenados, obtuvieron grasas base aplicando su fraccionamiento para la producción de margarinas y shortenings de uso en pastelería.

Hoy en día el fraccionamiento de grasas y aceites, es la técnica más empleada debido a su bajo costo, el cual no requiere un post-tratamiento suplementario de los productos terminados.

1.4.2. Procesos Químicos. Otra forma de obtener las grasas base es mediante la hidrogenación o la transesterificación respectivamente.

Hidrogenación. La hidrogenación de las grasas consiste en la adición de hidrógeno a los dobles enlaces de las cadenas de los ácidos grasos de los triacilgliceroles. A pesar de que el proceso de

hidrogenación puede originar ácidos grasos *trans*, aún se aplica para la obtención de estas grasas. Por ejemplo, la mayoría de las margarinas y shortenings producidos en los Estados Unidos son obtenidas de una combinación de aceites parcialmente hidrogenados con el aceite de soya (D'Souza et al., 1992; Woerfel, 1995). Grimaldi et al. (1998) estudiaron la hidrogenación de diferentes aceites para la producción de margarinas y encontraron que disminuyendo en grado de insaturación de la grasa de partida, se obtiene un producto con buenas características para ser usado en la preparación de margarinas.

En Colombia, no obstante, de los estudios realizados a nivel mundial sobre las consecuencias del consumo de los ácidos grasos *trans*, la mayoría de los productos de consumo humano fabricados con grasas, especialmente la margarinas, son producidos a partir de grasas hidrogenadas.

Interesterificación. Este proceso permite modificar la estructura y composición química de aceites y grasas con lo cual se logra mejorar sus propiedades físicas (cristalización, plasticidad y fusión) y propiedades nutritivas entre otras, manteniendo los ácidos grasos esenciales (Valenzuela et al., 1994; Ray y Bhattacharyya, 1995).

El término interesterificación es usado para describir las reacciones que envuelven el cambio de radicales acilos entre un éster y un ácido denominándose *acidólisis*, entre un éster y un alcohol llamado *Alcohólisis*, y finalmente entre un éster con otro éster conocido

como *transesterificación*. En este trabajo se hará énfasis en la transesterificación.

La transesterificación involucra el intercambio inter e intramolecular de los ácidos grasos de los triacilglicerolos. Este intercambio puede ser al azar y estereoespecíficamente, es decir manteniendo o modificando la posición de los ácidos grasos en la molécula del triacilglicérido, lo que se refleja en las propiedades de las grasas como la plasticidad y la cristalización del producto final (Sreenivasan, 1978; List et al., 1995).

Transesterificación Química: En la reacción de transesterificación química se han empleado como catalizadores el metóxido de sodio, una aleación de potasio y sodio, sodio metálico e hidróxido de sodio. La reacción catalítica se caracteriza por una migración al azar de los grupos acilo entre las moléculas de triacilglicerol, modificando de esta forma su composición y, su comportamiento físico (Posorske et al., 1988).

Diferentes aceites vegetales y grasas animales han sido utilizados en reacciones de transesterificación. Por ejemplo, usando metóxido de sodio se han investigado las siguientes reacciones: a) aceite de girasol con manteca de cerdo y sebo completamente hidrogenada (Chobanov y Chobanova., 1977), b) aceite de girasol con aceite de soya totalmente hidrogenado (List et al., 1977); c) aceite de soya con sebo de res (Lo y Handel, 1983); d) aceite de algodón (Hernández y Lusas,1997); y e) aceite de soya, canola, palma, algodón, maíz, maní (List et al., 1995). En estos estudios, se

evaluó el efecto de la transesterificación sobre los siguientes parámetros: punto de fusión, contenido de grasa sólida y la tendencia de cristalización de los productos obtenidos. Los resultados obtenidos en estos estudios mostraron que la transesterificación catalítica indujo cambios apreciables en las propiedades fisicoquímicas de las materias primas, obteniéndose un producto con aplicación industrial.

Otros investigadores como Petrauskaite et al. (1998), emplearon aceite de soya sin hidrogenar, aceite de soya completamente hidrogenado y estearina de palma. Mientras Habit et al. (1998), usaron aceite de palma, aceite de girasol y palmiste, y oleína de palma, empleando como catalizador el metóxido de sodio. Grompone (1992), preparó en cambio, las grasas base para producir margarinas y shortenings, transesterificando el aceite de soya y girasol parcialmente hidrogenados usando como catalizador el hidróxido de sodio. Los resultados obtenidos en todos los trabajos permitieron concluir que la transesterificación química puede ser utilizada como una alternativa a la hidrogenación parcial para producir grasas plásticas adecuadas para la fabricación de margarinas y shortenings.

Transesterificación Enzimática: La transesterificación también se puede llevar a cabo usando enzimas, tipo lipasa. Esta reacción tiene varias ventajas sobre la catálisis química, como es su alta selectividad esteroespecífica al intercambio del ácido graso específico, y el empleo de condiciones de reacción muy cercanas a la temperatura y la presión ambiental (Macrae, 1983).

La Figura 5 muestra el esquema general de la reacción de transesterificación catalizada por la lipasa 1,3 específica.

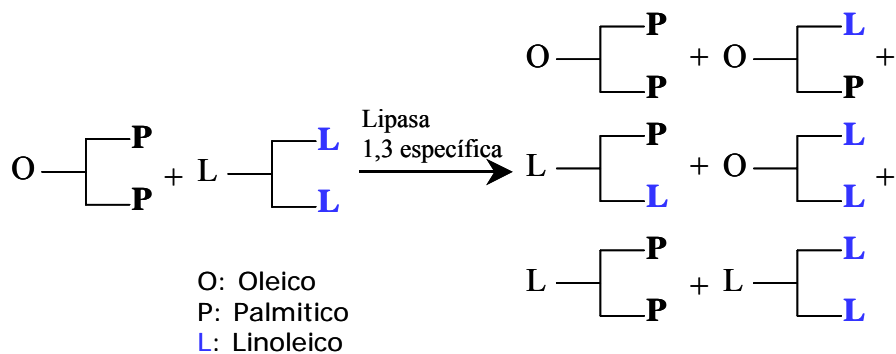


FIGURA 5. Esquema general de la reacción de transesterificación

Aunque el uso de lipasas para la modificación de grasas y aceites no es reciente (Valenzuela y Nieto, 1994), su utilización en la reacción de transesterificación en los últimos años ha crecido significativamente, debido a la producción de lipasas microbianas con altos rendimientos, mayor actividad catalítica, y su inmovilización sobre soportes de naturaleza orgánica ó inorgánica.

Las enzimas que tienen mayor aplicación potencial en la industria oleoquímica son las lipasas microbianas extracelulares como la lipasa pancreática porcina 1,3-específica y la lipasa 1,3-esteroespecífica del *Mucor miehei*, principalmente en la forma inmovilizada. (Macrae, 1992).

La aplicación de estas enzimas se pueden ver en diferentes trabajos entre los cuales se destacan los realizados por Kurashige et al.,

(1993) quienes estudiaron la reacción de transesterificación del aceite de canola y aceite de palma usando como catalizador la lipasa de origen *Rhizopus delemar*. Los autores evaluaron el efecto de la relación de sustratos, sobre el punto de fusión, la composición de triacilgliceroles, contenido de grasa sólida y tendencia de las formas polimórficas de las mezclas, observando que la fluidez y su estabilidad mejoran significativamente, permitiendo al producto obtenido su uso como aceite para fritura.

Fogolia et al. (1993), realizaron la transesterificación del sebo con aceite de girasol a 60°C durante 5 horas, las lipasas usadas tuvieron los siguientes origen microbianos: *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* y la *Geotrichum candidum*, todas fueron inmovilizadas. Sus estudios fueron orientados a determinar la especificidad de cada enzima, observando que la lipasa de *Geotrichum candidum* es selectiva para los ácidos grasos insaturados, mientras que las dos restantes son específicas para las posiciones 1,3.

Forsell et al. (1992), estudiaron el efecto de la transesterificación del sebo con aceite de colza sobre el punto de fusión del producto, usando una lipasa de origen *Mucor miehei* inmovilizada.

Lai et al. (1998) evaluaron las propiedades físicas tales como punto de fusión, contenido de grasa sólida y forma de cristalización de los productos obtenidos durante la transesterificación de la estearina de palma con aceite de palmiste usando lipasas de origen microbiano *Rhizomucor miehei* y *Pseudomonas*. Sus resultados permitieron observar que las grasas obtenidas son adecuadas para

la fabricación de margarinas, debido a que funden completamente entre 37 y 40° y su forma de cristalización predominante fue la β' ; igualmente apreciaron cambio significativos en la composición de triglicéridos del producto de reacción.

Formuso y Ago (2001), obtuvieron lípidos estructurados apropiados para la fabricación de margarinas, durante la reacción del ácido esteárico con el aceite de canola usando una lipasa no específica de origen microbiano *Candida antarctica*.

1.5. LAS LIPASAS

En la naturaleza las lipasas son enzimas que hidrolizan los triacilglicéridos para producir ácidos grasos libres y glicerol. Sin embargo, la reacción inversa (reacción de transesterificación) se puede realizar en condiciones de bajo contenido de agua.

En la reacción de transesterificación se emplean las lipasas conocidas con el nombre de triacilglicerol acilhidrolasas, E.C. 3.1.1.3. Estas enzimas se caracterizan por hidrolizar solamente los triglicéridos emulsionados, siendo activas en la interfase agua-grasa. En términos de selectividad de sustrato, las lipasas pueden ser clasificadas normalmente en tres grupos: Lipasas 1,3 selectivas (específicas para la posición 1 y 3); Lipasas selectivas para un grupo acil dado de una estructura específica (selectividad hacia tipos particulares de ácidos grasos) y Lipasas no específicas (actúan al azar). Además, existe la lipasa con especificidad para la posición

2, sin embargo, ésta enzima no esta disponible comercialmente (Belitz y Grosch, 1997).

El uso progresivo de las lipasas se debe a la disponibilidad de diferentes fuentes comerciales con bajo costo y con alto grado de pureza, asimismo, porque no necesitan cofactores para su actividad catalítica. Se pueden emplear con solventes orgánicos, ya que su actividad catalítica envuelve una interfase lipofílica - hidrolítica, que les confiere una inherente afinidad por los medios hidrófobos, diferenciándose así de otras enzimas, permitiendo su aplicación en síntesis orgánica.

La lipasa pancreática de cerdo, ha sido la lipasa más estudiada. La velocidad de hidrólisis de esta enzima disminuye en el siguiente orden triglicéridos >> diglicéridos > monoglicéridos, los últimos son desdoblados muy lentamente. La velocidad de la lipólisis depende tanto de la longitud del resto acilo, como del tamaño de la gota de aceite, es decir entre menor sea la gota de aceite, más activas serán las lipasas. Esta relación debe tenerse en cuenta al preparar las emulsiones que se emplean como substrato para determinar la actividad enzimática (Belitz y Grosch, 1997).

En la interfase aceite - agua, la lipasa fija la gota de aceite (fase aceitosa) que es la parte hidrófoba, mediante interacciones hidrófobas de forma que el centro activo de la enzima se orienta hacia el enlace éster de la molécula de substrato como se muestra en la **Figura 6**.

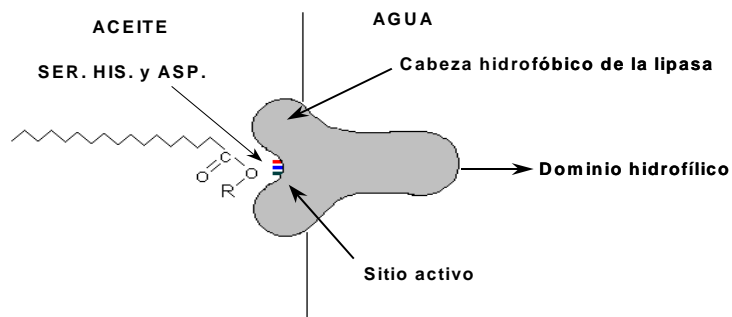


FIGURA 6. Modelo hipotético de la fijación de la lipasa pancreática sobre la interfase aceite - agua

De otra parte, las lipasas tienen algunos elementos de estructura secundaria (llamada "tapa") los cuales ocultan el sitio activo, haciéndolo impenetrable al sustrato. No obstante, en la interfase hidrofóbica tienen lugar importantes cambios conformacionales generando la estructura abierta de las lipasas que le otorga funcionalidad a la enzima (**Figura 7**), ya que permite la interacción del sustrato con el centro activo, el cual está formado por la tríada, Serina, Histidina, Ácido Aspártico, que participa en la hidrólisis del enlace éster por un mecanismo semejante al de la quimotripsina.

A diferencia de las serinoproteinasas, la lipasa pancreática posee en su centro activo un resto de Leucina, que incrementa el contacto hidrófobo con el sustrato y lo dirige hacia el centro activo.

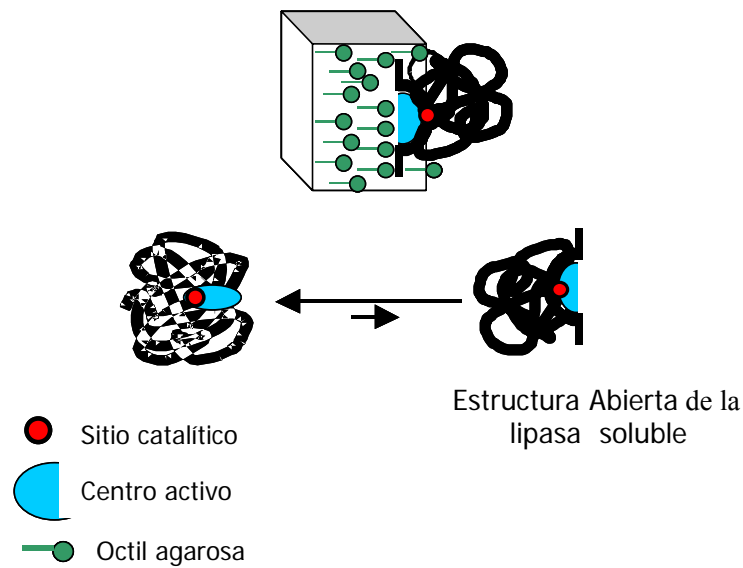


FIGURA 7. Modulación del centro activo de la lipasa por adsorción sobre un soporte hidrófobo.

Una de las características más relevantes de las lipasas es la retención de su actividad en ausencia de agua, debido a que el agua no es el medio de reacción apropiado para la mayoría de los procesos industriales. Cuando el agua se elimina, exceptuando una pequeña cantidad, necesaria para mantener la integridad de la proteína, las posibilidades de biocatálisis se incrementan (Bloomer y Mattiasson, 1990).

La acción enzimática en solventes orgánicos tiene grandes ventajas en contraposición al medio acuoso. Algunas de estas ventajas son: 1). La gran solubilidad de muchos compuestos orgánicos en medio no acuoso; 2): La mayor facilidad en la recuperación del correspondiente producto en disolvente orgánico en comparación con el agua y 3). La insolubilidad de la enzima en medio orgánico.

Esto hace que sea más fácil la separación de ésta del medio de reacción.

1.5.1. Reacciones catalizadas por lipasas

Las lipasas catalizan la hidrólisis / síntesis de un intervalo amplio de ácidos carboxílicos, ésteres y amidas solubles e insolubles, y reacciones que pueden utilizarse industrialmente para una gran variedad de propósitos (hidrólisis de aceites y grasas), síntesis de ésteres de ácidos grasos como materia prima para cosméticos o surfactantes, producción de intermedios para síntesis orgánica o producción de grasas con propiedades funcionales definidas. Estas últimas aplicaciones han tomado fuerza actualmente debido a la combinación de una amplia especificidad del sustrato así como una alta regio- y estereoespecificidad exhibida por la mayoría de las lipasas (Bastida et al., 1998).

La hidrólisis de un éster catalizado por lipasas se cree que procede vía un intermedio acil-enzima. La reacción es reversible, y en condiciones de bajo contenido de agua, la lipasa puede funcionar "inversamente", es decir, sintetizando enlaces éster en lugar de hidrolizarlos (Mojovic et al., 1993).

1.5.2. Lipasas inmovilizadas

Las aplicaciones industriales de las enzimas deben permitir la posibilidad de re-usar la enzima por razones de economía del

proceso. En este sentido, la inmovilización es necesaria para facilitar su recuperación y reutilización, facilitando además la realización de procesos continuos.

Sin embargo, hay factores como el solvente, el soporte y volumen de agua que influyen en el desempeño de una enzima inmovilizada. Por lo anterior, se han llevado a cabo investigaciones tendientes a incrementar su estabilidad y a protegerla cuando el medio de reacción es no polar (Hultin, 1983; Brady y col., 1988; Huges-Jensen et al., 1988; Arroyo, 1988; Mojovic et al., 1993; Bastida et al., 1998; Knezevic et al., 1998). Por ejemplo, un soporte adecuado para la transesterificación en medio no polar son las tierras de diatomeas o diatomáceas, perlite, y sílica gel, debido a que poseen un área superficial alta y una capacidad de retención de agua adecuada para la activación de la enzima, otorgándole gran capacidad para operar en medios orgánicos, y permitir la síntesis catalítica de ésteres con altos rendimientos. Estos soportes paralelamente proporcionan mayor resistencia mecánica a la enzima, permitiendo adaptar condiciones de trabajo económicamente rentables.

Últimamente, el desarrollo de las lipasas inmovilizadas ha incrementado la posibilidad de aplicación industrial de estos procesos ya sea en reactores tipo batch o de flujo continuo. La lipasa *Rhizomucor miehei* es una enzima muy prometedora para la aplicación de estos procesos debido a su elevada actividad, buena selectividad, y tiempo de vida media alto (Bloomer et al., 1990).

1.6. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Como cualquier catalizador, las lipasas pueden incrementar la velocidad de la reacción por un factor de 10⁶ a 10¹¹. Las condiciones requeridas de temperatura y de pH son generalmente suaves. Basado en la expresión de velocidad asociado con un par de substratos/productos y catalizador, es posible en un principio diseñar sistemas reactantes, y anticipar su desempeño, basado en relaciones mecanísticas o empíricas entre las variables del proceso como tiempo, temperatura, pH y concentración de los compuestos presentes en el medio de reacción (Paiva et al, 2000).

La reacción catalizada por lipasas, la enzima asume su conformación natural, donde determinados grupos aminoácidos se acoplan en una disposición geométrica específica para formar el sitio activo. Las cadenas laterales de estos sitios activos ayudan a enlazar las moléculas de los reactantes al sitio o catalizar la transformación química para formar los productos.

1.6.1. El mecanismo de la reacción

Todas las 130 lipasas poseen como sitio activo un conjunto de grupos no secuenciales de Ser – His – Asp o Ser – His – Glu, esta tríada catalítica, esta oculta en el interior de la estructura de la enzima esencialmente en las moléculas de las lipasas inactivas.

Independientemente del tipo de reacción catalizada (hidrólisis, esterificación o interesterificación), la más general, exacta, y aceptada descripción de la acción catalítica de las lipasas es el mecanismo Pin Pong Bi Bi constituido por dos pasos importantes: 1) El ataque nucleofílico sobre el enlace éster del sustrato por parte del átomo de oxígeno del grupo hidróxido de la serina en el sitio activo después apertura de la tapa, resultando así en la formación de un complejo acil-enzima y liberando la mitad del alcohol del sustrato original; y 2) la hidrólisis del complejo acil-enzima, resultando así la formación del producto y regeneración de la enzima. Estos eventos ocurren a una velocidad desde 10^3 a 10^6 veces por minuto por molécula de enzima (Ault, 1974; Splittgerber, 1985; Paiva et al, 2000).

Cuando el agua está presente en gran exceso en el medio de reacción, la expresión para velocidad puede ser escrita en una ecuación simple que se asemeja a la expresión de velocidad de Michaelis – Menten, es decir :

$$v = \frac{V_{\text{max,aparente}} \times [\text{Sustrato}]}{K_{\text{M,aparente}} + [\text{Sustrato}]} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $V_{\text{max, aparente}}$, denota la velocidad máxima aparente en la dirección de formación del producto, y $K_{\text{M, aparente}}$, denota una constante aparente de Michaelis Menten y es característica de la enzima. La ecuación de Michaelis Menten en esta forma es aplicable solamente para un solo sustrato. Las reacciones

catalizadas por enzimas que tengan más de un sustrato están sujetas a leyes de velocidad más complejas en la cual se tienen en cuenta las concentraciones de todos los sustratos.

Las constantes de Michaelis, V_{\max} y K_M permiten determinar la afinidad de la enzima por el sustrato. Es decir, el sustrato que registre el menor valor de K_M tiene la mayor afinidad por la enzima, en otras palabras el mejor sustrato es aquel que presente el valor más alto de V_{\max}/K_M (Ault, 1974; Splittgerber, 1985; Garcia et al., 1999).

1.6.2. Factores que afectan las velocidades de reacción

Todo lo que cause la disminución de la energía de activación en una reacción acelera la velocidad de la reacción. Hay, sin embargo, otros factores que tienen poca o no afectan la energía de activación y que sin embargo afectan la velocidad de la reacción. Entre estos son la concentración de enzima, de sustratos y productos, así como el pH y la temperatura. Estos factores no afectan la altura de la barrera del estado transitorio, pero afectan la población del estado transitorio en otros caminos (Splittgerber, 1985).

1.6.3. Cinética en sistemas grasos

Como se mencionó anteriormente la ecuación de Michaelis-Menten es aplicable para un solo sustrato. En el caso cuando se tienen dos sustratos constituidos por diferentes compuestos como es el caso de los aceites y grasas, la aplicación de la ecuación de

Michaelis-Menten no es adecuada, debido a que se hace necesario tener en cuenta la concentración de todas las especies existentes en el medio de reacción lo que conlleva a obtener una expresión matemática compleja (Splittgerber, 1983).

Por todo lo anterior son pocos los trabajos realizados sobre la cinética enzimática. Existen algunos estudios realizados pero empleando sustratos específicos, entre los que se destaca el estudio realizado por Akimoto et al (1999), quienes estudiaron la cinética con la finalidad proveer las bases matemáticas para el diseño y operación en continuo de un reactor de lecho empacado de la reacción de acidólisis catalizada por la lipasa *Mucor miehei*, del aceite de soya con ácido oleico. Por otro lado, los estudios de García et al (1999) se enfocaron en el modelamiento cinético de las reacciones de esterificación catalizada por la lipasa inmovilizada *Candida antarctica* del ácido 2 – metil-butirico con n – octanol y la síntesis de monoglicéridos a partir de la reacción del ácido ricinoleico y glicerol.

1.7. METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

Uno de los factores que limita el uso de las lipasas en la fabricación de productos a nivel industrial es su alto costo. Por esta razón, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la optimización de las condiciones del proceso que permitan obtener un producto a menor costo. Una herramienta estadística adecuada para este propósito es la metodología de superficie de respuesta (**RSM**). Esta

técnica determina las condiciones óptimas por combinación especial del diseño experimental con modelamiento por ecuaciones polinomiales de primer y segundo orden, en un procedimiento comprobación secuencial. El **RSM** especifica el efecto de las variables independientes, solas o en combinación, sobre el proceso cuando se aplican a varios sistemas de reacción.

Los resultados de un experimento clásico donde se aplica como metodología analizar el efecto de una variable manteniendo las otras constantes, son poco adecuados para lograr condiciones óptimas si la respuesta depende de dos o más factores que interaccionen (Senanayake y Shahidi, 1999). La aplicación de **RSM** permite describir los efectos simultáneos de forma más completa y ayudan a la optimización de manera más exacta los factores que afectan el proceso.

Teniendo en cuenta que, son muchos los factores que pueden afectar la reacción de transesterificación entre la estearina de palma y el aceite de palma con el aceite de soya. Éstos incluyen el tiempo de reacción, la concentración de enzima y de substratos, así como la relación de substratos, entre otros. Es por ello que, se hace necesario estudiar estos factores colectivamente para encontrar las mejores condiciones de reacción que permitan obtener un producto adecuado para la fabricación de margarinas y shortenings, y además que el proceso sea económicamente viable.

1.8. EL ACEITE DE PALMA, LA ESTEARINA DE PALMA Y EL ACEITE DE SOYA COMO MATERIAS PRIMAS PARA LA OBTENCIÓN DE GRASAS ESPECIALES

Debido a la composición de los ácidos grasos, los triacilglicéridos del aceite de palma pueden cristalizarse en forma fraccionada para producir una fracción sólida y una líquida. La estearina, constituye la fracción sólida y se caracteriza por un alto contenido de triacilglicéridos compuesto por ácidos grasos saturados (ver **Tablas 3 y 4**) los cuales le otorgan la propiedad de presentar un punto de fusión alto y facilitan su cristalización en la forma β' , por lo cual es utilizada como *hardstock* en la fabricación de margarinas y shortenings (Habi y Rahim, 1998; Lai et al., 1998). La estearina también se utiliza como iniciador de la cristalización en la industria de la confitería, en la preparación de sopas secas y mezclas en polvo, y después de la glicerólisis, en la preparación de emulsificantes para alimentos (Cottrell, 1996).

La fracción líquida, denominada oleína, constituida fundamentalmente por triacilglicéridos con ácidos grasos insaturados (ver **Tablas 3 y 4**), lo cual permite obtener un punto de fusión bajo (Habi y Rahim, 1998; Lai et al., 1998). La oleína se utiliza como sustituto de los aceites blandos en aceites para ensaladas y freído de consumo humano. Igualmente se utiliza en los sustitutos de la leche y blanqueadores líquidos para café.

(Cottrell, 1996).

TABLA 3. Composición (%) en ácidos grasos del aceite de palma, estearina de palma y del aceite de soya.

Ácido Grasos	Aceite de palma♦	Estearina de Palma♦	Aceite de Soya ♠	Aceite de palma ♣
12:0	0,1	0,6	-	-
14:0	1,0	1,9	-	1,5
16:0	44,7	60,5	11,9	47,2
18:0	4,0	4,9	2,2	4,8
18:1	40,1	26,0	22,7	37,2
18:2	9,5	5,8	54,3	8,6
18:3	0,2	0,1	9,3	-
20:0	0,2	0,2	-	-
I. de yodo	51,5	30,9	131,7	N.D.
Pto Fusión, °C	36,7	52,5	-	43,5

♦ Tomado de Yap y deMan (1989),

♠ Tomado de Akimoto y col. (1999)

♣ Tomado de Moreno, (2001).

TABLA 4. Composición (% en peso) en triacilglicerolos (TG's) de diferentes aceites y grasas vegetales.

No. Equivalente ^a	Carbón de palma ♠	Aceite de palma ♠	Estearina de Palma ♠	Aceite de Soya ♠	Aceite de palma ♣	Estearina de Palma ♣
C46	1,0	1,9	-	0,6	1,4	
C48	9,5	24,1	-	7,7	19,9	
C50	42,5	37,1	3,4	34,1	37,6	
C52	38,2	27,6	31,4	39,4	28,7	
C54	8,5	5,3	65,7	12,3	7,9	
C56	-	-	-	0,6	0,5	
Digliceridos	10,2	Nd	-	5,3	4,1	

♠ Tomado de Christie et al (1991)

♣ Tomado de Moreno, (2001).

a. **C46**: MPP/MOMO; **C48**: PPP, MOP, MLP; **C50**: LPP + PLP, SPP*, POP, **C52**: LOP, LLP, PLLn, OOP*, PSS, POS, PLO + POL; **C54**: SOO*, SOS, SSS, LOO, LLO, LLL, LLLn, LnOO, LLnLn, OLO, SLO, SLL; **C56**: SOA. L = linoléico; Ln = linolénico;

O = oleico; P = palmítico; S = esteárico

* En aceite de palma y sus fracciones: POO: (POO+PLS); SOO: (SOO+SLS); PPS: (PPS+MSS)

Con el fin de aumentar las aplicaciones de la estearina, es necesario modificarla de tal manera que pueda ser utilizada como materia prima para la fabricación de grasas especiales. En este sentido se ha pensado de realizar una reacción de transesterificación entre la estearina y el aceite de soya. El aceite de soya debido a su alto contenido de triacilgliceroles constituidos por ácidos grasos insaturados (ver **Tablas 3 y 4**), ha sido utilizado con fuente de "basestock", lo cual le confiere al producto propiedades como estabilidad, plasticidad, a bajas temperaturas entre otras.

La reacción de transesterificación de la estearina con el aceite de soya, permitirá modificar la composición de los ácidos grasos de sus triacilglicéridos, introduciendo ácidos grasos insaturados de tal forma que modifique sus propiedades de fusión y permitan su aplicación en la fabricación de margarinas y shortenings; los cuales actualmente utiliza productos hidrogenados como materia prima, que contienen ácidos grasos *trans*, los cuales no son recomendados para consumo humano. La modificación de la estearina tal como se ha descrito permitirá usarla como materia prima para obtener margarinas y shortenings sin ácidos grasos *trans*.

El presente trabajo se propuso realizar la transesterificación enzimática de la estearina de palma y del aceite de palma con el aceite de soya para obtener un producto con las ventajas mencionadas, manteniendo en la estructura de los triacilgliceroles ácidos grasos esenciales, lo cual adicionaría un factor nutricional importante al producto obtenido mediante esta vía.

2. METODOLOGÍA

2.1. MATERIAS PRIMAS

El Aceite de palma, estearina de palma y aceite de soya refinados fueron proporcionados por la Empresa Santandareana de Aceites – SACEITES. En cuanto a la enzima es una lipasa de *Rhizomucor miehei* producida por fermentación del microorganismo *Aspergillus oryzae*. La enzima empleada, es un producto granular con tamaño de partícula entre 0,2 a 0,6 mm, su densidad bulk esta entre 350 – 450 kg/m³. se encuentra soportada en una resina de intercambio aniónica específicamente del tipo fenólica, con un contenido de agua entre 2 – 3% y puede ser usa a temperaturas entre 30 – 70°C. Esta enzima fue comprada a la Novo Nordisk. Los reactivos utilizados fueron todo grado analítico.

2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los métodos señalados a continuación se emplearon para la caracterización de las materias primas y de los productos obtenidos en la reacción de transesterificación.

2.2.1. Actividad Hidrolítica (Lipolítica) de la Enzima

La actividad de una enzima se define como la cantidad de la misma que cataliza la formación de 1 μmol de producto en 1 minuto. Su determinación se llevó a cabo utilizando una adaptación del método descrito por Moreno y col. (2001).

La actividad hidrolítica de la enzima se evaluó con oleína de palma y con cada uno de los sistemas estudiados con la finalidad de efectuar una comparación adecuada con los resultados obtenidos de la reacción de transesterificación y observar el efecto del sustrato sobre la actividad de la enzima. El sustrato se preparó emulsionando una cantidad fija de oleína de palma con un volumen determinado de una solución de cloruro de sodio (0.89% NaCl w/v) y una cantidad fija de goma arábiga, agitando esta mezcla en un tubo de ensayo durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Luego se tomó 20 mL de la emulsión de sustrato y se agregó solución de cloruro de sodio al 0,89% hasta completar un volumen 40 mL. El pH se ajustó a 8.0 adicionando NaOH al 10 mM, y finalmente se agregó una cantidad fija de lipasa. La mezcla se incubó a 70°C con agitación constante en un vial de 50 mL. Los ácidos grasos liberados fueron monitoreados continuamente por titulación con NaOH 10 mM con una bureta automática Dosimat 665 (Metrohn, Switzerland), manteniendo constante el pH a 8,0.

2.2.2. Determinación de los ácidos grasos libres (FFA)

El aceite se disolvió en una mezcla neutra de acetona/alcohol y se valoró su acidez con NaOH 0,1N. El valor obtenido representa la

extensión de la hidrólisis de los glicéridos del aceite por la lipasa. Los ácidos grasos libres se calculan normalmente como ácido oleico. Su determinación se hizo siguiendo la Norma AOAC (Official Methods of Analysis, 1984) numero 28.032. El contenido de FFA se calculo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acido oleico} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{Peq}_{\text{Acido oleico}}}{10 \times W_{\text{Muestra}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

V_{NaOH} : Volumen de NaOH gastado en la valoración, en mL.

N_{NaOH} : Normalidad del NaOH, 0,1N

Peq: Peso equivalente del ácido oleico, 282,45.

W_{muestra} : Peso de aceite o grasa.

10 : Factor de multiplicación, por el peso equivalente del ácido oleico.

2.2.3. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por cromatografía de gases, GC.

La composición en ácidos grasos de los triacilglicéridos del aceite de palma y soya así como de la estearina de palma fueron determinados por cromatografía de gas usando un inyector split – splittess en relación 80:1 a 250°C y un detector de ionización por llama (FID) a 250°C. Los metil esteres de los ácidos grasos fueron separados sobre una columna capilar DB-WAX (100% Polyethylene Glycol; J & W Scientific) de longitud 30 m, diámetro interno 0.32 mm, tamaño de partícula de 0.25 µm usando como gas de arrastre

helio a flujo constante de 0,7 mL/min. El programa de temperatura fue: La temperatura inicial del horno fue establecida a 100°C, y se incremento a una velocidad de 22°C/min hasta 170°C, donde fue mantenida durante 2 min, posteriormente la temperatura fue elevada a 12°C/min hasta 250, y se mantuvo a esta temperatura durante 10 min. El equipo empleado fue un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 Series.

La conversión de los ácidos grasos en sus correspondientes metil esterés se empleo KOH como catalizador, según el método descrito por el Laboratorio de Alimentos (Castellanos y González; 2003). En un tubo de ensayo provisto de tapa, se pesaron 0,5 gramos de grasa, se le adicionaron 10 mL de hexano, agitándose hasta disolución completa. Posteriormente, se adicionaron 500 µL de KOH 2N en metanol y se agitó durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 3500 rpm para lograr una buena separación de las capas. De la capa superior que contiene los metil esterés se tomaron 100 µL y se le adicionaron 60 µL de tridecano (patrón interno) y se aforo a 1 mL, del cual se tomó 1 µL y se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases.

La identificación de los ácidos se hizo por comparación de sus tiempos de retención con los patrones. Los patrones se prepararon a partir de una mezcla estándar de metil ésteres de ácidos grasos en diferentes porcentajes (Supelco, No. 189 18 – 1AMP), por dilución con hexano, en las concentraciones especificadas en la **Tabla 5**. A cada una de las estas soluciones se le adicionaron 60

μL de tridecano de concentración 20,28 mg/mL, como estándar interno.

La cuantificación de los ácidos se realizó por el método del estándar interno, multiplicando el factor de respuesta del ácido por la relación del área del pico del componente (A_m) sobre el área del pico del estándar interno (A_{IS}).

TABLA 5. Concentración (mg/mL) en metil ésteres de los patrones

Nombre	Concentración (mg/mL)
Patrón A	44,8
Patrón B	17,92
Patrón C	13,44
Patrón D	8,96
Patrón E	4,48
Patrón F	2,24
Patrón G	1,12
Estándar Interno	20,28

2.2.4. Identificación y cuantificación de los triglicéridos (TG)

La composición en triacilglicéridos de las materias primas, aceite de palma y soya, y de la estearina de palma, así como de los productos obtenidos de la reacción de transesterificación fueron determinados empleando la técnica de cromatografía de gases. En las etapas de optimización de las condiciones de reacción y caracterización de las materias primas y de los productos de la reacción se emplearon equipos diferentes y por ende métodos

cromatográficos distintos. Tales diferencias se describen a continuación.

En la etapa de optimización de las condiciones de reacción se empleó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL, con detector de ionización por llama (FID). Se empleó una columna capilar HP - 1 (100% Polidimetilsiloxanol) de longitud 5 m, diámetro interno 0.53 mm, tamaño de partícula de 0.15 μm con la siguiente programación de temperatura: Después de 1 min a 180°C, la temperatura se aumentó 10°C/min hasta 300°C, y después de un período isoterma de 1 min, la temperatura se incrementó a 5°C/min hasta 325°C, y a esta temperatura se mantuvo durante 6 min. Las condiciones de funcionamiento fueron: Gas de arrastre argón (0,8 psi), temperatura del inyector fue de 325°C modo split y temperatura del FID 350°C.

En la etapa de caracterización de las materias primas como de los productos obtenidos del escalado en el laboratorio y planta piloto de la reacción de transesterificación se empleó un cromatógrafo de gases HP 6890 Series Plus equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar DB-17 ht (50% Phenyl Methylpolysiloxane) de 30m x 0.32mm x 0.15 μm con la siguiente programación de temperatura: de 100°C - 250°C a 40°C/min, 250°C - 360°C (6 min) a 7°C/min. Las demás condiciones de trabajo fueron: Gas de arrastre helio a 2ml/min, inyector a 360°C modo split (relación 60:1), FID a 370°

En un vial de 2 mL provisto de tapa, se pesaron 20 μg de grasa (materia prima o producto de la reacción de transesterificación), se

le adicionaron 1 mL de hexano y 25 μ L de colesterol (patrón interno), agitándose hasta disolución completa. Posteriormente se aforó a 1,5 mL, del cual se tomó 1 μ L y se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases.

La identificación de los triacilglicéridos por número de carbonos en la etapa de optimización se hizo empleando los tiempos de retención relativos de cada componente con respecto al estándar interno (colesterol) y empleando los datos de los perfiles cromatográficos reportados por Moreno y Arango (1999), mientras que para las materias prima y productos obtenidos se emplearon los datos de los perfiles cromatográficos reportados en la literatura (www.quadrexcorp.com). La cuantificación se realizó por el método de normalización de áreas, en el cual se suman las áreas de todos los componentes considerándolo como el 100% y se reporta el porcentaje de área que pertenece a los componentes de interés.

2.2.5. Determinación de los Perfiles de Fusión, SFC

El contenido de grasa sólida (**SFC**) fue determinado con un analizador de resonancia nuclear magnética de pulso Brucker Minispec modelo PC -120 (Perkin Elmer). La grasa después de remover los ácidos grasos libres fue fundida a 70°C y posteriormente llevada a 0°C durante 60 min., antes de la primera lectura del **SFC**. Antes de la determinación, la muestra fue acondicionada por 30 min. a la temperatura deseada.

2.2.6. Determinación del Punto de Fusión

El punto de fusión fue determinado mediante el método descrito en AOCS CC. 1 -.25. El tubo capilar con una columna de grasa de un cm de altura fue enfriado a $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas antes de ser sumergidas en un vaso con agua destilada. El baño de agua fue agitado y calentado a una velocidad de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y se tomo la temperatura a la cual la columna de la grasa empieza a fundirse y al final de la fusión.

2.2.7. Determinación de la consistencia

La determinación de la consistencia o estabilidad al almacenamiento fue evaluada en un penetrómetro marca Precisión modelo TS – 73510 – AN -2. La muestra fue colocada en un envase de aluminio de diámetro 60 mm y 12 mm de profundidad y mantenida toda la noche a 4°C . Una aguja cilíndrica de 60 mm, fue fijada a una carga de 50 Kg ajustada en la cruceta del Instron. La velocidad de la cruceta fue determinada a 20 mm/min. El pistón fue fijado para que penetre la muestra 5 mm. Se determinaron lecturas por triplicado para cada muestra.

2.2.8. Determinación del cremado

El cremado es una prueba que determinada la capacidad de la margarina o shortening para incorporar aire en la masa. Este ensayo consiste en mezclar una cantidad de margarina o shortenings con cierta cantidad de azúcar, y determinar su peso cada 5 min. El mezclado se realizó en una batidora eléctrica con una velocidad de 170 rpm.

2.2.9. Análisis de los productos obtenidos del proceso de transesterificación

El producto obtenido de la reacción de transesterificación del escalado a nivel de planta piloto fue caracterizado en cuanto a su composición en triacilglicéridos, ácidos grasos liberados, punto de fusión y contenido de grasa sólida. La composición en triacilglicéridos fue determinada como se describe en el numeral 2.2.4, mientras que el contenido de ácidos grasos libres, punto de fusión y contenido de grasa sólida como se describe en los numerales 2.2.2, 2.2.6, y 2.2.5, respectivamente.

Las margarinas y shortenings fabricados con las grasas bases obtenidas se evaluaron determinando su estabilidad al almacenamiento y cremado como se describe en los numerales 2.2.7 y 2.2.8, respectivamente.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Determinación de las condiciones óptimas de la reacción de transesterificación

Para evaluar las mejores condiciones de reacción, se siguió el diseño experimental de análisis de superficie de respuesta para optimizar las variables de la reacción y que permitieran usar en mayor proporciones la estearina y aceite de palma con relación al aceite de soya, analizándose como variable de respuesta el contenido del triacilglicérido tripalmitina, **PPP**. Se realizaron ensayos a nivel de laboratorio con 1, 100, y 500 gramos de masa de reaccionantes y a nivel de planta piloto con 30 Kg de masa.

Teniendo en cuenta que, son varios los factores que pueden afectar la reacción de transesterificación de las grasas vegetales catalizada por enzimas. En este estudio, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros para optimizar la reacción: la relación de substratos (X_1 , en porcentaje), tiempo de reacción (X_2 en horas), y cantidad de enzima (X_3 , en mg). La temperatura del medio de reacción (70 °C) fue mantenida constante debido a que la enzima presenta su máxima actividad, y los substratos se funden completamente a esta temperatura. Además, esta temperatura fue seleccionada aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta (**RMS**) en otros trabajos realizados por Moreno y Arango (2000) con la misma enzima. La concentración de enzima y el tiempo de reacción son los principales factores que afectan la reacción de transesterificación enzimática. Además, el tiempo de reacción y la temperatura del medio de reacción pueden ser considerados importantes debido a que estos influyen el estado oxidativo de los aceites.

La respuesta o variable independiente estudiada (**Y**) fue la disminución del contenido tripalmitina presente en el aceite de palma y de la estearina de palma. Los 17 experimentos y sus réplicas se hicieron en un orden totalmente al azar para cada uno de los sistemas estudiados.

En este estudio, los niveles de las variables usadas en cada ensayo son mostrados en la **Tabla 6**. Los niveles de la variable independiente son codificados para el diseño experimental. El

punto central para cada variable independiente fue codificado con el cero. Los niveles de interés más alto y bajo para cada variable independiente son codificados con + 1 y - 1, respectivamente, para estos tres niveles del diseño (**Tabla 6**). La principal ventaja de esta clase de diseño es que permite estudiar una o más variables simultáneamente en un solo diseño experimental de tamaño viable (Montgomery, 1991).

TABLA 6. Variables independientes y niveles del diseño experimental para los sistemas a estudiar.

Variable Independiente	Símbolo	Código del nivel de la variable		
		- 1	0	1
Relación substrato/substrato (% peso)	X_1	70:30	80:20	90:10
Tiempo de reacción (H)	X_2	3	5	7
Cantidad de enzima (mg)	X_3	50	100	150

Adicionalmente a la variable de respuesta contenido de **PPP**, se analizó el grado de acidez del producto, con el fin de tenerlo en cuenta ya que las aplicaciones del producto requiere tener un bajo grado de acidez.

2.3.2. Transesterificación enzimática de los sistemas Estearina de palma – Aceite de soya, EP/AS, y Aceite de Palma – Aceite de soya, AP/AS.

A continuación se describen los procedimientos seguidos para realizar la reacción de transesterificación en el laboratorio y planta piloto.

2.3.2.1. Ensayo de Laboratorio

En un tubo de ensayo provisto de tapa, se peso el sustrato, ya sea aceite de palma – aceite de soya, ó estearina de palma – aceite de soya. La mezcla se incubó durante 5 minutos a la temperatura de reacción, luego se agregó la cantidad de enzima necesaria y un 10% en peso de agua con respecto a la cantidad de enzima. La mezcla se mantuvo con una agitación magnética de 200 rpm en un baño termostataado. Los tubos de ensayo con las muestras individuales se removieron a los distintos tiempos de reacción.

Al final de la reacción, la enzima fue removida del producto obtenido por medio de filtración. El filtrado se recogió en un erlenmeyer de 125 mL, se le adicionaron 20 mL de una mezcla de acetona/etanol, 1:1 v/v, y se neutralizó con NaOH 0,1N hasta punto final con fenolftaleína. Este paso se realiza para retirar los ácidos grasos libres, los cuales son los causantes de la acidez del producto.

La mezcla neutralizada, se agitó vigorosamente con 20 mL de hexano. La capa acuosa se separó y descartó, mientras que la capa que contenía los triacilgliceroles se recuperó por remoción del hexano a 40°C en un rotoevaporador.

La composición en triacilgliceroles del producto así obtenidos se determinó por cromatografía de gases, de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 2.2.4.

2.3.2.2. Escalonamiento de la reacción de transesterificación en el laboratorio.

El escalonamiento se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción optimizadas a nivel de ensayo de laboratorio. Estas condiciones fueron: mínima cantidad de enzima, menor tiempo de reacción y mayor relación aceite de palma ó estearina de palma – aceite de soya, las cuales deberían permitir una mayor transesterificación de triacilglicéridos y un proceso viable económicamente.

La reacción de transesterificación se realizó en un reactor cerrado con capacidad de 2 Litros, en el cual se acondicionó un agitador mecánico provisto de una propela o hélice de cuatro hojas. El sistema de calentamiento empleado fue un baño termostatado con recirculación con la finalidad de mantener la temperatura de $70 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Al producto así obtenido se le retiraron los ácidos grasos libres aplicando el mismo procedimiento realizado a nivel de laboratorio.

2.3.2.3. Escalonamiento de la reacción de transesterificación a nivel de planta piloto.

De los productos obtenidos en el escalonamiento en el laboratorio, se seleccionó uno para llevar a cabo la reacción a nivel de planta piloto. El escalonamiento se llevó a cabo bajo las condiciones de

reacción que permitieron obtener un producto adecuado para la formulación de margarinas y shortenings y grasas especiales con aplicación en la industria de chocolatería.

La reacción de transesterificación se realizó en un reactor con capacidad de 50 Litros, con agitador mecánico provisto de una propela o hélice de cuatro hojas. El sistema de calentamiento empleado fue vapor de agua, manteniendo la temperatura entre $70 \pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante un termostato. Del mismo modo que el escalonamiento en el laboratorio, al producto se le retiraron los ácidos grasos libres.

2.3.3. Estabilidad Operacional de la Enzima

La estabilidad operacional de la enzima se define como la capacidad de la enzima para mantener su actividad después de un determinado periodo de uso, se evaluó realizando varias veces la reacción con la misma enzima pero con substrato nuevo, bajo las mismas condiciones de reacción determinadas a nivel de planta piloto. El criterio de evaluación seleccionado fue la disminución de tripalmitina.

3. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Con la finalidad de organizar los resultados de acuerdo con el orden de los objetivos planteados en la investigación, este capítulo se divide en tres secciones. En la primera se trata lo relacionado con el método de elución, identificación y cuantificación por cromatografía de gases de los ácidos grasos y triacilglicéridos, constituyentes de los substratos empleados.

En segundo lugar, se presentan los resultados del diseño experimental y se examina el efecto de las variables evaluadas sobre el proceso de transesterificación. Se establecen las mejores condiciones para realizar el proceso a nivel de planta piloto, y finalmente se evaluó la estabilidad operacional de la enzima.

En tercer lugar, se presenta la caracterización en cuanto a composición en ácidos grasos y triacilglicéridos de los substratos y productos de la transesterificación, así como las características de fusión de los productos obtenidos. Igualmente la evaluación en cuanto a cremado, y estabilidad de las margarinas shortenings producidos con las grasas obtenidas de la reacción de transesterificación.

3.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y TRIACILGLICÉRIDOS PRESENTES EN LOS SUBSTRATOS EMPLEADOS.

3.1.1. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos como metil ésteres (FAME) por cromatografía de gases.

Se usó el método de elución cromatográfico establecido en el Laboratorio de Alimentos (Castellano y González, 2003), para la separación y cuantificación de los ácidos grasos, como metil ésteres por cromatografía de gases, ajustándolo de forma que las condiciones de análisis seleccionadas son descritas en el numeral 2.2.3. Bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución de los ácidos grasos, constituyentes de los triacilglicéridos de los substratos, y fue posible la identificación y cuantificación de los mismos (ver **Anexo 1**). Con estas condiciones se analizaron los patrones de metil esterres de ácidos grasos y se determinaron los tiempos de retención (t_R) y las ecuaciones correspondientes a las curvas de calibración de cada uno de ellos (ver **Tabla 7**).

TABLA 7. Ecuaciones para la cuantificación de los ácidos grasos patrones por cromatografía de gases.

Ácidos	t _R (min) ☆	Ecuación	Factor de correlación (R ²)
Caprilico, C8	4,73 ± 0,02	Y = 1,868X + 0,0291	0,999
Caprico, C10	5,90 ± 0,01	Y = 1,753X + 0,0225	0,999
Láurico, C12	7,46 ± 0,01	Y = 1,722X + 0,0215	0,999
Mirístico, C14	9,18 ± 0,01	Y = 1,627X + 0,0249	0,999
Palmítico, C16	10,90 ± 0,01	Y = 1,660X + 0,036	0,999
Palmitoleico, C16:1	11,12 ± 0,01	Y = 1,697X + 0,0171	0,999
Estearico, C18	12,52 ± 0,00	Y = 1,787X + 0,0243	0,999
Oleico, C18:1	12,70 ± 0,01	Y = 1,758X + 0,0151	0,999
Linoleico, C18:2	13,11 ± 0,00	Y = 1,933X + 0,0165	0,999
Linolénico, C18:3	13,71 ± 0,01	Y = 2,100X + 0,0155	0,999
Araquídico, C20	14,36 ± 0,01	Y = 2,145X + 0,0249	0,999
Behénico, C22	16,80 ± 0,01	Y = 2,591X + 0,0235	0,999
Erucico, C22:1	17,15 ± 0,02	Y = 2,236X + 0,0155	0,999
Lignocérico, C24	20,38 ± 0,01	Y = 3,205X + 0,0218	0,999

☆ Promedio de 4 inyecciones

X: relación de áreas, A_{pico de interés}/A_{patrón interno}

Y: concentración de ácido en mg/mL

3.1.2. Composición en ácidos grasos del aceite de palma, estearina de palma y aceite de soya.

Los ácidos grasos, como metil ésteres se evaluaron aplicando el método de cromatográfico desarrollado por Castellano y González, (2003). La determinación y cuantificación se realizaron empleando el método de estándar externo (ver cromatogramas en lo **Anexos 2, 3 y 4**). En la **Tabla 8** se presentan la composición en ácidos grasos del aceite de palma (**AP**) y soya (**AS**) refinados, así como de la estearina de palma (**EP**), fracción sólida del aceite de palma, encontrándose muy similares a la composición reportada en la literatura para cada uno de los aceites empleados (Nassu y Guaraldo, 1995; Akimoto y col., 1999). El **AP** utilizado en este

estudio presenta mayor contenido de ácido palmítico y menor contenido de ácido esteárico y linoléico. Esto se puede deber a diferencias genéticas de las plantas y condiciones ambientales de los cultivos, mientras que las diferencias en la composición, observadas en **EP** pueden deberse principalmente a variaciones en el proceso de su obtención como son, velocidad de enfriamiento, temperatura y tipo de proceso de fraccionamiento.

Con respecto al **AS**, registra mayores contenidos de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y menor contenido de linoléico y linolénico, estas diferencias se pueden deber a las condiciones ambientales de los cultivos.

TABLA 8. Composición en ácidos grasos (%) de los aceites vegetales empleados.

Ácidos	Muestras Analizadas			Literatura		
	Aceite de Palma	Estearina de Palma	Aceite de Soya	Aceite de Palma ♣	Estearina de Palma ♣	Aceite de Soya ♠
Mirístico	0,93	1,19	0,0	0,82	0,80	0,0
Palmítico	43,40	53,58	12,72	38,23	49,83	11,5
Esteárico	4,44	4,62	4,63	5,23	6,59	2,2
Oleico	42,19	34,20	22,54	42,47	32,62	22,7
Linoléico	9,16	6,40	52,93	12,19	9,28	54,3
Linolénico	-	-	7,17	0,10	0,50	9,3

♣ Nassu y Guaraldo (1995)

♠ Akimoto y col. (1999)

3.1.3. Identificación y cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases.

Se usaron dos métodos de análisis para la separación de triacilglicéridos por cromatografía de gases. Uno para ser aplicado al cromatógrafo Perkin Elmer modelo 1020 y otro para el

cromatógrafo HP 6890 Series Plus. En los **Anexos 5, 6 y 7** se muestran los perfiles cromatográficos de los triacilglicéridos del aceite de palma, estearina de palma, y aceite de soya respectivamente, obtenidos en el cromatógrafo HP, mientras que el **Anexo 8** se muestra el perfil cromatográfico obtenido en el cromatógrafo Perkin Elmer para estos mismos substratos. Bajo estas condiciones se determinaron los tiempos de retención (t_R) correspondientes a cada triacilglicérido (ver **Tablas 9 y 10**). Estos se clasificaron de acuerdo al número de carbonos, **C46, C48, C50, C52, y C54**, que se pueden representar con la siguiente clasificación dada por la literatura: SSS, SSU, UUS, y UUU (S = saturados, y U = insaturados).

TABLA 9. Tiempos de retención para la cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases, cromatógrafo Perkin Elmer.

Triacilglicéridos	t_R (min) *		
	Aceite de palma	Estearina de palma	Aceite de soya
<i>Diacilglicéridos</i>			
C32	8,55 ± 0,05	8,52 ± 0,03	-
C34	9,34 ± 0,03	9,31 ± 0,02	9,33 ± 0,03
C36	10,14 ± 0,05	10,10 ± 0,02	10,11 ± 0,02
<i>Triacilglicéridos</i>			
C46	13,63 ± 0,02	13,71 ± 0,02	-
C48	15,17 ± 0,05	15,38 ± 0,12	-
C50	17,20 ± 0,19	17,24 ± 0,21	16,61 ± 0,08
C52	19,46 ± 0,37	19,20 ± 0,34	18,80 ± 0,31
C54	21,13 ± 0,35	20,94 ± 0,33	21,35 ± 0,53

* Valores correspondientes al promedio de seis mediciones

TABLA 10. Tiempos retención para la cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases, cromatógrafo HP 6890.

Triacilglicéridos	t_R (min) *
-------------------	---------------

	Aceite de palma	Estearina de palma	Aceite de soya
<i>Diacilglicéridos</i>			
C32	2,77 ± 0,41	2,92 ± 0,03	2,27 ± 0,11
C34	3,88 ± 0,02	3,51 ± 0,01	-
C36	4,45 ± 0,42	4,35 ± 0,01	4,23 ± 0,01
<i>Triacilglicéridos</i>			
C46			-
C48	11,28 ± 0,11	9,91 ± 0,05	-
C50	14,46 ± 0,14	12,55 ± 0,03	25,45 ± 0,02
C52	17,87 ± 0,09	15,97 ± 0,03	28,03 ± 0,02
C54	21,59 ± 0,03	19,02 ± 0,03	30,99 ± 0,09

* Valores correspondientes al promedio de seis mediciones

3.1.4. Identificación y cuantificación de los triacilglicéridos por cromatografía de gases.

La **Tabla 11** muestra la composición en triacilglicéridos del **AP**, **AS** y **EP**. Estos se cuantificaron aplicando el método cromatográfico desarrollado por Moreno y Arango, 2001. Los **C48**, **C50**, **C52** y **C54** son el resultado de combinación de diferentes triacilglicéridos con igual número de carbono, (ver **Anexos 9, 10, 11 y 12**).

El principal constituyente para el **AP** y **EP** fue el **C50** (45,05 y 48,60% respectivamente), mientras que el contenido de **C48** para la **EP** fue significativamente superior al **AP**, esta diferencia se debe al proceso de fraccionamiento que es sometido el **AP** con la finalidad de retirarle su fracción líquida. Con respecto al **AS** se observa que sus principales constituyentes son el **C52** y **C54** con 48,5% y 41,7% respectivamente.

TABLA 11. Composición en triacilglicéridos (%) de los aceites vegetales empleados.

TG	Muestras		
	Aceite de Palma	Estearina de Palma	Aceite de Soya
DG	1,95	4,33	1,90
C46 (MPP)	-	0,93	-
C48 (PPP, MOP, MLP)	8,06	18,11	-
C50 (PLP, POP, PPS)	45,05	48,60	8,40
C52 (PLO, POO, POS, PSS, PLL)	38,48	24,49	48,51
C54 (SOS, SOO, SLO, OLO, OOO, LLL,	6,46	4,70	41,72

3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN

3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la enzima Novosyme

En esta parte del estudio se evaluó la actividad hidrolítica de la enzima con un sustrato estándar recomendado por la literatura, oleína de palma (**OP**), y con los sistemas seleccionados para esta investigación, estearina de palma – aceite de soya (**EP/AS**), y aceite de palma – aceite de soya (**AP/AS**), con una relación de sustratos de 4:1, con la finalidad de comparar su comportamiento con respecto al sustrato estándar. De forma general se observó diferencias significativas en términos de actividad de la enzima al comparar los valores de registrados por cada uno de los sustratos empleados.

En la **Figura 8** se muestra la actividad hidrolítica obtenida de la enzima usando la oleína de palma y con cada uno de los sistemas

en estudio, los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**. En ella se observa el efecto que tienen los diferentes sustratos sobre la actividad hidrolítica de la enzima. La actividad hidrolítica de la enzima con el sustrato estándar es mas alta que con los sustratos en estudio. Cabe destacar que, con los sustratos de estudio la actividad hidrolítica de la enzima tiene el mismo comportamiento del sustrato estándar a lo largo de todo el tiempo del experimento para lograr su máxima actividad. Por otro lado, la enzima presentó una menor actividad con el sistema **EP/AS** que con el **AP/AS**. Esto puede ser debido a una viscosidad relativamente alta del sistema **EP/AS** a la temperatura de medición (70°C), lo cual origina que las moléculas del sustrato posean una baja movilidad favoreciendo que la interacción con la enzima sea baja y por consiguiente la cantidad de ácidos liberados sea menor. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Wisdom y col. (1987) quienes reportaron diferencias en el desempeño de la enzima cuando se interesterifican aceites diferentes a la oleína. La actividad fue calculada a 70°C, temperatura de reacción usada en este estudio. Los valores obtenidos fueron para el sistema **EP/AS** 99,77 UI/g, para el sistema **AP/AS** 114,16 UI/g y para el sustrato estándar 145,94 UI/g.

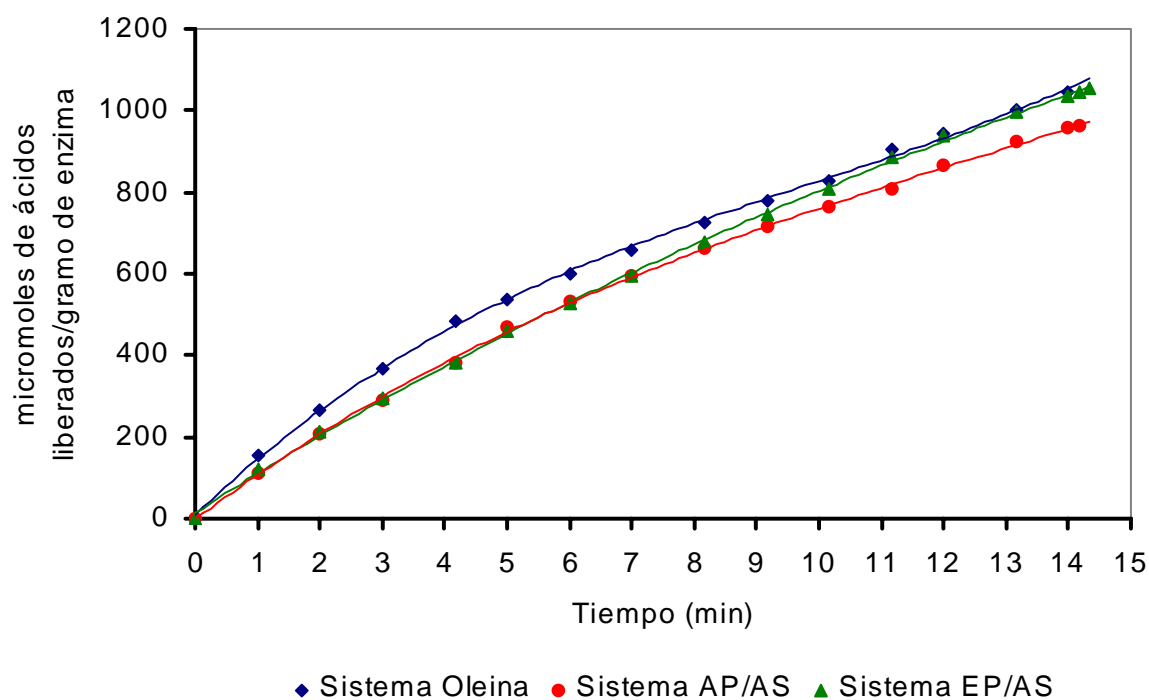


FIGURA 8. Actividad hidrolítica de la enzima (a 70 °C) en los sistemas estudiados.

En conclusión, se observó que la lipasa *Rhizomucor miehei* presentó una reducción en su actividad hidrolítica en 31,6 y 21,8% en el sistema **EP/AS** y **AP/AS** respectivamente con respecto al sustrato estándar.

3.2.2. Optimización de las condiciones de la reacción de transesterificación

En las **Tablas 12** y **13** se muestran los valores experimentales obtenidos para las variables de respuesta **Y** (contenido de tripalmitina, **PPP** en %), y **W** (porcentaje de ácidos grasos libres)

para los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**, respectivamente. Como se observa en las **Tablas 12 y 13**, el contenido de **PPP** en la mayoría de los puntos del diseño fue menor al registrado por la mezcla física, observándose reducciones del triacilglicérido **PPP** en el sistema **EP/AS** desde el 37 al 81% y en el sistema **AP/AS** desde el 8 al 54% con respecto al contenido inicial para **EP** (18,11%) y aceite de palma (6,50%) sin transesterificar.

Con respecto, al porcentaje de ácidos grasos libres (**W**) se aprecia de forma general en ambos sistemas que a mayor tiempo de reacción y mayor cantidad de enzima, la acidez en el producto se incrementó, observándose aumentos desde 4,2 a 23,2% y 3,8 a 28,7% en el sistema **EP/AS** y **AP/AS** respectivamente. No obstante, el contenido de triacilglicéridos en el producto fueron superiores del 88% para ambos sistemas indicando posiblemente que el proceso de transesterificación se llevó a cabo.

Es importante resaltar que se hizo necesario realizar otros ensayos con la finalidad de observar el efecto de incrementar y disminuir los valores de las variables seleccionadas en este diseño, los datos corresponden a los puntos del diseño 18 al 24 para el sistema **EP/AS** y del 18 al 23 para el sistema **AP/AS**.

TABLA 12. Disposiciones y respuestas del diseño de cubo centrado en las caras para el sistema EP/AS

Puntos del Diseño	Nivel de las variables			% PPP ♣	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	W
Mezcla Física	-	-	-	18,11	0,50
1	-1	-1	-1	10,69	8,31
2	1	-1	-1	11,36	6,65
3	-1	1	-1	7,66	9,87
4	1	1	-1	6,43	13,17
5	-1	-1	1	7,33	13,18
6	1	-1	1	6,75	15,55
7	-1	1	1	5,52	19,01
8	1	1	1	6,66	21,39
9	0	0	0	5,72	16,90
10	0	0	0	5,23	17,57
11	-1,682	0	0	3,38	15,60
12	1,682	0	0	10,07	13,39
13	0	-1,682	0	7,43	11,82
14	0	1,682	0	6,71	15,64
15	0	0	-1,682	7,22	4,80
16	0	0	1,682	6,81	20,08
17	0	0	0	7,48	15,93
18	1,8	0	0	10,00	13,42
19	1,8	0	-1	10,02	7,27
20	0	0	0	6,47	19,34
21	0	0	1,8	5,70	20,90
22	0	0	-1,8	10,40	2,88
23	-1,8	0	0	3,37	23,27
24	0	-1,8	0	4,66	11,04

♣ Promedio de dos mediciones.

Y₁: Contenido de PPP, sistema EP/AS

W: % ácidos grasos libres, FFA

TABLA 13. Disposiciones y respuestas del diseño de cubo centrado en las caras para el sistema AP/AS

Puntos del Diseño	Nivel de las variables			% PPP ♣	
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	W
1	-1	-1	-1	5,97	7,28
2	1	-1	-1	4,44	9,78
3	-1	1	-1	4,95	10,05
4	1	1	-1	3,67	13,21
5	-1	-1	1	4,14	14,00
6	1	-1	1	4,18	15,95
7	-1	1	1	4,52	16,36
8	1	1	1	3,98	18,00
9	0	0	0	5,24	12,78
10	0	0	0	4,20	13,30
11	-1,682	0	0	3,93	16,36
12	1,682	0	0	5,34	14,09
13	0	-1,682	0	3,76	10,58
14	0	1,682	0	4,20	12,67
15	0	0	-1,682	5,04	3,82
16	0	0	1,682	4,61	24,26
17	0	0	0	3,86	11,71
18	1,8	0	0	2,95	28,38
19	1,8	0	-1	2,95	23,74
20	0	0	1,8	2,74	26,87
21	0	0	-1,8	4,10	15,44
22	-1,8	0	0	3,20	28,66
23	0	-1,8	0	2,07	18,18

♣ Promedio de dos mediciones.

Y₁: Contenido de PPP para el sistema **AP/AS**

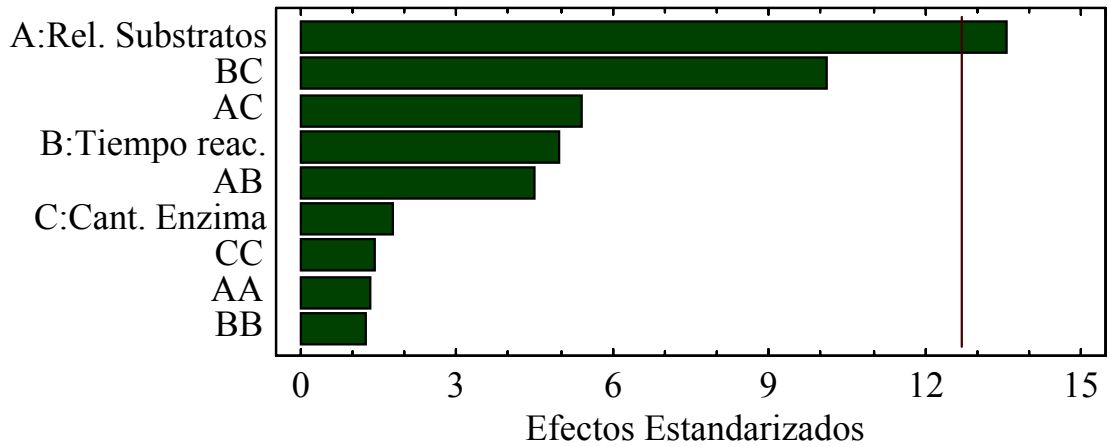
W: % ácido grasos libres, FFA

Con los datos indicados en las tablas anteriores, se generaron las gráficas de superficie de respuesta tridimensional y los mapas de contorno, en los cuales se refleja el efecto de cada una de las variables independientes evaluadas sobre el contenido de **PPP** durante la reacción de transesterificación.

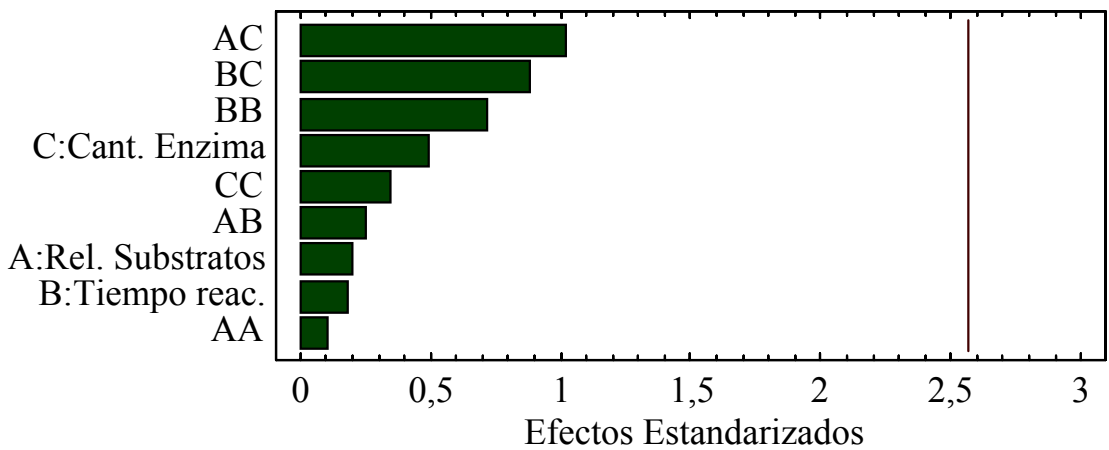
3.2.2.1. Análisis de Pareto

El análisis de Pareto fue realizado para determinar la incidencia de cada una de variables y su combinación sobre el proceso. El diagrama de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados en orden creciente de magnitud. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado. El efecto estandarizado es definido como el efecto estimado (promedio de respuesta del nivel más alto menos el promedio de la respuesta del nivel más bajo) dividido por su error estándar (desviación estándar dividida por la raíz cuadrada del tamaño de la muestra). La línea vertical sobre la gráfica determina los efectos que son estadísticamente significativos. Las barras que se extiendan más allá de la línea corresponden a los efectos que son estadísticamente significativos.

En la **Figura 9** se observa que la interacción de las variables: relación de substratos, así como la interacción tiempo de reacción y cantidad de enzima afectan considerablemente la reacción de transesterificación para el sistema **EP/AS** (ver **Figura 9A**). Mientras que para el sistema **AP/AS** (ver **Figura 9B**) las interacciones relación de substratos y cantidad de enzima, así como tiempo de reacción y cantidad de enzima son las que más influyen en el proceso, aunque ninguna sobrepasa la línea vertical de significado estadístico.



A



B

FIGURA 9. Diagrama de Pareto. A: Sistema EP/AS, B: Sistema AP/AS

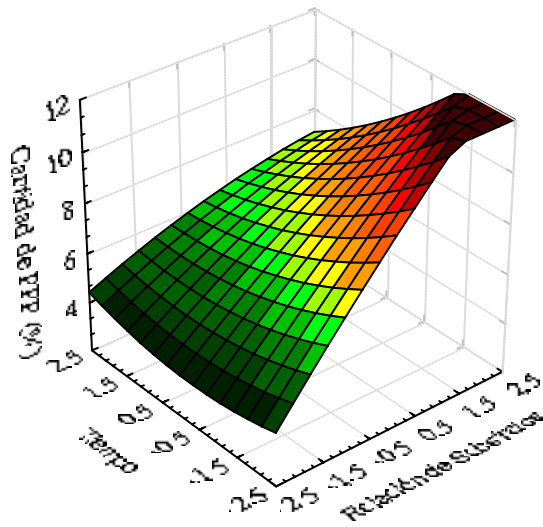
3.2.2.2 Efecto del tiempo de reacción y relación de sustratos

El tiempo de reacción y la relación de sustratos fueron estudiados en los intervalos de 1,4 – 8,6 horas de reacción y 62:38 a 98:2% de sustratos, respectivamente. Las **Figuras 10 y 11** muestran el

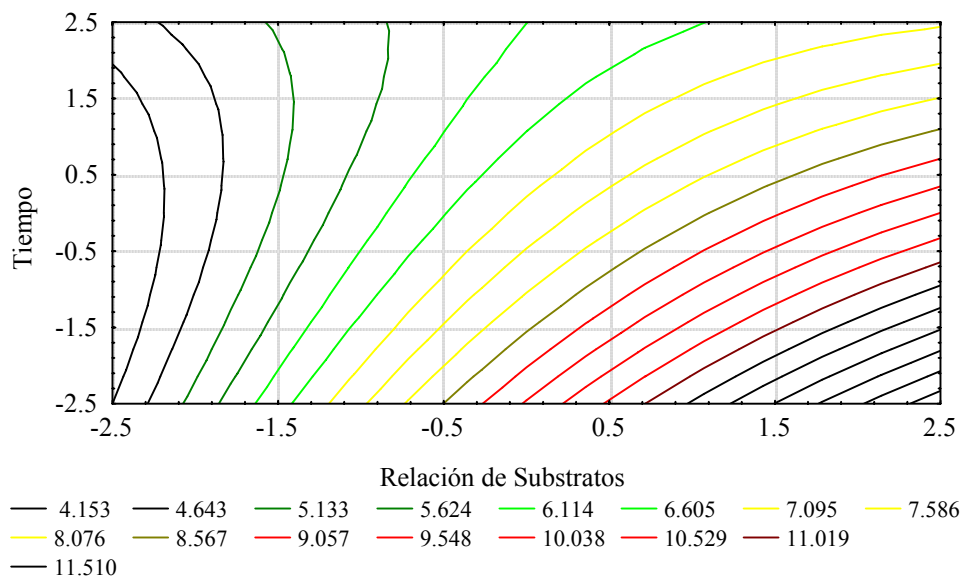
efecto de la relación de sustratos y tiempo de reacción, y su interacción mutua sobre la disminución del contenido de **PPP** a 70°C donde el contenido de agua fue 10% con respecto al peso de la enzima, para los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**. Aunque la tendencia general mostrada por las curvas son diferentes, las menores reducciones del contenido de **PPP** la registró el sistema **AP/AS**.

Para el sistema **EP/AS** (**Figura 10**), se observó que, con la menor relación de sustratos (62:38% en peso) y cualquier tiempo de reacción, se obtiene un producto con el menor contenido de **PPP** ($\leq 6\%$). Un incremento de la relación de sustratos aumenta la viscosidad del sistema debido al incremento del contenido de estearina de palma, lo que causa un aumento de los efectos difusionales hacia el centro activo. En consecuencia, el número de moléculas de sustrato que interaccionaría con la enzima por unidad de tiempo disminuiría.

De otro lado, el sistema **AP/AS** (**Figura 11**) muestra que con el menor tiempo de reacción (1,4 horas) con la mayor (98:2%) y menor (62:38%) relación de sustratos, se obtiene un producto con el menor y similar contenido de **PPP**. Para la reacción con un tiempo de 5,52 horas y una relación de sustrato de 78,8-21,2% de aceite de palma y de aceite de soya respectivamente, da un producto con contenido de **PPP** de 4,91%, en el punto estacionario.

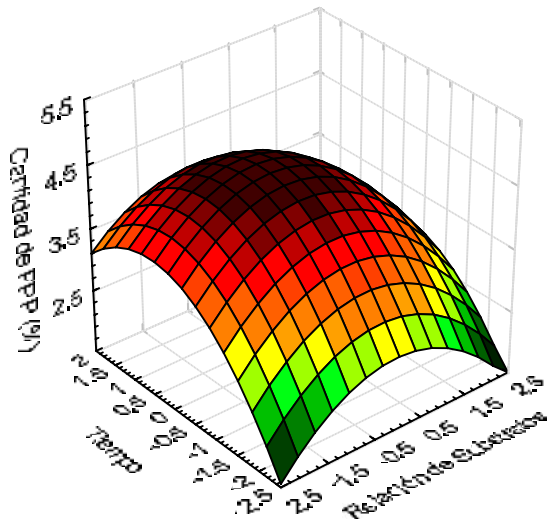


A

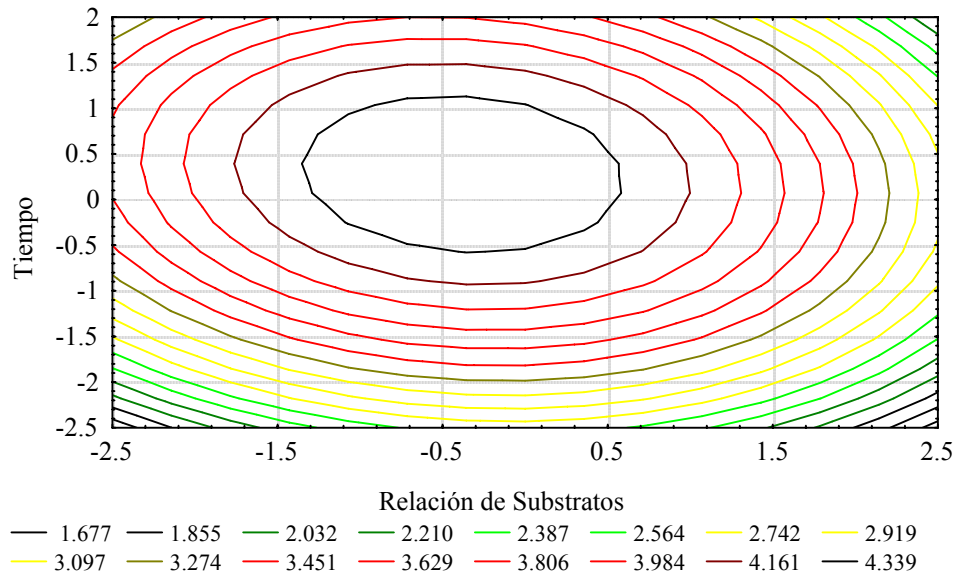


B

FIGURA 10. Efecto del tiempo y relación de sustratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de transesterificación para el sistema EP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional.



A



B

FIGURA 11. Efecto del tiempo y relación de sustratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de transesterificación para el sistema AP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional.

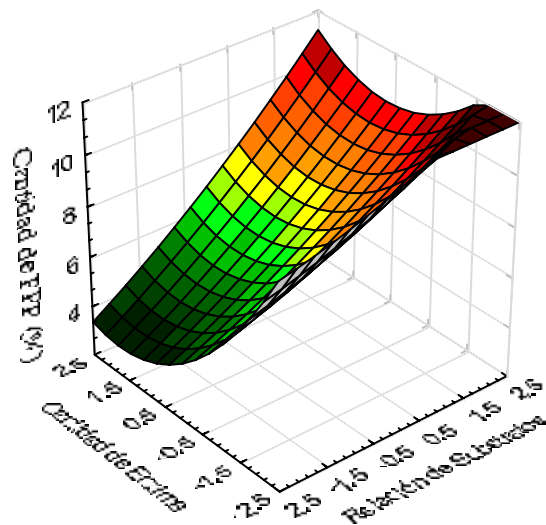
3.2.2.3. Efecto de las variables: cantidad de enzima y relación de sustratos

El efecto de variar la cantidad de enzima y la relación de sustratos y su interacción sobre la disminución del contenido de **PPP** a 70°C y contenido de agua del 10%, para los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**, se muestran en las **Figuras 12** y **13**, respectivamente. Se observa que aunque la tendencia general de las curvas son diferentes, el incremento de cantidad de enzima y acompañado con la disminución de la relación de sustratos, favoreciendo la disminución del contenido de **PPP** en el producto.

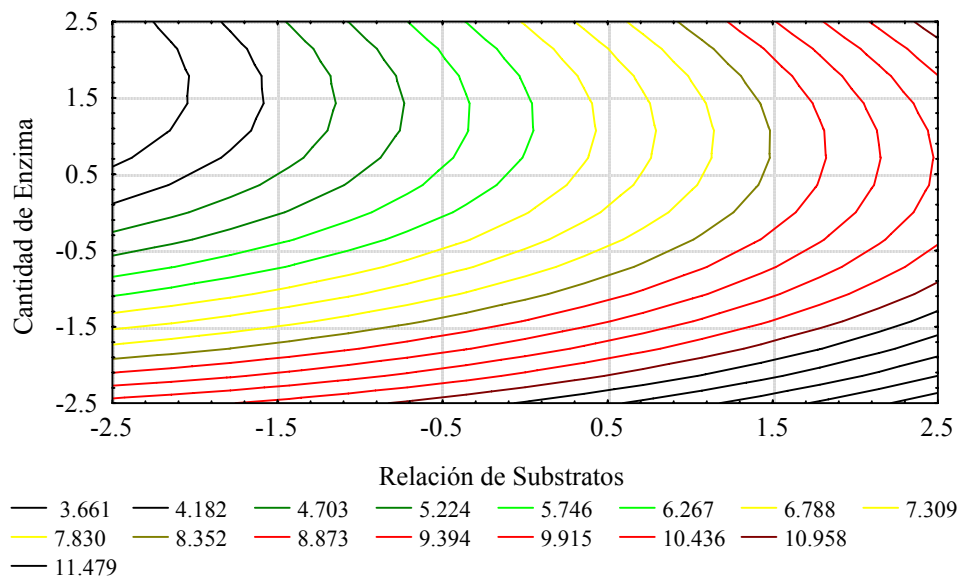
En el sistema **EP/AS** (**Figura 12**), se observa que a mayor o menor cantidad de enzima (3%) origina un decaimiento en el intercambio de los grupos acilos, por tanto una disminución del contenido de **PPP**. Una posible explicación para este comportamiento se debe posiblemente a que el producto se enlaza al sitio activo de la enzima formando un complejo el cual causa una inhibición de la enzima (Paiva, Balcão y Malcata, 2000).

Para el sistema **AP/AS** (ver **Figura 13**), se aprecia que se obtiene un producto con el menor contenido de **PPP**, empleando tanto la menor relación de sustratos (62:38%) como la mayor cantidad de enzima (10%), ó mayor relación de sustratos (98:2%) y la menor cantidad de enzima (0,9).

Finalmente se observó que la influencia de las variables estudiadas sobre los dos sistemas evaluados afectan de manera diferente a los sistemas empleados tal como se manifiesta en las curvas de superficie generadas a partir de los datos experimentales.



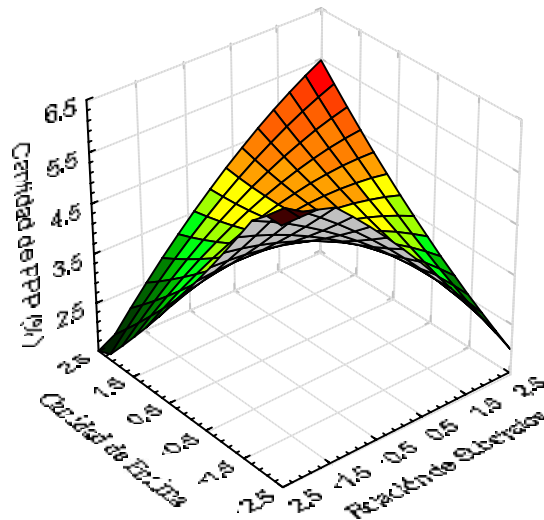
A



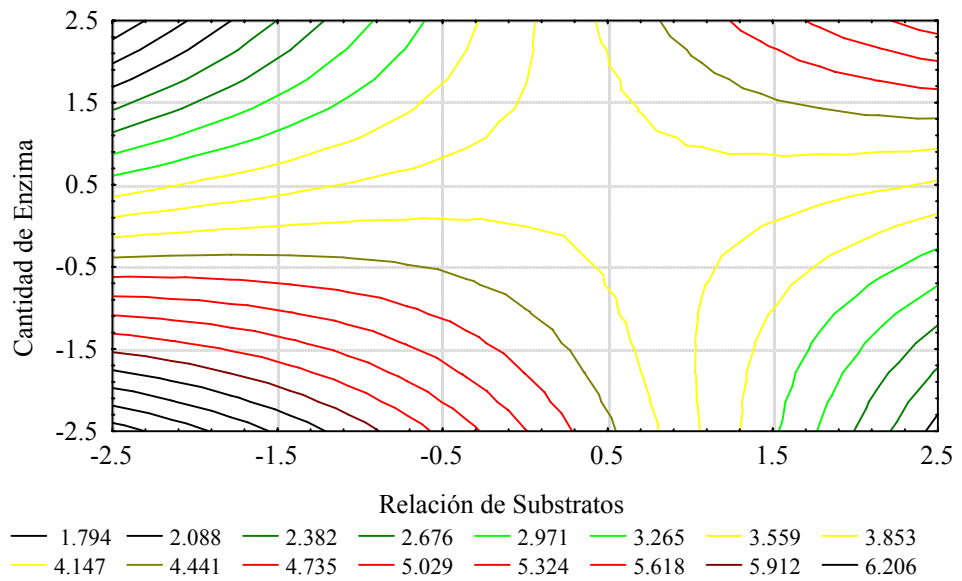
B

FIGURA 12. Efecto de la cantidad de enzima y relación de substratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de

transesterificación para el sistema EP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional.



A



B

FIGURA 13. Efecto de la cantidad de enzima y relación de sustratos sobre el contenido de tripalmitina (%) en la reacción de transesterificación para el sistema AP/AS. A: Superficie de respuesta tridimensional, B: mapa de contorno dimensional.

3.2.2.4. Desarrollo de un modelo matemático para el contenido de PPP del proceso de transesterificación.

El siguiente paso de la optimización del proceso fue establecer los valores apropiados de las variables mencionadas. La optimización del proceso se basó teniendo en cuenta su viabilidad económica desde el punto de vista industrial es decir, uso de la menor cantidad de enzima, utilización de la mayor cantidad de estearina y aceite de palma y el menor porcentaje de ácidos grasos libres.

La metodología de Superficie de Respuesta (**RSM**) usa los polinomios ortogonales debido a que ellos son construidos de forma tal que cualquier término del polinomio es independiente del resto de los términos. Esta propiedad de independencia permite que se obtenga un coeficiente de regresión para cada término y pueda ser aprobada su significación por separado en el análisis de la Varianza (Chacín, 1998). A continuación se plantea el siguiente modelo de regresión polinómico para el contenido de PPP (ecuación 3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 + \beta_{10} X_1 X_2 X_3 \quad \mathbf{3}$$

Donde Y es la variable dependiente (contenido de **PPP**), β_0 a β_{10} son los coeficientes para los interceptos, los términos lineales, los

cuadráticos e interacciones respectivamente, y X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes. El análisis estadístico usado fue el análisis de múltiples regresiones y análisis de la varianza (ANOVA), empleando para ello el software *STATGRAPHICIS PLUS* (1994).

Los coeficientes de regresión de los polinomios de segundo orden propuesto por **RMS** para calcular el contenido de **PPP** (%) en los sistemas, **EP/AS** y **AP/AS** fueron determinados empleando el método de mínimos cuadrados (ver **Tabla 14**). Estos coeficientes fueron determinados a partir de los datos indicados en las **Tabla 12y 13**.

TABLA 14. Coeficientes de regresión del polinomio cuadrático propuesto para la variable de respuesta.

Coeficiente	R ² ♣		% PPP	
	EP/AS	AP/AS	EP/AS	AP/AS
β_0			7,1725	4,3159
Términos Lineales				
β_1			1,2423	- 0,1648
β_2	0,7624	0,3245	- 0,5879	0,1653
β_3			- 0,9292	- 0,2139
Términos cuadráticos				
β_4			0,0989	- 0,2654
β_5	0,8315	0,3448	0,3136	- 0,3358
β_6			0,4650	- 0,1248
Interacciones				
β_7			- 0,4630	- 0,0413
β_8			- 0,3443	0,3928
β_9	0,3189	0,3539	0,7575	0,2463
β_{10}			0,4525	- 0,1038
R², Total	0,8554	0,6237		

♣ Coeficiente de determinación

En la **tabla 14** se observa que el coeficiente de determinación (R^2) para el contenido de PPP (Y) fue 85,5 y 62,4% para el sistema **EP/AS** y **AP/AS** respectivamente. Esto indica que en el sistema **EP/AS** la mayoría de las variaciones observadas para los puntos del diseño pueden ser explicadas por el modelo propuesto; mientras que para el sistema **AP/AS** lo hace solo hasta el 62%. Los términos lineales, cuadrático e interacciones para el sistema **EP/AS** contribuyeron en 76,2, 83,1 y 31,9% al modelo, respectivamente. En el caso del sistema **AP/AS** las contribuciones de los términos lineales, cuadráticos e interacciones al modelo fueron 32,45, 34,48 y 35,39% respectivamente. Por tanto los polinomios de segundo orden predicho para el contenido de PPP en el sistema **EP/AS** (**ecuación 4**) y sistema **AP/AS** (**ecuación 5**) fueron:

$$\begin{aligned}
 Y = & 7,1725 + 1,2423 \times X_1 - 0,5879 \times X_2 - 0,9292 \times X_3 + 0,0989 \times X_1^2 \\
 & + 0,3136 \times X_2^2 + 0,4650 \times X_3^2 - 0,4630 \times X_1 X_2 - 0,3443 \times X_1 X_3 \\
 & + 0,7575 \times X_2 X_3 + 0,4525 \times X_1 X_2 X_3
 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned}
 Y = & 4,3159 - 0,1648 \times X_1 + 0,1653 \times X_2 - 0,2139 \times X_3 - 0,2654 \times X_1^2 \\
 & - 0,3358 \times X_2^2 - 0,1248 \times X_3^2 - 0,0413 \times X_1 X_2 + 0,3928 \times X_1 X_3 \\
 & + 0,2463 \times X_2 X_3 - 0,1038 \times X_1 X_2 X_3
 \end{aligned} \quad (5)$$

El análisis de la varianza (**ANOVA**) para los polinomios de segundo orden propuestos por **MSR** para los sistemas **EP/AS** y **AP/AS** se dan en la **Tablas 15** y **16** respectivamente. El "*Lack of fit*" es calculado para determinar si los modelos seleccionados son los adecuados para describir los valores observados, o si un modelo

más complejo debe ser usado. Como los valores de p registrados por el sistema **EP/AS** y **AP/AS** (0,4799 y 0,3743 respectivamente) son mayores de 0,05 (95% de confiabilidad), los polinomios propuestos son los apropiados para la descripción de la superficie de respuesta con un nivel de confianza del 95%.

A partir del análisis estadístico (**Tablas 15 y 16**) se puede indicar que para el sistema **EP/AS**, la cantidad de enzima (X_3), tiempo de reacción (X_2) y relación de sustratos (X_1), así como los términos cuadráticos y la interacción X_2X_3 fueron las variables significativas debido a que ellas afectan la reacción de transesterificación significativamente ($p \leq 0,05$), ver **Tabla 15**. En cambio para el sistema **AP/AS** (**Tabla 16**), los términos que más afectan significativamente el proceso son, cantidad de enzima, término cuadrático X_2X_2 y la interacción X_1X_3 , donde se obtuvieron los valores más bajos de p ($p < 0,26$).

TABLA 15. ANOVA de las variables estudiadas para el modelo de superficie de respuesta para el sistema EP/AS

Término	Efectos	SS	D _f	MS	F	p
Lineal	X_1	20,3262	1	20,3262	28,35	0,0000
	X_2	19,7429	1	19,7429	27,54	0,0000
	X_3	18,1021	1	18,1021	25,25	0,0000
Cuadrático	X_1X_1	3,6526	1	3,6526	5,09	0,0360
	X_2X_2	6,1602	1	6,1602	8,59	0,0086
	X_3X_3	5,7305	1	5,7305	7,99	0,0108
Interacciones	X_1X_2	0,1296	1	0,1296	0,18	0,6755
	X_1X_3	0,0841	1	0,0841	0,12	0,7357
	X_2X_3	10,923	1	10,923	15,24	0,0010
Lack of fit		50,8589	5	10,1718	0,4788	0,4799
Error		13,6215	19	0,7169		
Total corregido		143,708	33			

SS: suma de cuadrados; Df: grados de libertad; MS: promedio cuadrado; p : nivel de significancia

TABLA 16. ANOVA de las variables estudiadas para el modelo de superficie de respuesta para el sistema AP/AS

Término	Efectos	SS	Df	MS	F	P
Lineal	X ₁	0,21317	1	0,21317	0,41	0,5866
	X ₂	0,22919	1	0,22919	0,44	0,5740
	X ₃	1,3005	1	1,3005	2,52	0,2536
Cuadrático	X ₁ X ₁	0,87714	1	0,87714	1,70	0,3225
	X ₂ X ₂	1,2809	1	1,2809	2,48	0,2561
	X ₃ X ₃	0,18938	1	0,18938	0,37	0,6065
Interacciones	X ₁ X ₂	0,01361	1	0,01361	0,03	0,8860
	X ₁ X ₃	1,33707	1	1,33707	2,59	0,2490
	X ₂ X ₃	0,48511	1	0,48511	0,94	0,4349
Lack of fit		11,6157	11	1,05597	2,04	0,3743
Error		1,03387	2	0,51693		
Total corregido		18,3443	22			

SS: suma de cuadrados; Df: grados de libertad; MS: promedio cuadrado; p : nivel de significancia

Con el objetivo de observar y verificar la confiabilidad de los modelos anteriormente mencionados se realizaron cuatro (4) ensayos independientes con cada uno de los sistemas en estudio. Los resultados obtenidos para ambos modelos predichos mostraron valores muy próximos a los valores calculados (ver **Tablas 17 y 18**).

TABLA 17. Análisis canónico para el contenido de tripalmitina (PPP) para el sistema EP/AS

Puntos	Nivel de las Variables			Variable dependiente	
	Substrato, EP/AS	Tiempo, (h)	Enzima, (%)	Esperado, (% PPP) ^a ± 0,3465 ^b	Observado, (% PPP) ^c
1	94,5:5,4	6,9	8,8	8,67	8,88
2	87,8:12,2	6,3	8,1	7,15	7,54
3	71,5:28,5	2,2	1,9	9,56	9,71
4	80:20	5	0,9	9,40	9,45

^a Promedio de tres experimentos, ^c Promedio de tres mediciones, ^b Error estándar determinado en el análisis de la varianza, este valor se usa para predecir los límites de los valores calculados con respecto a los observados

TABLA 18. Análisis canónico para el contenido de tripalmitina (PPP) para el sistema AP/AS

Puntos	Nivel de las Variables			Variable dependiente	
	Substrato, AP/AS	Tiempo, (min.)	Enzima, (%)	Esperado, (% PPP) ^a ± 0,7354 ^b	Observado, (% PPP) ^c
1	80:20	420	5,5	4,85	4,43
2	87:13	432	3,7	4,60	4,72
3	70:30	413	7,3	5,24	5,00
4	80:20	300	0,9	5,58	5,08

^a Promedio de tres experimentos, ^c Promedio de tres mediciones, ^b Error estándar determinado en el análisis de la varianza, este valor se usa para predecir los límites de los valores calculados con respecto a los observados

A nivel molecular, una explicación dada al mecanismo de la reacción de transesterificación implica la ocurrencia simultánea de

la hidrólisis del enlace éster de los triacilglicéridos y la formación de nuevos enlaces (Posorke y col., 1988). A mayor concentración de enzima, mayor cantidad de agua y mayor tiempo de reacción, la reacción de hidrólisis se ve favorecida. En los sistemas usados se llegó a alcanzar un alto contenido de ácidos grasos libres presentes en el medio de reacción para los dos sistemas usados, desde un 3,4 hasta un 23,15% para el sistema **EP/AS** y desde un 4,4 hasta un 28,66% para el sistema **AP/AS**. Estos valores altos de ácidos grasos libres pueden limitar la aplicación industrial del proceso, al adicionar una etapa de eliminación de los ácidos grasos libres. Por esta razón, del diseño experimental realizado (ver **Tablas 12 y 13**) se seleccionaron los puntos en los cuales se alcanzó el nivel más bajo de ácidos grasos libres tanto en el sistema **EP/AS** y **AP/AS**, en cuyo caso las condiciones tomadas como óptimas se muestran en la **Tabla 19**.

TABLA 19. Condiciones de reacción óptimas para los sistemas

Variables	Sistemas	
	EP/AS	AP/AS
Relación de sustratos (% peso)	80 : 20	80 : 20
Tiempo de reacción (h)	7	5
Cantidad de enzima (% peso)	0,9	0,9
Cantidad de agua (% peso)	10	10
Velocidad de agitación (rpm)	200	200

3.2.2.5. Efecto del escalado en la reacción de transesterificación

Con el fin de observar la influencia de incrementar la masa de los reaccionantes sobre las variables óptimas determinadas previamente (ver **Tabla 19**) se decidió, realizar la reacción de

transesterificación utilizando una masa de 500 gramos para el substrato **EP/AS** y de 100 gramos para el substrato **AP/AS**. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados obtenidos se presentan en las **Tablas 20** y **21**. Los valores del índice de acidez y el contenido de tripalmitina en el producto obtenido del sistema **EP/AS** (ver **Tabla 20**) no presentaron cambios significativos con los resultados obtenidos anteriormente. El mismo comportamiento se observó en el sistema **AP/AS** (ver **Tabla 21**). Estos resultados indican que las variables optimizadas bajo las condiciones usadas no son afectadas por un aumento de la masa de substratos. Una posible explicación para la diferencia de los valores observados en el porcentaje de **PPP** puede ser debida al empleo de la agitación mecánica en lugar de la agitación magnética, con la cual se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst y como consecuencia el substrato puede llegar con mayor facilidad a la enzima.

TABLA 20. Resultados observados en el escalado del sistema EP/AS masa 500 gramos

Puntos de Estudio	Variables (♣)		
	% Agua	Índice de acidez	% tripalmitina
MUESTRA 1	10	2,79	8,67
MUESTRA 2	10	2,65	7,77
MUESTRA 3	10	2,55	7,97
MUESTRA 4	10	2,60	7,50

♣ Valores promedio de tres mediciones; MUESTRA 1: masa 1,7 g; MUESTRA 2, 3 y 4: masa 500g

TABLA 21. Resultados observados en el escalado del sistema AP/AS masa 100 gramos

Puntos de Estudio	Variables (♣)		
	% Agua	Índice de acidez	% tripalmitina
MUESTRA 1	10	5,42	5,04
MUESTRA 2	10	5,18	5,58
MUESTRA 3	10	5,20	5,19
MUESTRA 4	10	5,15	5,21

♣ Valores promedio de tres mediciones; MUESTRA 1: masa 1,7 g; MUESTRA 2, 3 y 4: masa 100g

3.2.2.6. Efecto del contenido de agua

Dado a los altos valores de acidez obtenidos inicialmente (ver **Tablas 12 y 13**), se decidió evaluar el efecto del contenido de agua (1, 10%) y la velocidad de agitación (100, 200 rpm) para buscar una mayor eficiencia de la reacción, con el aumento de la masa de los substratos.

La **Figura 14** indica los resultados obtenidos al variar el contenido de agua. La actividad hidrolítica de la enzima aumentó levemente al pasar el contenido de agua de 1 al 5% incrementando el índice de acidez, lo cual concuerda con lo mencionado por Porsorske et al (1988) quien ha indicado que el contenido de agua puede afectar el equilibrio de las reacciones de hidrólisis y esterificación. En nuestros experimentos al aumentar el contenido de 5 al 10% de agua se observó un ligero decaimiento de su actividad hidrolítica (aproximadamente 1%). No obstante, algunos trabajos como los realizados por Kermassha y Bisakowski (1998), observaron una disminución de la actividad hidrolítica cuando usaron una lipasa *Rhizomucor niveus* inmovilizada sobre Celita, usando concentraciones de 4% de agua.

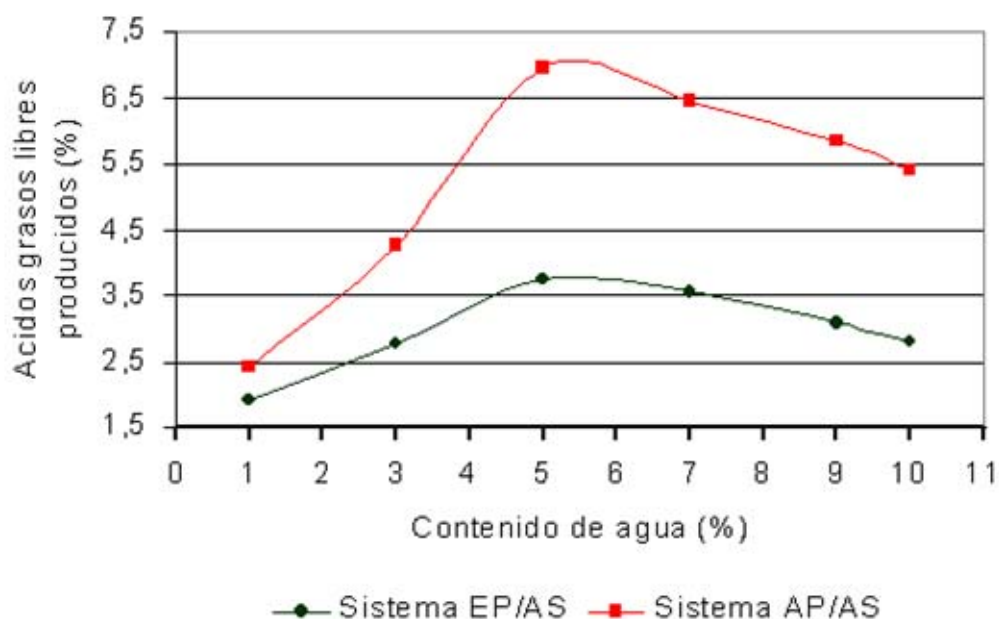


FIGURA 14. Efecto del contenido de agua sobre la actividad hidrolítica de la enzima para una relación de sustrato 80:20, empleando una agitación de 200 rpm y cantidad de enzima 0,9%. (●) Sistema EP/AS, tiempo de reacción 7 horas. (■) Sistema AP/AS, tiempo de reacción 5 horas

En conclusión entre el 1% y el 10% de agua la acidez no se ve afectada significativamente, porque se obtiene una diferencia de los índices de acidez menor a 2%.

3.2.2.7. Efecto de la velocidad de agitación

La actividad real de una enzima inmovilizada esta afectada por los efectos difusionales externos, capa de Nerst que rodea el soporte, y los internos, atravesar el poro del soporte donde se encuentra la enzima. Según Goldstein (1976), existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales, como por ejemplo aumentar la velocidad de agitación, con ello se consigue reducir el grosor de la

capa de Nerst, facilitando el acceso del sustrato al centro activo de la enzima.

En la **Figura 15** se describe el efecto de la velocidad de agitación sobre la disminución de la **PPP**, observándose una disminución significativa entre 200 y 250 rpm. Por encima y por debajo de 250 rpm se observó un efecto menos pronunciado, lo cual muestra que para velocidades de agitación (250 – 450 rpm) el área interfacial resultó independiente de la velocidad de agitación. Una posible explicación para los resultados observados a bajas velocidades de agitación, es debida a los efectos de transferencia de masa y hidrodinámicos (área interfacial) que conduce a una menor conversión. En efecto, cuando se empleó velocidades de 100 y 200 rpm, se observó en el reactor la sedimentación del catalizador.

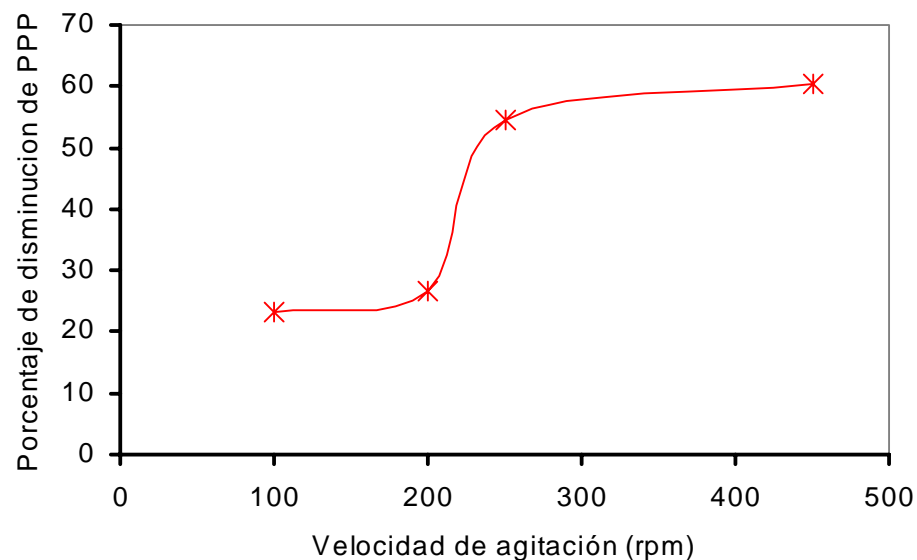


FIGURA 15. Efecto de la velocidad de agitación sobre el porcentaje de disminución del contenido de PPP. Condiciones de reacción: Relación de sustratos (80% de estearina de palma, 20% de aceite

de soya), tiempo de reacción 7 horas, cantidad de enzima 0,9% y cantidad de agua 1% en peso con respecto al peso de enzima

3.2.2.8. Comparación del contenido de grasa sólida (SFC)

La cantidad de cristales presentes en las mezclas determina muchas características del producto, tales como: propiedades organolépticas, facilidad de esparcir, y exudación de aceite "*oil in – out*". Para una aplicación del producto como margarina y shortenings los datos de **SFC** entre 5 y 10°C, entre 20 y 25°C, y entre 35 y 37°C son los que interesa, debido a que ellos indican la esparcibilidad del producto a la temperatura de refrigeración, resistencia al *oil in out*, y la facilidad de liberar el sabor y frescura en la boca, respectivamente. Para que la margarina sea esparcible a temperatura de refrigeración su contenido de **SFC** no debe ser superior al 32% a 10°C, y para eliminar la serosidad en la boca la margarina debe poseer un contenido de menor de 5% a 37°C (Habi y col., 1998).

En consecuencia, las grasas bases obtenidas a nivel del escalado en laboratorio de los sistemas **EP/AS** y **AP/AS** fueron analizadas por su contenido de grasa sólida por el método de RMN, cuyos valores fueron comparados con las obtenidos para la mezcla física, y así como con grasas bases de margarinas comercialmente disponibles.

3.2.2.8.1. Análisis del SFC de los productos obtenido con el sistema EP/AS. Los productos obtenidos del sistema **EP/AS** se relacionan en la **Tabla 22**, mientras que sus perfiles de **SFC** y su mezcla física se presentan en las **Figuras 16, 17 y 18**. En general, se observa que el proceso de transesterificación induce cambios

significativos en el comportamiento de fusión, reflejándose en la reducción del SFC en todo el intervalo de temperatura de medición.

TABLA 22. Variación del contenido de grasa sólida del producto

MUESTRA	Cantidad enzima (%peso)	% agua	Tiempo reacción (h)	Velocidad agitación rpm	Contenido de grasa sólida, SFC (% peso)		
					10°C	20–25°C	35–37°C
M. F.	-	-	-	-	44,3	28,5	15,2
A	0,9	10	7	200	28,9	18,1	7,5
B	0,9	1	7	200	33,9	20,7	8,9
C	0,9	10	7	100	29,2	18,3	7,6
D	0,9	1	7	100	34,7	19,9	8,3
E	2,1	1	5	100	31,0	17,8	7,8
F	2,1	1	5	200	29,4	18,3	7,4
G	2,1	10	5	100	22,7	15,5	6,3
H	2,1	10	5	200	22,7	13,1	5,6
I	2,1	10	7	200	24,2	14,6	4,8
J	2,1	1	7	200	24,9	15,5	5,6
K	0,9	1	5	200	36,5	19,2	7,1
L	0,9	10	5	200	37,2	20,3	8,2

M. F. : Mezcla física Estearina de palma y aceite de soya

En la **Tabla 22** se observa que todos los productos registran valores de **SFC** menores que la mezcla física. Igualmente, se observa que las muestras obtenidas con la mayor cantidad de agua (muestras A, C, G, H e I) registran menores valores de **SFC** que los productos obtenidos con menor cantidad de agua (1%). Cabe

destacar que los valores de **SFC** fueron independientes de la velocidad de agitación debido a que los valores más bajos también fueron obtenidos con 100 y 200 rpm.

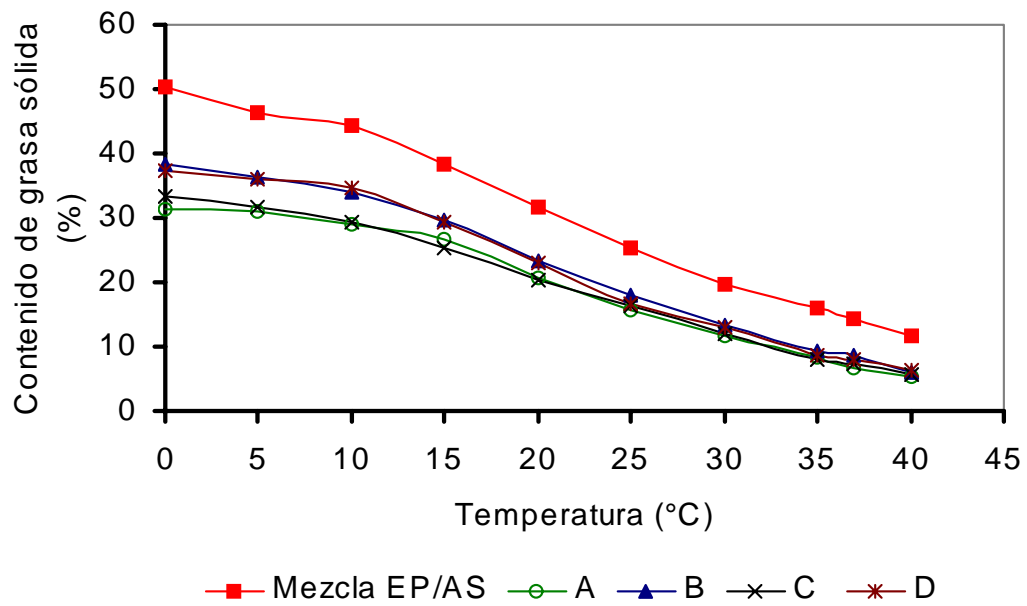


FIGURA 16. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y transesterificada del sistema EP/AS.

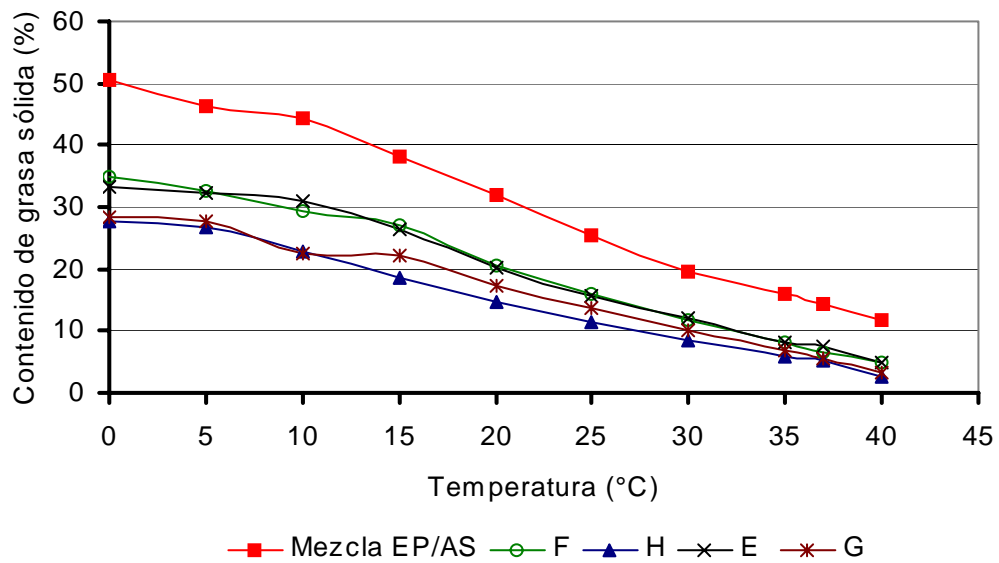


FIGURA 17. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y transesterificada del sistema EP/AS.

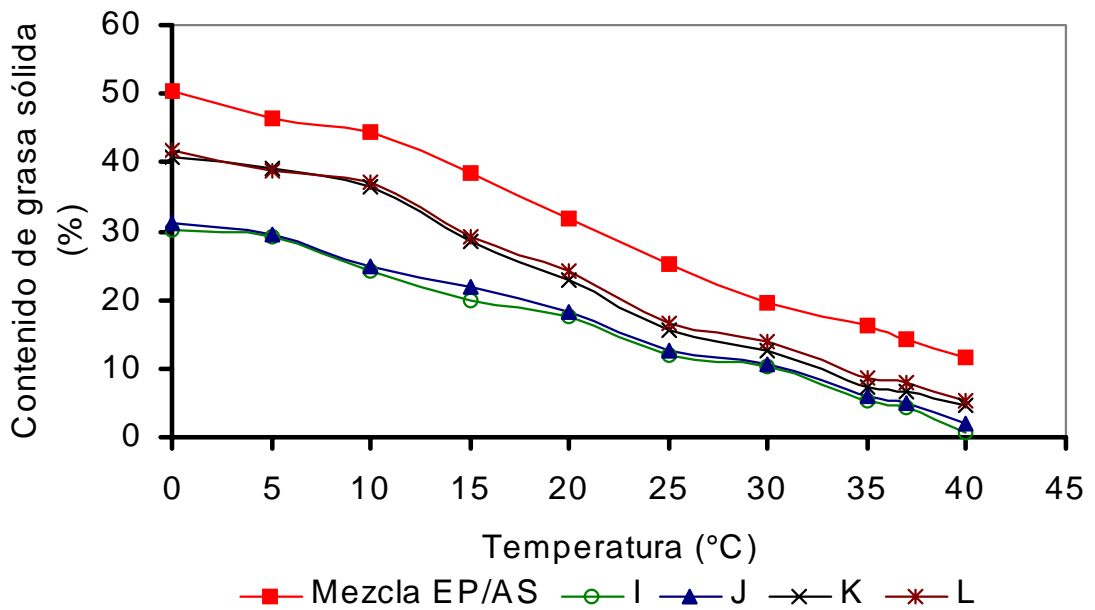


FIGURA 18. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y transesterificada del sistema EP/AS.

3.2.2.8.2. Análisis del SFC de los productos obtenidos del sistema AP/AS. Los productos obtenidos del sistema **AP/AS** se relacionan en la **Tabla 23**, mientras que los perfiles de **SFC** de los productos y de la mezcla física se presentan en la **Figura 19**. Al igual que el sistema **EP/AS**, el proceso de transesterificación induce cambios significativos en el comportamiento de fusión, reflejándose en la reducción del **SFC** en todo el intervalo de temperatura de medición.

En la **Tabla 23** se observa que todos los productos registran valores de **SFC** menores que la mezcla física en todo el intervalo de temperatura de medición. Del mismo modo se observa que al comparar los productos obtenidos con la misma relación de substratos (muestras A, B, C y D) los valores más bajos de **SFC** se registran cuando se emplea la mayor cantidad de enzima (muestras C y D). Por otro lado, se observa que los productos obtenidos con una mayor cantidad de aceite de palma y menor tiempo de reacción (muestras E y F) registran similares valores de **SFC**. Sin embargo la muestra E registra valores próximos a los registrados por las muestras A y B.

TABLA 23. Variación del contenido de grasa sólida del producto

MUESTRA	Cantidad enzima (%peso)	% agua	Tiempo reacción (h)	Velocidad agitación rpm	Contenido de grasa sólida, SFC (% peso)		
					10°C	20–25°C	35–37°C
M.F	-	-	-	-	26,6	9,8	2,9
A	0,9	10	5	200	20,7	7,3	1,5
B	0,9	1	5	200	21,0	7,0	1,6
C	2,1	10	5	200	17,1	6,9	1,2
D	2,1	1	5	200	19,3	6,9	1,3
E *	0,9	10	3	200	22,6	8,6	1,9
F *	0,9	1	3	200	25,0	8,8	1,9

* Las muestras E y F tienen una relación de sustrato de 90% de aceite de palma y 10% de aceite de soja

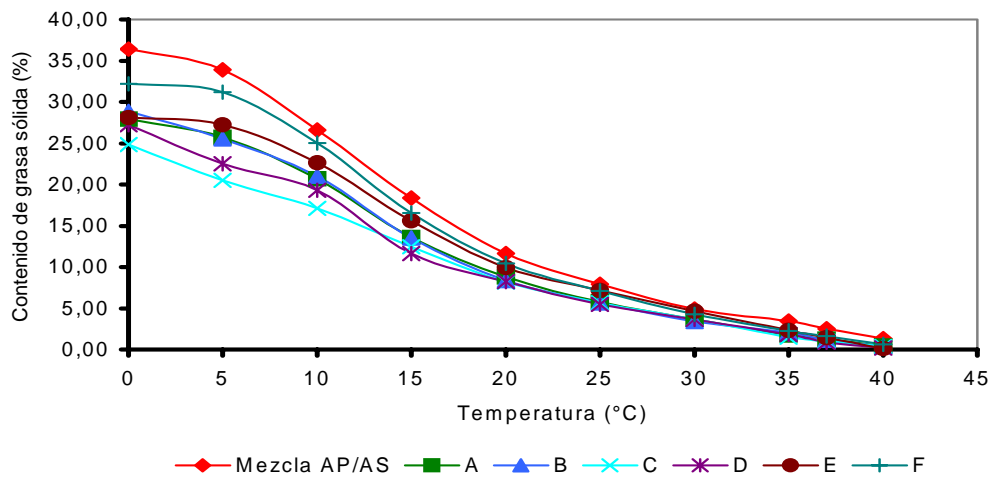


FIGURA 19. Contenido de grasa sólida para la mezcla física y transesterificada del sistema AP/AS.

En conclusión, los productos obtenidos del sistema **EP/AS** presentan una mayor estabilidad térmica que los del sistema **AP/AS**, debido a que el cambio de sólidos con el cambio de la temperatura es más suave en el primer sistema. Según las curvas de sólidos los productos del sistema **EP/AS** pueden ser aplicados como grasa base para la fabricación de margarinas, en cambio los productos del sistema **AP/AS** podrían aplicarse para la fabricación de rellenos de confitería.

3.2.2.8.3. Comparación del SFC de los productos transesterificados con grasas bases reportadas en la literatura.

Los valores de **SFC** de las grasas bases obtenidas con los sistemas **EP/AS** y **AP/AS** se compararon con grasas bases mencionadas en la literatura, las cuales son obtenidas mediante modificación química, cuya composición se da en la **Tabla 24**.

TABLA 24. Composición de las grasas bases mencionadas en la literatura

Muestras	Materia Prima (%)		
	Estearina de Palma	Aceite de soya	Aceite de soya hidrogenado
GL – 1	50	50	
GL – 2	40	60	
GL – 3		70	30
GL – 4	30	70	

Tomado de Petrauskaite et al, 1998

Los productos obtenidos con el sistema **EP/AS** se compararon con las muestras, **GL – 1**, y **GL – 2**). Mientras que los productos obtenidos con el sistema **AP/AS** fueron comparados con las muestras **GL – 3**, y **GL – 4**. La muestra **GL – 1** es empleada en la

fabricación de margarinas tipo barra, y las muestras **GL – 2, 3 y 4** en confitería, y fabricación de shortenings (Petrauskaite y col., 1998).

En las **Figuras 20, 21 y 22** se presentan los valores de **SFC** para las muestras de la literatura indicadas en la **Tabla 24** y las obtenidas en este trabajo obtenidos, en ambos casos el **SFC** fue obtenido por **RMN**. Se observa que a 10°C, las muestras **GL – 1 y 2** tienen valores de **SFC** superiores al 32% (34,6 y 43% respectivamente), mientras que, los productos A, C, F, G H, I, y J obtenidos mediante transesterificación enzimática registran valores de **SFC** menores. En cambio los productos B, D, K y L presentan valores de **SFC** cercanos a los registrados por **GL – 1 y 2**. Entre 20 y 25°C, tanto las grasas de la literatura como las obtenidas en este estudio presentan valores de **SFC** mayores del 10%. Se observa que, los **SFC** de los productos obtenidos mediante transesterificación enzimática son relativamente mas altos que los reportados por las muestras de la literatura, en consecuencia éstos presentaran mayor estabilidad y resistencia a la exudación que los otros. Y en algunos casos dados el contenido de **SFC** es superior al 5%, en consecuencia los productos no funden completamente en la boca.

Cabe concluir que, los productos de la transesterificación enzimática presentan las características necesarias para ser empleadas como grasa base para margarinas, con la ventaja que no presentan ácidos grasos *trans* al no utilizar materia prima hidrogenada y un mayor contenido de estearina de

palma, ventaja entre otras (contenido de ácidos grasos esenciales, no presentan el efecto *oil in – out*) que los productos de la literatura mencionados no presentan.

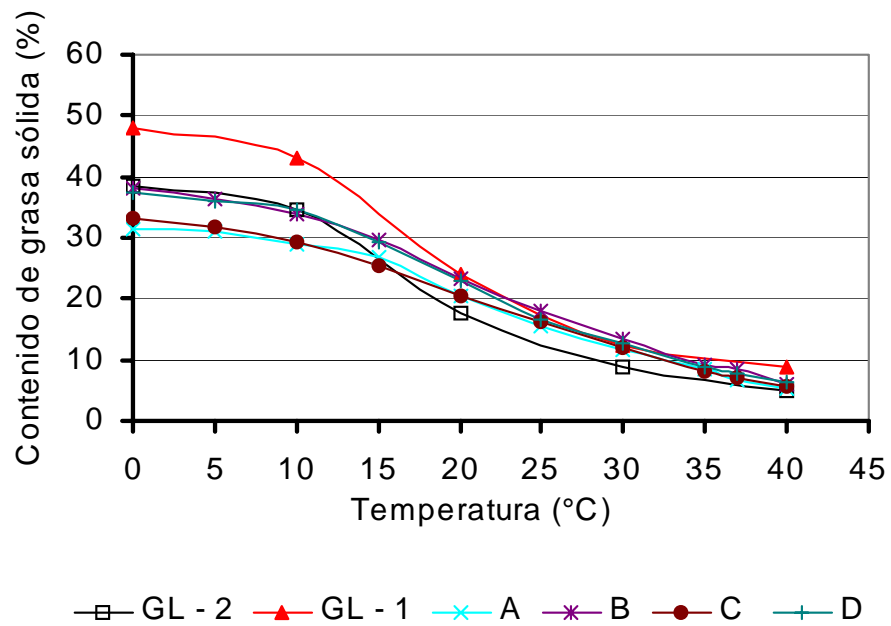


FIGURA 20. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL – 2 (literatura) y A, B, C y D obtenidas en este estudio.

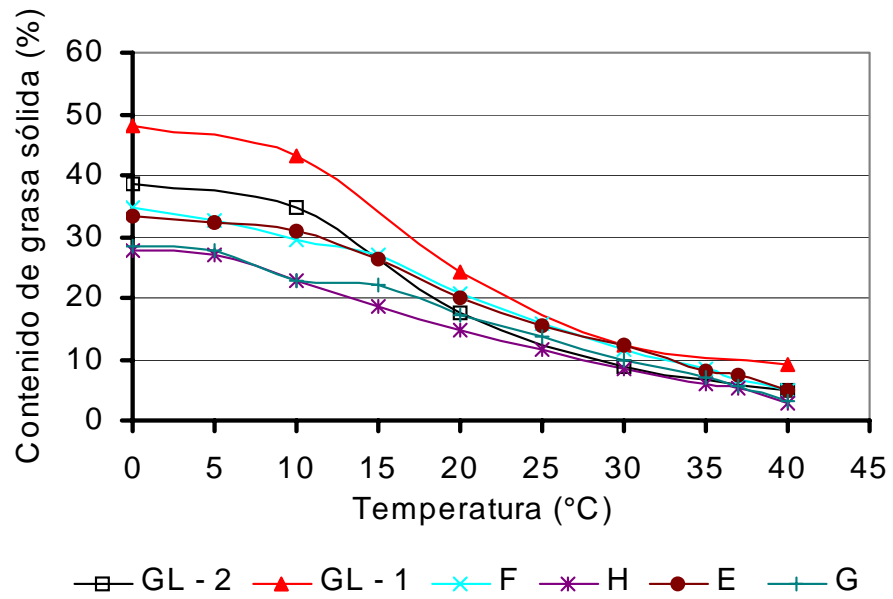


FIGURA 21. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL – 2 (literatura) y F, H, E y G obtenidas en este estudio.

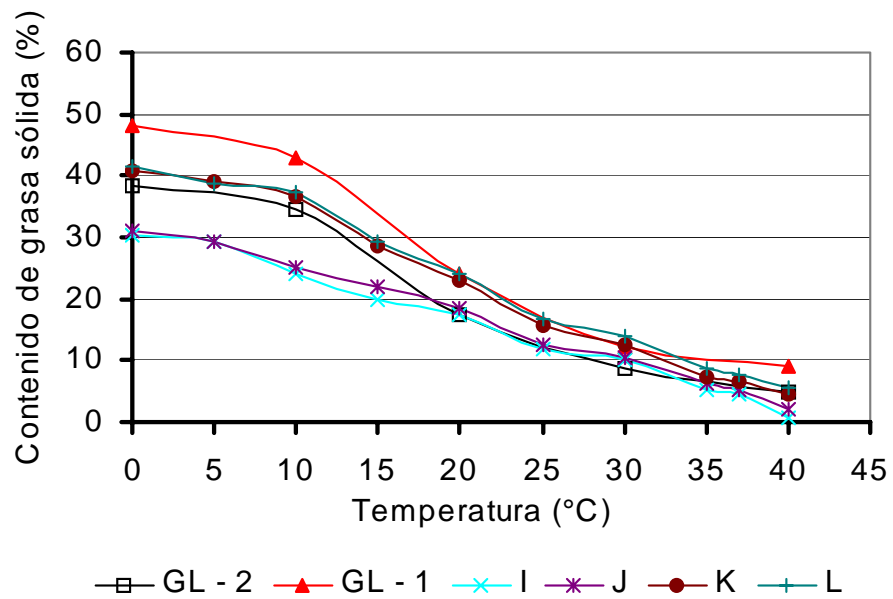


FIGURA 22. Contenido de grasa sólida de las muestras GL – 1 y GL – 2 (literatura) y I, J, K y L obtenidas en este estudio.

Con respecto al sistema **AP/AS**, en la **Figura 23** se han graficado los datos de **SFC** para los productos **GL – 3** y **GL – 4** (literatura) y A, B, C, y D. Se observa que en todo el intervalo de temperatura de medición la mayoría de los productos obtenidos en este trabajo presentan similares contenidos de grasa sólida que la muestra **GL – 4**, mientras que la muestra **GL – 3** registra valores mas altos.

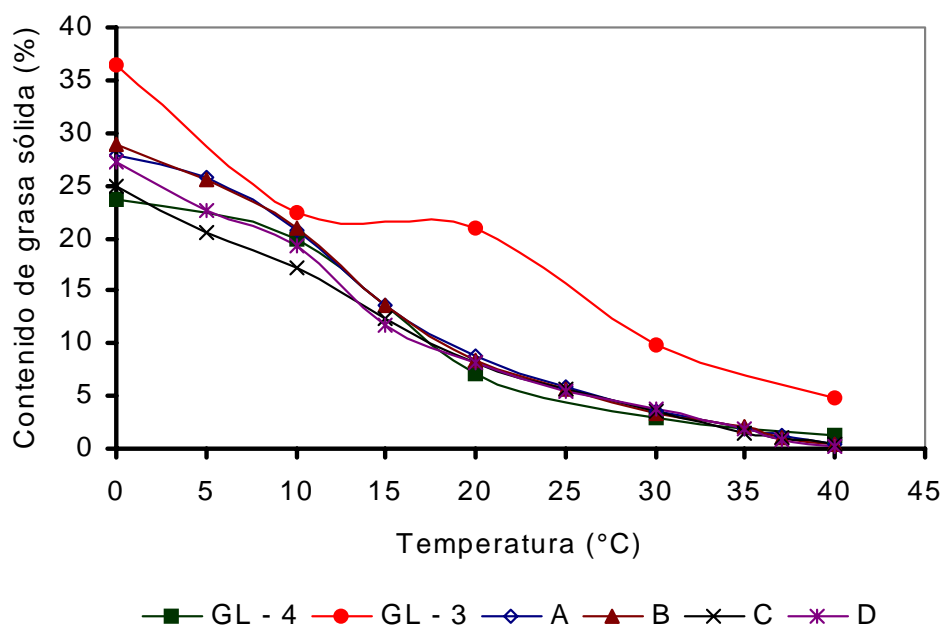


FIGURA 23. Comparación de los contenidos de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema AP/AS en este trabajo con las grasas reportadas en la literatura.

En general, la transesterificación enzimática de una grasa vegetal con alto contenido de ácidos grasos saturados y un aceite con alto contenido de ácidos grasos insaturados puede ser usada como una alternativa para remplazar los productos hidrogenados que son usados para dar plasticidad al producto para producir una grasa adecuada para shortenings, margarinas, y confitería. Además, los

productos de la transesterificación enzimática se caracterizan por no poseer ácidos grasos *trans*.

Cabe destacar que, los productos obtenidos mediante transesterificación enzimática de los sistemas **EP/AS** y **AP/AS** fueron producidos utilizando un contenido de estearina de palma y aceite de palma superior a los reportados en la literatura. Por esta razón, se esperaba que los valores de **SFC** de los productos del sistema **EP/AS** a las temperaturas mencionadas fueran más altos que los registrados por las muestras de la literatura aunque las propiedades fisicoquímicas de las estearinas empleadas fueran diferentes. Asimismo, que los **SFC** de los productos obtenidos con el sistema **AP/AS** fueran más bajos debido a su bajo contenido de aceite de soya con respecto a los utilizados en la literatura. Una posible explicación a este comportamiento es que la transesterificación enzimática permite el intercambio de los grupos acilos de forma selectiva con lo cual se forman otros triglicéridos que no estaban presentes en la mezcla inicial y que por transesterificación química no se forman debido a que el reordenamiento de los grupos acilos en este caso es al azar, no favoreciendo la formación selectiva de uno en particular sino muchos.

3.2.2.8.4. Comparación del SFC de los productos transesterificados con grasas bases comerciales.

Con el fin de buscar la aplicación de los productos obtenidos se decidió realizar una comparación de los **SFC** con dos grasas base comerciales empleadas en la fabricación de margarinas para hornear. Estas grasas base fueron obtenidas mediante procesos de

fraccionamiento. Las grasas comerciales fueron codificadas de la siguiente manera: **GT**, y **CO**. Las curvas de sólidos se indican en las **Figuras 24, 25 y 26** para el sistema **EP/AS**. Las grasas obtenidas mediante transesterificación enzimática tienen un contenido de grasa sólida a 10°C entre 22,7 a 37,2%, mientras que la muestra comercial **CO** tiene un contenido de sólidos de aproximadamente un 40%. En general, los productos presentan en todo el intervalo de temperatura de medición un perfil de fusión similar al de las muestras comerciales **CO** y **GT**. Se observa que a temperaturas inferiores a 20°C, el contenido de SFC de los productos transesterificados es menor que las bases comerciales. En cambio para temperaturas superiores a 20°C las diferencias se hacen menores. Sin embargo, es posible apreciar que para las muestras A, B, C, y D sus contenidos de sólidos se encuentran entre los dos productos comerciales. En el caso de los productos F, H, E, y G, I, J, K, y L sus valores se mantienen por debajo de las grasas comerciales, llegándose a obtener productos como H, I, y J que durante todo el intervalo sus valores de sólidos son bajos. Lo anterior permite concluir que las grasas bases obtenidas con el sistema **EP/AS** pueden ser empleadas en la fabricación de margarinas para hornear, en otras palabras con aplicaciones en panadería, y pastelería entre otras.

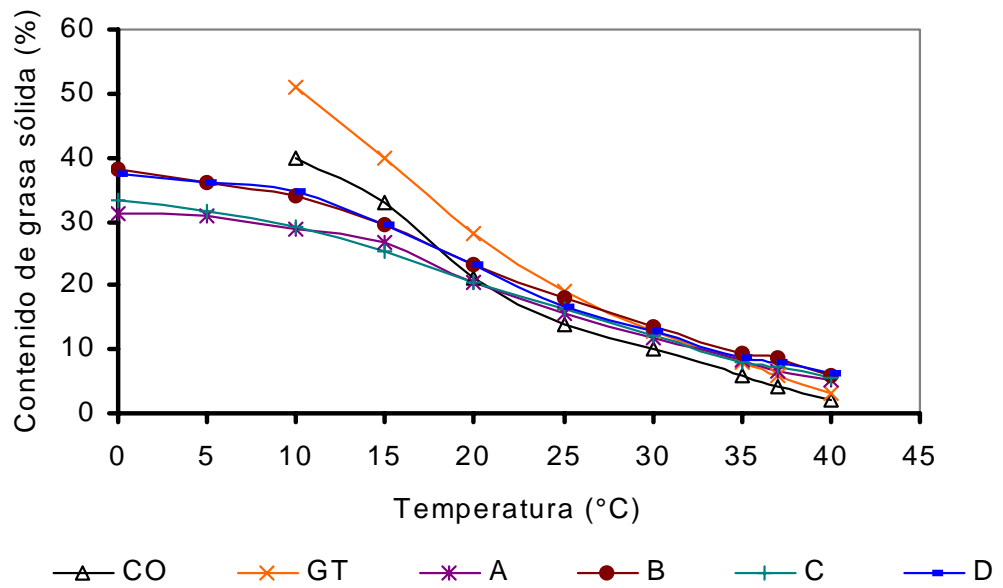


FIGURA 24. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.

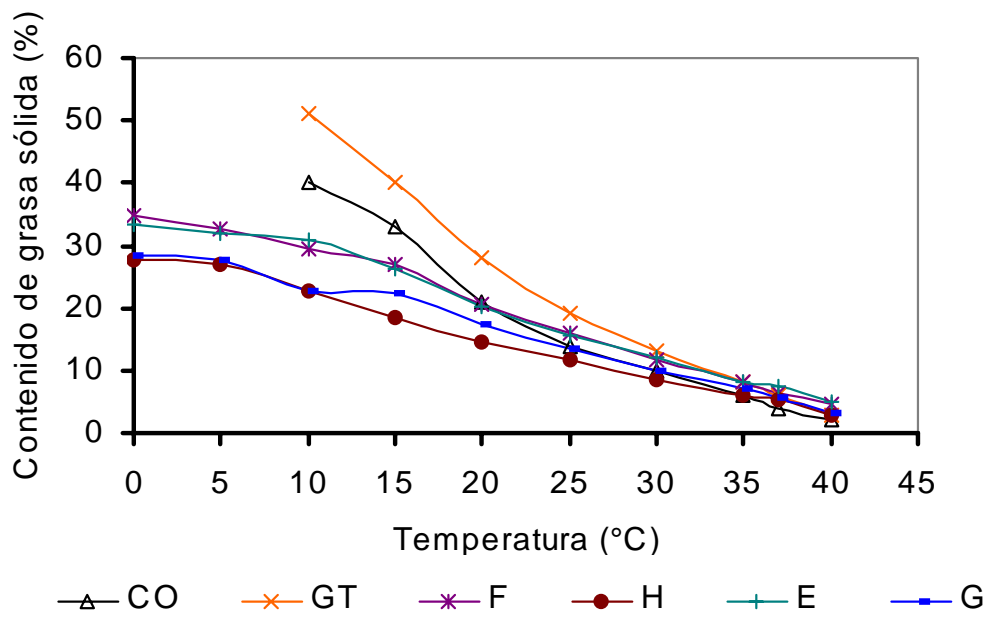


FIGURA 25. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.

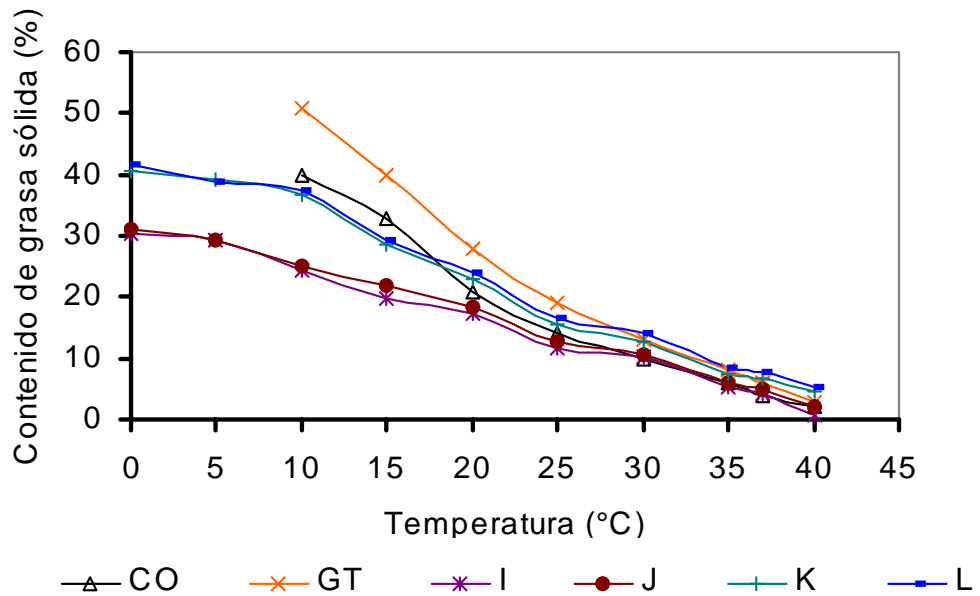


FIGURA 26. Contenido de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema EP/AS con las grasas bases comerciales.

En la **Figura 27** se observa los resultados obtenidos con el sistema **AP/AS**. Los productos registran valores de **SFC** más bajos que las muestras comerciales en todo el intervalo de medición. No obstante, los perfiles de fusión de los productos de transesterificación son similares, pero su bajo contenido de sólidos no puede emplearse en la fabricación de margarinas para hornear por su baja resistencia térmica, sin embargo podrían ser empleados en la fabricación de margarinas para mesa y/o esparcibles.

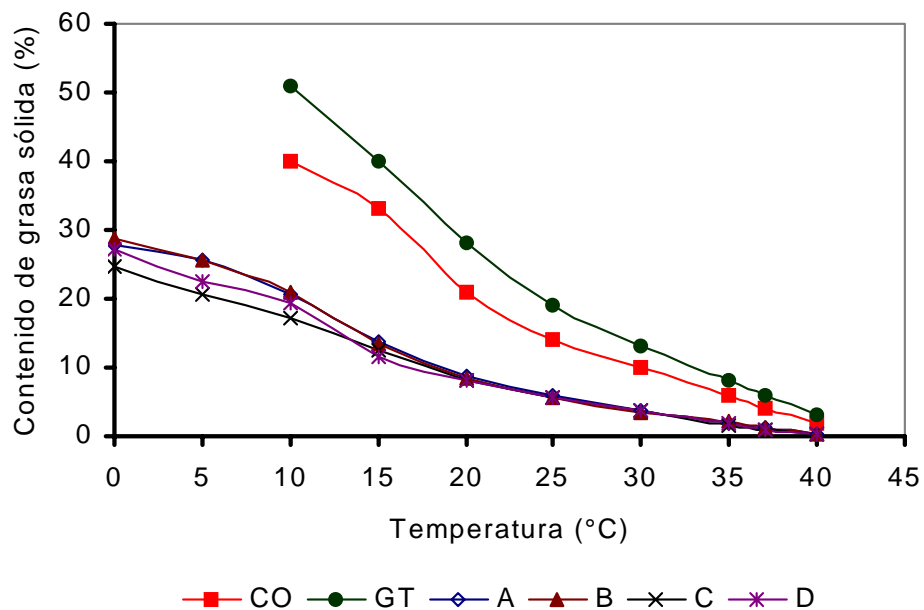


FIGURA 27. Contenidos de grasa sólida de las grasas obtenidas con el sistema AP/AS con las grasas bases comerciales.

En conclusión, al comparar las curvas de **SFC** registrada por las mezclas físicas con las presentadas por las grasas transesterificadas obtenidas en este estudio, se observaron cambios apreciables entre ellas. Las mezclas transesterificadas registran valores de **SFC** menores que las mezclas física de partida. Este decaimiento en el **SFC** posiblemente es debido al reordenamiento de los ácidos grasos en la estructura del glicerol (Zeitoun y col., 1993). Para ambos sistemas en estudio los mayores cambios de **SFC** se observaron a temperaturas bajas (menores de 20°C). De otro lado, las curvas de **SFC** de las grasas bases obtenidas en este estudio presentan valores de **SFC** menores que las grasas bases comerciales en la mayoría de las temperaturas determinadas.

Teniendo en cuenta que los productos obtenidos por transesterificación enzimática pueden tener aplicación en la fabricación de margarinas, shortenings, y rellenos de confitería, tal como los indicados por la literatura o las usadas comercialmente, de acuerdo a su perfil de fusión, se consideró que los productos C, E y G obtenidos con el sistema **EP/AS** y el producto **C** obtenidos con el sistema **AP/AS** son los candidatos para realizar un escalado a planta piloto.

3.2.2.9. Escalado a nivel de planta piloto. Se realizó la reacción de transesterificación empleando una masa de substratos de 35 Kg y con los valores de las variables optimizadas a escala de laboratorio. De forma general se observó que los productos obtenidos en el escalado a planta piloto no presentan diferencias importantes en cuanto a sus perfiles de fusión con respecto a los productos obtenidos en el laboratorio, indicando que el proceso no es afectado por el incremento de la masa.

Los productos obtenidos a nivel de planta piloto fueron codificados de la siguiente manera: Muestra C como **C – PP**, muestra E como **E – PP** y como **G – PP** la muestra G. Los productos fueron caracterizadas en cuanto a contenido de grasa sólida (**SFC**), ácidos grasos libres (**FFA**), diacilglicéridos (**DG**) y triacilglicéridos (**TG's**). Es necesario recalcar que las materias primas, es decir estearina de palma, aceite de palma, y aceite de soya, no fueron las mismas que se emplearon inicialmente en el laboratorio.

Los resultados del proceso de transesterificación realizado en planta piloto se indican en la **Tabla 25**. Se observa que, los valores de **FFA** y **DG** son menores a los observados en el laboratorio. Una posible explicación para los bajos niveles de acidez se podría deber

al empleo de una mayor velocidad de agitación (450 rpm), lo que causaría una disminución de la capa de Nernst o de difusión permitiendo una mayor interacción entre las moléculas del substrato con la enzima, lo que se traduce a su vez que en un aumento del intercambio de los grupos acilos, reflejándose en la menor producción de **DG** y mayores **TG's** (Oliveira y col., 2000).

TABLA 25. Valores de FFA, DG y TG's de los productos transesterificado en planta piloto y laboratorio.

MUESTRAS	<i>Parámetros, (producidos)</i>			
	FFA, %	DG, %	PPP, %	TG's, %
Escalado en Laboratorio				
Sistema EP/AS				
Mezcla Física	0,38	2,00	18,2	99,78
C	2,32	6,36	13,02	91,22
E	2,32	2,73	11,80	94,93
G	4,16	6,68	9,63	89,0
Sistema AP/AS				
Mezcla Física	0,18	6,34	10,47	93,48
C	4,49	10,51	8,54	84,99
Escalado Planta Piloto				
Sistema EP/AS				
Mezcla Física	0,15	3,09	19,19	96,76
C – PP	1,86	2,73	12,84	95,13
E – PP	1,81	3,06	13,68	94,97
G – PP	2,87	4,71	11,40	92,17
Sistema AP/AS				
Mezcla Física	0,10	4,31	8,29	95,60
C - PP	3,88	11,48	6,74	84,65

Con respecto al contenido de grasa sólida para el sistema **EP/AS** (**Figuras 28, 29 y 30**), los productos C, E y G, obtenidos en planta piloto tienen valores de **SFC** relativamente superiores (33,2, 33, y 26%) a los registrados por los productos del laboratorio (29,2, 31 y

22,7%) a 10°C, respectivamente. Mientras que a 37°C, los productos obtenidos en el laboratorio tienen **SFC** relativamente superiores (7,2, 7,4 y 5,7%, C, E y G, respectivamente) que los obtenidos en planta piloto (6,5, 5,2 y 4,6% C, E y G, respectivamente). Además, nuevamente, los productos presentan menor contenido de sólidos en todo el intervalo de medición que las mezclas físicas. Por otro lado, los productos presentan los niveles de sólidos que permiten confirmar las aplicaciones mencionadas con los productos obtenidos a escala laboratorio.

Para el producto E, se empleó un menor tiempo de reacción y contenido de agua, pero un mayor contenido de enzima (2,1%) con respecto a los productos C y G. Los resultados muestran que la enzima puede llevar a cabo la reacción de transesterificación en presencia de un menor contenido de agua.

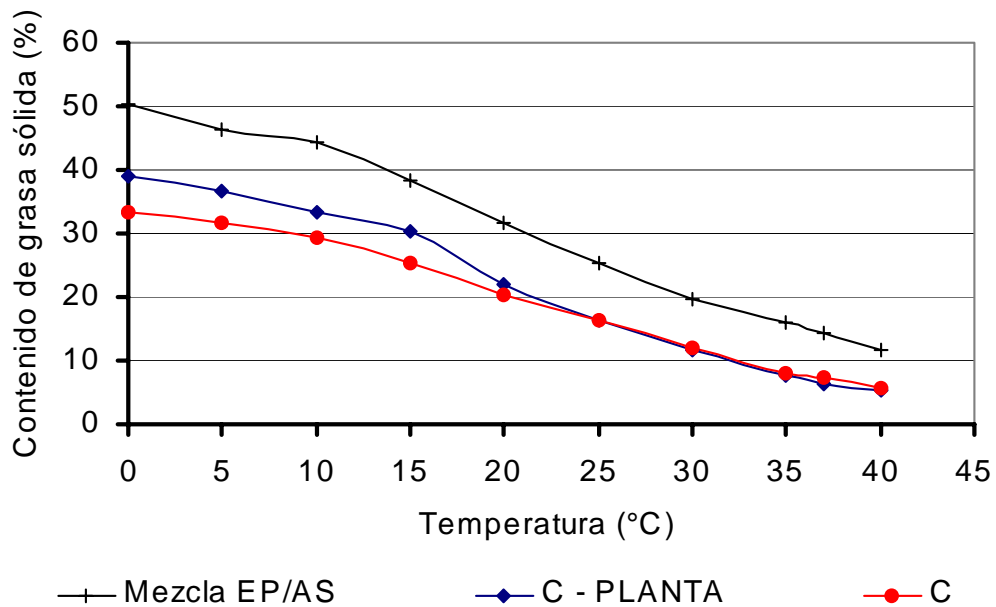


FIGURA 28. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 0,9% de enzima, 10% de agua, 7 horas de reacción.

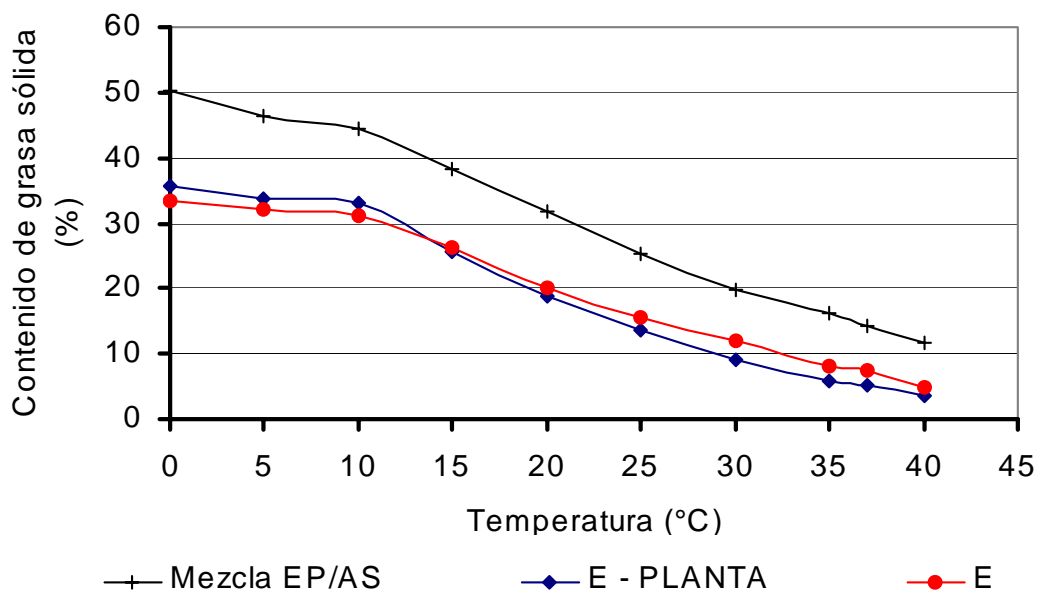


FIGURA 29. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 1% de agua, 5 horas de reacción.

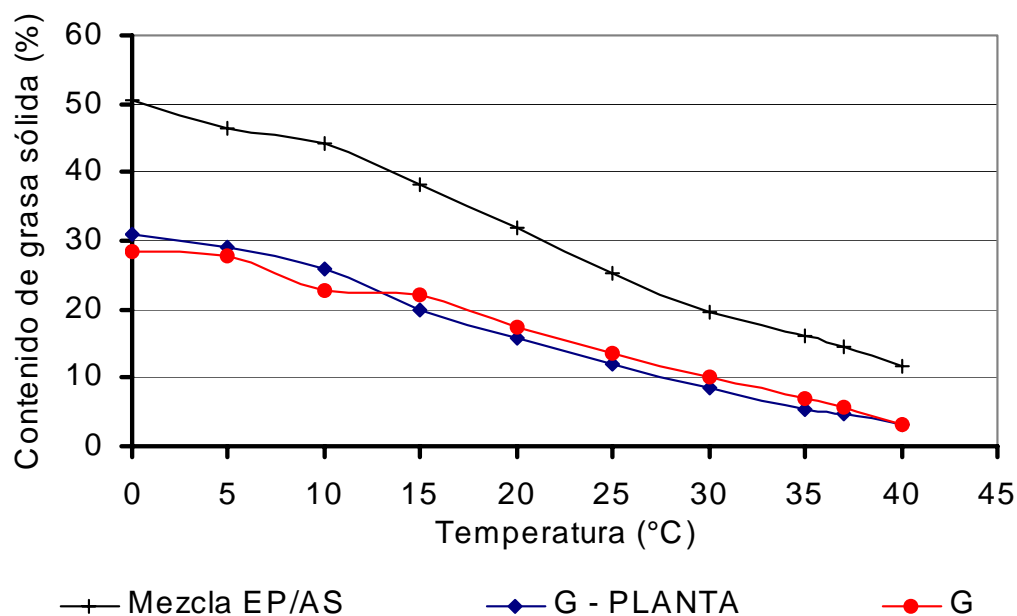


FIGURA 30. Contenido de grasa sólida del sistema EP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 10% de agua, 5 horas de reacción.

Con respecto al producto obtenido con el sistema **AP/AS** en planta piloto, ver **Figura 31**, se observa que en todo el intervalo de medición (0 a 40°C) los productos, de planta piloto y laboratorio tiene **SFC** muy similares, confirmando nuevamente que el proceso no se ve afectado por el incremento de la escala.

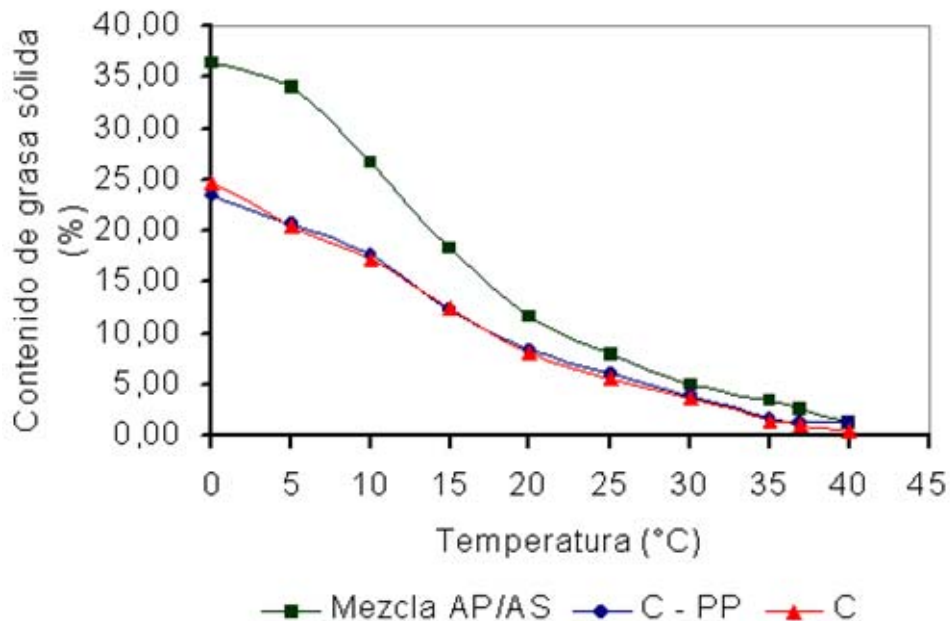


FIGURA 31. Contenido de grasa sólida del sistema AP/AS transesterificado en plantas piloto y laboratorio. Condiciones: 2,1% de enzima, 10% de agua, 5 horas de reacción.

Con el fin de estudiar la factibilidad económica a nivel industrial de la transesterificación enzimática se decidió evaluar la estabilidad operacional de la enzima así como la cinética de la reacción en el ámbito de planta piloto.

3.3. ESTABILIDAD OPERACIONAL DE ENZIMA

Bajo las mismas condiciones en las cuales se obtuvieron los productos E y C de los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**, se realizaron ocho ensayos con la misma enzima. Al finalizar cada serie, la enzima fue separada del producto de la reacción por filtración, y en ningún caso fue sometida a un lavado antes de su re-uso. El substrato se reemplazo cada 5 horas y se empleo una velocidad de

agitación de 250 rpm. La enzima *Rhizomucor miehei* mostró buena estabilidad aun después de 6 re-usos, indicando una aplicación potencial para la industria.

En la **Figura 32** se indican los resultados de los ácidos grasos libres analizados al finalizar cada serie. Se observó una disminución leve de **FFA** en ambos sistemas. En el sistema **EP/AS**, la acidez paso de 1,7%, primer uso, a 0,7% en el octavo uso. Mientras que en el sistema **AP/AS** se redujo del 3,9 a 2,6% respectivamente. La baja formación de ácidos grasos libres en el sistema **EP/AS** con respecto al registrado por el sistema **AP/AS** se debe a la baja actividad hidrolítica que presentó la enzima con el sistema **EP/AS**, cuyo valor fue 13% menor que el registrado en el sistema **AP/AS**.

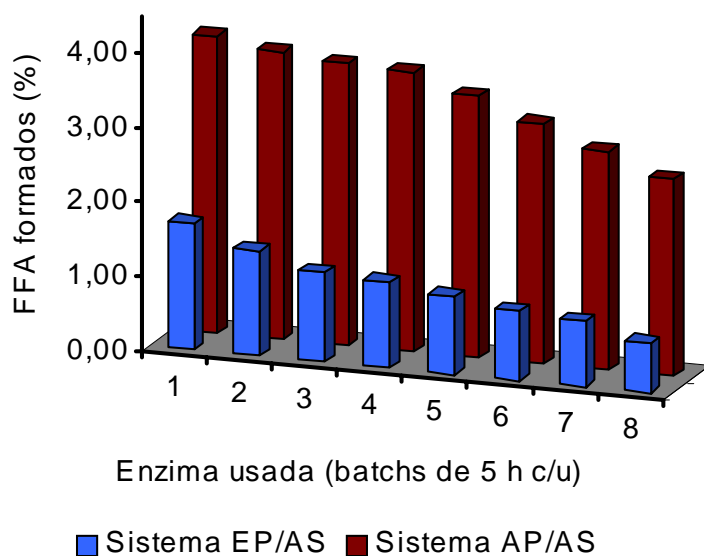


FIGURA 32. Producción de FFA por el re-uso de la enzima. (■) 1% de agua y cantidad de enzima 2,1%. (■) 10% de agua y cantidad de enzima 2,1%.

Igualmente se observó el contenido de PPP a lo largo de los ocho ensayos (ver **Figura 33**). Los datos experimentales obtenidos con una carga de substrato 35 Kg muestran que, en ambos sistemas, el grado de conversión de la PPP decrece con el tiempo.

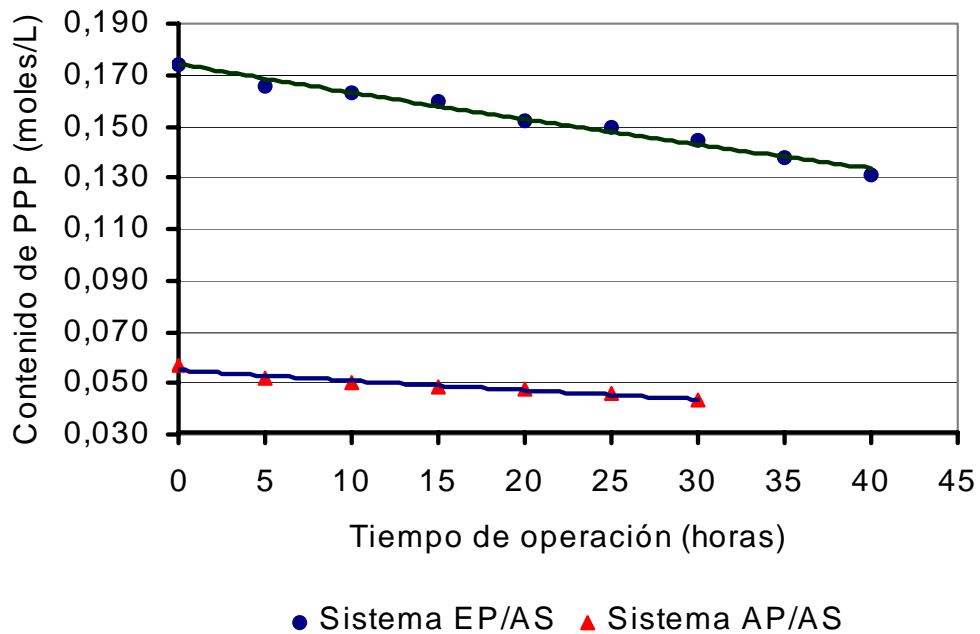


FIGURA 33. Reducción del contenido de PPP en el producto por el re-uso de la enzima. (●) 1% de agua y cantidad de enzima 2,1%. (▲) 10% de agua y cantidad de enzima 2,1%.

Para modelar el comportamiento observado, se puede usar el modelo de desactivación de primer orden propuesto por Oliveira et al, (2000), debido a que el grado de conversión de la **PPP** disminuye con el tiempo, el modelo establece la siguiente ecuación:

$$E_t = E_0 * e^{-k_d * t}$$

Donde E_t y E_0 son la concentración de enzima total, a tiempo $t = t$ y $t = 0$ respectivamente, k_d es la constante de desactivación y t es el tiempo de operación. El tiempo de vida medio (tiempo después de que enzima ha perdido la mitad de la actividad), se define como:

$$t_{1/2} = \frac{2,3 \cdot \text{Log} 2}{k_d}$$

Y ha sido usado como indicador de la estabilidad de la enzima.

Estas ecuaciones fueron aplicadas a los datos experimentales, permitiendo la determinación de los valores de la constante desactivación reportados en la **Tabla 26**. Como se puede observar, la actividad de la enzima con el sistema **AP/AS** decae más rápido (k_d mayor, $0,0077 \text{ h}^{-1}$), que con el sistema **EP/AS**. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de altos contenidos de **FFA** en el medio de reacción, ya que el sistema **AP/AS** se presentaron altos valores de **FFA** (3,9 a 2,6%).

TABLA 26. Constante de desactivación (K_d) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para la enzima empleada

Sistemas	K_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R^2
EP/AS	0,0066	104,9	0,983
AP/AS	0,0077	89,9	0,952

R^2 representa el cuadrado del coeficiente de correlación

En lo que respecta a la estabilidad operacional de la enzima, los valores del tiempo de vida media obtenidos (**Tabla 26**) muestran que, la lipasa pierde el 50% de su actividad inicial al cabo de 4,4 y 3,7 días de operación con el sistema **EP/AS** y **AP/AS**,

respectivamente. Indicando que la enzima es más estable en el sistema **EP/AS**.

3.4. CINÉTICA QUÍMICA DE LA REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN

En este estudio se determinó el orden la reacción y su velocidad inicial mediante el cambio de la concentración de la **PPP** en función del tiempo. El análisis consistió en remover una alícuota de la mezcla de reacción a intervalos de tiempo regulares después de haber iniciado la reacción, la enzima fue separada mediante filtración.

En la **Figura 34** se muestra la variación de la **PPP** en el tiempo. Como se puede observar, en ambos sistemas la disminución del contenido de **PPP** no es lineal con el tiempo. Sin embargo, aplicando la ley de velocidad de una reacción (Owen and Cornelius, 1988), es decir graficando el logaritmo de la concentración versus el tiempo (**Figura 35**) se obtienen líneas rectas con pendientes negativas, indicando que la concentración de **PPP** disminuye con el tiempo. A partir de las pendientes de cada recta, se calcularon las constantes de la velocidad (k , min^{-1}) para cada uno de los sistemas en estudio, obteniéndose para el sistema **EP/AS** un valor de $1,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y de $5,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ para el sistema **AP/AS**. Por tanto, las velocidades iniciales de transesterificación obtenidas fueron $5,3 \times 10^{-3}$ y $1,2 \times 10^{-3} \text{ mmoles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para el sistema **EP/AS** y **AP/AS**, respectivamente. Estos valores fueron obtenidos aplicando la siguiente expresión matemática:

$$v = k * [PPP] \quad 8$$

Los datos obtenidos indican que la reacción de transesterificación para ambos sistemas es de primer orden con respecto a la estearina y aceite de palma.

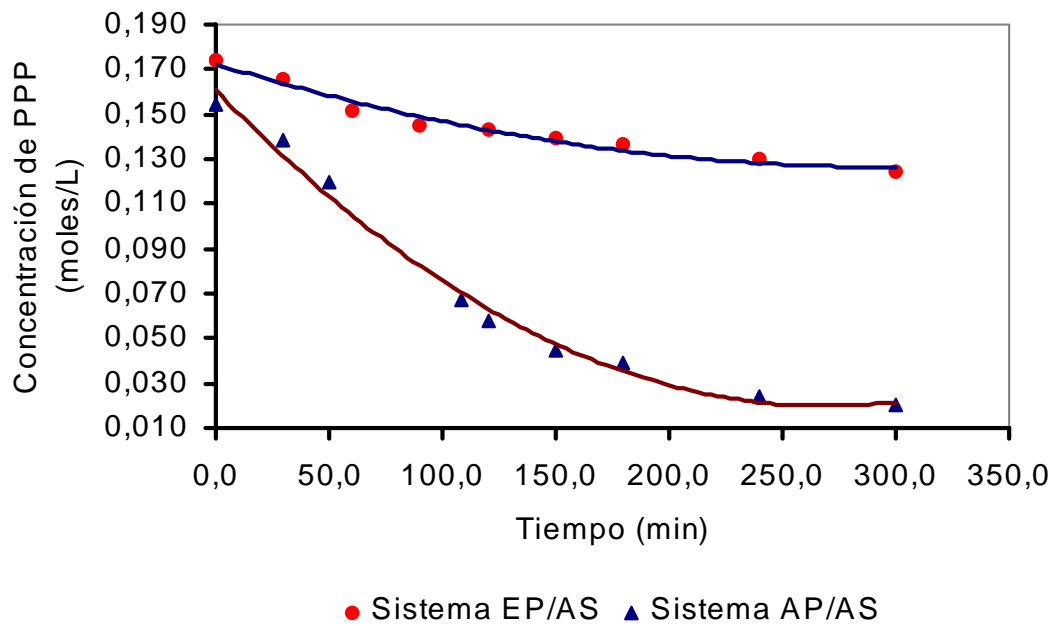


FIGURA 34. Disminución del contenido de PPP en el tiempo para la reacción catalizada por la enzima para los sistemas EP/AS y AP/AS.

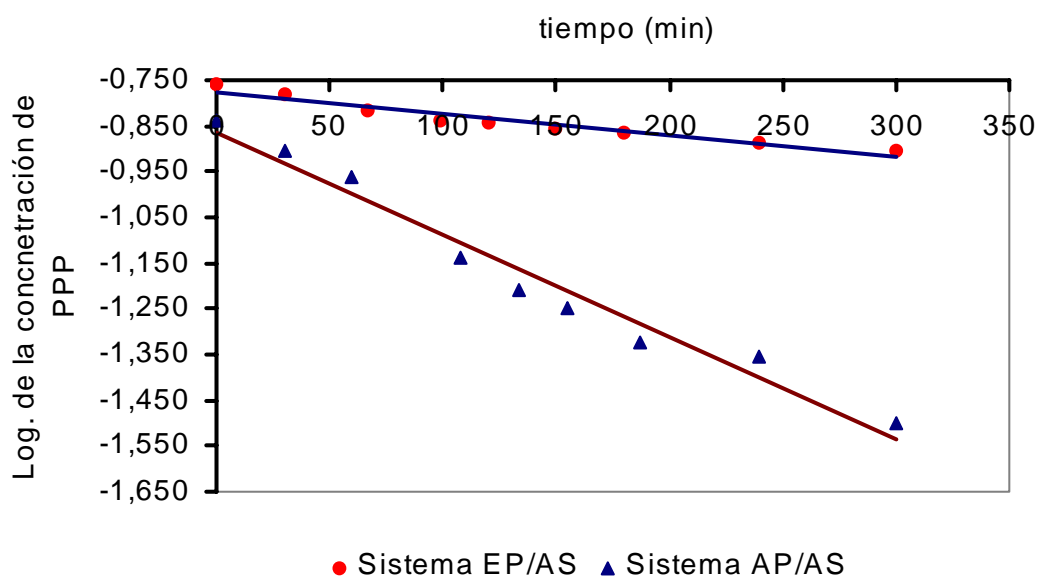


FIGURA 35. Gráfica semilogarítmica de la integral de la ecuación de velocidad de primer orden para los sistemas EP/AS y AP/AS.

Los valores de la constante de Michaelis, K_M , y la velocidad máxima, V_{max} , fueron determinados a partir de las gráficas obtenidas de la forma integrada de la ecuación Henri – Michaelis – Menten (Segel, 1976), ecuación 9 (**Figuras 36 y 37**).

$$v = -\frac{d[PPP]}{dt} = \frac{V_{max} * [PPP]}{K_M + [PPP]} \quad \mathbf{9}$$

Reordenando se tiene:

$$V_{max}.dt = \frac{K_M + [PPP]}{[PPP]} d[PPP] \quad \mathbf{10}$$

Integrando entre un tiempo $t = 0$ y $t = t$ y la correspondiente concentración del sustrato $[PPP]_0$ y $[PPP]_t$

$$V_{\max}t = 2,3 * K_M * \log \frac{[PPP]_0}{[PPP]_t} + ([PPP]_0 + [PPP]_t) \quad \mathbf{11}$$

Reordenando se tiene

$$\frac{2,3}{t} * \log \frac{[PPP]_0}{[PPP]_t} = \frac{1}{K_M} * \frac{([PPP]_0 + [PPP]_t)}{t} + \frac{V_{\max}}{K_M} \quad \mathbf{12}$$

Donde [PPP] es la concentración de PPP en cualquier tiempo t. La ecuación es la ecuación para una línea recta. Así, K_M y V_{\max} pueden ser determinados midiendo la concentración de substrato utilizado durante el tiempo de la reacción, donde la pendiente de la línea recta indica el valor de $1/K_M$ y el intercepto sobre el eje Y el valor de V_{\max}/K_M (Segel; 1976; Spliettergerber, 1983)

Los valores de K_M para el sistema **EP/AS** y **AP/AS** fueron 1,1 y $3,3 \times 10^{-2}$ moles/L, respectivamente, esto indica que la enzima tiene mayor afinidad por el sistema **AP/AS** que por sistema **EP/AS**. En otras palabras, como se muestra en las **Figuras 36** y **37**, los valores de V_{\max} son completamente diferentes, el valor de V_{\max} del sistema **AP/AS** es aproximadamente el doble ($4,95 \times 10^{-3}$ moles*L*min⁻¹) del sistema **EP/AS** ($2,79 \times 10^{-3}$ moles*L*min⁻¹), esto sugiere que la enzima registra menor afinidad por el sistema **EP/AS**, lo cual concuerda con los valores obtenidos en la actividad hidrolítica de la lipasa. De forma general, la enzima muestra mayor afinidad por el sistema **AP/AS**, debido a que este sistema registra el mayor cociente de la relación V_{\max}/K_M , 0,15 contra $2,6 \times 10^{-3}$ para el sistema **EP/AS**.

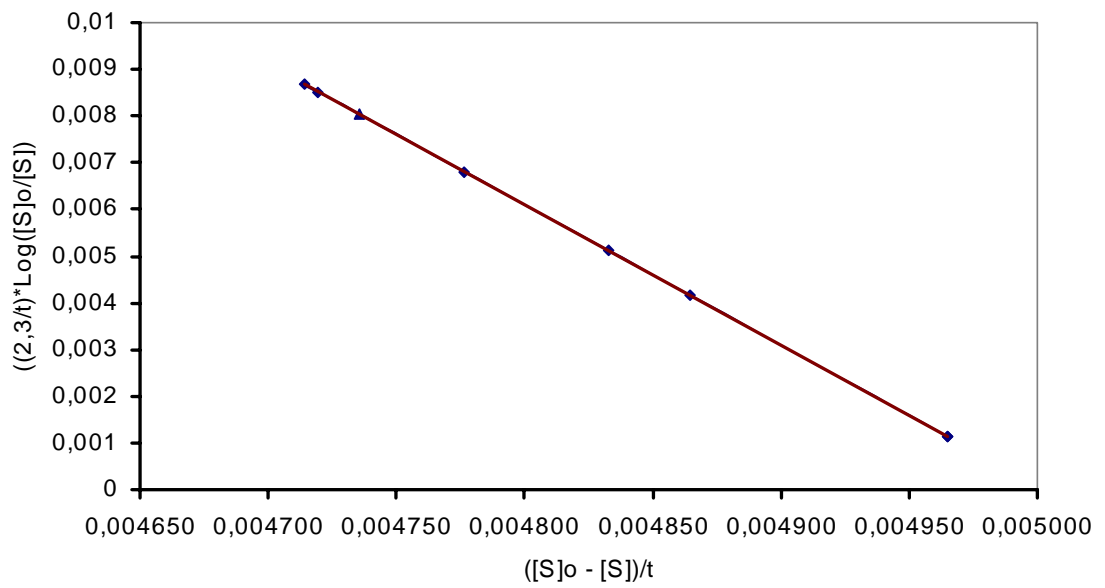


FIGURA 36. Gráfica de Henri – Michaelis – Menten para la transesterificación enzimática del sistema AP/AS.

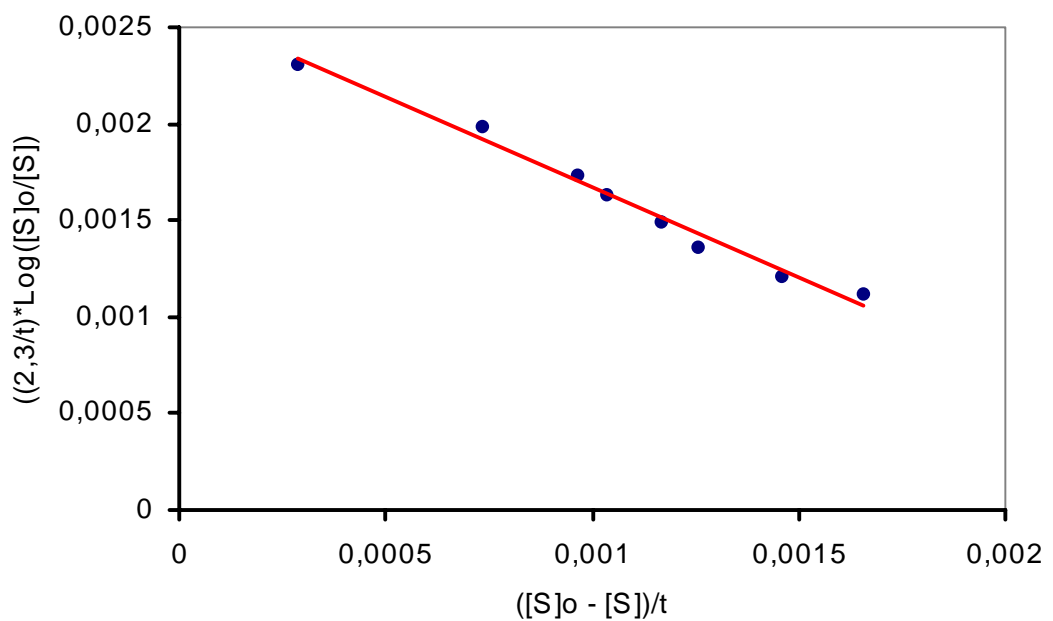


FIGURA 37. Gráfica de Henri – Michaelis – Menten para la transesterificación enzimática del sistema EP/AS.

3.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA TRANSESTERIFICACIÓN DEL SISTEMA ESTEARINA DE PALMA Y ACEITE DE SOYA.

3.5.1. Caracterización de los productos de transesterificación

El proceso de transesterificación catalizado por la enzima *Rhizomocur miehei* entre la estearina de palma y aceite de soya, refinados, bajo las condiciones empleadas en el escalonamiento en planta piloto (80% p/p de estearina de palma, 20% p/p de aceite de soya, 2,1% p/p de enzima, 1% de agua con respecto al peso de la enzima, velocidad de agitación 250rpm) produjo cambios en la composición de triacilgliceroles, debido a la liberación e intercambio de ácidos grasos entre las moléculas de triacilgliceroles, especialmente la tripalmitina, **PPP**, por lo cual su composición se vio disminuida (ver **Tabla 27**). Este proceso de intercambio de grupos acilos afectó la composición en triacilgliceroles de forma que el contenido de diacilgliceroles, **DG's** se incremento en 0,5%, mientras que los **TG's C48**, (**PPP**) y **C54** disminuyeron en aproximadamente 2,3 y 2,2%, respectivamente. **C50** y **C52** aumentaron en 1,6 y 1%, respectivamente.

TABLA 27. Composición en triacilglicéridos de la materia prima y producto de la transesterificación y sus fracciones (% área).

<i>Muestra</i>	<i>Fracción</i>	<i>TG's (número de carbonos)</i>					
		DG	C46	C48	C50	C52	C54
	Estearina	4,92	1,02	20,89	43,45	22,90	5,26
	M. F. (80%:20%)	3,09	1,45	20,44	38,40	28,63	7,84
	Producto obtenido	3,59	1,54	18,19	40,04	29,67	5,62
	Fracción Líquida, FL	5,27	0,28	1,75	40,03	41,09	8,75
	Fracción Sólida, FS	4,13	2,34	38,05	33,97	18,59	1,85

Los resultados corresponden al promedio de dos mediciones. La dispersión de los valores son: para DG y C50 es de $\pm 0,23$, para C48 de $\pm 0,21$, para C52 de $\pm 0,25$ y para C54 de $\pm 0,04$.

En resumen, la variación en la composición de los TG's observados en el producto evaluado, fueron probablemente al reordenamientos e intercambio de posición de los ácidos grasos en la estructura del triacilglicerol durante la transesterificación enzimática. Así que el producto de la transesterificación tiene una composición de **TG** diferente al material de partida, es decir se hizo mas insaturada y rica en **TG** de menor punto de fusión que le proporcionan una apariencia semi-sólida a temperatura ambiente.

En trabajos desarrollados por otros autores se encontraron resultados similares, por ejemplo Lai y col. (1998) determinaron que el proceso de transesterificación de la estearina de palma y aceite de palmiste catalizado por la enzima *Rhizomucor miehie* produce cambios en la composición de triacilgliceroles, disminuyendo principalmente **PPP** y **POP**, obteniendo así un producto blando, debido a la reducción del contenido de grasa sólida.

Una de las características más empleadas en la industria de la grasa para visualizar la aplicación de una grasa es su contenido de grasa sólida (**SFC**) a una determinada temperatura. Las curvas de **SFC** de la mezcla transesterificada fue completamente cambiada (ver **Figura 38**). La mezcla transesterificada presentó en todo el intervalo de medición valores más bajo de **SFC** que la mezcla de partida. A baja temperatura (inferiores a 20°C), se observó una disminución importante en **SFC**, disminución desde el 25 hasta el 41%. A altas temperaturas (superiores a 25°C), se observaron las

mayores disminuciones en **SFC**, desde el 46 al 69%. También se puede observar, que se mejora su plasticidad. Esto puede ser explicado por la disminución de los triacilgliceroles **C48** y **C50**, los cuales están constituido principalmente de **PPP** y **POP** respectivamente. La reducción de estos triacilgliceroles evita que se forme una solución sólida por lo cual el producto así obtenido presenta buena plasticidad (Noor y Ali, 1998).

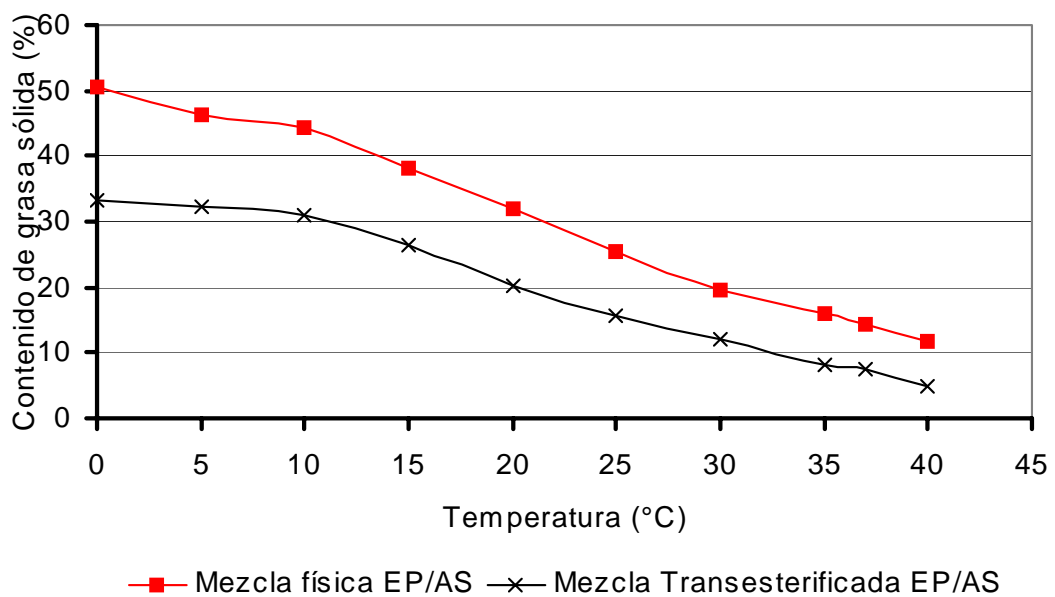


FIGURA 38. Contenido de grasa sólida de la mezcla de estearina de palma y aceite de soya antes y después de la reacción de transesterificación

Con el fin, de evaluar el contenido de sólido de cada una de las fracciones que constituyen el producto transesterificado se realizó un fraccionamiento en seco a nivel de planta piloto, del cual se obtuvieron dos fracciones cuyas principales características se describen a continuación.

Fracción Líquida, FL. La cual represento el 76% del producto transesterificado, caracterizándose por ser una grasa altamente insaturada con 5,27% de diacilgliceridos. Su composición en triacilglicéridos, en orden decreciente fue: **C52** (41,09%), **C50** (40,03%), **C54** (8,75%), **C48** (1,78%), y **C46** (0,28%), ver **Tabla 27**.

El análisis del perfil de fusión (ver **Figura 39**) de esta fracción reveló una grasa con un bajo contenido de grasa sólida en todo el intervalo de medición, dado a su elevado contenido de triacilgliceroles **C52** (41,1%).

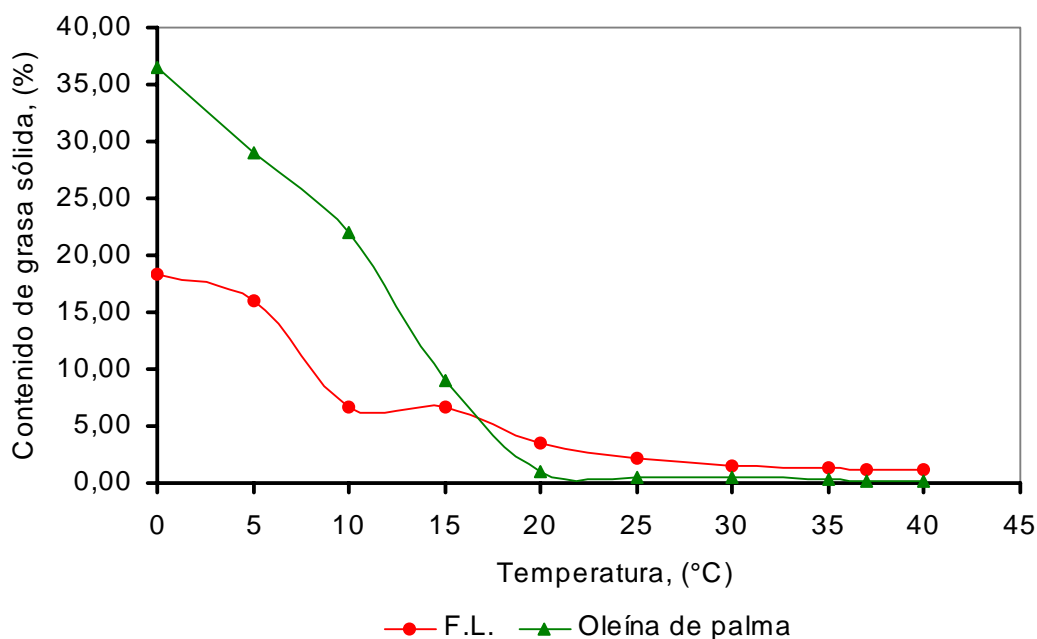


FIGURA 39. Contenido de grasa sólida de la fracción líquida del producto transesterificado y de la oleína de palma.

Fracción Sólida, FS. Represento el 23,9% del producto transesterificado. Fue sólida a temperatura ambiente y su composición en triacilglicéridos se presenta en la **Tabla 27**. Su composición vario con respecto a la estearina original, presentó un 9,48% menos de **C50**, 4,31% menos de **C52**, 3,41% menos de **C54**, y un 17,16% más de **C48**. En otras palabras, esta fracción presenta una consistencia más dura que la estearina de palma, lo cual se debe a su alto contenido de **C48**, y por tal razón su punto de fusión puede ser ligeramente más alto.

Los resultados del análisis del contenido de grasa sólida de esta fracción mostró diferencias respecto la estearina, presentó un contenido de **SFC** más altos en todo el intervalo de temperatura de medición (ver **Figura 40**). Esta tendencia se puede deber al alto contenido de **C48** y **C50**, constituido por los triacilgliceroles **PPP** y **POP** respectivamente, los cuales forman una solución sólida que hace que el producto presente mayor contenido de grasa sólida.

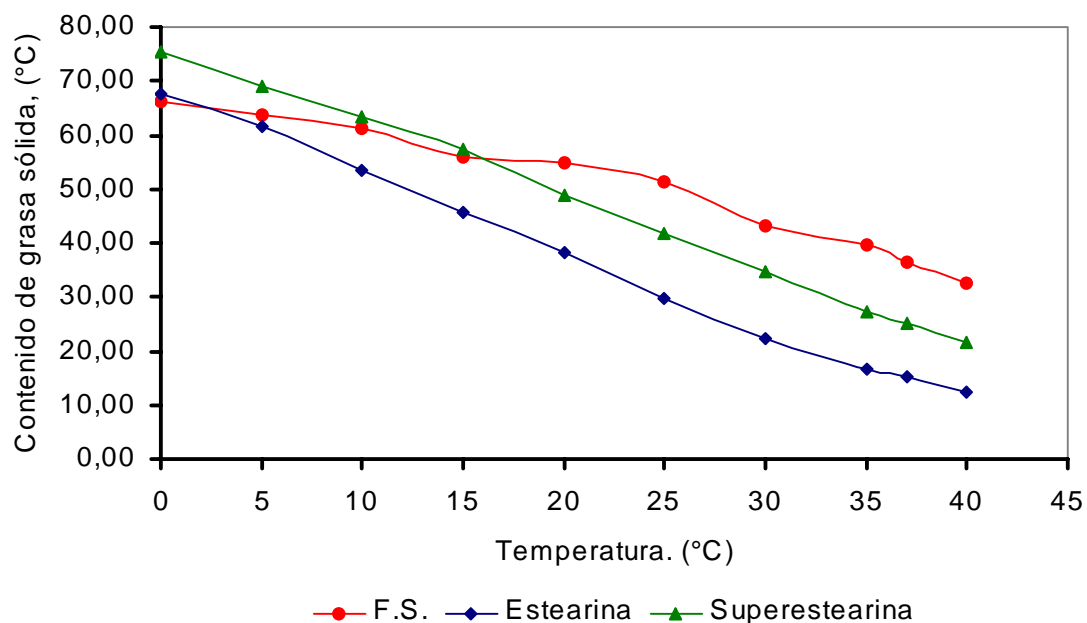


FIGURA 40. Contenido de grasa sólida de la fracción sólida del producto transesterificado y de la Estearina de palma.

Estos resultados indican que la mezcla transesterificada de estearina de palma y aceite de soja (80:20) produce una grasa base que puede ser empleada en preparación de margarinas tipo barra, shortenings y grasas para confitería entre otras.

3.5.2. Características de desempeño de las margarinas obtenidas

En esta etapa del estudio se fabricaron tres margarinas empleando las grasas obtenidas en este estudio, para ello se emplearon las materias primas reportadas en la **Tabla 28**. A cada una de las margarinas así obtenidas se le determinó la habilidad de cremar, y la consistencia.

Cabe destacar que con las mezclas A y B se obtuvieron margarinas para comercialización en clima cálido, mientras que con la mezcla C se obtuvo una margarina para clima frío.

TABLA 28. Composición de las mezclas empleadas para la producción de las margarinas

COMPONENTES (%)	MEZCLA A	MEZCLA B	MEZCLA C
MUESTRA TRANS.	45	85	50
ACEITE DE PALMISTE	15	15	10
ACEITE DE SOYA			40
REFINADO DE PALMA	30		
ESTEARINA DE PALMA	10		

Las propiedades físicas de cremado y consistencia determinadas como se describió en el capítulo de metodología numeral 2.2.7 y 2.2.8, para las margarinas preparadas fueron comparadas con dos margarinas comerciales denominadas **M.C. – A** para comercializar en clima caliente, y **M.C. – B** para comercializar en clima frío.

En la **Figura 41** se compara la consistencia entre las margarinas, como se observa las dos mezclas para clima caliente (muestras A y B) presentan una consistencia estable durante el tiempo de almacenamiento. Asimismo se aprecia que presentan una consistencia mas alta que la margarina comercial **M.C. –A**, lo cual se puede deber a su mayor contenido de grasa sólida.

Con respecto a la mezcla C se observa que igualmente presenta una consistencia estable durante todo el tiempo de almacenamiento

al compararla con la margarina comercial **M.C. – B**. Esto puede ser debido al hecho que el producto transesterificado es rico en **C50** (40,0%). De acuerdo a Duns (1985), el arreglo molecular que tiene lugar en la transesterificación reduce la proporción de los triacilglicéridos **PPP** y **POP**. Este fenómeno facilita que no se forme un compuesto sólido durante la cristalización debido a las interacciones entre ellos, originando una mejor consistencia del producto y se incremente durante el tiempo de refrigeración.

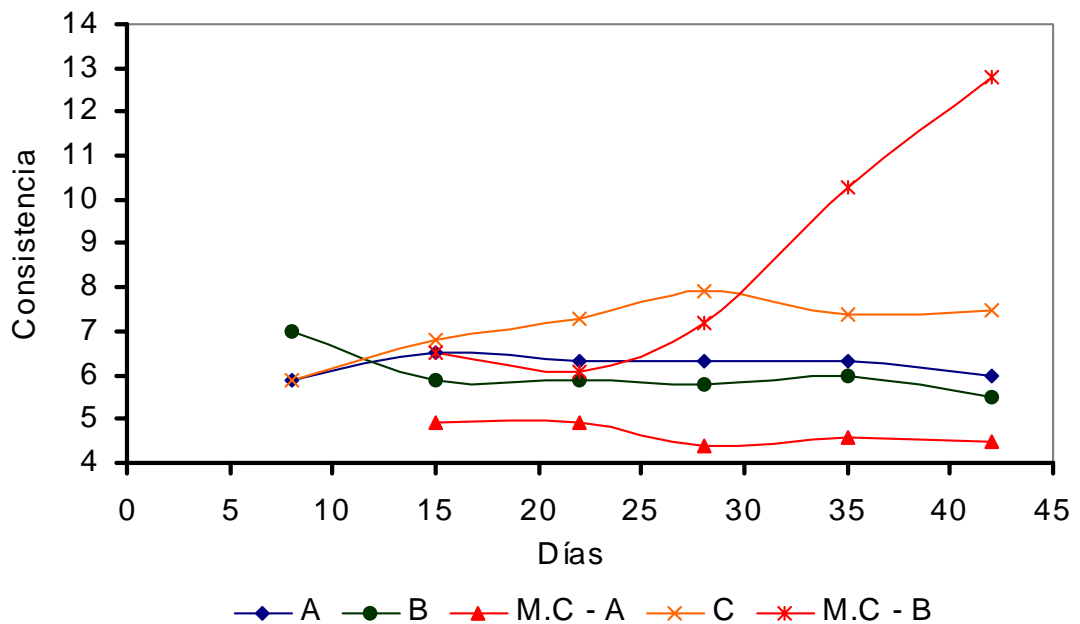


FIGURA 41. Consistencia de las margarinas obtenidas con el tiempo de almacenamiento

En la **Figura 42** se representa el cremado de las margarinas, se observó que las mezclas A y B registran valores similares, igualmente ambas mezclas no registran habilidad para cremar, mientras que la mezcla C muestra un aumento de su habilidad para cremar con el transcurrir del tiempo de batido. Cabe resaltar que

aunque las mezclas A y B no muestran habilidad para cremar no significa que ellas no induzcan un incremento del volumen del producto, según estudios realizados por Noraini et al (1992).

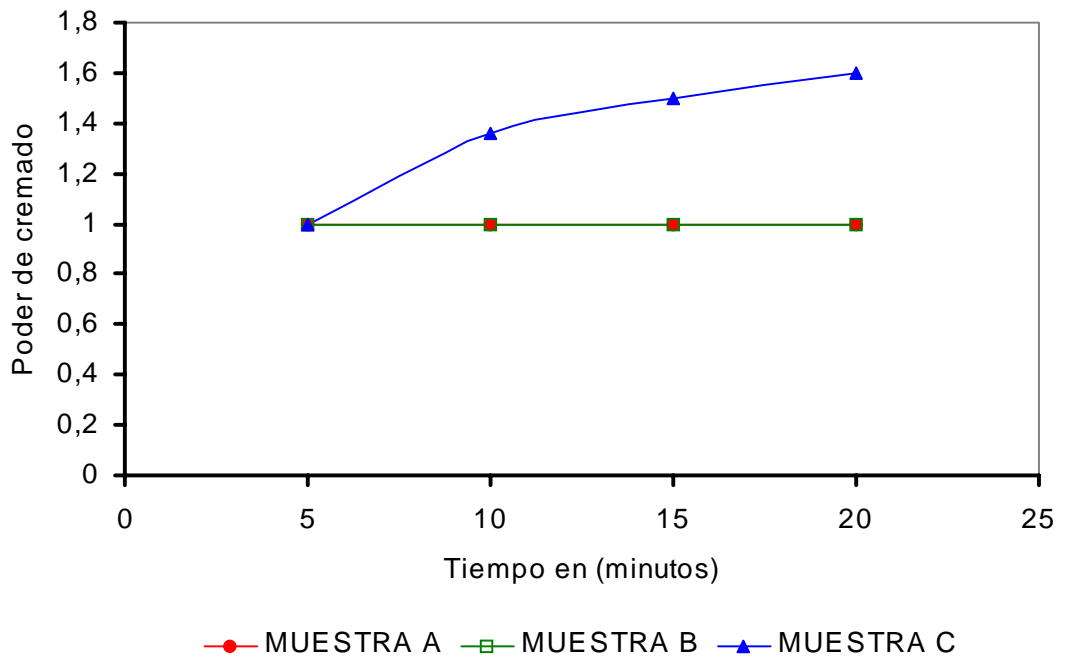


FIGURA 42. Poder de cremado de las margarinas producidas

3.5.3. Identificación de los productos de la transesterificación del sistema aceite de palma y aceite de soya.

3.5.3.1. Caracterización de los productos de transesterificación.

El proceso de transesterificación entre el aceite de palma y aceite de soya, bajo las mismas condiciones empleadas en el escalonamiento en planta piloto (80% p/p de aceite de palma, 20% p/p de aceite de soya, 2,1% p/p de enzima, 10% de agua, y velocidad de agitación 250 rpm), produjo una grasa con un contenido de **DG** del 7,2% mas, con un 1,55% menos de **C48**, con 5,63% menos de **C50**, y con 2,63% de **C52**. La disminución de estos triacilglicéridos se debe en parte al intercambio de los grupos acilos que ocurren en el proceso de transesterificación, y además teniendo en cuenta que algunos de ellos no se incorporan nuevamente a la estructura del triacilglicerol, tal como se puede observar por el alto contenido de diacilglicerol presente en el producto final (ver **Tabla 29**).

TABLA 29. Composición en triacilglicéridos de la materia prima y del producto de la transesterificación (% área).

Muestra	Fracción	TG's (número de carbonos)					
		DG	C46	C48	C50	C52	C54
	Aceite de Palma	1,95	-	8,06	45,05	38,48	6,46
	AP – AS (80%:20%)	4,31	0,55	8,29	39,50	39,23	8,03
	Producto	11,48	0,43	6,74	33,87	36,40	7,21

Los resultados corresponden al promedio de dos mediciones. La dispersión de los valores son: para DG y C50 es de $\pm 0,23$, para C48 de $\pm 0,21$, para C52 de $\pm 0,25$ y para C54 de $\pm 0,04$.

En trabajos desarrollados por otros autores se encontraron resultados similares. Por ejemplo, List et al (1995) quienes

transesterificaron la mezcla de 80% de aceite de palma y 20% de estearina de soya, mediante catálisis química obtuvieron un producto cuya composición en triacilglicerol es diferente al obtenido en este estudio. Sin embargo, el producto así obtenido puede ser aplicado en la preparación de margarina blandas.

Idris et al. (1996) estudiaron la composición y propiedades físicas de margarinas obtenidas a partir de la mezcla física de aceite de palma con aceite de soya y de palmiste. El producto así obtenido fue empleado en la preparación de una margarina. Esta presentó buena estabilidad al almacenamiento, sin embargo su consistencia fue alta debido a su alto contenido de **C48** (43,1%).

En general, el proceso de transesterificación catalizado por la enzima de Novozyme, produjo una disminución del contenido de grasa sólida de la mezcla de partida, debido al ordenamiento de los ácidos grasos dentro de las moléculas de triacilglicerol. Este producto fue sólido a temperatura ambiente y el análisis de **SFC** reveló un contenido de grasa sólida menor que el producto sin transesterificar en todo el intervalo de medición (ver **Figura 43**). A temperaturas inferiores a 30°C, se observó una disminución de **SFC** aproximadamente del 32%, mientras a temperaturas superiores a 35°C, se observaron las mayores disminuciones en **SFC**, de aproximadamente 52%.

Estos resultados indican que la mezcla transesterificada de aceite de palma y aceite de soya (80:20) produce una grasa base que puede ser empleada en preparación de margarinas esparcibles o

como materia prima para grasas con aplicación en la industria de la confitería.

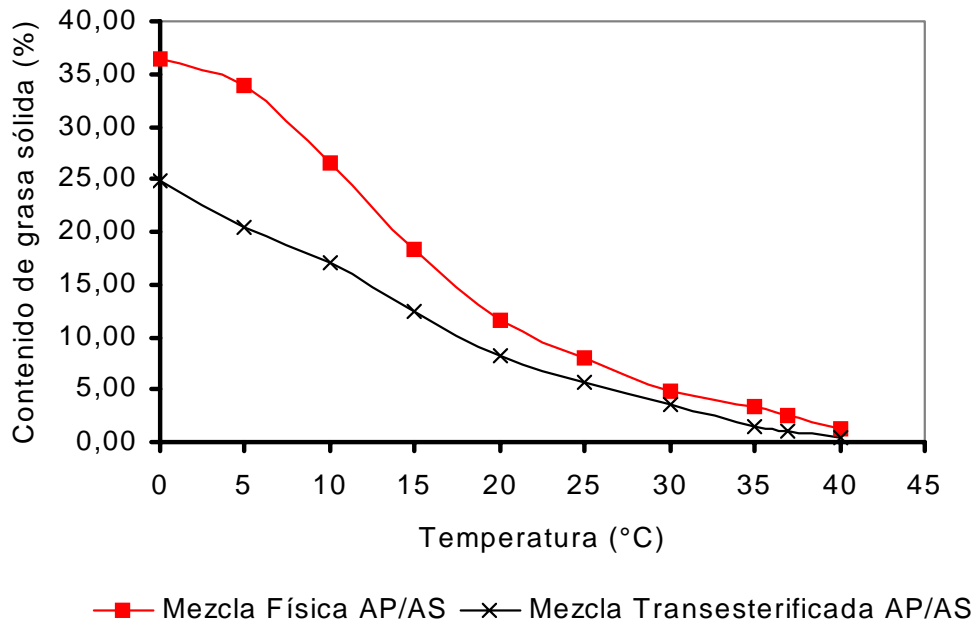


FIGURA 43. Contenido de grasa sólida de la mezcla aceite de palma y aceite de soya antes y después de la reacción de transesterificación

3.6. ESTUDIO FINANCIERO DEL PROCESO DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA.

3.6.1. Estructura de costos para el proceso de transesterificación a escala industrial del sistema estearina de palma/aceite de soya, ep/as.

El diagrama de flujo a seguir para realizar el proceso de transesterificación se presenta en la **Figura 44**.

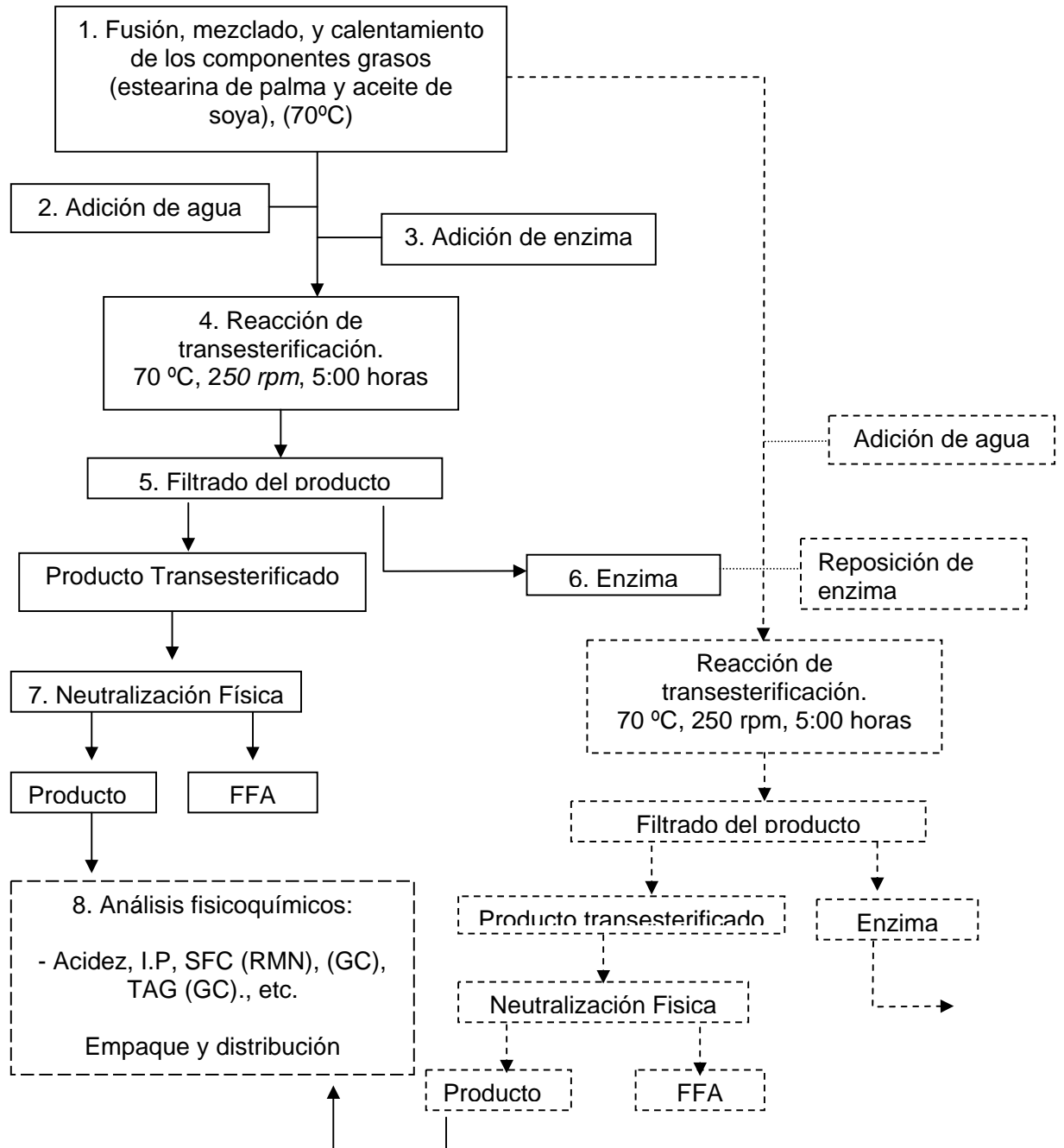


FIGURA 44. Esquema del proceso de transesterificación sistema EP/AS

✓ ***Materias primas básicas***

- Estearina de palma RDB
- Aceite de soya RDB
- Enzima LIPOZYME® RM IM
- Agua

✓ ***Materias primas auxiliares***

- Insumos: Empaque para almacenamiento del producto transesterificado.
- Insumos secundarios: vapor
- ✓ Servicios : energía eléctrica
- ✓ Servicios técnicos: índice de acidez, curva de sólidos, triacilglicéridos
- ✓ Mantenimiento: Repuestos

✓ ***Rendimiento de la reacción de transesterificación:***

El máximo valor de acidez registrado por el producto transesterificado sin refinar fue del orden del 1,81 %. Con base en este parámetro se calcula el rendimiento de la reacción. Asumiendo una producción de 1000 kilogramos de producto, se obtendrían 97,9% de producto transesterificado libre de acidez y 2,1% de ácidos grasos libres.

✓ ***Estructura de Costo***

Los costos de materias primas básicas y auxiliares, así como gastos de energía y proceso de neutralización física se muestran en la **Tabla 30**.

TABLA 30. Estructura de costos para el proceso de transesterificación (1000 Kg)

Materias primas ^a	Cantidad (Kg)	Valor unit. / Kg, (\$)	Valor total / 1000 Kg (\$)
Estearina de palma RDB	800	1.121,0	896.800,0
Aceite de soya RDB	200	2.241,0	448.200,0
Agua	0,21	1,4	0,294
Enzima Lipozyme ® IM RM	21	273.585,0 ^b	5'745.285,0
Reposición de enzima	0,02	1'641.510	32.830,2
Consumo de energía ^a	Cantidad	Valor unit. / h	Valor total / 5 h
Potencia del agitador (Kw/h)	0,43	147	316,0
Vapor (0.1 Kg/Kg de aceite)	100,0	18,0	9.000,0
Mano de obra/h	1,0	3.480,75	17.403,8
Proceso de Desodorización/Neutralización ^a		Valor unit./Kg (\$)	Valor total / 1000 Kg (\$)
Costos indirectos de fabricación		41,6	41.600,0
Mano de obra		12,0	12.000,0
Desodorización/Neutralización			
CIF Desodorización/Neutralización		46,2	46.200,0
Antioxidante (TBHQ) ^c		5,5	5.500,0

a. Datos suministrados por la empresa COMERCIALIZADORA INTERNACIONAL SANTANDEREANA DE ACEITES S.A.

b. El valor de la enzima, se calculó dividiendo el costo por kilogramo (\$1641510/Kg para una compra de 20Kg) por el número de *batch* en los que la enzima presentó actividad mayor al 85% de la actividad inicial (6 *batch*).

c. El costo del antioxidante se calcula asumiendo una concentración final de 100 ppm.

En la **Tabla 31** se reporta el costo real del producto transesterificado, calculado con base en los datos reportados en la anterior tabla.

TABLA 31. Costo de producción de grasas base para fabricación de margarinas y shortenings a partir de estearina de palma y aceite de soya a escala industrial

	Cantidad producida (Kg)	Costo de producción, (\$)	Costo del producto / Kg (\$)
Producto sin fraccionar	979,0	6'443.531,0	6.581,9
Ácidos grasos libres	20,1	16.675,0	830,0

Los precios presentados corresponden a producto interesterificado, a granel y sin empacar.

No obstante, asumiendo que la enzima se puede utilizar en proceso de transesterificación hasta que su actividad alcance el 50% de su actividad inicial, el número de veces que se podrían re-usar sería 21 (la enzima pierde 2.4% de actividad/batch) en lugar de los 6 empleados para el cálculo anterior sin embargo, no se verificó este número. Bajo estas consideraciones, el costo por Kg de producto transesterificado se reduce a \$3.388,0 /Kg. Esto es posible de realizar ajustando los tiempos de reacción si se trata de un proceso en batch, o ajustando el flujo de sustratos si hablamos de un proceso continuo, en reactor de lecho empacado.

Según la revisión bibliográfica se encuentra que la enzima se puede utilizar más de 20 veces con resultados satisfactorios, y algunos investigadores (D'Agostini, 2002) sugieren que en procesos continuos la enzima inmovilizada se podría utilizar hasta 100 veces. Sin embargo esto deberá verificarse.

3.6.2. Estructura de costos para el proceso de transesterificación a escala industrial del sistema aceite de palma/aceite de soya.

El diagrama de flujo a seguir para realizar el proceso de transesterificación se presenta en la **Figura 45**.

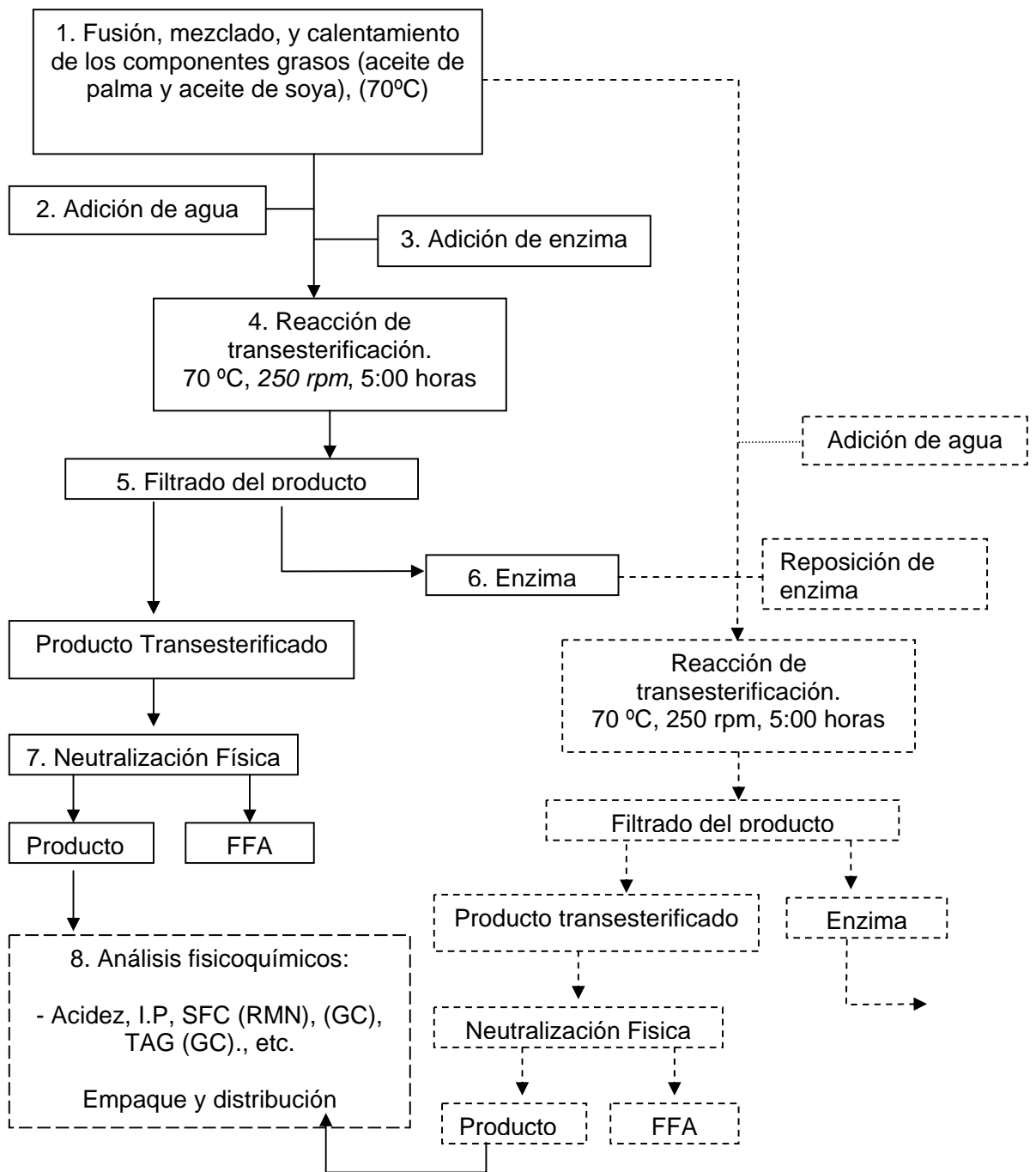


FIGURA 45. . Esquema del proceso de transesterificación sistema AP/AS

✓ **Materias primas básicas**

- Aceite de palma RDB
- Aceite de soya RDB
- Enzima LIPOZYME® RM IM
- Agua

✓ ***Materias primas auxiliares***

- Insumos: Empaque para almacenamiento del producto transesterificado.
- Insumos secundarios: Vapor
- ✓ Servicios: Energía eléctrica
- ✓ Servicios técnicos: índice de acidez, curva de sólidos, triacilglicéridos
- ✓ Mantenimiento: Repuestos

✓ ***Rendimiento de la reacción de transesterificación:***

El máximo valor de acidez registrado por el producto transesterificado sin refinar fue del orden del 3,88 %. Con base en este parámetro se calcula el rendimiento de la reacción. Asumiendo una producción de 1000 kilogramos de producto, se obtendrían 95,6% de producto transesterificado libre de acidez y 4,31% de ácidos grasos libres.

✓ ***Estructura de Costo***

Los costos de materias primas básicas y auxiliares, así como gastos de energía y proceso de neutralización física se muestran en la **Tabla 32**.

TABLA 32. Estructura de costos para el proceso de transesterificación (1000 Kg)

Materias primas ^a	Cantidad (Kg)	Valor unit. / Kg (\$)	Valor total / 1000 Kg (\$)
Aceite de palma RDB	800	1.121,0	896.800,0
Aceite de soya RDB	200	2.241,0	448.200,0
Agua	2,1	1,4	2,94
Enzima Lipozyme ® IM RM	21	273.585,0 ^b	5'745.285,0
Reposición de enzima	0,02	1'641.510	32.830,2
Consumo de energía ^a	Cantidad	Valor unit. / h	Valor total / 5 h
Potencia del agitador (Kw/h)	0,43	147	316,0
Vapor (0.1 Kg/Kg de aceite)	100,0	18,0	9.000,0
Mano de obra/h	1,0	3.480,75	17.403,8
Proceso de Desodorización/Neutralización ^a		Valor unit./Kg (\$)	Valor total / 1000 Kg (\$)
Costos indirectos de fabricación		41,6	41.600,0
Mano de obra		12,0	12.000,0
Desodorización/Neutralización			
CIF Desodorización/Neutralización		46,2	46.200,0
Antioxidante (TBHQ) ^c		5,5	5.500,0

a. Datos suministrados por la empresa COMERCIALIZADORA INTERNACIONAL SANTANDEREANA DE ACEITES S.A.

b. El valor de la enzima, se calculó dividiendo el costo por kilogramo (\$1641510/Kg para una compra de 20Kg) por el número de *batch* en los que la enzima presentó actividad mayor al 85% de la actividad inicial (6 *batch*).

c. El costo del antioxidante se calcula asumiendo una concentración final de 100 ppm.

En la **Tabla 33** se reporta el costo real del producto transesterificado, calculado con base en los datos reportados en la anterior tabla.

TABLA 33. Costo de producción de grasas base para fabricación de margarinas y shortenings a partir del aceite de palma y aceite de soya a escala industrial

	Cantidad producida (Kg)	Costo de producción (\$)	Costo del producto / Kg (\$)
Producto sin fraccionar	956,0	6'424.464,0	6.720,0
Ácidos grasos libres	43,1	35.745,0	830,0

Los precios presentados corresponden a producto interesterificado, a granel y sin empacar.

Sin embargo, si se asume, como en el caso anterior, que la enzima se puede utilizar en proceso de transesterificación hasta que su actividad alcance el 50% de la actividad inicial, el número de batches que se podrían procesar sería 18, no verificado experimentalmente. Bajo estas consideraciones, el costo por Kg de producto transesterificado se reduce a \$3.722,0 /Kg.

4. CONCLUSIONES

- ❖ El análisis de los datos experimentales usando la metodología de superficie de respuesta mostró que es posible la transesterificación de los sistemas **EP/AS** y **AP/AS**. El proceso de transesterificación para el sistema estearina de palma con aceite de soya es fuertemente influenciado por las variables relación de sustratos y la interacción del tiempo y cantidad de enzima, mientras que para el sistema compuesto de aceite de palma y aceite de soya por la interacción de la relación de sustratos con la cantidad de enzima y la interacción del tiempo de reacción y cantidad de enzima.
- ❖ El proceso de transesterificación enzimático pudo reproducirse a nivel de planta piloto (masa total 35 Kg), lográndose obtener un producto adecuado con aplicación en la industria de panadería, chocolatería y en la fabricación de margarinas.
- ❖ Se estableció que es posible obtener un producto adecuado para la fabricación de margarinas, shortenings, y grasas para la aplicación en la industria de chocolatería, con una cantidad baja de enzima (entre 1 y 2,1%), a 70°C de temperatura y con alto contenido de estearina de palma y aceite de palma (80%), otorgándole un mayor valor agregado a las materias primas.

- ❖ Se logró la preparación de tres margarinas con el producto transesterificado, las cuales mostraron buena estabilidad al

almacenamiento y textura. Igualmente, se pudo preparar grasas, adecuadas para el relleno de chocolatería.

- ❖ En este estudio se demostró que mediante la transesterificación enzimática de la estearina de palma y el aceite de palma con el aceite de soya es posible obtener un producto que no presenta ácidos grasos *trans*, debido al no uso de materia prima hidrogenada. Además, la reacción de transesterificación permite aumentar el valor agregado de la estearina de palma y aceite de palma al obtener un producto que puede usarse como materia prima en la preparación de margarinas y rellenos de chocolatería.

5. RECOMENDACIÓN

- ❖ Dado a la ventaja del proceso desarrollado en cuanto a la obtención de un producto sin ácidos grasos *trans* y alto contenido de aceite de palma y estearina de palma se recomienda evaluar y optimizar el proceso en forma continua con la finalidad hacerlo más eficiente y rentable a nivel industrial.
- ❖ Utilizar la nueva enzima comercial de Novo, la TLM, la cual por estar soportada sobre sílica, es de menor costo, permitiendo realizar el proceso en condiciones más económicas, dado que la enzima representa aproximadamente el 60% del costo total del proceso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **AKIMOTO**, Masamichi, **NAGASHIMA**, Yoshiko, and **SATO**, Daiki. 1999, A Kinetic Study on Lipase-Catalyzed Interesterification of Soybean Oil with Oleic Acid in a Continuous Packed-Bed Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 81, 131 – 142.
2. **ARROYO**, Miguel. 1998. Inmovilización de Enzimas. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39 (2); 23 – 29.
3. **AULT**, Addison. 1974. An Introduction to Enzyme Kinetics. *Journal of Chemical Education*. 51 (6); 381 – 386.
4. **BELITZ** H. D., and **GROSCH** W. 1997, *Química de los Alimentos*, 2ª edición. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España. 175 - 266
5. **BERGER**, Kurt, 1986. Palm Oil Products, *Why and How to Use Them*. *Food Technology*, September, 73 - 79
6. **BERNARDINI**, E., 1981, *Tecnología de Aceites y Grasas*, 1era edición, Editorial Alambra. 413 – 419
7. **BLOOMER**, S., **ADLERCREUTZ**, P., and **MATTIASSON**, B., 1990. Triglyceride Interesterification by Lipases. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 67 (8), 519 – 524.
8. **BOSIN**, W. A.; **MARMOR**, R. A. The Determination of the Solids Content of Fats and Oils by Nuclear Magnetic Resonance. *The Journal of the American Oil Chemists' Society*. 45, 335 - 337

8. **BRADY**, L.; et al. 1990. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase. *Nature* **343**; 767 – 770.
9. **BUSFIELD**, W. K., and **PROSCHOGO**, P. N., 1990, Thermal Analysis of Palm Stearin by DSC. *Journal of American of Oil Chemistry Society*, **67** (3), 171 - 175
10. **CASTELLANO**, Fabian y **GONZALES**, Rosita. 2004. Síntesis de esteres aquilicos mediante alcoholisis de aceite de palmiste utilizando como catalizador lipasa de mucor miehei. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
11. **CARPENTER**, D. L., and **SLOVER**, H. T., 1976, *Journal of American Oil Chemistry Society*, **50**:372
12. **CHRISTIED**, William W., et al. 1991. Stereospecific Analysis of Triacyl-sn-Glycerols via Resolution of Diastereomeric Diacylglycerol Derivatives by High-Performance Liquid Chromatography on Silica. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 68 (10), 695 – 701.
13. **CHOBANOV**, D., and **CHOBANOVA**, R., 1977, *Journal of American Oil Chemistry Society*, **54**,47
14. **COTTRELL**, Richard C., 1996. Aspectos Nutricionales del Aceite de Palma. *Aceites y Grasas. Salud y Nutrición*, marzo, 65 – 96.
15. **DeMAN**, L., **SHEN**, C. F., y **BLACKMAN**, B., 1989, Composition, Physical and Textural Characteristics of Soft (Tub) Margarines. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **68** (2), 70 - 78

16. **DeMAN**, L., **deMAN**, J. M., y **BLACKMAN**, B., 1991, Physical and Textural Characteristics of Some North American Shortenings. *Ibis*, **68** (2), 63 - 69
17. **DeMAN**, L., **deMAN**, J. M., y **BLACKMAN**, B., 1989, Physical and Textural Evaluation of Some Shortenings and Margarines. *Ibis*, **66** (1), 128 - 132
18. **D'SOUZA**, V.; **deMAN** J. M. and **deMAN** L. 1992, Chemical and Physical Properties of the Solid Fats in Commercial Soft Margarines. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **69** (12), 1198-1205
19. **DUNS**. M. L. 1985. Palm Oil in Margarines and Shortenings. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **62**, 408 – 410
20. **FOGOLIA**, Tomas A, **PETRUSO**, Kimberly and **FEAIRHELLER**, Stephen H.. 1993, Enzymatic Interesterification of Tallow-Sunflower Oil Mixtures. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **70** (3), 281 – 285
21. **FOMUSO**, Lydia B., y **AKOH**, Casimir C. Enzymatic Modification of High-Laurate Canola To Produce Margarine Fat. 2001, *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49, 4482 – 4487.
22. **FORSELL**, P., **KERVINEN**, R., **LAPPI**, M., **LINKO**, P., **SOURTTI**, T., and **POUTANEN**, K.. 1992, Effect of Enzymatic Interesterification on the Melting Point of Tallow-Raped Oil (LEAR) Mixture. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **69** (2), 126 - 129
23. **GARCIA**, R., **MARTINEZ**, M., **GARCIA**, T., and **ARACIL**, J., 1999. Kinetic Modelling of Enzymatic Chiral Resolution of () 2-Methyl Butyric Acid. Elsevier Science.
24. **GRIMALDI**, Renato; **NASSU**, Renata Tieko; **GUARALDO**, Lireny Aparecida; **CAVALETTI**, Rosana Nogueira. 1998, Characterization of Hydrogenated for Margarine Manufacturing Purposes. *Grasas y Aceites*, **49** (1), 1 - 8

25. **GROMPONE**, M. A. 1992, Propiedades de los Aceites Vegetales Modificados por Hidrogenación, Interesterificación y fraccionamiento. *Grasas y Aceites*, **43** (6), 330 - 335

26. **HERNÁNDEZ**, E. y **LUSAS**, E. W. 1997, Trends in transesterification of Cottonseed Oil. *Food technology*, **51** (5), 72 – 76

27. **HOLUB**, B. J.; **M.**, Thomas L. Nutritional Aspectos of Fast and Oils, in *Technological Advances in Improved and Alternative Jources of Lipids*. Edited by B. J. Kameland Y., Kakuda, Blackie Academic and professional, New York, 1994, 16 – 44.

28. **HULTIN**, Herbert O. 1983. CURRENT AND Potential Uses of Immobilized enzymes. *Food Technology*, October, 66 – 82.

29. **IDRIS**, Nor Aini, **deMAN**, Leny, **TANG**, T. S., y **CHONG**, C. L. 1996,b Chemical Composition and Physical Properties of Soft (Tub)t Margarines Solid in Malaysia. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **73** (8), 995 - 1010

30. **JENNINGS**, Brenda H., and **AKOH**, Casimir C., 2000, Lipase-Catalyzed Modification of Rice Bran Oil To Incorporate Capric Acid. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48, 4439 – 4443.

31. **KELLENS**, Ir Marc, 1995, Desarrollos en la Tecnología de Modificación de grasas, “Interesterificación de Grasas y Aceites”. *Aceites y Grasas*, Septiembre, 266 – 279.

32. **KERMASHA**, S., and **BISAKOWSKI**, B. 1998, The Effect of Immobilization on the Hydrolytic/Interesterification Activity

- of Lipase from *Rhizopus niveus*. Journal of American Oil Chemistry Society, 12, 1791 – 1799.
33. **KNEZEVIC**, Zorica; **MOJOVIC**, Ljiljana; and **ADNADJEVIC**, Borivoje. 1998. Palm Oil hydrolysis by Lipase From *Candida cylindracea* Immobilized on Zeolite Type Y. Enzyme Microb. Technol., 22, March, 275 – 280.
 34. **KURASHIGE**, J., **MATSUZAKI**, N., and **TAKAHASHI**, H. 1993. Enzymatic Modification of Canola/Palm Oil Mixtures: Effects on the Fluidity of the Mixture. Journal of American Oil Chemistry Society, **70** (9), 849 - 852
 35. **LAI**, O. M., **GHAZALI**, H. M., and **CHONG**, C. L. 1998, Physical Properties of Pseudomonas and *Rhizomucor miehei* Lipase-Catalyzed Transesterified Blends of Palm Stearin:Palm Kernel Olein. Journal of American Oil Chemistry Society, **75** (8), 953 – 959
 36. **LIST**, G. R., **MOUNTS**, T. L., **ORTHOEFER**, F. y **NEFF**, W. E. 1995, Margarine and Shortening Oils by Interesterification of Liquid and Trisaturated Triglycerides. Journal of American Oil Chemistry Society, **72** (3), 379 - 382
 37. **LIST**, G.,R., **EMKEN**, E. A., **KWOLEK**, W. F., **SIMPSON**, T. D. and **DUTTON**, H. J.; 1977, Zero trans Margarines: Preparation Structure, and Properties of Interesterified Soybean Oil-Soy Trisaturate Blends. Journal of American Oil Chemistry Society, **54**,408 – 413.
 38. **MACRAE**, A. R. 1983, Lipase-Catalyzed Interesterification of Oil and Fat. Journal of American Oil Chemistry Society, 60 (2), 291 – 294.
 39. **MOE**, Owen and **CORNELIUS**. 1988, Enzyme Kinetics. Journal of Chemical Education, 65 (2). 137 – 141.
 40. **MOJOVIC**, L., **SILER-MARINKOVIC**, S., **KUKIC**, G., and **VUNJAK-NOVAKOVIC**, G. 1993, *Rhizopus arrhizus* Lipase-Catalyzed Interesterification of the Midfraction of

Palm Oil to a Cocoa Butter Equivalent Fat. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 438 – 442.

41. **MONTGOMERY**, D. C., Response Surface methods and Designs. In *Design and Analysis of experiments*, 3rd ed.; Wiley: New York, 1991; 521 – 568.
42. **NASSU**, Renato Tiekó, and **GUARALDO**, G. Lireny Aparecida. 1999. Determination of melting Point of Vegetable Oils and Fats by Differential Scanning Calorimetry (DSC) Technique. *Grasas y Aceites*, 50 (1), 16 – 22.
43. **NOOR** L. H. M. and **ALI**, A. R. M. 1998; Physicochemical Characteristics of Palm-Based Oil Blends for the Production of Reduced Fat Spreads. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 75 (11), 1625 - 1631
44. **NORAINI**, I., **EMBO**N, M. S., **ABDOLLAH**, A. y **OH**, Flingoh . 1992, Characteristics and Performance of Some Commercial Shortenings. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **69** (9), 912 - 916
45. **OLIVEIRA**, A. C., **ROSA**, M. F., **AIRES-BARROS**, M. R., **CABRAL**, J. M. S., 2000. Enzymatic Esterification of Ethanol by an Immobilised *Rhizomucor miehei* Lipase in a Perforated Rotating Disc Bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 26. 446 – 450.
46. **PAIVA**, Ana L., **BALCÃO**, Victor M., **MALCATA**, F. Xavier. 2000, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187 – 204.
47. **PETRAUSKAITE**, V., **De GREYT**, W. **KELLENS**, M., y **HUYGHEBAERT**, A. 1998, Physical and Chemical Properties of trans-Free Fats Produced by Chemical Interesterification of Vegetable Oil Blends. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **75** (4), 489 – 493.

48. **POSORSKE**, L. H., **LEFEBVRE**, G., **MILLER**, C. **HANSENT**, T., and **GIENVIG**, B. 1988, Process Considerations of Continuous Fat Modification with an Immobilized Lipase. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 65 (6), 922 - 926

49. **QUAGLIA**, Giovanni. 1991, *Ciencia y Tecnologías de la Panificación*. 2da Edición. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, España. 131 - 151.

50. **RAY**, Sil, and **BHATTACHARYYA**, D. K.. 1993, Comparative Nutritional Study of Enzymatically and Chemically Interesterified Palm Oil Products. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **72 (3)**:327 – 339.

51. **ROSSELL**, J. B. and **DOWNES**, M. J., 1985, Composition of Oil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **62**:221 - 230

52. **SEGEL**, Irwin. *Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry*. Secon Edition. Jhon Wiley & Sons Inc. 1976. Pag 208 a 293

53. **SENANAYAKE**, Namal, and **SHAHIDI**, Fereidoon. 1999, Enzyme-Assisted Acidolysis of (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.) Oils: Incorporation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 47, 3105 – 3112

54. **SERIBURI**, Vimon. y **AKOH**, Casimir., 1998, Enzymatic Interesterification of Triolein and Tristearin: Chemical Structure and Differential Scanning Calorimetric Analysis of the Products. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **75 (6)**, 711 - 716

55. **SPLITTGERBER**, Allan G. 1983. Simplified Treatment of Two-Substrate Enzyme Kinetics. *Journal of Chemical Education*. 60 (8), 651 – 655.

56. **SREENIVASAN**, B. 1978, Interesterification of Fats. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **55 (11)**, 796 - 805

57. **STIER**, R. F. 1997, Alimentos Procesados, **16** (10), 1-20
58. **VALENZUELA**, Alfonso y **NIETO**, Susana. 1994, Biotechnology of Lipids: the Use of Lipases for the Structural Modification of Fat and Oils. *Grasas y Aceites*, **45** (5), 337 - 343
59. **WISDOM**, R. A.; **DUNNHILL**, P., **LILLY**, M. D. 1985. enzymic Interesterification of Fat: The effect of Non-Lipase Material on Immobilized Enzyme Activity. *Enzyme Microb. Technol.* 7: 567 - 572
60. **WOERFEL**, John B. 1995, Formulation of Soy Oil products. *Grasas y Aceites*, **46** (6), 357 – 365
61. **YAMANET**, T. 1987, Journal of American Oil Chemistry Society, **64** (12), 1657 - 1662;
62. **ZEITOUN**, M. A. M., **NEFF**, W. E., **LIST**, G. R., **MOUNTS**, T. L. 1993, Physical Properties of Interesterified Fat Blends. *Ibis*, 70 (5), 467 – 471.

GLOSARIO DE TERMINOS

Ácidos grasos libres, FFA. Son ácidos grasos que tienen un grupo ácido pero que no están unidos a un alcohol. Generalmente los ácidos grasos están unidos al glicerol formando triacilgliceridos y por lo tanto no se encuentran libres.

Análisis de la varianza: técnica estadística que se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación en los resultados experimentales.

Formas cristalinas: Cuando las moléculas de triacilgliceroles de una grasa pasan del estado líquido al sólido como resultado de la disminución de la temperatura, ellas se conglomeran y se acomodan en tres formas diferentes principalmente. Las formas cristalinas existen únicamente cuando las grasas se encuentran en el estado sólido y pueden afectar las propiedades físicas o funcionales del aceite o grasa.

Diacilglicerol: Un compuesto que tiene una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos.

Emulsión: Una dispersión homogénea de dos fases líquidas diferentes. Si el aceite es dispersado en el agua se trata de una emulsión aceite en agua. Si el agua es dispersa en el aceite se trata de una emulsión agua en aceite.

Estearina: Es una sustancia blanca y cristalina que forma la fracción sólida de la mayoría de las grasas animales y vegetales.

Hidrólisis: Reacción química en la cual una sustancia reacciona con el agua de manera que es convertida en una o más sustancias tal como sucede con las grasas naturales que se transforman en glicerol y ácidos grasos . Es un proceso inverso a la esterificación.

Monoacilglicerol: Compuesto que tiene una molécula de glicerol unida a un ácido graso.

Plasticidad: Propiedad física de la grasa que describe cuan suave, plegable y moldeable es a una determinada temperatura.

Poliinsaturado: Acido graso que contiene mas de dos dobles enlaces carbono – carbono, en la cadena carbonada.

Punto de fusión: Temperatura a la cual un sólido se convierte en líquido. Debido a que las grasas son una mezcla de compuestos, ellas tienden a derretirse en un intervalo amplio de temperaturas.

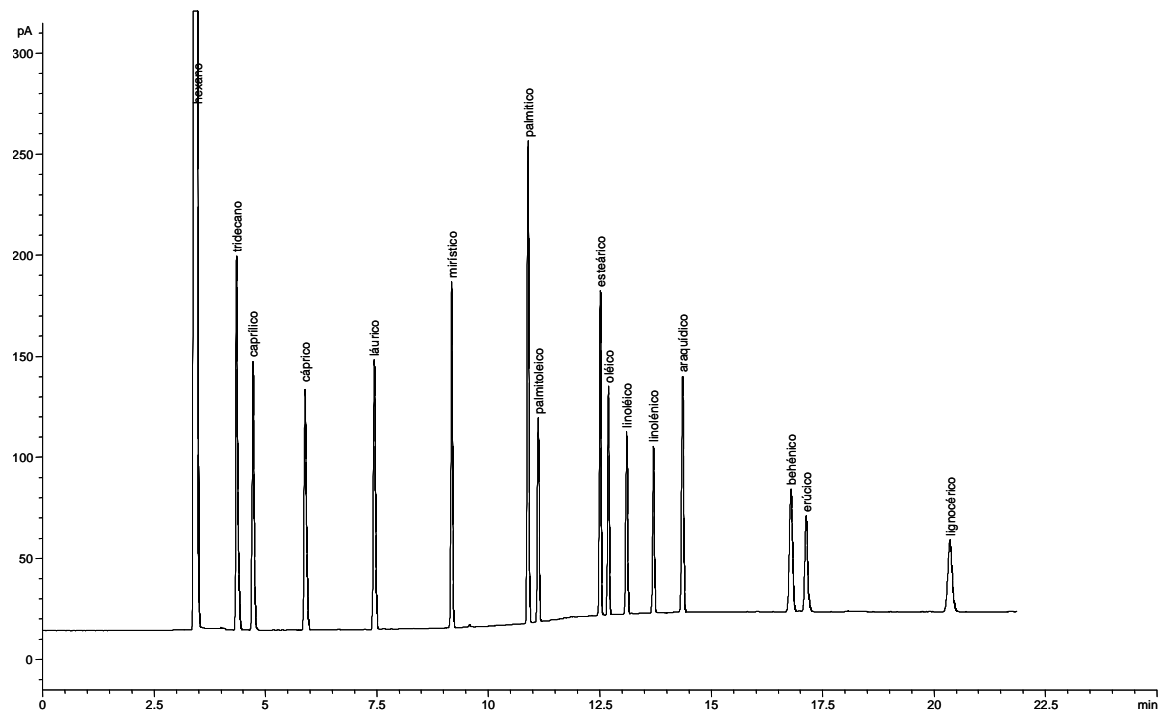
Prueba de significancia F: Prueba estadística ampliamente utilizada en la evaluación de los resultados experimentales. Prueba si las diferencias entre dos resultados son significativas o si se pueden justificar solo por variaciones aleatorias.

Shortening: Es un tipo de grasa utilizada en el horneado o la fritura. El nombre proviene de su habilidad por acortar el tiempo de ingesta de los productos de panadería.

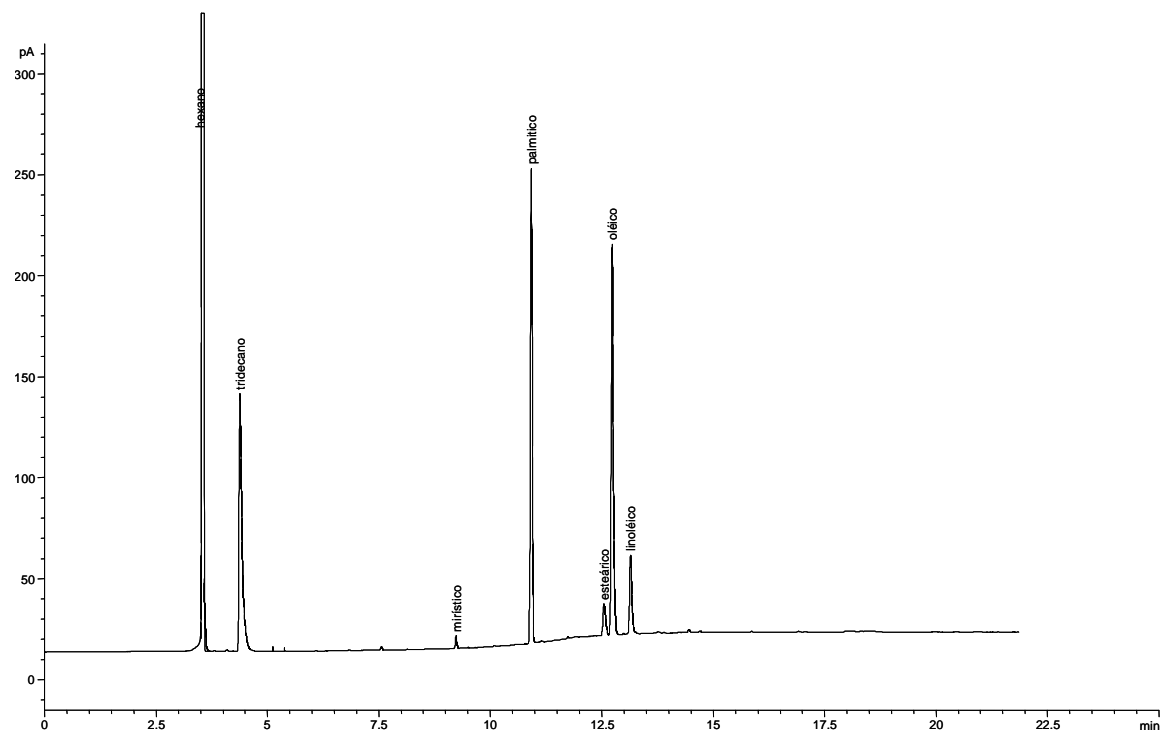
Triacilglicerol: Son tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol. Si los tres ácidos grasos son iguales, se trata de un triacilglicerol simple, si son diferentes entre ellos se trata de un triacilglicerol compuesto. Los triacilgliceroles compuestos son los componentes más comunes de grasas y aceites.

ANEXOS

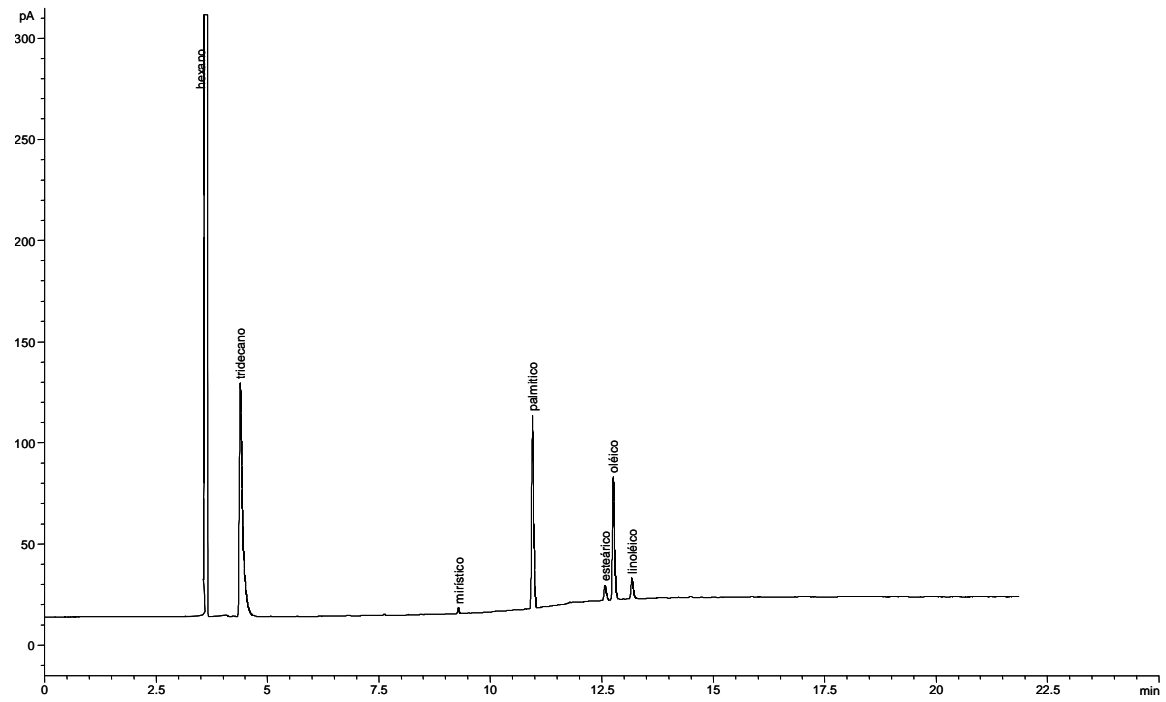
ANEXO 1. Perfil cromatográfico de los metil ésteres patrones de ácidos grasos



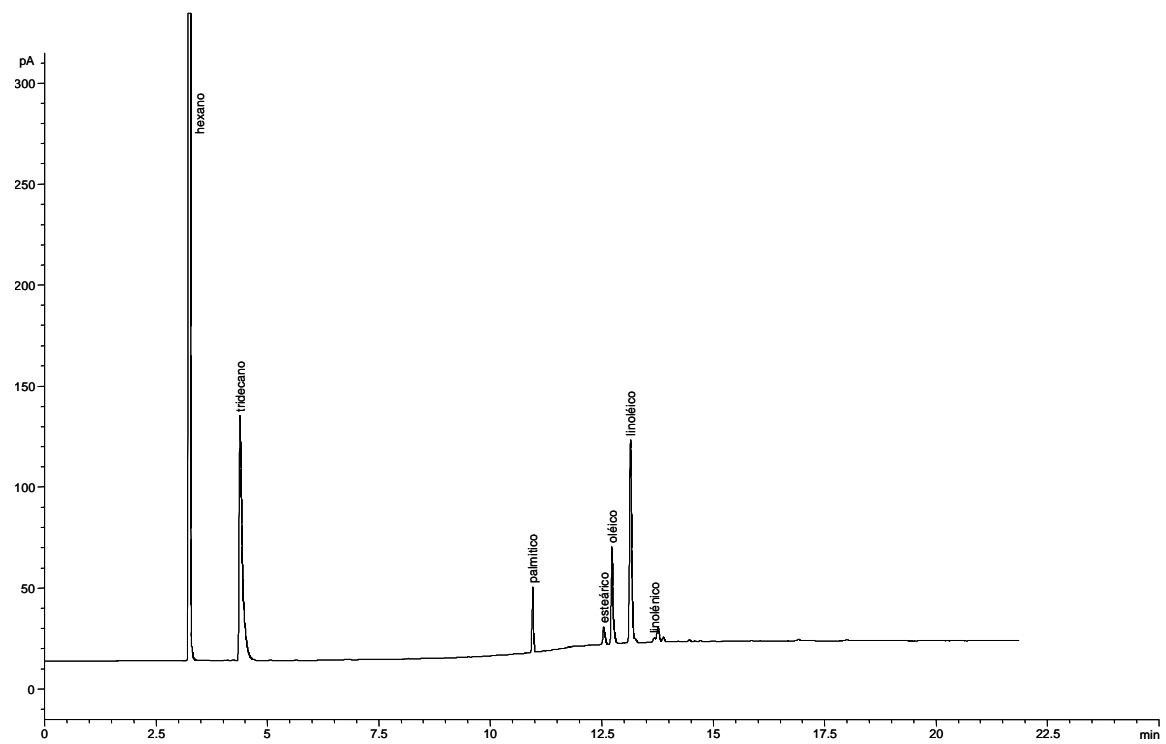
ANEXO 2. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos del Aceite de Palma



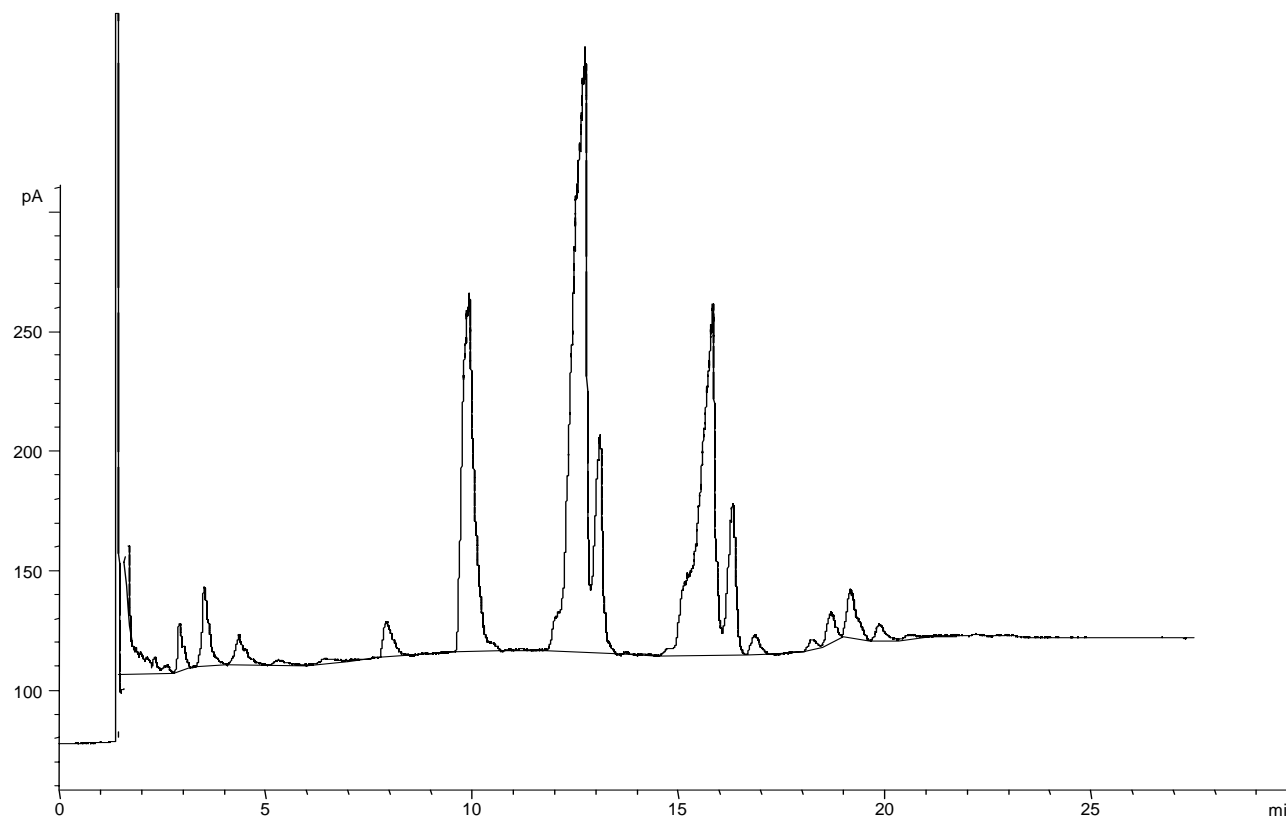
ANEXO 3. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos de la Estearina de Palma



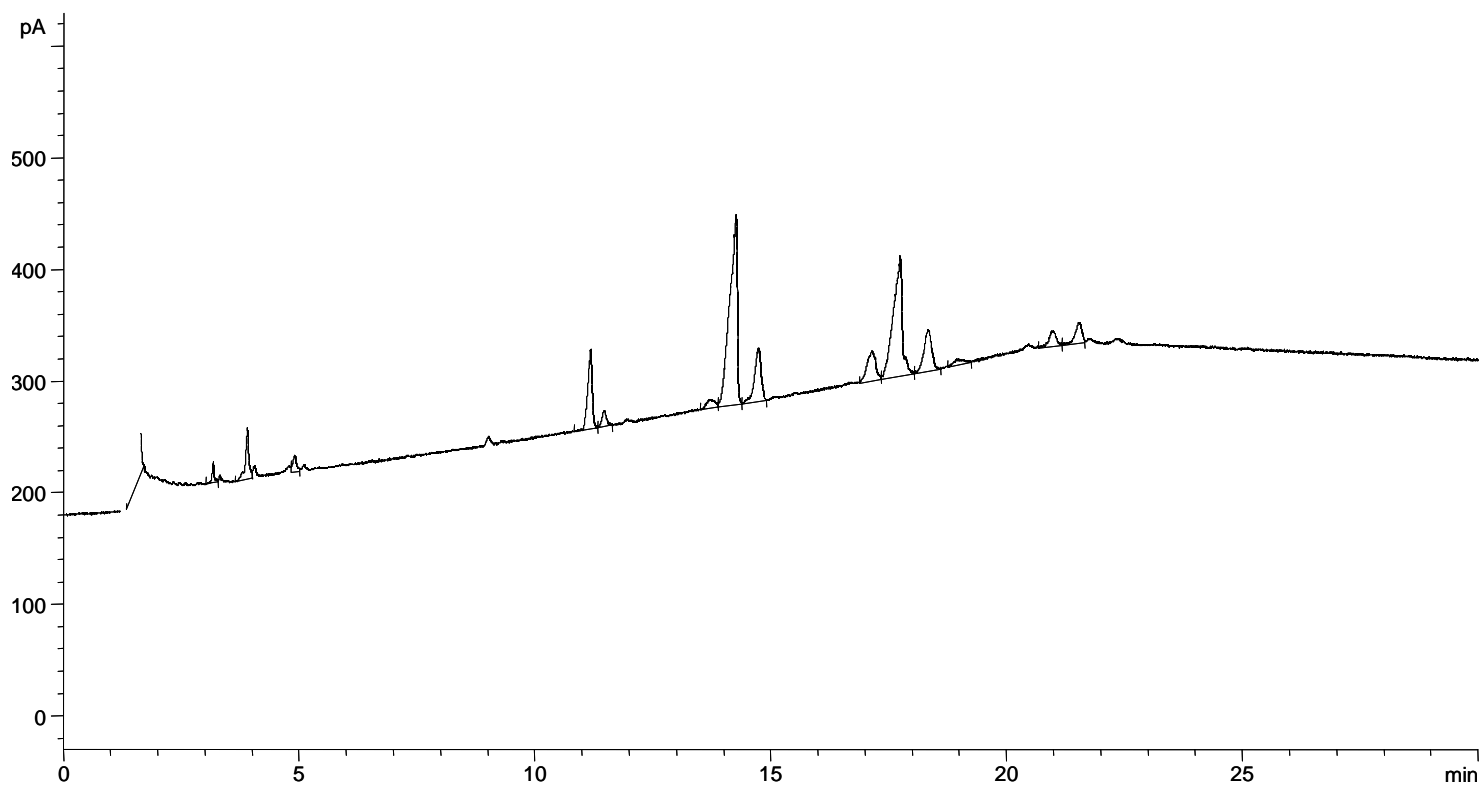
ANEXO 4. Perfil cromatográfico de los metil ésteres de los ácidos grasos del Aceite de Soya



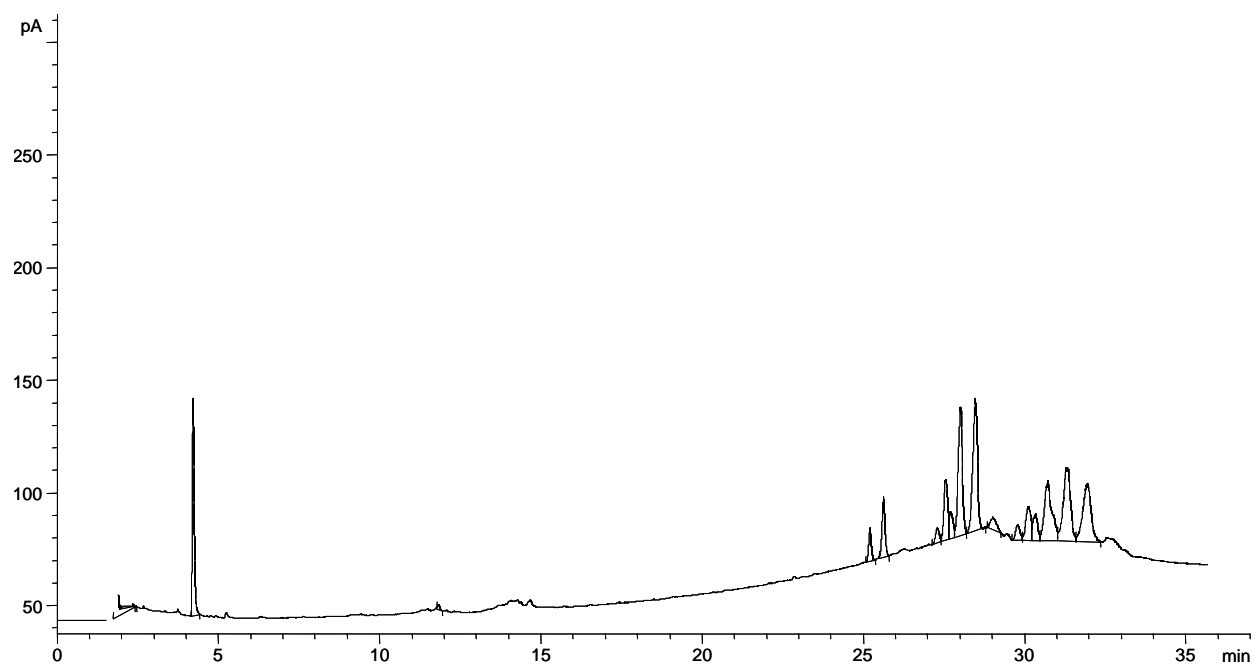
ANEXO 5. Perfil cromatográfico de la Estearina de Palma empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus.



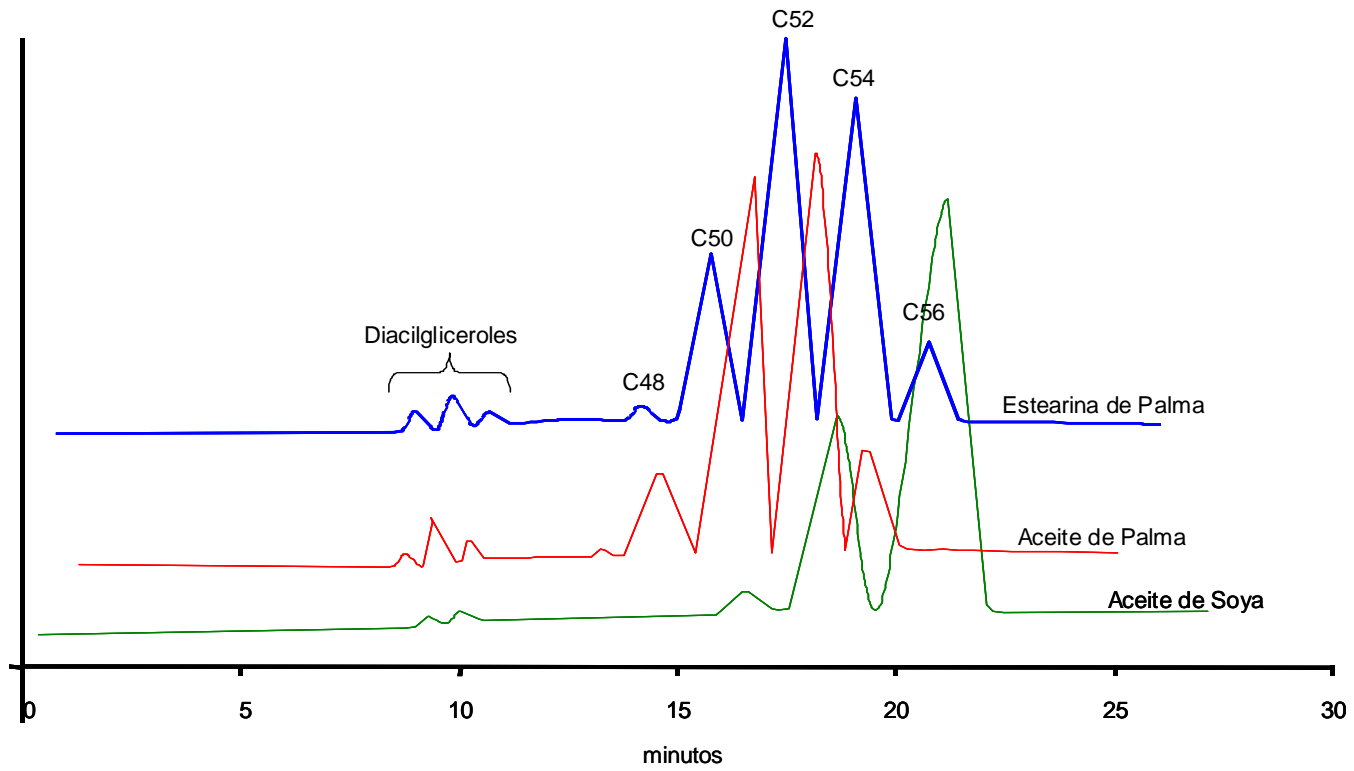
ANEXO 6. Perfil cromatográfico del Aceite de Palma empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus



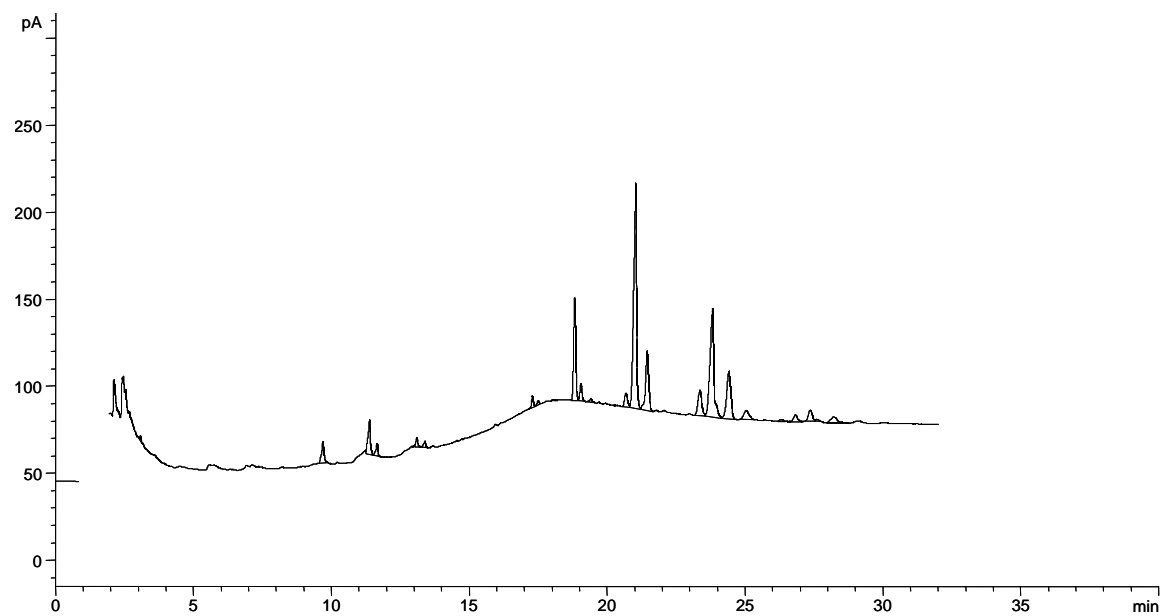
ANEXO 7. Perfil cromatográfico del Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus



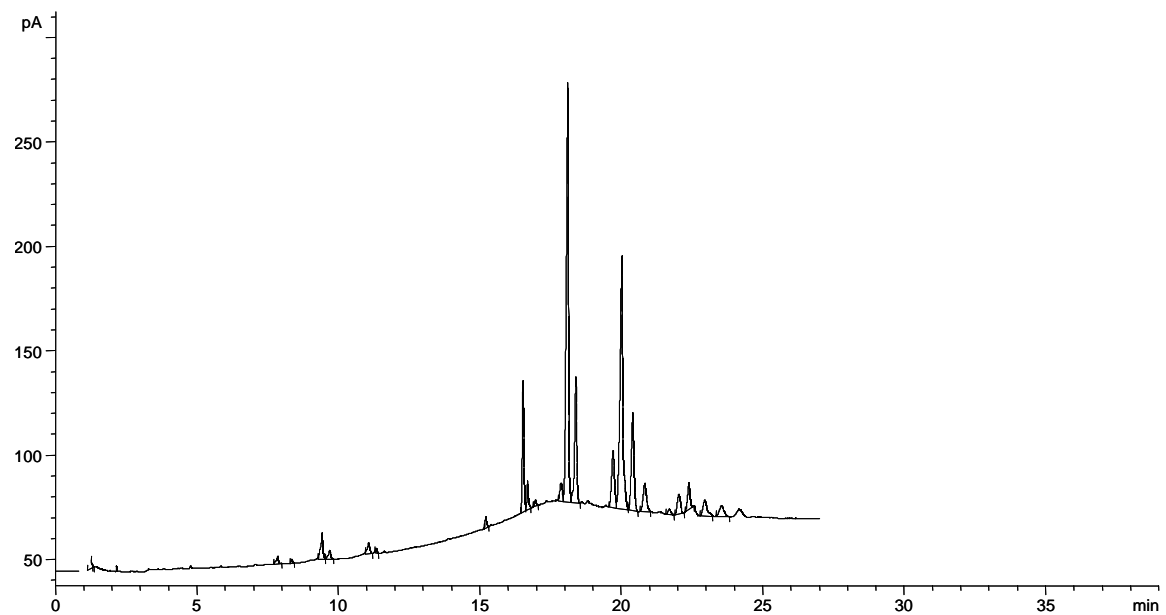
ANEXO 8. Perfil cromatográfico de la estearina de palma, aceite de palma y aceite de soya empleando el cromatógrafo Pelkin Elmer.



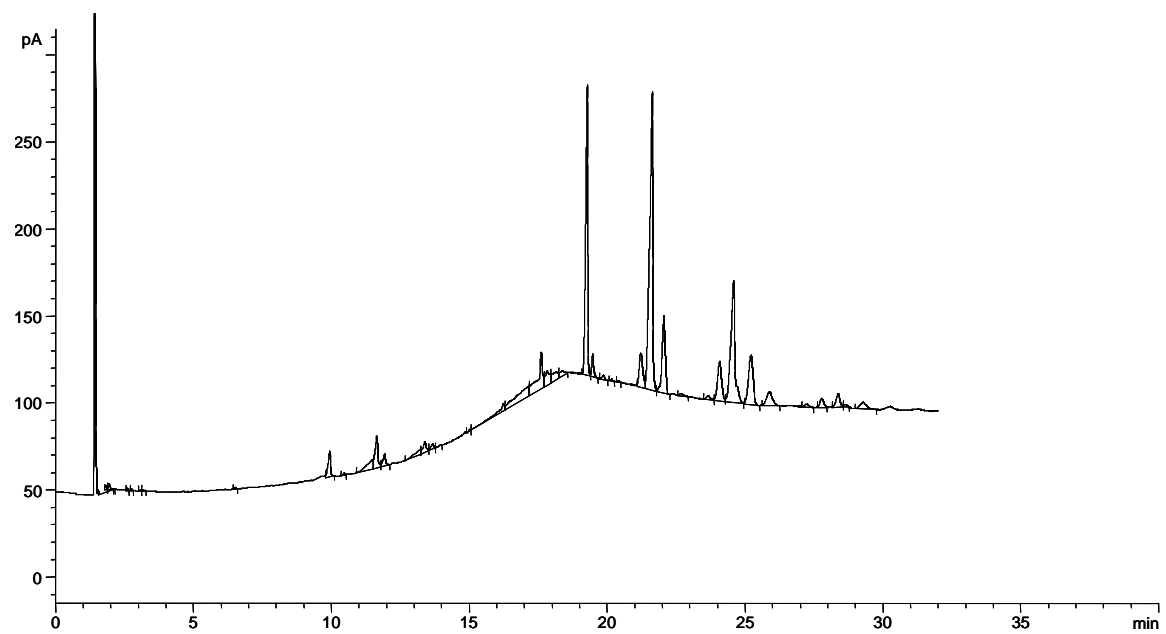
ANEXO 9. Perfil cromatográfico del sistema Aceite de Palma – Aceite de Soya transesterificado empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus



ANEXO 10. Perfil cromatográfico de la mezcla física del sistema Aceite de Palma – Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus



ANEXO 11. Perfil cromatográfico del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya transesterificado empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus



ANEXO 12. Perfil cromatográfico de la mezcla física del sistema Estearina de Palma – Aceite de Soya empleando el cromatógrafo HP 6890 serie Plus

