

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS A ESCALA SEMIINDUSTRIAL
MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASAS ESTEREOESPECÍFICAS
INMOVILIZADAS**

NELSON MORENO SAFRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BUCARAMANGA**

2008

**OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS A ESCALA SEMIINDUSTRIAL
MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASAS ESTEREOESPECÍFICAS
INMOVILIZADAS**

NELSON MORENO SAFRA, Qco. M.Sc.

**Trabajo de grado para optar al título de
Doctor en Química**

Directora:

**JANETH AIDÉ PEREA VILLAMIL
Química, Magíster en Química, Doctora en Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
BUCARAMANGA**

2008

A mi familia por su apoyo incondicional

*Saber no es suficiente; tenemos que aplicarlo. Tener voluntad no es suficiente:
tenemos que implementarla. (Goethe)*

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos – CICTA – por el apoyo brindado para la ejecución de esta investigación.

A la doctora Janeth Aidé Perea, por la dirección de este proyecto, constante apoyo y orientación.

A los calificadores, por aceptar evaluar este trabajo y dedicar parte de su tiempo a la revisión.

Al Centro de Investigación en Catálisis y al Laboratorio de Geología, por el préstamo de los cromatógrafos de gases utilizados en los análisis.

Al Laboratorio de Cromatografía, por la realización de algunos análisis por cromatografía de gases.

A la empresa Comercializadora Internacional Santandereana de Aceites – C.I. Saceites S.A.- por el aporte de la materia prima, el préstamo de las instalaciones y equipos requeridos para los ensayos a escala piloto.

A mi querida Universidad Industrial de Santander.

TABLA DE CONTENIDO

		pág.
1	INTRODUCCIÓN	32
1.1	ALCANCE DE LA PRESENTE TESIS	44
1.2	OBJETIVOS	46
1.2.1	OBJETIVO GENERAL	46
1.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
1.2.3	CONTENIDO DE ESTA TESIS	47
2.	CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS USADAS EN LAS REACCIONES DE INTERESTERIFICACIÓN	50
2.1	INTRODUCCIÓN	50
2.1.1	Ácidos grasos	51
2.1.2	Triacilgliceroles	55
2.1.3	Grasas y aceites vegetales	56
2.2	METODOLOGÍA	60
2.2.1	Materias primas, solventes y equipos	60
2.2.2	Métodos de análisis	61

2.2.2.1	Análisis de ácidos grasos	61
2.2.2.2	Análisis de acilgliceroles	62
2.2.2.3	%Hidrólisis - Índice de acidez	68
2.2.2.4	Perfiles de fusión	68
2.2.2.5	Puntos de fusión	68
2.2.2.6	Consistencia	68
2.2.2.7	Viscosidad	69
2.3	RESULTADOS	69
2.3.1	Composición en ácidos grasos de materia primas y mezclas binarias	70
2.3.2	Composición en acilgliceroles de la superestearina de palma, el aceite de palmiste y el aceite de soya y sus mezclas	71
2.3.2.1	Puntos de fusión, consistencia y viscosidad de las mezclas binarias del aceite de palmiste, superestearina de palma y aceite de soya	73
2.3.3	Contenido de grasa sólida (SFC)	76
3.	OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS POR INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE DE SOYA Y ACEITE DE PALMISTE EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO-TANQUE AGITADO	80
3.1	INTRODUCCIÓN	80
3.1.1	Obtención de lípidos estructurados	83
3.1.1.1	Esterificación directa	83
3.1.1.2	Interesterificación	83
3.2	LAS LIPASAS COMO CATALIZADORES	88
3.3	METODOLOGÍA	93
3.3.1	Materia prima, solventes y equipos	93
3.3.2	Desarrollo experimental	94

3.3.2.1	Procedimiento general de la reacción	94
3.3.2.2	Selección de las condiciones de reacción	94
3.3.2.3	Escalado a 1 kilogramo	96
3.3.2.4	Escalado a planta piloto	96
3.3.2.5	Cinética de la reacción	97
3.3.2.6	Evaluación de la actividad de la enzima	98
3.3.3	Métodos de análisis	98
3.3.3.1	Propiedades fisicoquímicas de los sustratos y productos	98
3.3.3.2	Análisis estructural de los triacilgliceroles	98
3.3.3.3	Determinación de la actividad de interesterificación de la enzima	99
3.4	RESULTADOS	101
3.4.1	SISTEMA 1. Aceite de soya-aceite de palmiste (SBO:PKO)- Lipozyme RM-IM	101
3.4.1.1	Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación	104
3.4.1.2	Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis	110
3.4.1.3	Optimización de la reacción	115
3.4.1.4	Escalado a 1 kilogramo	118
3.4.1.5	Escalado a planta piloto (35 kg)	121
3.4.1.6	Estudio cinético de la reacción de transesterificación. Cambios en los triacilgliceroles con el transcurso de la reacción	125
3.4.2	SISTEMA 2. Aceite soya-aceite de palmiste (SBO:PKO)- Lipozyme® TL-IM	134
3.4.2.1	Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación	136
3.4.2.2	Efecto de las variables del proceso sobre la reacción de hidrólisis	140
3.4.2.3	Optimización de la reacción	144
3.4.2.4	Escalado a 1 kilogramo	145
3.4.2.5	Escalado a planta piloto (35 kg)	147

3.4.2.6	Estudio cinético de la reacción de transesterificación. Cambios en los triacilgliceroles con el transcurso de la reacción	149
3.4.3	Evaluación de la estabilidad operacional de las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM	156
3.4.4	Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:PKO 60:40 p/p	158
4.	OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS POR INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE DE SOYA Y SUPERESTEARINA DE PALMA EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO - REACTOR DE TANQUE-AGITADO	165
4.1	INTRODUCCIÓN	165
4.2	METODOLOGÍA	169
4.2.1	Materia prima, solvente y equipos	169
4.2.2	Desarrollo experimental	170
4.2.3	Métodos de análisis	171
4.3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	171
4.3.1	SISTEMA 3. Aceite soya – Superestearina de palma (SBO:SEP)- Lipozyme® RM-IM	171
4.3.1.1	Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación	173
4.3.1.2	Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis	176
4.3.1.3	Optimización de la reacción	180
4.3.1.4	Escalado a 1 kilogramo	181

4.3.1.5	Escalado a planta piloto	182
4.3.1.6	Estudio cinético de la reacción. Cambios en la composición de TAG con el avance de la reacción	187
4.3.2	SISTEMA 4. Aceite soya – Superestearina de palma (SBO:SEP)- Lipozyme® TL-IM	189
4.3.2.1	Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación	191
4.3.2.2	Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis	194
4.3.2.3	Optimización de la reacción	198
4.3.2.4	Escalado de la reacción a 1 kg	199
4.3.2.5	Escalado a planta piloto (35 kg)	200
4.3.3	Análisis estereo-específico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:SEP 60:40 p/p	205
5.	REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN UN SISTEMA EN CONTINUO - REACTOR DE LECHO EMPACADO	211
5.1	INTRODUCCIÓN	211
5.2	METODOLOGÍA	213
5.2.1	Materia prima, solventes y equipos.	213
5.2.2	Desarrollo experimental	214
5.2.3	Evaluación de la estabilidad de la enzima – Cálculo de la actividad residual	215

5.2.4	Métodos de análisis	216
5.3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	216
5.3.1	Reactor de lecho empacado con Lipozyme® RM-IM	216
5.3.1.1	Cálculo de la actividad residual de la enzima inmovilizada	222
5.3.1.2	Cálculo de la productividad de la enzima Lipozyme® RM-IM	225
5.3.2	Reactor de lecho empacado con Lipozyme® TL-IM	226
5.3.2.1	Evaluación de la estabilidad de la enzima Lipozyme® TL-IM	228
5.3.2.2	Cálculo de la productividad de la enzima Lipozyme® TL-IM	231
5.3.2.3	Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:PKO 60:40 p/p, en reactor de lecho empacado	232
5.3.2.4	Caracterización de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla aceite de soya – aceite de palmiste (60:40 p/p) y aceite de soya – superestearina de palma 60:40 p/p.	234
5.3.3	Aplicaciones potenciales de las grasas especiales obtenidas	234
5.3.3.1	Producción de emulsiones lipídicas para uso en nutrición parenteral.	237
5.3.3.2	Producción de margarinas funcionales y formulaciones infantiles	238
6.	CONCLUSIONES GENERALES	241

BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 2.1 Ácidos grasos frecuentes en alimentos de consumo habitual	53
Tabla 2.2 Triacilgliceroles (mol%) del aceite de palma y sus fracciones	57
Tabla 2.3 Propiedades del aceite de palmiste	58
Tabla 2.4 Composición (%) en ácidos grasos del aceite de soya	59
Tabla 2.5 Tiempos de retención de los FA patrón y curvas de calibración	63
Tabla 2.6 Curvas de calibración para la serie de triacilgliceroles saturados	66
Tabla 2.7 Factores de respuesta relativos (RR_f) para los TAG con ACN:DB de C24:0 a C54:7 , calculados usando la ecuación descrita en la Figura 2.4	67
Tabla 2.8 Composición de las mezclas binarias evaluadas	70
Tabla 2.9 Composición en ácidos grasos de las grasas individuales y sus mezclas binarias (%p/p)	71
Tabla 2.10 Composición en TAG del aceite de palmiste (PKO), el aceite de soya (SBO) y la superestearina de palma (SEP)	72
Tabla 2.11 Puntos de fusión, viscosidad, consistencia, índice de saponificación e índice de acidez de las grasas individuales y sus mezclas binarias	74
Tabla 2.12 Valores de SFC de las grasas individuales y sus mezclas binarias	76
Tabla 3.1 Catalizadores de interesterificación usados en catálisis homogénea	85

Tabla 3.2	Variables independientes y niveles del diseño experimental	101
Tabla 3.3	Posibles TAG generados por transesterificación del aceite de soya con el aceite de palmiste, utilizando una lipasa <i>sn</i> -1,3-específica	102
Tabla 3.4	Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:PKO, utilizando Lipozyme ® RM-IM como catalizador	103
Tabla 3.5	Análisis de la varianza (ANOVA) para la RTA-2	106
Tabla 3.6	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho	107
Tabla 3.7	Niveles de las variables independientes que conducirían a una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2)	110
Tabla 3.8	Análisis de la varianza (ANOVA) para el grado de hidrólisis	112
Tabla 3.9	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho para la variable respuesta grado de hidrólisis	111353
Tabla 3.10	Niveles de las variables independientes que conducen a un menor grado de hidrólisis	115
Tabla 3.11	Combinación de factores y niveles que maximizan la función “Deseabilidad”	116
Tabla 3.12	Resultados seguimiento de la reacción a escala piloto: 35 kg aceite (SBO:PKO 60:40 p/p), 0.875 kg eEnzima, 0.044 kg agua 70°C	123
Tabla 3.13	Variables independientes y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:PKO utilizando Lipozyme ® TL-IM como catalizador	135
Tabla 3.14	Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:PKO utilizando Lipozyme ® TL-IM como catalizador	135
Tabla 3.15	Análisis de la varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2	137
Tabla 3.16	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho	138
Tabla 3.17	Niveles de las variables que conducen a una mayor producción de lípidos estructurados	140
Tabla 3.18	Análisis de la varianza para la respuesta grado de hidrólisis	142

Tabla 3.19	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho	142
Tabla 3.20	Valores que conducen a un menor grado de hidrólisis	144
Tabla 3.21	Combinación de factores y niveles que maximizan la "Deseabilidad"	145
Tabla 3.22	Resultados del seguimiento de la reacción a escala de 1 kg de aceite, con Lipozyme® TL-IM (2.5%), 70°C y 300 rpm	146
Tabla 3.23	Distribución de los FA (%mol) en las posiciones <i>sn</i> -1,3 y <i>sn</i> -2, de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación con Lipozyme® TL-IM y Lipozyme® RM-IM	159
Tabla 4.1	Distribución espacial de los ácidos grasos (mol%) esterificados en los triacilglicerolos de las grasas de la leche de varias especies	166
Tabla 4.2	Posibles TAG generados por interesterificación del aceite de soya y la superestearina de palma, utilizando una lipasa <i>sn</i> -1,3-específica	168
Tabla 4.3	Variables y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:SEP	172
Tabla 4.4	Arreglos y respuestas del diseño experimental	172
Tabla 4.5	Análisis de la varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2	174
Tabla 4.6	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho	175
Tabla 4.7	Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho	178
Tabla 4.8	Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad	180
Tabla 4.9	Resultados de seguimiento de la reacción a escala de 1 kg	182
Tabla 4.10	Variables independientes y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:SEP 60:40 p/p, utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador	190
Tabla 4.11	Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:SEP 60:40 p/p utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador	190

Tabla 4.12	Análisis de la varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2	192
Tabla 4.13	Coefficientes de regresión del modelo matemático predicho	193
Tabla 4.14	Análisis de la varianza (ANOVA) para la respuesta grado de hidrólisis	196
Tabla 4.15	Coefficientes de regresión del modelo matemático predicho	196
Tabla 4.16	Combinación de factores que minimizan la reacción de hidrólisis	198
Tabla 4.17	Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad	198
Tabla 4.18	Resultados del seguimiento de la reacción a escala de 1 kg	200
Tabla 4.19	Distribución de los FA (%mol) en las posiciones <i>sn</i> -1,3 y <i>sn</i> -2, de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación con Lipozyme® TL-IM y Lipozyme® RM-IM	206
Tabla 4.20	Composición en ácidos grasos (%mol) de la grasa láctea humana y Betapol 45, ubicados en las posiciones <i>sn</i> -2 y <i>sn</i> -1,3 de los TAG	208
Tabla 5.1	Efecto del flujo de aceite sobre el grado de hidrólisis y la RTA-2	218
Tabla 5.2	Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO (60:40) a 70 °C con Lipozyme® RM-IM en reactor PBR, operado a un flujo de 9.3 kg aceite/kg Enzima*hora).	224
Tabla 5.3	Efecto del flujo de aceite sobre el grado de transesterificación alcanzado (medido como disminución en el valor SFC a 15 °C)	228
Tabla 5.4	Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO (60:40) a 70 °C con Lipozyme® TL-IM en reactor PBR, operado a un flujo de 12 kg aceite/kg enzima*hora.	230
Tabla 5.5	Distribución de los FA (%mol) en las posiciones <i>sn</i> -1,3 y <i>sn</i> -2, de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación en reactor de lecho empacado.	233

Tabla 5.6	Características fisicoquímicas de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p	235
Tabla 5.7	Características fisicoquímicas de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p	236
Tabla 5.8	Emulsiones lipídicas comerciales para uso endovenoso	239

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 2.1	Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de FAME	64
Figura 2.2	Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de TAG	65
Figura 2.3	Factores de respuesta relativos (RR_f) para la serie de TAG saturados en función del tiempo de retención	67
Figura 2.4	Variación en los puntos de fusión de las mezclas SEP:SBO y PKO:SBO en función de la participación del SBO	75
Figura 2.5	Variación de la consistencia a 7°C de las mezclas binarias SEP:SBO y PKO:SBO en función de la participación del SBO	75
Figura 2.6	Curvas SFC para las mezclas binarias de aceite de soya y superestearina de palma (SBO:SEP)	77
Figura 2.7	Curvas SFC para las mezclas binarias de aceite de soya y el aceite de palmiste (SBO:PKO)	85
Figura 3.1	Hidrólisis de un éster catalizado por lipasas	90
Figura 3.2	Efectos del tipo de solvente sobre la síntesis de miristil miristato	91
Figura 3.3	Mecanismo de transesterificación (R_2 = alquilo) o hidrólisis (R_2 = hidrógeno) catalizado por la lipasa B de <i>Cándida antarctica</i>	92
Figura 3.4a	Reactor utilizado para la reacción de transesterificación a escala de 1000 g de sustrato	97
Figura 3.4b	Reactor utilizado para la reacción de transesterificación a escala piloto 35 kg de sustrato	97
Figura 3.5	Diagrama de Pareto para la variable RTA- 2. Las barras que se extienden más allá de la línea azul corresponden a efectos	104

	significados en un nivel de confianza del 95%	
Figura 3.6	Diagrama de Efectos Principales para la variable respuesta RTA-2	105
Figura 3.7	Efecto de variar la relación de sustratos y la carga de enzima sobre la variable de Respuesta RTA-2. A. Superficie de respuesta. B. mapa de contorno	108
Figura 3.8	Efecto de variar la carga de enzima y el tiempo de reacción sobre la respuesta RTA-2. A. Superficie de respuesta. B. mapa de contorno	109
Figura 3.9	Mapas de contorno mostrando A) El efecto de variar la relación de sustratos y el tiempo de reacción sobre la variable de Respuesta RTA-2. B) Efecto de variar la carga de enzima y el tiempo de reacción sobre la respuesta RTA-2	109
Figura 3.10	Diagrama de Pareto estandarizado para la variable respuesta grado de hidrólisis. Las barras que se extienden más allá de la línea azul corresponden a efectos significados en un nivel de confianza del 95%.	111
Figura 3.11	Diagrama de efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis	111
Figura 3.12	Superficie de respuesta que muestra el efecto de la cantidad de enzima y el tiempo de reacción sobre el grado de hidrólisis alcanzado	114
Figura 3.13	Superficie de respuesta que muestra: A. el efecto combinado de la cantidad de enzima y la relación de sustratos sobre el grado de hidrólisis alcanzado. B. Efecto de la cantidad de enzima y la temperatura de reacción	114
Figura 3.14	Efecto de las variables de proceso sobre la “deseabilidad” de la reacción: A. Efecto de cantidad de enzima y el tiempo de reacción, B. Efecto de la cantidad de enzima y la relación de sustratos	117

Figura 3.15	Efecto de las variables de proceso sobre la deseabilidad de la reacción: A. Efecto de cantidad de enzima y la temperatura de reacción, B. Efecto del tiempo y la relación de sustratos	117
Figura 3.16	Evolución del grado de hidrólisis con el tiempo de reacción, en el proceso de transesterificación del sistema SBO:PKO a 1 kg	119
Figura 3.17	Variación en la composición en ácidos grasos del producto transesterificado (libre de acidez) con el tiempo de reacción	120
Figura 3.18	Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala de 1 kg, medido por el incremento en la RTA-2	121
Figura 3.19	Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg), medido por el incremento en la RTA-2	122
Figura 3.20	Valores de SFC medidos experimentalmente a 15 °C y valores SFC de predichos del modelo matemático desarrollado (Ec. 3.2) para reacción por lotes	125
Figura 3.21	Perfil cromatográfico de la mezcla inicial SBO:PKO 60:40 (0 horas). La línea roja agrupa los TAG que disminuyen y la azul los que se generan	126
Figura 3.22	Cromatograma HTGC de la mezcla SBO:PKO (60:40) después de 6 horas de reacción. La línea roja agrupa los TAG que disminuyeron, en tanto que la línea azul los que se generaron	127
Figura 3.23	Cambio en la concentración de los TAG saturados con ACN 30 a 38, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	128
Figura 3.24	Cambio en la concentración de los TAG insaturados con ACN 52 y 54, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.	129
Figura 3.25	Cambio en la concentración de los TAG C38:0, C38:1 y C38:2, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el	129

área relativa de los picos cromatográficos.

Figura 3.26	Cambio en la concentración de los TAG C40:0, C40:1, C40:2 y C40:3 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	130
Figura 3.27	Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1, C42:2 y C42:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	131
Figura 3.28	Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y C44:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	132
Figura 3.29	Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1, C46:2 y C46:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	132
Figura 3.30	Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	133
Figura 3.31	Cambio en la concentración de los TAG C50:1, C50:2, C50:3 y C50:4, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.	134
Figura 3.32	Diagrama de Pareto para la variable RTA- 2.	136
Figura 3.33	Diagrama de efectos principales para la variable respuesta RTA-2	137
Figura 3.34	Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar simultáneamente la carga de enzima y la temperatura de reacción sobre la respuesta RTA-2	139
Figura 3.35	Efecto sobre la respuesta RTA-2, al variar simultáneamente la carga de enzima y el tiempo e reacción	139
Figura 3.36	Efecto sobre la respuesta RTA-2, al variar simultáneamente el tiempo de reacción y la temperatura de reacción	139
Figura 3.37	Pareto estandarizado para la variable respuesta grado de	141

	hidrólisis	
Figura 3.38	Diagrama de Efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis	141
Figura 3.39	Efecto de la razón enzima/sustrato y el tiempo sobre el grado de hidrólisis.	143
Figura 3.40	Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura sobre el grado de hidrólisis.	143
Figura 3.41	Valores de SFC medidos experimentalmente a 15°C y valores SFC de acuerdo al modelo matemático desarrollado (Ec.3.2) para la reacción por lotes.	147
Figura 3.42	Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción, en el proceso de transesterificación del sistema SBO:PKO a escala piloto (35 kg)	148
Figura 3.43	Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg), medido por el incremento en la RTA-2	149
Figura 3.44	Cambio en la concentración de los TAG saturados con ACN 30 a 38, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes	150
Figura 3.45	Cambio en la concentración de los TAG C38:0 y C38:1, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG.	151
Figura 3.46	Cambio en la concentración de los TAG C40:0, C40:1 y C40:2 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los TAG.	151
Figura 3.47	Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1 y C42:2 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes.	152
Figura 3.48	Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y	153

C44:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes.

- Figura 3.49** Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1 y C46:2, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes. 154
- Figura 3.50** Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa 155
- Figura 3.51** Cambio en la concentración de los TAG C50:2, C50:3 y C50:4, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa. 155
- Figura 3.52** Actividad relativa de la enzima respecto al número de usos (de 6 h/lote para lipozyme RM-IM y 4 horas/lote para Lipozyme TL-IM). 157
- Figura 3.53** Actividad hidrolítica de la enzima respecto al número de usos 158
- Figura 4.1** A. Diagrama de Pareto para la variable RTA-2; B. Efectos principales. 173
- Figura 4.2** Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la carga de enzima y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta RTA-2 175
- Figura 4.3** Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la carga de enzima y la relación de sustratos sobre la variable de respuesta RTA-2 176
- Figura 4.4** A) Análisis de Pareto para la variable de respuesta Grado de hidrólisis, del sistema SBO:SEP. La línea azul indica un nivel de confiabilidad del 95%. B) Diagrama de efectos principales para la variable respuesta %Hidrólisis 177

Figura 4.5	Efecto del tiempo y la razón enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis alcanzado al final del proceso de transesterificación.	179
Figura 4.6	Efecto de la razón enzima/sustrato y la relación de sustratos sobre el grado de hidrólisis alcanzado al final del proceso de transesterificación.	179
Figura 4.7	Efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la función deseabilidad de la reacción.	181
Figura 4.8	Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción para el sistema SBO:SEP (60:40 p/p) a escala piloto (35 kg)	184
Figura 4.9	Producción de lípidos estructurados durante la reacción a escala piloto (35 kg) del sistema SBO:SEP, medido por el incremento en la RTA-2	184
Figura 4.10	Cromatograma HTGC de la mezcla inicial SBO:SEP 60:40 (0 horas de reacción)	185
Figura 4.11	Cromatograma HTGC de la mezcla SBO:SEP (60:40) después de 6 horas de reacción.	186
Figura 4.12	Cambio en la concentración de los TAG C46:0 a C50:0, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes	187
Figura 4.13	Cambios en la concentración de los TAG C50:1, C50:2, C50:3 y C50:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.	188
Figura 4.14	Cambios en la concentración de los TAG C52:1, C52:2, C52:3 y C52:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.	188
Figura 4.15	A. Diagrama de Pareto y B: efectos principales para la variable RTA- 2	191
Figura 4.16	Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la carga de enzima y la temperatura de reacción sobre la variable de respuesta RTA-2	193

Figura 4.17	Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la carga de enzima y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta RTA-2	194
Figura 4.18	A. Diagrama de Pareto estandarizado y B. Diagrama de efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis.	195
Figura 4.19	Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis.	197
Figura 4.20	Efecto de la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre el grado de hidrólisis	197
Figura 4.21	Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción que conducen a la menor hidrólisis y mayor valor de RTA-2 (Deseabilidad)	199
Figura 4.22	Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción, en el proceso de transesterificación del sistema SBO:SEP a escala piloto (35 kg)	201
Figura 4.23	Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg), medido por el incremento en la RTA-2	202
Figura 4.24	Cambio en el punto de fusión de la mezcla transesterificada con el avance de la reacción	203
Figura 4.25	Cambio en la concentración de los TAG C46:0 a C50:0, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondiente.	205
Figura 4.26	Cambios en la concentración de los TAG C50:1, C50:1, C50:2, C50:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.	205
Figura 4.27	Cambios en la concentración de los TAG C52:1, C52:2, C52:3 y C52:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	206
Figura 5.1	Reactor de lecho empacado para 500 g de enzima	217

Figura 5.2	Efecto del flujo de aceite sobre la RTA-2.	218
Figura 5.3	Cambio en la concentración (área relativa) de los TAG C30 a C40 en función del flujo de aceite a través de la columna de enzima	219
Figura 5.4	Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1, C42:2 y C42:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	220
Figura 5.5	Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y C44:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	220
Figura 5.6	Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1 y C46:2, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	221
Figura 5.7	Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.	221
Figura 5.8	Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial	225
Figura 5.9	Reactor de lecho empacado piloto para 10 kg de enzima.	227
Figura 5.10	Modelo exponencial para la actividad residual la enzima Lipozyme® TL-IM en el reactor de lecho fijo, en función del tiempo.	231

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Número de acil carbono: número de átomos de carbono de los grupos acilo
DB	Número de dobles enlaces
ACN:DB	Número de átomos de carbono de los grupos acilo : dobles enlaces
C8:0	Ácido caprílico
C10:0	Ácido cáprico
C12:0	Ácido láurico
C14:0	Ácido mirístico
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
ICTA	Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos
CNO	Coconut Oil (Aceite de coco)
DAG	Diacilglicerol
EFA	Essential Fatty Acid (ácido graso esencial)
FA	Fatty acid (Ácido graso)
FFA	Free Fatty Acid (Ácido graso libre)
FID	Flame Ionization Detector (Detector de ionización en llama)
GC	Gas Chromatography (Cromatografía de gases; cromatógrafo de gases)
LCFA	Long Chain Fatty Acid (Ácido graso de cadena larga)
LCT	Long Chain Triacylglycerol (Triacilglicerol de cadena larga)
LPL	Lipoprotein Lipase (Lipasa lipoproteica)

MAG	Monoacilglicerol
MCFA	Medium Chain Fatty Acid (Ácido graso de cadena media)
MCT	Medium Chain Triacylglycerol (Triacilglicerol de cadena media)
OP	Oleína de palma
PKO	Palm Kernel Oil (Aceite de palmiste)
PN	Parenteral Nutrition (Nutrición Parenteral)
PUFA	Poliunsaturated Fatty Acid (Ácido graso poliinsaturado)
RDA	Recommended Daily Allowance
RMN	Resonancia magnética nuclear
SCFA	Short Chain Fatty Acid (Ácido graso de cadena corta)
SCT	Short Chain Triacylglycerols (Triacilgliceroles de cadena corta)
SEP	Superestearina de palma
SFC	Solid Fatty Content (Contenido de grasa sólida)
SL	Structured Lipid (Lípido estructurado)
SBO	Soybean Oil (Aceite de soya)
TAG	Triacilglicerol
TPN	Total parenteral nutrition (Nutrición Parenteral Total)
TPN	Total Parenteral Nutrition (Nutrición Parenteral Total)
T_R	Tiempo de retención
U	Unsaturated (Insaturado)

RESUMEN

TÍTULO

OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL MEDIANTE TRANSESTERIFICACIÓN CON LIPASAS ESTEREOESPECÍFICAS INMOVILIZADAS¹.

AUTOR:

*Nelson Moreno Safra*²

PALABRAS CLAVE

Lípidos estructurados, lipasas, transesterificación, reactor, lecho empacado

DESCRIPCIÓN

Los lípidos estructurados (SL) son triacilgliceroles (TAG) modificados por la alteración de su composición en ácidos grasos (FA) y su distribución en las moléculas de glicerol. La mayoría de ellos combinan FA de cadena media con FA de cadena larga en una misma molécula de glicerol y se pueden obtener por reacciones de interesterificación químicas o enzimáticas empleando lipasas *sn*-1,3- o *sn*-2-específicas como catalizadores. Algunos de estos lípidos se pueden clasificar como alimentos funcionales o nutracéuticos, por estar directamente asociados a la prevención o tratamiento de diversas enfermedades.

En este trabajo se sintetizaron SL por medio de transesterificación enzimática de mezclas binarias de aceite de palmiste y aceite soya, en un caso, y superestearina de palma (rica en tripalmitina) y aceite de soya en otro, utilizando como catalizadores lipasas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM. En el primer caso, se produjo una mezcla de TAG cuya característica principal fue contener FA de cadena media en las posiciones primarias del glicerol y FA de cadena larga en la posición central; En el segundo caso, una grasa con TAG que contienen ácido palmítico en la posición central del glicerol y FA insaturados en las posiciones primarias.

Las mejores condiciones de reacción se determinaron haciendo uso del diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta para la producción de SL a escala semi-industrial, en reactores de tanque agitado y de lecho empacado (PBR). La productividad alcanzada con Lipozyme® RM-IM en reactor PBR fue 2344 kg aceite transesterificado por kilogramo de enzima, en tanto que con Lipozyme® TL-IM fue de 4281 kg aceite por kilogramo de enzima.

A todos los productos de reacción se les determinó acidez, punto de fusión, viscosidad, consistencia, contenido de grasa sólida por RMN, composición en FA y en TAG por cromatografía de gases, análisis estereoespecífico por métodos enzimáticos.

¹ Trabajo de Grado de Doctorado en Química

² Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Janeth Aidé Perea Villamil.

SUMMARY

TITLE

PRODUCTION OF STRUCTURED LIPIDS TO SEMI-INDUSTRIAL SCALE USING TRANSESTERIFICATION WITH STEREOESPECIFIC IMMOBILIZED LIPASES¹

AUTHOR:

Nelson Moreno Safra²

KEYWORDS

Structured lipids, lipases, transesterification, packed bed reactor

DESCRIPTION

The structured lipids (SL) are modified triacylglycerols (TAG) to alter the fatty acids (FA) composition (FA) and their distribution into the glycerol molecules. Most of them combine medium chain FA with long chain FA in a single glycerol molecule and can be obtained by chemical or enzymatic interesterification reaction using *sn*-1,3 - or *sn*-2-specific lipase as catalysts. Some of these lipids can be classified as functional foods or nutraceuticals, because they are directly associated to the prevention or treatment of many diseases.

In this work SL are synthesized via enzymatic transesterification of binary mixtures of palm oil and soybean oil, in one case, and palm super-stearine (rich in tripalmitin) and soybean oil in another, using Lipozyme® RM –IM and ® Lipozyme TL-IM lipases as catalyst. In the first case, there was a mixture of TAG whose main characteristic was contain medium chain FA in the primary positions of glycerol and long chain FA in the central position; In the second case, a fat with TAG containing palmitic acid in the central position of glycerol and unsaturated FA in primary positions.

The best reaction conditions to semi-industrial SL production in the batch tank and packed bed reactor (PBR) were determined using the experimental design and response surface methodology. The productivity achieved with Lipozyme® RM-IM in PBR reactor was 2344 kg transesterified oil per kg enzyme, while with Lipozyme® TL-IM was 4281 kg of oil per kilogram of enzyme.

All reaction products were determined acidity, melting point, viscosity, consistency, solid fat content by NMR, FA and TAG composition by gas chromatography, estereoespecific analysis by enzymatic methods.

¹ Doctoral Thesis Degree in Chemistry

² Faculty of Science, School of Chemistry, Director: Janeth Aidé Perea V

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El vínculo entre los alimentos y la salud es algo ancestral en el hombre, no sólo por razones de nutrición, sino también por el efecto que generan sobre el organismo (Sehanputri, 1999; Silveira *et al.*, 2003). De manera que se plantean tres formas de ver esta relación: 1) Los alimentos contienen -naturalmente o incorporados- elementos necesarios y beneficiosos para la salud (vitaminas, minerales, antioxidantes, entre otros); 2) Pueden ofrecer prevención, mantenimiento, alivio o curación ante determinadas enfermedades y 3) Contienen componentes que pueden causar efectos perjudiciales y que sería conveniente limitar (grasas saturadas, colesterol, sal, etc.).

En la década de los 90, los alimentos saludables funcionaban sobre una “base negativa”, de eliminar o reducir aquellos elementos potencialmente nocivos (grasas saturadas, colesterol, etc.). Estos alimentos eran principalmente preventivos y dirigidos a la “gente sana”, generando un mercado con ventas estimadas en decenas de miles de millones de dólares. El paso siguiente consistió en manejar el “aspecto positivo”, es decir, no sólo reducir los elementos perjudiciales sino ingerir cantidades suficientes de los beneficiosos. Al respecto se establecieron las ingestas en términos de las RDA (*Recommended Daily Allowance*) y nacieron los Suplementos Dietarios (concentrados de los principios activos en forma de polvos, píldoras, líquidos, etc.) para suplir la dieta normal, generando un mercado interesante que oscila entre alimentos y medicamentos.

Con el tiempo, los consumidores optaron por nuevas alternativas: alimentos normales, beneficiosos para la salud, diseñados para evitar lo malo e incorporar lo bueno. Esto permitió producir Alimentos Funcionales definidos como “*productos vendidos y consumidos como alimentos, que deben tener una apariencia similar a la de un alimento convencional, consumirse como parte de la dieta normal y contener algún componente que ha demostrado beneficios para alguna función fisiológica particular o la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, más allá de sus funciones nutricionales*” (Sehanputri, 1999; Health Canada, 1998). A este grupo pertenecen los *lípidos estructurados* (SL), un grupo de grasas novedosas con aplicaciones en la industria farmacéutica y con aplicación potencial en la industria de alimentos.

Los *lípidos estructurados* son triacilgliceroles (TAG) modificados en su composición de ácidos grasos (FA), y en su distribución en las moléculas de glicerol, ya sea por la incorporación de nuevos FA o por cambio en la posición de los FA existentes en la molécula. También se conocen como *triacilgliceroles estructurados* (STAG), y presentan las ventajas de las grasas convencionales porque combinan ácidos grasos de cadena larga (LCFA) con ácidos grasos de cadena media (MCFA) o ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en una misma molécula de TAG, lo cual les confiere propiedades químicas, físicas y fisiológicas únicas (Osborn y Akoh, 2002; Zhou *et al.*, 2001; Huang y Akoh, 1996). Dentro de éstas se destaca la rápida absorción y asimilación de los SCFA y de los MCFA y el aporte de ácidos grasos esenciales (EFA) a partir de los LCFA (Haman y Shahidi, 2007, 2005; Mu y Porsgaard, 2005; Akoh, 1998). Algunos autores clasifican también como SL a las grasas y aceites modificados compuestos por TAG que poseen únicamente ácidos grasos de cadena larga, por ejemplo los equivalentes de la manteca de cacao.

Los SL están asociados directamente con la prevención o tratamiento de diversas enfermedades como cáncer-caquexia, absorción deficiente de la grasa, fibrosis quística, síndrome de intestino corto, entre otras, principalmente porque inciden en

el mejoramiento de la respuesta inmune y porque ayudan a superar algunos desórdenes metabólicos, como lo demuestran las numerosas publicaciones y patentes registradas hasta el momento: Matulka *et al.*, 2007; Matsuo y Takeuchi, 2001, 2004; U.S. Patent No. 6,369,252 (Akoh, 2002); Montejo y González, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Rodríguez, 2000; U.S. Patente No. 6.013.665 (DeMichele *et al.*, 2000); U.S. Patent No. 6.130.244 (DeMichele *et al.*, 2000); Craig *et al.*, 1997; Fitch, 1997; U.S. Patent No. 5.661.180 (DeMichele *et al.*, 1997); Huang y Akoh, 1996; U.S. Patent No 5.081.105 (Bistrrian, 1992); U.S. Patent No. 4.906.664 (Bistrrian *et al.*, 1990); U.S. Patent No 4.847.296 (Babayán *et al.*, 1989); U.S. Patent No 4.528.197 (Blackburn, 1985).

Industrialmente se producen emulsiones lipídicas para alimentación parenteral y enteral de niños prematuros y de personas recién operadas, el tratamiento de personas con cáncer o con quemaduras graves y para pacientes con fibrosis quística, entre otros. Estas emulsiones se elaboran a partir de *mezclas físicas* de aceites como los de soya, canola o girasol, ricos en ácidos grasos de cadena larga (C16:0, C18:0; C18:1; C18:2) y aceites ricos en ácidos grasos de cadena media y de cadena corta (C8; C10, C12) como el de coco. Sin embargo, las mezclas físicas de aceites, aún cuando pueden tener la misma composición en FA que los *lípidos estructurados*, difieren en sus rutas metabólicas, en parte debido a su estructura, a la composición en FA en la posición *sn-2* de los TAG, y a las diferencias en la velocidad de hidrólisis de los mismos (Mu y Porsgaard, 2005; Iwasake y Yamane, 2000; Nieto *et al.*, 1999; Mu *et al.*, 1998).

Los SL en cambio, al tener ácidos grasos de cadena larga y de cadena media o corta unidos directamente a la molécula de glicerol, son compuestos estructural y metabólicamente diferentes de la simple mezcla física, con ventajas tales como una superior retención de nitrógeno, preservación de la función inmune, rápida absorción y metabolismo en el organismo, generación de concentraciones más bajas de TAG en el plasma sanguíneo (González *et al.*, 2000), disminución del riesgo de cáncer, prevención de la trombosis y disminución del colesterol e

incorporación de ácidos grasos esenciales (Turan *et al.*, 2007; Simoens *et al.*, 2004; Beermann *et al.*, 2003; Kruiemel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Straarup y Hoy, 2000; Lee *et al.*, 1999).

Estos compuestos, además de su aplicación clínica, tienen un alto potencial de utilización en la industria de alimentos para la fabricación de productos de consumo masivo, con usos específicos como alimentos hipocalóricos, grasas ricas en ácidos *omega-3* y *omega-6*, margarinas, grasas plásticas conocidas como “*shortenings*” y grasas base para la elaboración de productos con mejores propiedades físicas, funcionales, organolépticas y nutricionales que las grasas convencionales y sobre todo con escasos niveles de ácidos grasos *trans* (Perea *et al.*, 2006; Agyare *et al.*, 2005; Kanjilal *et al.*, 1999; Rousseau y Marangoni, 1998a y 1998b; List *et al.*, 1995).

Los SL pueden obtenerse por reacciones de interesterificación química o enzimática. Para la interesterificación química se emplean catalizadores ácidos, hidróxidos de metales alcalinos, alcóxidos, carbonatos y bases no iónicas como aminas (Willis y Marngoni, 1999; Schuchardt *et al.*, 1998) y se realiza en tiempos cortos (30-60 minutos), pero requiere altas temperaturas y los catalizadores son muy sensibles a la calidad del aceite y a la humedad, por lo cual se requiere un aceite refinado y blanqueado. Adicionalmente, esta reacción da como resultado productos con una distribución al azar de los FAS en la molécula de glicerol, lo que hace que se produzca una mezcla de compleja TAG, que impide el direccionamiento hacia la obtención de lípidos estructurados específicos (Klinkesorn *et al.*, 2004; Norizazzah *et al.*, 2004; Rodríguez y Gioiell, 2003; Osborn y Akoh, 2002; Iwasaki y Yamane, 2000; Schuchardt *et al.*, 1998).

La interesterificación enzimática, por su parte, requiere condiciones de temperatura y presión moderadas y se efectúa usando lipasas no específicas o lipasas específicas, especialmente *sn-1* y *sn-3* estereoespecíficas (D'Agostini *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1998, 2000; DeMichele *et al.*, 1997). En este caso, la distribución de los ácidos grasos en la molécula de glicerol es más ordenada, lo

que supone una ventaja importante por que se pueden fabricar lípidos con propiedades funcionales o fisiológicas especiales (Matulka *et al.*, 2007; Turan *et al.*, 2007; Simoens *et al.*, 2004; Sellapan, 2001; DeMichelle *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Chandler *et al.*, 1998; Mu *et al.*, 1998).

La interesterificación química ha sido hasta el momento más investigada y utilizada a nivel industrial, mientras que la enzimática tiene un desarrollo reciente que requiere aún de una amplia investigación, debido a que influyen más variables en el proceso, como se deduce de los resultados obtenidos a escala de laboratorio por Jácome y Perea 2004; Moreno y Perea 2001; Xu *et al.*, 2000; Willis y Marangoni, 1998; Akoh 1995; y a escala de planta piloto, por Moreno *et al.*, 2005; Arango *et al.*, 2004; Pareja *et al.*, 2004. Estos investigadores encontraron que los sustratos, la clase de enzima, la relación enzima-sustrato, la temperatura, el tiempo de reacción, la agitación, el contenido de agua y la presencia o ausencia de solvente constituyen las variables más importantes, tanto en las reacciones de acidólisis (entre TAG y FAs libres), como en las reacciones de transesterificación (entre TAG del mismo o diferentes sustratos).

La mayoría de las investigaciones reportan el empleo de las siguientes materias primas: trilinoleína y ácido cáprico y esteárico (Sellapan y Akoh, 2001), aceite de soya y ácido caprílico (Huang y Akoh, 1996), aceite de canola y ácido caprílico (Zhou *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2000), aceite de arroz y ácido cáprico (Jennings y Akoh, 2000), aceite de girasol y ácido caproico (Mu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998), ácido docosapentaenoico, ácido docosahexaenoico y ácido cáprico (Haman y Shahidi, 2005), trilinoleína y trilinoleína (Haman y Shahidi, 2007), aceite de soya y una mezcla de ácido esteárico y palmítico (Carrin y Crapiste, 2007), aceite de atún y ácido cáprico (Hita *et al.*, 2007), aceite de palma y aceite de palmiste (Chen, *et al.*, 2007; Díaz y Gioielli 2003). En Colombia, se han evaluado el aceite de palma, la oleína de palma, la estearina de palma y el aceite de palmiste (Moreno *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2004; Arango *et al.*, 2004; Jácome y Perea, 2004 y Pareja *et al.*, 2004; Moreno y Perea, 2001).

Como catalizadores, se han utilizado especialmente lipasas de origen microbiano como *Rizhomucor miehei*, *Rhizopus japonicus* (SAIKEN 100), *Rhizopus arrhizuz*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* y *Thermomyces lanuginosa*, entre otras. De estas se destaca la lipasa Lipozyme® RM-IM de *Rhizomucor miehei* inmovilizada sobre una resina de intercambio iónico, utilizada en las investigaciones realizadas por Carrin y Crapiste, 2007; Haman y Shahidi, 2007; Maduko *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2005, 2004; Arango *et al.*, 2004; Jácome y Perea, 2004; Pareja *et al.*, 2004; Moreno, 2001; Sellappan y Akoh, 2001, Jennings y Akoh, 2000; Nieto *et al.*, 1999; Lee y Akoh, 1998, Mu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998a, 1998b. Aunque esta enzima presenta alta actividad esterificante e hidrolítica y requiere de una cantidad mínima de agua para mantener su actividad, se debe controlar el contenido de humedad del medio para evitar la generación de ácidos grasos libres por hidrólisis (Arango *et al.*, 2004; Pareja *et al.*, 2004; Moreno, 2001).

Recientemente Novozymes, ha lanzado al mercado la *Lipozyme® TL-IM*, lipasa con alta actividad estearasa obtenida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus* y soportada en gránulos de sílice, lo cual la hace más económica que sus contrapartes inmovilizadas sobre resinas de intercambio iónico, pero a su vez más susceptible al agua (Jácome y Perea, 2004; Novozymes, 2003). El bajo costo de esta enzima (aproximadamente $\frac{1}{4}$ del precio de Lipozyme® RM-IM) la convierten en una alternativa importante, por lo que su aplicación a escala industrial debe ser evaluada.

Lipozyme® RM IM ha sido evaluada tanto a escala de laboratorio como de planta piloto, en sistemas discontinuos de tanque agitado y en sistemas en continuo en reactores de lecho empacado (Nielsen *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2005; Camacho Páez *et al.*, 2002; Fomuso y Akoh, 2002; Mu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998, 1999, 2000). En este último sistema, la migración de grupos acilo (principal problema de los sistemas en discontinuo, porque se reduce la pureza de los triacilgliceroles estructurados), se reduce a aproximadamente un cuarto ($\frac{1}{4}$) de la alcanzada en un sistema en discontinuo debido al menor tiempo de residencia y, además, la

actividad de la enzima se mantiene por más tiempo, permitiendo una mayor reutilización y, por tanto, reducción de los costos de transformación. Xu *et al.*, 1998 encontraron que después de cuatro (4) semanas de uso continuo, la actividad de la enzima en un reactor de lecho empacado había decaído un 40%, mientras que en reactor en discontinuo de tanque agitado la actividad después del quinto uso había decaído aproximadamente en un 55% (Lee y Akoh, 1998).

El uso de Lipozyme® TL-IM, en cambio, está en pleno desarrollo. Se encuentran los trabajos reportados por Villeneuve *et al.*, 2007; Ronne *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2003 y Xu *et al.*, 2002. Ko y colaboradores evalúan la producción de SL a partir de aceite de ricino y ácido cáprico; Yamaguchi y su grupo emplean aceite de pescado y metil ésteres de ácido esteárico, mientras que Ronne y su grupo usan como materias primas triestearina y diferentes ácidos grasos puros.

Los aspectos mencionados adquieren gran relevancia cuando se pretende desarrollar la producción de SL a escala industrial, y aún cuando se tienen investigaciones en el área que sirven de base, en cada caso se requiere, para cada sistema sustrato-enzima, optimizar las variables influyentes; evaluar tanto los procesos a escala de laboratorio como el efecto del cambio de escala sobre las características del proceso; establecer la cinética de la reacción; caracterizar el producto finalmente obtenido y analizar la estabilidad y el costo de la enzima, de forma que la información generada permita predecir las condiciones de operación que conduzcan a productos hechos a la medida con las características deseadas.

En el ámbito mundial, existen pocas empresas que producen lípidos estructurados (*Laboratorios Novartis* en Suiza, las compañías *Stepan* y *Abitec S.A.* en Estados Unidos, y *Loders Crocklaan* de *Unilever*, Inglaterra) y las que lo hacen emplean básicamente transesterificación química, y los comercializan con fines médicos y nutricionales. Sólo recientemente, ante la creciente demanda de los consumidores por productos más saludables, las grandes empresas productoras

de grasas en el mundo se han interesado en la interesterificación enzimática, con el objeto de reemplazar el proceso de hidrogenación y así eliminar la formación de los ácidos grasos *trans*.

En el 2005, tres de estas empresas (una en China, una en Estados Unidos y otra en Holanda) iniciaron la producción de grasas modificadas por interesterificación enzimática a escala industrial. Estos procesos además de ser patentados, tienen un alto nivel de confidencialidad industrial.

En este sentido, las industrias de grasas y aceites nacionales ante las necesidades del mercado, requieren desarrollar e implementar tecnologías con bases científicas sólidas para sus procesos de transformación, de manera que les permitan generar productos competitivos aprovechando en lo posible las materias primas nacionales, como son los derivados de la palma africana, cuyo cultivo en Colombia tiene una dinámica de expansión continua reflejada en que en los últimos años el país, se ha convertido en el mayor productor de América Latina y el quinto en el mundo, después de Malasia, Indonesia, Nigeria y Tailandia (FEDEPALMA, 2007a y 2007b).

En Colombia, la producción de aceite de palma crudo en 2006 alcanzó un nivel de 710.407 toneladas, 37.810 toneladas adicionales a las producidas en el año anterior. Regionalmente volvió a destacarse el desempeño de la Zona Central, cuya producción de aceite de palma crudo en el año 2006 creció 10,1%, equivalente a 18.411 toneladas, respecto al año anterior. La Zona Oriental, en la cual se encuentra la zona de influencia de Santander, fue la segunda región que más creció (6,2%). Se estima que a finales de 2007, Colombia tendrá un área sembrada en palma de aceite de 303.768 hectáreas, un 10,3% adicional a la que existía en 2005, con lo cual la producción de aceite crudo de palma ascenderá a 784.510 toneladas (Fedepalma, 2007a).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta el incremento progresivo del cultivo de palma

en el país, se planteó un proyecto de cooperación entre la Universidad Industrial de Santander y la Empresa Comercializadora Internacional Santandereana de Aceites, para desarrollar y optimizar la producción a escala semi-industrial de grasas especiales, mediante una reacción de transesterificación en presencia de lipasas comerciales grado alimentario.

Dentro de estas grasas especiales, los lípidos estructurados tienen actualmente gran potencial de desarrollo, por lo cual, para su obtención en el presente proyecto, se utilizaron materias primas derivadas de la palma africana como el aceite de palmiste y la superestearina de palma y el aceite de soya, rico en ácidos grasos insaturados. Como biocatalizadores se utilizaron las lipasas *Lipozyme*® *RM-IM* de *Rhizomucor miehei* y la *Lipozyme*® *TL-IM*, lipasa con alta actividad estearasa obtenida del microorganismo *Thermomyces lanuginosus*.

Los sistemas de reacción aceite de palmiste - aceite de soya y superestearina de palma - aceite de soya fueron transesterificados en un sistema en discontinuo - reactor de tanque agitado. Se optimizaron a escala de laboratorio las condiciones de reacción para obtener la mayor producción de lípidos estructurados y con las condiciones seleccionadas, el proceso fue escalado a un kilogramo y a planta piloto (35 kilogramos), lo que permitió observar una gran reproducibilidad en los resultados. A esta misma escala se midió además la estabilidad de la enzima y la esteroespecificidad de la misma. Los productos obtenidos fueron caracterizados en cuanto a su perfil de fusión y composición en TGA.

Con base en los datos obtenidos en el sistema en discontinuo se evaluó el sistema en continuo con un reactor de lecho empacado, utilizando como sistema de reacción la mezcla aceite de palma - aceite de palmiste. Cuando se empleó como catalizador la lipasa *Lipozyme*® *RM-IM*, los experimentos se llevaron a cabo a escala de un kilogramo (por el costo de la enzima), mientras que al usar como biocatalizador *Lipozyme*® *TL-IM*, los experimentos se evaluaron a escala de uno y de 10 kilogramos. En los dos casos se midió la estabilidad de las enzimas y su

esteroespecificidad.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que es factible y económicamente posible producir lipidos estructurados con las mezclas de aceites y en los sistemas evaluados, obteniéndose los mejores resultados al emplear *Lipozyme® TL-IM* como catalizador, en reactor de lecho empacado. Además permitieron sentar las bases para la producción de grasas especiales en la Empresa, lo cual le va a permitir hacer frente a los retos y oportunidades que el comercio internacional ofrece a raíz de las nuevas legislaciones sobre los ácidos grasos *trans* que empezaron a regir a partir del 1 de enero de 2006 (FDA, 2005) y a la posibilidad de encontrar nuevos mercados.

En consecuencia con estos resultados, actualmente la empresa Comercializadora Internacional Santandereana de Grasas y Aceites se encuentra construyendo el reactor para el desarrollo ya a escala industrial del proceso para la producción de grasas interesterificadas enzimáticamente.

El proyecto, financiado parcialmente por COLCIENCIAS, la Comercializadora Internacional Santandereana de Aceites – C.I. SACEITES S.A y la Universidad Industrial de Santander (Proyecto 1102-07-11015), se desarrolló en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos -CICTA-, de la UIS, y en las instalaciones de la planta piloto y laboratorios de la empresa C.I. SACEITES S.A.

Los resultados de esta investigación se obtuvieron paralelamente con los de otros investigadores y han sido presentados y publicados en las memorias de varios eventos, a saber:

1. PEREA, J. A.; PAREJA, C.; MARTÍNEZ, F.; MANTILLA, C. y **MORENO, N.** Aplicación de grasas interesterificadas enzimáticamente en productos de panadería, pastelería y chocolatería. En: Memorias del Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bogotá, Colombia, 2006; 1:45.

2. PEREA, J. A.; MARTÍNEZ F. y **MORENO, N.** Grasas a la medida con lípidos estructurados obtenidos por interesterificación enzimática. En: Memorias del IX Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de Alimentos. Instituto de Investigaciones para la Industria de Alimentos, La Habana, Cuba, 2005; 1:301-305.
3. **MORENO, N.**; PEREA, J. A. y MANTILLA, C. Modificación de aceites vegetales con lipasas microbianas para la obtención de alimentos funcionales. En: Memorias del XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites, Buenos Aires, Argentina, 2005; 1:349-351.
4. PEREA, J. A.; MARTÍNEZ, F. y **MORENO, N.** Utilización de lipasas inmovilizadas en la producción de lípidos estructurados. En: Memorias del XIII Congreso Nacional de Química, Cartagena, Colombia, 2004; 1:42-48.
5. ARANGO, L. M.; PEREA, J. A.; **MORENO, N.**; PAREJA, C. A. y MARTÍNEZ, F. Transesterificación Enzimática de la Oleína de Palma para la Producción de Grasas Especiales en un Reactor tipo Batch. *Revista Palmas*. 2004; 25(1):371-375.
6. ARANGO, L. M.; **MORENO, N.**; PEREA, J. A. y MARTÍNEZ, F. Acidólisis Enzimática de la Oleína de Palma para la Producción de Equivalentes de la Manteca de Cacao. En: Memorias del XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Bucaramanga, Colombia, 2003; 1:2-5.
7. PEREA, J. A., MARTÍNEZ, F.; **MORENO, N.** y ARIZA, E. V. Producción de monoglicéridos por reacción enzimática. En: Memorias del X Congreso latinoamericano AOCS de los aceites y grasas, 2003, Manta, Ecuador, 2003; 1:65.

8. PAREJA, C.; ARANGO, L. M.; **MORENO, N.**; PEREA, J. A.; MARTÍNEZ, F. La Transesterification Enzymatique de Palme Africane par une Lipase Immobilise. En: Resumen del Symposium International - Chimie verte. Uses and Applications of Renewable Raw Materials, Poitiers, Francia, 2003; 1:83.
9. ARANGO, L. M.; **MORENO, N.**; PAREJA, C. A.; PEREA, J. A. y MARTÍNEZ, F. L'esterification Enzymatique de L'Oleine de Palme par L'Acide Stearique Commercial. En: Resúmenes del Symposium International - Chimie Verte. Uses and Applications of Renewable raw Materials, Poitiers, Francia, 2003; 1:84.
10. **MORENO, S.N.**; PEREA, V.J.A. Análisis regioespecífico de los ácidos grasos presentes en una mezcla grasa antes y después de ser transesterificada con Lipozyme® TL-IM. En: memorias del XII Congresso Latino_americano de Óleos e Gorduras. Florianópolis, SC, Brasil.

1.1 ALCANCE DE LA PRESENTE TESIS

Los lípidos estructurados tienen actualmente gran potencial de desarrollo, como se discutió anteriormente, pero para su producción se requiere una selección adecuada de los sustratos que van a aportar los ácidos grasos de cadena media y los ácidos grasos de cadena larga (ácidos grasos esenciales), así también del catalizador a emplear.

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones sobre producción de lípidos estructurados se han enfocado en la reacción de acidólisis, utilizando como sustratos ácidos grasos libres de cadena media, lo cual eleva el costo de producción de estos compuestos, no solo por el precio de las materias primas sino también por el proceso de refinación. Estos estudios se han realizado, en su gran mayoría, a escala de gramos y en raros casos se evalúa la reacción en reactor de lecho empacado, pese a que se reporta una menor migración de grupos acilo en este sistema. De otra parte se han evaluado como catalizadores enzimas lipasas no disponibles comercialmente, excepto Lipozyme RM-IM y Novozymes 435.

La intención de esta tesis es por tanto evaluar la transesterificación, como una opción frente a la reacción de acidólisis para producir SL a bajo costo, de forma que se puedan incorporar posteriormente en productos alimenticios de consumo masivo. En este sentido, se evalúa la habilidad de Lipozyme TL-IM, una lipasa comercial de bajo costo y poco estudiada, frente a Lipozyme RM-IM, para catalizar la reacción de transesterificación y producir SL, tanto en reactor de tanque agitado (escala de 1 y 35 kg de sustrato) como en reactor de lecho empacado (en reactores con capacidad para 0.5 y 10 kg de enzima). En todos los casos se determinan las mejores condiciones de reacción para cada sistema sustrato-enzima-reactor, haciendo uso del diseño experimental acompañado de un análisis estadístico riguroso, y se compararan los productos obtenidos con cada uno de ellos para elegir finalmente la mejor opción para la producción industrial de SL.

Como sustratos para la obtención de SL en el presente proyecto, se utilizan

materias primas derivadas de la palma africana como el aceite de palmiste porque se considera una buena fuente de ácidos grasos de cadena media, la superestearina de palma como fuente de TAG con ácido palmítico en la posición central y el aceite de soya como fuente de ácidos grasos insaturados de cadena larga, especialmente ácidos grasos esenciales. Como biocatalizadores se utilizan las lipasas *Lipozyme RM-IM* de *Rhizomucor miehei* y la *Lipozyme TL-IM* del *Thermomyces lanuginosus*, que presentan estereoespecificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG.

Para lograr este objetivo se realiza, entre otros análisis, la determinación de la composición en TAG de los sustratos y productos así como la distribución de ácidos grasos en la estructura de los TAG.

Con el desarrollo de la presente investigación también se contribuye a establecer los siguientes aspectos no evaluados:

1. La estereoespecificidad de *Lipozyme TL-IM* frente a *Lipozyme RM-IM*
2. La productividad de *Lipozyme TL-IM* frente a *Lipozyme RM-IM* tanto reactor de taque agitado como en reactor de lecho empacado.
3. El efecto del tipo de reactor sobre la migración de grupos acilo en la transesterificación enzimática de los sistemas aceite de soya – aceite de palmiste y aceite de soya – superestearina de palma.
4. La relación de sustratos Aceite de soya – aceite de palmiste o aceite de soya – superestearina de palma más adecuada para la producción de SL.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción a escala semi-industrial de lípidos estructurados con aplicación potencial en la industria de alimentos, por medio de la interesterificación enzimática de mezclas binarias de derivados del aceite de la palma africana y de aceite de soya, utilizando lipasas 1,3-estereoespecíficas en forma inmovilizada.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2.2.1** Caracterizar física y químicamente los sustratos empleados en la reacción de transesterificación.
- 1.2.2.2** Elegir una propiedad que pueda ser utilizada para evaluar la formación de lípidos estructurados en la reacción de transesterificación.
- 1.2.2.3** Evaluar la reacción de transesterificación en un sistema discontinuo a escala de laboratorio, usando como catalizador las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM, para seleccionar en cada caso, las condiciones más favorables de reacción.
- 1.2.2.4** Evaluar el efecto del escalamiento a planta sobre: Rendimiento de la reacción, características del producto y estabilidad de la enzima.
- 1.2.2.5** Evaluar el proceso de interesterificación enzimática en un sistema continuo, reactor de lecho fijo, a escala piloto y semi-industrial.
- 1.2.2.6** Caracterizar física y químicamente los productos de la reacción en cuanto a composición en ácidos grasos, triacilgliceroles, perfiles de fusión, índice de acidez, análisis estereoespecífico, entre otros.
- 1.2.2.7** Evaluar las posibilidades de uso de los productos de reacción como grasas base para el desarrollo de productos alimenticios.

1.2.3 CONTENIDO DE ESTA TESIS

Para el cumplimiento de los objetivos planteados, el trabajo fue dividido en etapas, cada una de las cuales se presenta en capítulos separados. Así:

En el capítulo segundo “**Caracterización de las materias primas usadas en las reacciones de interesterificación**” se presenta una descripción de las materias primas y de las mezclas de reacción usadas en la ejecución del proyecto, los métodos de análisis utilizados para su caracterización en cuanto a propiedades físicas y químicas y los resultados obtenidos.

En el capítulo tercero se describe la “**Obtención de lípidos estructurados por interesterificación enzimática de aceite soya y aceite de palmiste en un sistema en discontinuo-tanque agitado**”. Inicialmente se hace el análisis del estado del arte sobre lípidos estructurados, con énfasis en su producción en sistemas discontinuos usando enzimas inmovilizadas. Posteriormente se presentan la metodología utilizada y los resultados obtenidos a escala de laboratorio, a escala de un kilogramo y a escala de planta piloto, utilizando como biocatalizadores las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM.

El capítulo cuarto “**Obtención de lípidos estructurados por interesterificación enzimática de aceite soya y superestearina de palma en un sistema en discontinuo-tanque agitado**”, presenta los resultados obtenidos en la utilización de una mezcla de reacción diferente, en este caso el aceite de soya – superestearina de palma, usando las dos enzimas mencionadas anteriormente.

En el capítulo quinto se presenta la “**Evaluación de la reacción de interesterificación enzimática en un sistema en continuo - reactor de lecho empacado**”, utilizando como mezcla de reacción aceite de soya-aceite de palmiste y las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM. En este capítulo se describe el proceso utilizando un reactor a escala de 1 kilogramo y de 10

kilogramos, la optimización de condiciones de reacción, el estudio de estabilidad de la enzima, y la aplicación potencial de los compuestos obtenidos. Finalmente se hace una comparación entre los sistemas de reacción utilizados: sistema discontinuo de tanque agitado y sistema continuo de lecho fijo.

En el capítulo sexto se presentan las conclusiones del proyecto.

Finalmente se incluye la bibliografía consultada que permite soportar el proyecto.

CAPÍTULO 2

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS USADAS EN LAS REACCIONES DE INTERESTERIFICACIÓN

2.1 INTRODUCCIÓN

Los lípidos se reconocen como nutrientes esenciales tanto en las dietas animales como en la humana. Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias solubles en disolventes orgánicos apolares tales como éter, hexano o benceno y la mayoría tiene baja solubilidad en agua. A temperatura ambiente varían de consistencia desde líquidos hasta sólidos. Cuando son sólidos se les denomina grasas y cuando son líquidos, aceites.

Las grasas y los aceites están compuestos predominantemente (más del 95%) por triésteres de ácidos grasos y glicerol, llamados comúnmente triacilgliceroles. Pero pueden incluir además mono- y diacilgliceroles, fosfolípidos, cerebrósidos, esteroides, terpenos, alcoholes grasos, ácidos grasos, vitaminas liposolubles, entre otras sustancias. Cien gramos de grasa rinden aproximadamente 95 gramos de ácidos grasos, razón por la cual, las propiedades físicas y químicas de las grasas y los aceites dependen en gran medida de los tipos y proporciones de los ácidos grasos que los constituyen, así como del modo en que se distribuyen en la molécula de glicerol.

2.1.1 Ácidos grasos

Existen tres clases básicas de ácidos grasos: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Sus propiedades fisicoquímicas y efectos nutricionales y metabólicos están determinados por la longitud de la cadena hidrocarbonada, junto con el grado de insaturación y su ubicación espacial en la estructura del glicerol (Matalx *et al.*, 2002; Osborn y Akoh, 2002; Mu *et al.*, 1998). De acuerdo con el tamaño de la cadena hidrocarbonada los ácidos grasos pueden dividirse en ácidos grasos de cadena corta (SCFA), ácidos grasos de cadena media (MCFA) y ácidos grasos de cadena larga (LCFA) (Nieto *et al.*, 1999). En la **Tabla 2.1** se relacionan los ácidos grasos más importantes.

- **Ácidos grasos de cadena corta (SCFA)**

Más conocidos como ácidos grasos volátiles, comprenden los ácidos carboxílicos alifáticos de 2 a 4 átomos de carbono de longitud; se encuentran principalmente en la leche de vaca y la mantequilla. Se solubilizan en la fase acuosa del contenido intestinal, donde son absorbidos, enlazados a la albúmina y transportados directamente al hígado vía vena porta. Sin embargo, si los SCFA están unidos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de las moléculas de TAG, pueden hidrolizarse completamente en el lumen del estómago y en el intestino delgado por acción de la Lipasa Gástrica Humana que es específica en cuanto a posición y longitud de la cadena.

- **Ácidos grasos de cadena media (MCFA)**

Comprenden los ácidos carboxílicos alifáticos de 6 a 12 átomos de carbono de longitud. Las principales fuentes de MCFA son el aceite de coco (CNO) y el aceite de palmiste (PKO). Los MCFA se transportan preferentemente al hígado vía vena porta, debido a su tamaño pequeño y gran solubilidad comparados con los ácidos grasos de cadena larga. Pueden ingresar a la mitocondria de todos los tejidos sin

el beneficio de la carnitina (Osborn y Akoh, 2002) y son metabolizados en el cuerpo tan rápido como la glucosa (Greyt *et al.*, 1998), con poca tendencia a depositarse en los adipositos.

Aunque estos ácidos grasos de cadena media pueden usarse en el control de la obesidad, se ha encontrado que pueden elevar los niveles de colesterol en la sangre (Cater *et al.*, 1997) o bien disminuirlos si se suplementan con suficientes ácidos grasos polinsaturados (PUFA) (Kabara, 2001; Lima *et al.*, 1988).

Los MCFA, especialmente el ácido láurico (C12:0), y su monoéster de glicerol tienen un amplio espectro como agentes antibacteriales, antifúngicos y antivirales. El monoacilglicerol del ácido láurico, conocido comercialmente como Lauricidin® está protegido por varias patentes americanas (Mazer *et al.*, 1999; Isaacs *et al.*, 1991; Kabara, 1977, 1978, 1988). Muchos de los organismos patogénicos inactivados por *monolaurin*® son aquellos conocidos como responsables de las infecciones oportunistas en los individuos VIH-positivos (Kabara, 2001).

- **Ácidos grasos de cadena Larga (LCFA)**

Los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) poseen cadenas hidrocarbonadas de 14 a 24 átomos de carbono y están presentes en grasas animales y aceites vegetales y marinos. Estos ácidos se absorben y metabolizan más lentamente que los SCFA y MCFA, no pueden absorberse o transportarse en la sangre debido a su carácter altamente hidrofóbico, por lo que deben empaquetarse inicialmente en micelas para ingresar a las células intestinales donde se transforman en quilomicrones, los cuales son excretados y transportados en el sistema linfático hasta el hígado, para finalmente entrar a las mitocondrias de las células con ayuda de la carnitina. Sin embargo, la localización del LCFA en la molécula de glicerol también puede influenciar su destino metabólico.

Tabla 2.1 Ácidos grasos frecuentes en alimentos de consumo habitual

Nombre Común	Fórmula CN:DB*	Sigla nombre común	Punto de Fusión (°C)
Ácidos grasos de cadena corta (SCFAs)			
Ácido acético	C2:0	Ac	17.0
Ácido propiónico	C3:0	Pr	-22.0
Ácido butírico	C4:0	Bu	-7.9
Ácido caproico	C6:0	Ca	-3.4
Ácidos grasos de cadena media (MCFAs)			
Ácido caprílico	C8:0	Cy	16.7
Ácido cáprico	C10:0	C	31.6
Ácido láurico	C12:0	La	44.3
Ácidos grasos de cadena larga (LCFAs)			
Ácido mirístico	C14:0	M	53.9
Ácido palmítico	C16:0	P	63.1
Ácido palmitoleico	C16:1	Po	-5.0
Ácido esteárico	C18:0	S	69.6
Ácido oleico	C18:1n-9	O	13.4
Ácido lignocérico	C24:0	Lg	83.0
Ácidos grasos esenciales (EFAs)			
Ácido linoleico	C18:2n-6	L	-5.0
Ácido linolénico	C18:3 n-3	Ln	-11.0
Ácido araquidónico	C20:4n-6	A	-49.5
Ácido eicosapentaenoico	C20:5n-3	EPA	-54.0
Ácido docohexaenoico	C22:6n-3	DHA	-50.0

*CN:DB = Número de acil carbono : dobles enlaces, es decir, número de átomos de carbono de los grupos acilo del triacilglicerol : Número de dobles enlaces.

El ácido palmítico y el ácido esteárico libres tienen valores de absorción bajos debido a sus altos puntos de fusión y su habilidad para formar sales de calcio. Por consiguiente, las grasas que tienen ácidos grasos saturados de cadena larga localizados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de los triacilglicéridos pueden exhibir patrones de absorción y efectos metabólicos diferentes a las grasas que tienen ácidos palmítico o esteárico localizados en posición *sn*-2, los cuales son absorbidos más eficazmente como monoacilglicéridos.

De otra parte, se cree que los LCFA saturados como el ácido esteárico (C18:0) son neutrales con respecto a los niveles de colesterol en la sangre, parcialmente debido a su punto de fusión superior a la temperatura del cuerpo y porque es desaturado rápidamente a ácido oleico *in vivo*.

- **Ácidos grasos esenciales (EFA)**

Dentro de los LCFA se encuentran los denominados ácidos grasos Omega-6 y Omega-3, considerados ácidos grasos esenciales (EFA). Estos ácidos son componentes importantes de las membranas celulares y su concentración influye en la fluidez y permeabilidad de las mismas, así como en el acceso a las funciones de los receptores, transportadores y enzimas incrustadas en ella.

El ácido linoléico (C18:2n-6), encontrado en la mayoría de aceites vegetales, es un EFA que puede desaturarse posteriormente y elongarse a ácido araquidónico (C20:4n-6), precursor de los eicosanoides. Los ácidos grasos Omega-3, tales como el ácido linolénico (C18:3n-3), encontrado en el aceite de soya, el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y el ácido docohexaenoico (C22:6n-3, DHA), encontrados en los aceites de pescado son otros ácidos grasos Omega-3 poliinsaturados esenciales en el crecimiento y desarrollo a través del ciclo de vida humana, por lo que deben incluirse en la dieta.

2.1.2 Triacilgliceroles.

Un triacilglicerol puede ser simple, si todos sus ácidos grasos son idénticos y compuesto si dos o tres de los ácidos grasos son diferentes. Según el tamaño de los ácidos grasos se pueden distinguir:

Triacilgliceroles de Cadena Corta (SCT): Formados por glicerol y por tres ácidos grasos de cadena corta (2 a 4 átomos de carbono de longitud).

Triacilgliceroles de Cadena Media (MCT): Formados por glicerol y por tres ácidos grasos de cadena media (6 a 12 átomos de carbonos).

Triacilgliceroles de Cadena Larga (LCT): Formados por glicerol y tres ácidos grasos de cadena larga (16 a 24 átomos de carbono o más).

Los LCT se encuentran comúnmente en una alimentación normal, en tanto que los MCT, están presentes tan solo en cerca del 3% de los lípidos totales.

Los procesos de absorción y de digestión de los LCT dependen de varios factores tales como: a) su emulsificación con las sales biliares; b) la acción de la lipasa pancreática; c) su desdoblamiento en ácidos grasos de cadena larga y diacilglicerol; d) su reesterificación en el interior de las células de la mucosa intestinal; e) el transporte a través de quilomicrones en el sistema linfático y f) la entrada en el hepatocito. Por su parte, los triacilgliceroles SCT y los MCT, siguen en el organismo una vía metabólica más simple, lo que finalmente se convierte en un beneficio para quienes los consumen, ya que su absorción y digestión no dependen de los factores descritos para los LTC (Carnielli *et al.*, 1994).

Los MCT atraviesan la barrera intestinal en forma de triacilgliceroles o de ácidos grasos libres y a la salida se conducen por el circuito especial de la vena porta directamente al hígado donde la mayor parte son oxidados para proveer energía;

en consecuencia, participan muy poco en los depósitos en los tejidos adiposos. Su velocidad de absorción –oxidación- es semejante a la de la glucosa, pero son aproximadamente dos veces más energéticos que ésta. Pese a estas ventajas, los MCT no constituyen por sí solos un aporte lipídico suficiente y equilibrado debido a que no aportan ácidos grasos esenciales.

2.1.3 Grasas y aceites vegetales

2.1.3.1 Aceite de palma

La palma de aceite (*Eleais guineensis*) es considerada la más rica en aceite entre algunas oleaginosas tradicionales como semilla de algodón, coco, ajonjolí, girasol, soya y maíz. Produce dos clases de aceite: aceite de palma y aceite de palmiste, extraídos por procesos mecánicos y térmicos. Estos a su vez, están constituidos por dos fracciones: las oleínas (fracción líquida) y las estearinas (fracción sólida). Las oleínas son ricas en ácidos grasos insaturados, mientras que las estearinas lo son en ácidos grasos saturados.

El aceite de palma presenta una relación de ácidos grasos saturados e insaturados de 1:1 y sus principales componentes son los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico y en menor proporción (0.1 a 0.4%) ácido α -linolénico. En cuanto a su composición en TAG, el aceite de palma y su oleína están formados principalmente por 2-oleoil-glicerol, principalmente 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-glicerol (POP) y 1-palmitoil-2,3-dioleoil-glicerol (POO), mientras que en sus estearinas predomina la tripalmitina (PPP), como se observa en la **Tabla 2.2**.

El aceite de palma, la oleína y la estearina se utilizan ampliamente en la fabricación de margarinas y mantecas y aceites para fritura industrial. Debido a su consistencia semisólida, el aceite de palma no requiere del proceso de hidrogenación, por lo que se hace más económico desde el punto de vista

industrial, además no contiene ácidos grasos “*trans*”.

Del fraccionamiento de la estearina de palma por cristalización selectiva se obtiene una estearina más dura, conocida como superestearina de pama (SEP), cuyo principal componente es el TAG tripalmitina (PPP).

Tabla 2.2 Triacilgliceroles (mol %) del aceite de palma y sus fracciones.

Triacilglicerol	Aceite de palma		
	Crudo	Oleína	Estearina
POL	9.1	7.4	2.7
PPL	7.9	7.8	5.7
OOO	3.7	3.1	1.0
POO *	25.8	22.7	5.7
POP	31.6	39.0	21.9
PPP	7.3	2.2	46.9
SOO *	1.2	1.4	0.4
POS	4.2	6.1	1.6
PPS *	1.2	1.9	6.8
SOS	-	-	-
SPS	-	0.2	-
Diglicéridos	10.2	nd	nd

* POO: (POO+PLS); SOO: (SOO+SLS); PPS: (PPS+MSS), donde:

P= ácido palmítico, O=ácido oléico, S= ácido esteárico, L= ácido linoleico, M= ácido mirístico.

2.1.3.2 **Aceite de palmiste (PKO)**

El aceite de palmiste (*Palm Kernel Oil*), está predominantemente constituido por ácido láurico (47%) y pequeñas cantidades de ácidos grasos saturados de 8, 10, 14, 16 y 18 átomos de carbono. Es sólido a temperatura ambiente y presenta un rango de fusión muy estrecho, característica que lo distingue de otros aceites, los cuales no contienen más del 1% de ácido láurico (“Oil World”, 2000). En la **Tabla 2.3**, se presentan sus propiedades físicas y químicas.

Tabla 2.3 Propiedades del aceite de palmiste

Propiedad	Rango de valoración	Media
Índice de yodo	16.2-19.2	17.8
Índice de saponificación	243-249	245
Índice de refracción a 40 °C	1.4500-1.4518	1.4500
Punto de fusión (<i>slip</i>)	25.9-28.0 °C	27.3 °C
Contenido de caratenoides	4.3-11.8 ppm	7.6 ppm
Contenido de tocoferoles	80-100 ppm	90 ppm
Ácidos grasos (% p/p)		-
C6:0 capríco	0.1-0.5	0.3
C8:0 caprílico	3.4-5.9	4.4
C10:0 cáprico	3.3-4.4	3.7
C12:0 láurico	46.3-51.1	48.3
C14:0 mirístico	14.3-16.8	15.6
C16:0 palmítico	6.5-8.9	7.8
C18:0 esteárico	1.6-2.6	2.0
C18:1 oleico	13.2-16.4	15.1
C18:2 linoleico	2.2-3.4	2.7

Tomado de D'Agostini, 2001; Goh, 1994.

Las principales aplicaciones del aceite de palmiste se encuentran en la fabricación de jabones, detergentes sintéticos, ésteres, productos alimenticios, cosméticos, productos farmacéuticos, especialmente obtención de MCT, entre otros (Pantzaris y Hahmad, 2001).

2.1.3.3 *Aceite de soya (SBO)*

El aceite de soya (Soy Bean Oil) es el aceite de leguminosa de mayor importancia económica en la actualidad. Ocupa el primer lugar en la producción mundial de aceites vegetales comestibles y su mayor componente es el ácido linoleico, un ácido graso esencial. La composición en FA del aceite de soya se presenta en la **Tabla 2.4**.

Tabla 2.4 Composición (%) en ácidos grasos del aceite de soya

Ácido Graso		Media (%)
C16:0	palmítico	10
C18:0	esteárico	5
C18:1	oleico	21
C18:2	linoleico	53
C18:3	linolénico	8
C20:0	aráquico	0.5
C20:1	gadoleico	0.5

El aceite de palma, como el de palmiste y el de soya, al igual que la mayoría de las grasas y aceites, contienen TAG que presentan en su estructura ácidos grasos de cadena larga o ácidos grasos de cadena media o corta. Son escasos los TAG que contienen simultáneamente, ácidos grasos de cadena corta o media y larga unidos a la misma molécula de glicerol. Los TAG así conformados son los que constituyen los **lípidos estructurados** y están adquiriendo cada vez mayor importancia en el mundo debido a las ventajas nutritivas que genera su consumo y son el objetivo de este trabajo.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Materias primas, solventes y equipos

- **Materia prima:**

El aceite de palmiste (PKO), la superestearina de palma (SEP) y el aceite de soya (SBO), fueron suministrados por la empresa C.I. Santandereana de Aceites S.A., y caracterizados en cuanto a su composición en ácidos grasos, acilgliceroles, perfiles de fusión, acidez, usando los métodos señalados en el numeral **2.2.2**.

Los aceites fueron utilizados para obtener las mezclas de aceites para la reacción de transesterificación: la primera formada por aceite de soya-aceite de palmiste, en adelante se identificará como SBO:PKO; la segunda, formada por aceite de soya y superestearina de palma que en adelante se identificará como SBO:SEP.

- **Solventes:**

El metanol, el etanol, el n-hexano, el éter de petróleo, el n-butanol, la acetona, el NaOH, el KOH y los demás reactivos grado analítico fueron todos marca Merck.

- **Compuestos de referencia:**

Los patrones de metil ésteres de ácidos grasos (*Fatty Acid Methyl Ester Mix* Supelco Cat. N° 18918-1 Amp), monoacilgliceroles (monolauril R-476280, Lote LA85827; monomiristoil R-476290, Lote LA85829; monopalmitoil R-476300, Lote LB01416; monoestearoil R-476310, Lote LA85867), diacilgliceroles (dilaurina R-476285, Lote LB02113; dimiristina R-476295, Lote LA85830; dipalmitina R-476305, Lote LA99719; y diestearina R-476205, Lote LB00094), triacilgliceroles (*Triglyceride Mix*, 17811-1AMP compuesta por tricaprina, tricaprilina, trilaurina, trimiristina y tripalmitina; Trilaurina R-301245, Lote LA95446; trimiristina R-421510, Lote LA85716; tripalmitina R-421500, Lote LA97189; triestearina R-421545, Lote LA97905), y colesterol Sigma C8667 pureza $\geq 99\%$ se compraron a Sigma

Chemical Co., mientras que los aceites de referencia para palmiste (*coconut oil* Supelco Cat. N° 47112-U), palma (*palm oil* Supelco Cat. N° 46962) y soya (*soybean oil* Supelco Cat. N° 47122) se compraron a Supelco Co.

- **Equipos:**

Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 20 Mhz Bruker Minispec mq-20 Mhz (Rheinstetten, Germany). Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 (Palo Alto, California, USA) equipado con detector de ionización en llama (FID) e inyector *split* e inyector *On column*. Columnas capilares para cromatografía de gases DB-WAX Ref. 122-7032 (0.25 mm ID* 30 m * 0.25 µm) y DB-17ht Ref. 123-1831 (0.32 mm ID * 30m * 0.15 µm) compradas a J&W SCIENTIFIC. Columna capilar Mtx-65TG Cat # 17008 (0.25 mm ID * 30 m * 0.1 µm) comprada a Restek Corporation. Valorador automático (pH-stat) marca *Mettler Toledo*, modelo DL50 *Graphix* (Columbus, Ohio, EE.UU.). Balanza analítica de precisión ($\pm 1\mu\text{g}$) modelo AB204-S marca *Mettler Toledo* (Columbus, Ohio, EE.UU.). pH-metro modelo HI 223 marca *Hanna instruments*. Baños termostatos marca *MLW* (Berlin, Alemania). Bureta automática Dosimat 665 (Metrohn, Suiza). Viscosímetro para líquidos Visco Easy L, de Schott (Cambridge, UK). Penetrómetro con cono metálico de ángulo de 45°.

2.2.2 Métodos de análisis

2.2.2.1 Análisis de ácidos grasos

La composición en ácidos grasos de las materias primas y productos de interesterificación se determinó por cromatografía de gases de alta resolución, transformando los ácidos en sus correspondientes metil ésteres por el método del KOH en metanol (Cert *et al.*, 2000; Watson, 1993; IUPAC method 2.301, 1987). La identificación se realizó por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de FAME (*Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1) analizado bajo las mismas condiciones de elución, descritas a continuación:

Cromatógrafo: *Agilent Technologies HP 6890 Plus*
Columna: DB-WAX (30m x 0.32mm x 0.25µm)
Gas de arrastre: Helio
Horno: 50 °C por 2 min, 50-250 °C a 12 °C/min, 250 °C 10 min.
Inyector: *Split* (10:1), 250 °C
Detector: FID, a 300 °C
Nitrógeno como *gas make up* a 30 ml/min.

La cuantificación se realizó por el método del estándar interno usando tridecano como patrón. En la **Tabla 2.5** se presentan los tiempos de retención de los diferentes FA presentes en las materias primas, sus fórmulas condensadas, los nombres comunes y las ecuaciones de las curvas de calibración correspondientes, utilizadas para la cuantificación de los FA en las muestras. En la **Figura 2.1** se muestra el perfil cromatográfico de la muestra patrón de FAME.

2.2.2.2. Análisis de acilgliceroles

El análisis de acilgliceroles de los sustratos y de los productos de interesterificación se efectuó por cromatografía de gases de alta temperatura HTGC según los procedimientos descritos por Padley *et al.*, 1980; Geeraert *et al.*, 1987; Forsell *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 1992; Buchgraber y Anklam, 2003. Como patrón interno se utilizó colesterol.

En principio, los grupos de TAG con diferente número de acil carbono (ACN) y de dobles enlaces (DB), presentes en una grasa o aceite se pueden separar por cromatografía de gases capilar, bajo una programación de temperatura. Los TAG eluyen de acuerdo a su peso molecular y se identifican con referencia a una solución de estándares de triacilgliceroles. Si la columna es de polaridad intermedia o polarizable los TAG de igual número de acil carbono se separan también de acuerdo con el grado de insaturación de sus residuos acilo; Sin embargo, los triacilgliceroles con igual número de acil carbono y de dobles enlaces

(ACN:DB) eluyen en mismo pico cromatográfico.

En consecuencia, en la presente investigación, la identificación de los TAG componentes de los sustratos y productos de reacción se hará en función del número de acil carbono y dobles enlaces, más que por una estructura particular

Tabla 2.5 Tiempos de retención de los FA patrón y curvas de calibración

Fórmula	Nombre	Tiempo Retención (min)	Curva de calibración
C6:0	Hexanoico	6.46	$y = 2.5232x - 0.0994$ $R^2 = 0.9992$
C13	Tridecano (P.I)	7.82	
C8:0	Octanoico	8.87	$y = 2.5343x - 0.0992$ $R^2 = 0.9998$
C10:0	Decanoico	11.03	$y = 2.6220x - 0.2070$ $R^2 = 0.9992$
C12:0	Láurico	13.00	$y = 2.9311x - 0.2664$ $R^2 = 0.9994$
C14:0	Mirístico	14.74	$y = 3.1129x - 0.2950$ $R^2 = 0.9997$
C16:0	Palmítico	16.35	$y = 3.3244x - 0.3797$ $R^2 = 0.9996$
C16:1	Palmitoleico	16.55	$y = 3.3851x - 0.1574$ $R^2 = 0.9996$
C18:0	Estearico	17.84	$y = 3.5116x - 0.2333$ $R^2 = 0.9998$
C18:1n9c	Cis-9-Oleico	18.00	$y = 3.4632x - 0.1905$ $R^2 = 0.9997$
C18:2n6c	Linoleico	18.35	$y = 3.7789x - 0.1894$ $R^2 = 0.9995$
C18:2n6t	Linolelaídico	18.41	$y = 3.7789x - 0.1894$ $R^2 = 0.9995$
C18:3n6	γ -Linolénico	18.72	$y = 3.9505x - 0.1736$ $R^2 = 0.9996$
C18:3n3	Linolénico	18.77	$y = 3.9505x - 0.1736$ $R^2 = 0.9996$
C20:0	Araquídico	19.22	$y = 3.8148x - 0.1671$ $R^2 = 1.0000$
C22:0	Behenico	20.86	$y = 4.0558x - 0.1339$ $R^2 = 0.9997$
C22:1n9	Erúcico	21.12	$y = 3.8263x - 0.0903$ $R^2 = 0.9999$
C24:0	Lignocérico	23.20	$y = 4.3394x - 0.2036$ $R^2 = 0.9988$

y = concentración del ácido en la muestra,

x = es la razón de áreas de los picos (señales cromatográficos del componente (A_{FA}) y del estándar interno (A_{IS})).

$x = A_{FA}/A_{SI}$.

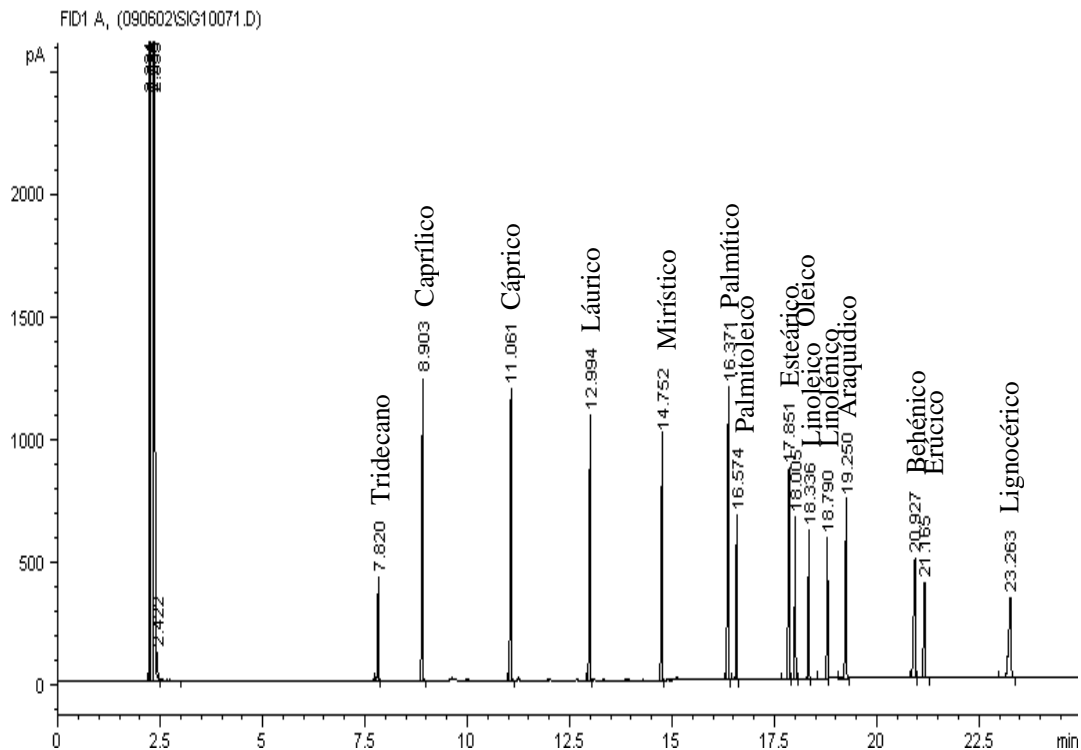


Figura 2.1 Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de FAME. GC/FID; Columna DB-WAX (30m x 0.32mm x 0.25µm). Inyección: 1µl (*Split* 10:1)

En la **Figura 2.2** se muestra el perfil cromatográfico de los TAG de la mezcla patrón. En el **Anexo 1**, se describe la preparación de las soluciones patrón de TAG, la concentración de cada uno de ellos en las diferentes soluciones estándar, un estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención, los tiempos de retención relativos, las áreas, las áreas relativas y los factores de respuesta y factores de respuesta relativos de cada uno de los picos cromatográficos correspondientes a los TAG. Así también se muestran los perfiles cromatográficos de las mezclas de monoacilgliceroles y diacilgliceroles y de los aceites sustratos utilizados en este estudio. Las condiciones de elución fueron:

Cromatógrafo: *Agilent Technologies HP 6890 Plus*
Columna: MXT-65TG alta temperatura, polaridad media,
30 m, 0.25 mm ID, 0.1 μm film
Gas de arrastre: Helio a 40 cm/s
Horno: 240 °C (1 min) a 360 °C (8 °C/min).
Inyector: *On-column*, 0.5 μl de solución de TAG
Detector: FID, a 370 °C
Nitrógeno como *gas make up* a 30 ml /min.

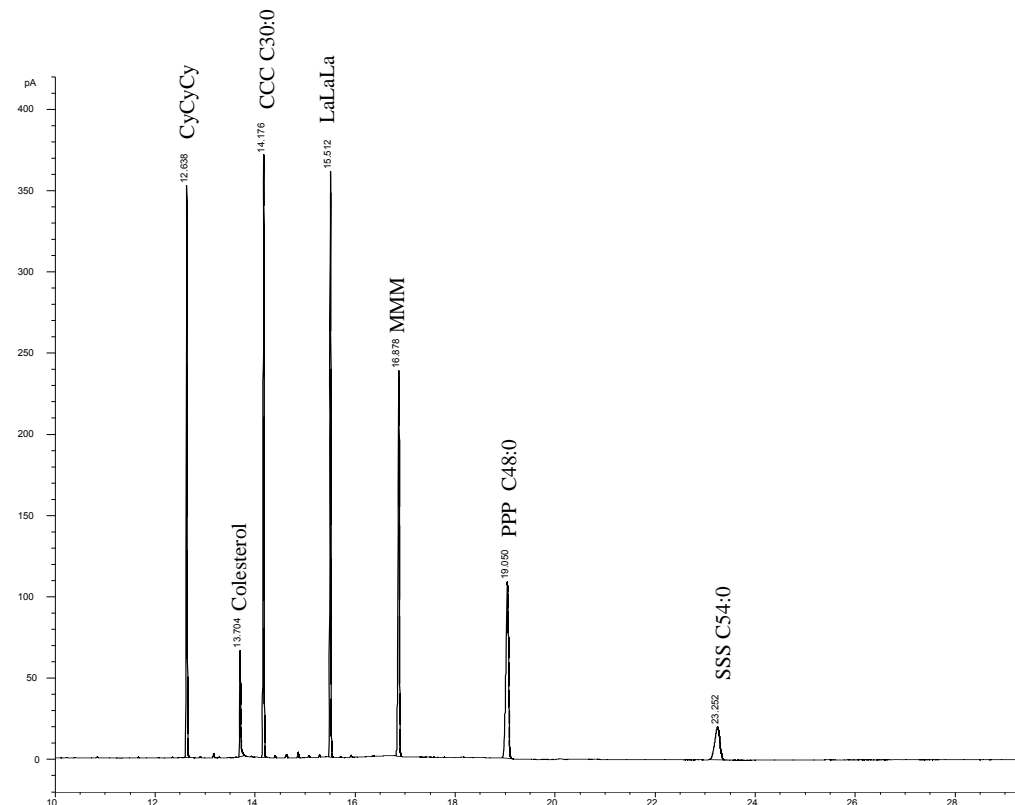


Figura 2.2 Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de TAG obtenido por HTGC. GC/FID. Columna MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μm , de alta temperatura). Inyección: 0.5 μl TAG disueltos en hexano *On column*. CyCyCy= tricaprilina, CCC= tricaprina, LaLaLa= trilaurina, MMM= trimiristina, PPP= triplmitina, SSS = triestearina.

- Linealidad de la respuesta del detector

Se prepararon soluciones de diferentes concentraciones de la mezcla patrón de TAG con ACN:DB variando entre C24:0 y C54:0, las cuales se inyectaron por triplicado al GC para determinar las ecuaciones de regresión lineal (**Tabla 2.6**) que relacionan la respuesta del detector con la masa del analito.

Los valores de r^2 para los patrones utilizados variaron entre 0.9906 a 0.9954 indicando buena linealidad en la respuesta del detector bajo las condiciones de trabajo utilizadas. En la **Figura 2.3** se muestra los factores de respuesta relativa del detector en función del tiempo de retención del analito. Los factores de respuesta relativos para los TAG desconocidos se determinaron por interpolación a partir los RR_f conocidos, haciendo uso de la ecuación de regresión descrita en la **Figura 2.4**. Estos factores de respuesta se presentan en la **Tabla 2.7**.

Tabla 2.6 Curvas de calibración para la serie de triacilgliceroles saturados.

Inyección *on-column* y *split* (10:1)

ACN:DB	Inyector <i>On-column</i>		Inyector <i>Split/splitless</i>	
	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²
C24:0 (C8:C8:C8)	y= 0.0119x	0.9950	Y= 0.2739X	0.9927
C30:0 (C10:C10:C10)	y= 0.0111x	0.9954	Y= 0.2465X	0.9922
C36:0 (C12:C12:C12)	y= 0.0111x	0.9952	Y= 0.2385X	0.9906
C42:0 (C14:C14:C14)	y= 0.0117x	0.9947	Y= 0.2391X	0.9908
C48:0 (C16:C16:C16)	y= 0.0140x	0.9941	Y= 0.2701X	0.9922
C54:0 (C18:C18:C18)	y= 0.0378x	0.9935	Y= 0.7052X	0.9930

Donde: x: relación de áreas. y: concentración (mg/ml). R² = coeficiente de correlación

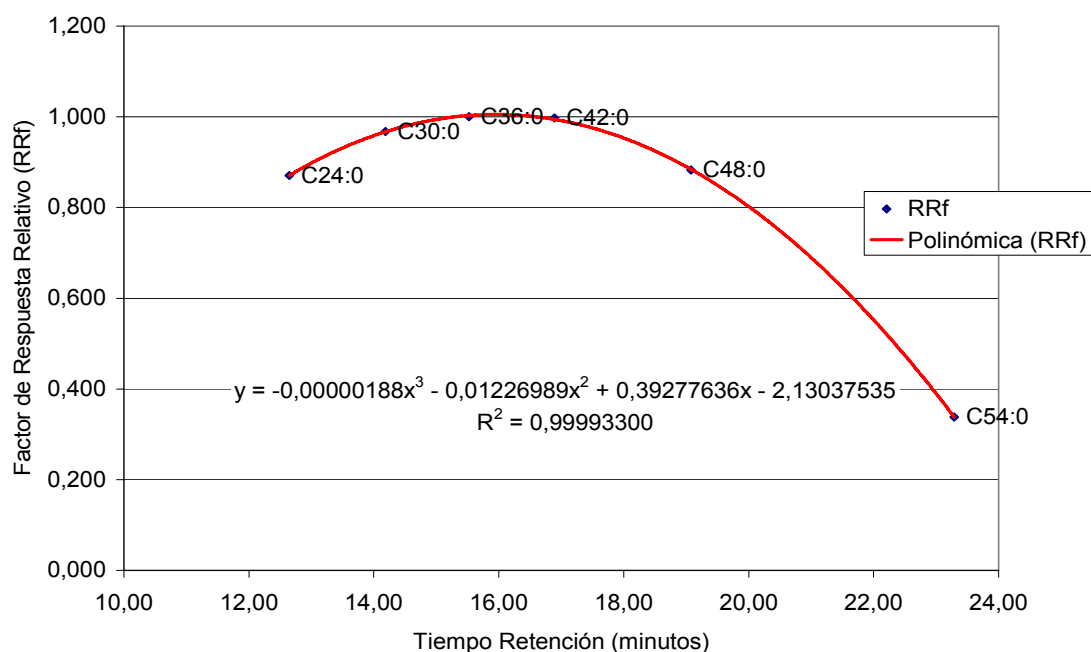


Figura 2.3 Factores de respuesta relativos (RR_f) para la serie de TAG saturados en función del tiempo de retención.

Tabla 2.7 Factores de respuesta relativos (RR_f) para los TAG con ACN:DB de C24:0 a C54:7, calculados usando la ecuación descrita en la Figura 2.4

TAG	RR_f	TAG	RR_f	TAG	RR_f
C24:0	0,924	C42:3	0,983	C50:2	0,729
C26:0	0,955	C44:0	0,976	C50:3	0,699
C30:0	0,969	C44:1	0,972	C50:4	0,653
C32:0	0,985	C44:2	0,965	C52:0	0,624
C34:0	0,996	C44:3	0,956	C52:1	0,582
C36:0	1,003	C46:0	0,943	C52:2	0,538
C38:0	1,005	C46:1	0,935	C52:3	0,466
C38:1	1,005	C46:2	0,923	C52:4	0,386
C38:2	1,005	C46:3	0,911	C54:1	0,282
C40:0	1,003	C48:0	0,886	C54:2	0,272
C40:1	1,002	C48:1	0,872	C54:3	0,263
C40:2	1,000	C48:2	0,856	C54:4	0,252
C40:3	0,998	C48:3	0,832	C54:5	0,230
C42:0	0,994	C48:4	0,805	C54:6	0,210
C42:1	0,992	C50:0	0,787	C54:7	0,180
C42:2	0,989	C50:1	0,765		

2.2.2.3 %Hidrólisis - Índice de acidez

La cantidad de ácidos grasos libres en el aceite después de la reacción de transesterificación es consecuencia de la hidrólisis de los sustratos por acción de la lipasa, y se calculó a partir del índice de acidez del aceite transesterificado, determinado según la norma NTC 218 y el índice de saponificación de la mezcla inicial, determinado según la NTC 235, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Hidrólisis} = \frac{I.A_{final} - I.A_{inicial}}{I.S - I.A_{inicial}} \times 100$$

Donde, $I.A_{inicial}$ e $I.A_{final}$ son el índice de acidez del aceite antes y después de la reacción; $I.S$ es el índice de saponificación del aceite.

2.2.2.3 Perfiles de fusión

Los perfiles de fusión se midieron por RMN de baja resolución (método AOCS Cd 16b-93 de 1996), siguiendo los procedimientos descritos por Chong *et al.*, 1992 y Forssell *et al.*, 1992. Para ello, las grasas se atemperan a 70 °C por 7 minutos y luego se someten a un enfriamiento a 0 °C por 60 minutos y luego se llevan 30 minutos a la temperatura deseada inmediatamente antes de realizar la lectura.

2.2.2.4 Puntos de fusión

Los puntos de fusión se determinaron según el método AOCS Cc 3-25.

2.2.2.5 Consistencia

La determinación de la consistencia se efectuó de acuerdo al método oficial de la AOCS Cc 16-60, utilizando un penetrómetro con cono metálico de ángulo de 45°. Las muestras se fundieron y calentaron a 70 °C durante 7 minutos, se transfirieron a vasos de 250 mL y se atemperaron 24 horas en refrigerador a 5-8 °C, seguido

de 24 horas en estufa de temperatura controlada de 25 °C, inmediatamente después de lo cual se realizó la medida. Para el cálculo de la tensión inicial o consistencia, se utilizó la ecuación propuesta por Haighton (1959):

$$C = K \times W / P^{1.6}$$

Donde: C: Tensión inicial (consistencia), en g/cm²

K: Factor dependiente del ángulo del cono (para 45°, K= 4700)

W: Peso total de sistema, en g (para penetrómetro de cono).

P: Profundidad de penetración, en 0,1 mm (para un tiempo de 5 s)

2.2.2.7 Viscosidad

La viscosidad de las mezclas y productos de interesterificación se determinó según la Norma ASTM D445-74 utilizando un viscosímetro Visco Easy L.

2.3 RESULTADOS

La longitud de la cadena carbonada de los FA, el grado de saturación y su ubicación en la estructura del glicerol son factores que afectan las propiedades físicas, químicas y funcionales de las grasas. Para los nutricionistas, los mismos factores afectan la biodisponibilidad y la contribución energética. Para los tecnólogos de alimentos, el punto de fusión, la viscosidad, el comportamiento de fases y el perfil de fusión de las grasas determinan su funcionalidad dentro de los alimentos (D'Agostini, 2001). En la **Tabla 2.8** se presentan los aceites usados como materias primas y sus las mezclas binarias, las cuales fueron identificadas con los números del 1 al 13.

Tabla 2.8 Composición de las mezclas binarias evaluadas

Mezcla (Nº)	Componentes (% p/p)		
	Aceite de Palmiste (PKO)	Aceite de Soja (SBO)	Superestearina (SEP)
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	70	30	0
5	60	40	0
6	50	50	0
7	40	60	0
8	30	70	0
9	0	70	30
10	0	60	40
11	0	50	50
12	0	40	60
13	0	30	70

2.3.1 Composición en ácidos grasos de materias primas y mezclas binarias.

La composición en ácidos grasos de las grasas individuales y de sus mezclas binarias (**Tabla 2.9**) se encuentra dentro de los valores reportados en la bibliografía y dentro de las especificaciones comerciales de los fabricantes. El aceite de palmiste es rico en ácidos grasos de cadena media (C10:0, C14:2 y C14:0), mientras que el aceite de soja es fuente importante de ácidos grasos esenciales, particularmente linoleico (C18:2n6c) (83%). La superestearina de palma está compuesta principalmente por ácido palmítico (C16:0).

Tabla 2.9 Composición en ácidos grasos de las grasas individuales y sus mezclas binarias (%p/p)

Ácido (CN:DB)*	Mezcla (Nº)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C6:0	0,3	-	-	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-
C8:0	3,7	-	-	2,6	2,2	1,9	1,5	1,1	-	-	-	-	-
C10:0	3,0	-	-	2,1	1,8	1,5	1,2	0,9	-	-	-	-	-
C12:0	48,0	-	-	33,6	28,8	24,0	19,2	14,4	-	-	-	-	-
C14:0	15,7	-	0,5	11,0	9,4	7,9	6,3	4,7	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4
C16:0	8,6	10,8	83,0	9,3	9,5	9,7	9,9	10,1	32,5	39,7	46,9	54,1	61,3
C18:0	2,0	4,1	5,5	2,6	2,8	3,1	3,3	3,5	4,5	4,7	4,8	4,9	5,1
C18:1n9c	16,2	21,9	8,9	17,9	18,5	19,1	19,6	20,2	18,0	16,7	15,4	14,1	12,8
C18:2n6c	2,5	56,6	1,6	18,7	24,1	29,6	35,0	40,4	40,1	34,6	29,1	23,6	18,1
C18:2n6t	-	0,6	-	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2
C18:3n6	-	1,3	-	0,4	0,5	0,7	0,8	0,9	0,9	0,8	0,7	0,5	0,4
C18:3n3	-	4,4	-	1,3	1,8	2,2	2,6	3,1	3,1	2,6	2,2	1,8	1,3
C20:0	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,0
C22:0	-	0,2	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

*CN:DB Número de átomos de carbono: número de dobles enlaces.

2.3.2 Composición en acilglicérols de la superestearina de palma, el aceite de palmiste, el aceite de soya y sus mezclas binarias.

Los principales TAG componentes del aceite de soya son el LLL (C54:6), LLO (C54:5), LLP (C52:4), LOO (54:4) y POL (52:3), los cuales representan más del 70% del total (List *et al.*, 2000; Humphrey *et al.*, 2003); para la superestearina de palma lo son: PPP (C48:0), POP (C50:1), POO (C52:2) y PPS (C52:0) que representan cerca del 80% del total y, para el aceite de palmiste LaLaLa (C36:0), LaLaM (C38:0) y LaMM (C40:0) (véase la **Tabla 2.10**).

Tabla 2.10 Composición en TAG del aceite de palmiste (PKO), el aceite de soya (SBO) y la superestearina de palma (SEP)

TAG (ACN : DB)*	Tiempo retención minutos	TAG (%Área)			TAG (%Peso)		
		PKO	SBO	SEP	PKO	SBO	SEP
C26:0	13,380	0,5%	-	-	0,5%	-	-
C28:0	13,926	0,2%	-	-	0,2%	-	-
C30:0	14,194	1,4%	-	-	1,4%	-	-
C32:0	14,667	7,2%	-	-	6,9%	-	-
C34:0	15,104	9,8%	-	-	9,2%	-	-
C36:0	15,538	24,1%	-	-	22,6%	-	-
C38:0	15,956	17,8%	-	-	16,7%	-	-
C40:0	16,399	10,4%	-	-	9,8%	-	-
C42:0	16,901	4,2%	-	-	4,0%	-	-
C42:1	16,991	4,4%	-	-	4,2%	-	-
C42:2	17,113	0,5%	-	-	0,4%	-	-
C44:0	17,488	1,5%	-	-	1,5%	-	-
C44:1	17,597	3,5%	-	-	3,4%	-	-
C44:2	17,768	0,8%	-	-	0,8%	-	-
C44:3	17,942	0,1%	-	-	0,1%	-	-
C46:0	18,198	0,5%	-	2,6%	0,5%	-	2,1%
C46:1	18,336	3,4%	-	-	3,4%	-	-
C46:2	18,517	0,5%	-	0,2%	0,6%	-	0,2%
C48:0	19,066	0,3%	-	53,7%	0,4%	-	45,7%
C48:1	19,241	1,5%	-	0,5%	1,6%	-	0,4%
C48:2	19,432	2,3%	-	0,1%	2,5%	-	0,1%
C48:3	19,689	0,4%	-	0,2%	0,5%	-	0,2%
C50:0	20,240	0,0%	-	9,0%	0,0%	-	8,7%
C50:1	20,366	1,1%	2,4%	16,1%	1,3%	0,9%	15,8%
C50:2	20,594	0,9%	4,4%	3,0%	1,1%	1,8%	3,1%
C50:3	20,929	0,1%	-	-	0,2%	-	-
C50:4	21,253	0,0%	-	-	0,0%	-	-
C52:0	21,572	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%	-	1,0%
C52:1	21,806	0,3%	1,0%	2,2%	0,4%	0,5%	2,9%
C52:2	22,095	1,1%	7,2%	6,9%	2,0%	4,0%	9,6%
C52:3	22,522	0,3%	12,8%	2,1%	0,7%	8,1%	3,4%
C52:4	23,008	-	17,1%	0,4%	-	13,2%	0,7%
C52:5+C54:1	23,602	-	2,4%	0,2%	-	2,6%	0,4%
C54:2	24,007	0,2%	1,5%	0,6%	0,6%	1,6%	1,6%
C54:3	24,399	0,5%	5,8%	1,1%	1,6%	6,7%	3,0%
C54:4	24,985	0,2%	11,6%	0,3%	0,7%	13,8%	1,0%
C54:5	25,764	-	15,7%	-	-	20,5%	-
C54:6	26,473	-	16,1%	-	-	22,9%	-
C54:7	27,171	-	2,0%	-	-	3,3%	-

*ACN:DB Número de carbonos de los grupos acilo: número de dobles enlaces en el TAG.

2.3.2.1 Puntos de fusión, consistencia y viscosidad de las mezclas binarias de aceite de palmiste, superestearina de palma y aceite de soya

Los puntos de fusión, la consistencia a 7 y 25 °C y la viscosidad a 50 y 60 °C de las grasas individuales y sus mezclas binarias se presentan en la **Tabla 2.11**.

El punto de fusión promedio del aceite de palmiste fue 27.8 °C (± 1 °C), el de la superestearina de palma 59 °C (± 1 °C) y el del aceite de soya -7 °C (± 1 °C). En la medida en que se incrementa la participación del aceite de soya en las mezclas binarias SBO:PKO y SBO:SEP, los puntos de fusión disminuyen en forma lineal hasta que el SBO alcanza un 60% (**Figura 2.4**) y la mezcla queda compuesta por aproximadamente el 35% de ácido linoleico. Concentraciones mayores de SBO causan un descenso más pronunciado.

La textura de los alimentos, medida como consistencia o como plasticidad (cambios de consistencia en función de la temperatura), es una de las características sensoriales más importantes de los productos grasos (Wassell and Young, 2007; Karabulut *et al.*, 2004). Las grasas plásticas son mezclas de cristales de grasa sólida y aceite líquido que soportan determinados niveles de tensión antes de deformarse (Deman, 1983; Narine y Marangoni, 1999; Ghotra *et al.*, 2002; Marangoni, 2002).

Los valores de consistencia de la SEP y el PKO indican que son grasas muy duras a 7 °C, en tanto que el SBO continua siendo líquido.

Las mezclas binarias de SBO:PKO y SBO:SEP resultan en grasas más blandas en la medida que se incrementa la participación del aceite de soya. Sin embargo, después de que la participación del SBO ha superado un 55% aproximadamente, el cambio en la consistencia es menor **Figura 2.5**.

Tabla 2.11 Puntos de fusión, viscosidad, consistencia, índice de saponificación e índice de acidez de las grasas individuales y sus mezcla binarias.

Mezcla (Nº)	Componentes (% p/p)			Punto fusión	Viscosidad a 50 °C	Consistencia (7 °C)	I.S ^b	I.A ^c
	PKO	SBO	SEP	(°C)	cP	(g/cm ²)		
1	100	0	0	27.8	25	292	248	0.054
2	0	100	0	-7.0	29	0	192	0.041
3	0	0	100	59.0	103 ^a	3427	208	0.050
4	70	30	0	25.0	24	1429	231	0.050
5	60	40	0	24.2	26	820	226	0.049
6	50	50	0	23.5	25	472	220	0.048
7	40	60	0	21.5	25	299	214	0.046
8	30	70	0	19.3	27	143	209	0.045
9	0	70	30	47.1	20 ^a	119	197	0.053
10	0	60	40	50.5	20 ^a	240	198	0.052
11	0	50	50	51.6	21 ^a	472	200	0.052
12	0	40	60	53.0	21 ^a	1017	202	0.052
13	0	30	70	54.9	22 ^a	1630	203	0.051

a. Viscosidad medida a 60 °C

b. Índice de saponificación, expresado en mg KOH / g muestra.

c. Índice de acidez, expresado en mg KOH / g muestra

A 50 °C las mezclas binarias de SBO:PKO son líquidas con una viscosidad promedio de 25 ± 1 cp, en tanto que las mezclas de SBO:SEP aun contienen cristales de grasa. A 60 °C las mezclas de SBO:SEP son líquidas con una viscosidad promedio de 21 ± 1 cp; luego, a partir de 60 °C se pueden trabajar todas las mezclas de aceites SBO:PKO y SBO:SEP sin problema de discriminación de masa (triacilgliceroles) en las reacciones de transesterificación.

En cuanto al índice de acidez, todas las grasas y sus combinaciones binarias presentaron valores bajos que oscilaron entre 0.04 y 0.06 mg KOH / g muestra.

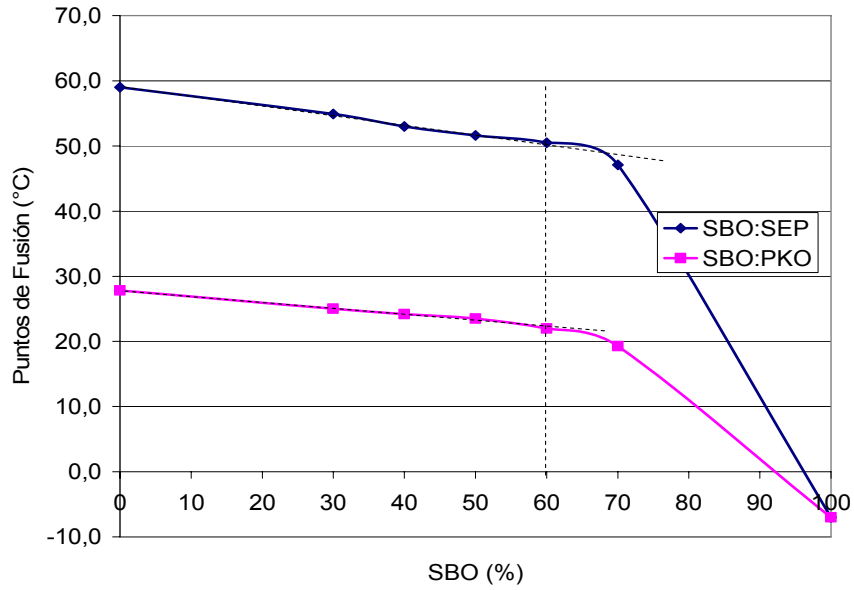


Figura 2.4 Variación en los puntos de fusión de las mezclas SBO:SEP y SBO:PKO en función de la participación del SBO.

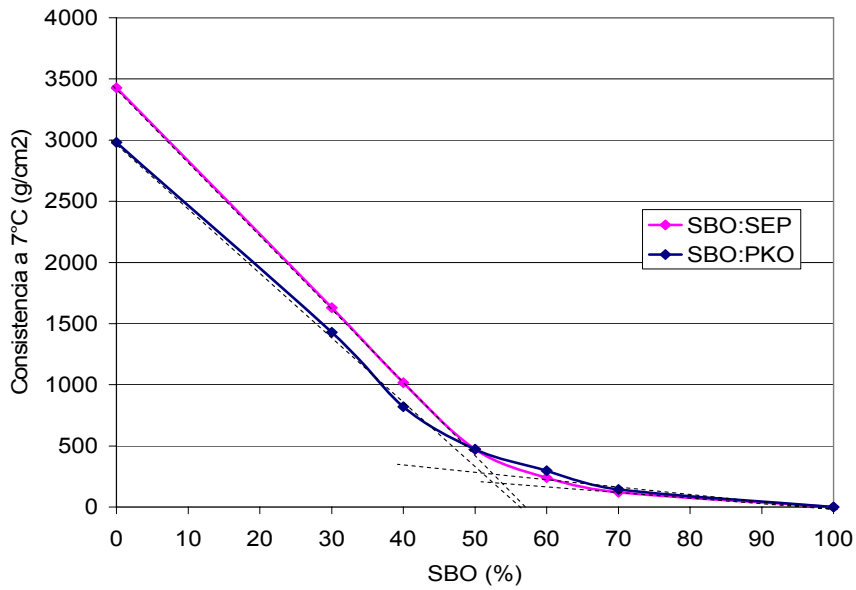


Figura 2.5 Variación de la consistencia a 7 °C de las mezclas binarias SBO:SEP y SBO:PKO en función de la participación del SBO.

2.3.3 Contenido de grasa sólida (SFC)

La curva SFC es la herramienta principal para las especificaciones de las grasas utilizadas como base para elaborar margarinas y productos grasos especiales. En la **Tabla 2.12** se presentan los valores SFC determinados a diferentes temperaturas y en las **Figuras 2.6 y 2.7** las curvas SFC para las mezclas SBO:PKO y SBO:SEP, respectivamente.

Tabla 2.12 Valores de SFC de las grasas individuales y sus mezclas binarias.

Mezcla (Nº)	Componentes (% p/p)			SFC (%)								
	PKO	SBO	SEP	5 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	
1	100	0	0	74,8	67,9	60,9	43,7	20,3	0,0	0,0	0,0	
2	0	100	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
3	0	0	100	88,4	84,7	79,1	73,8	68,1	60,2	51,4	42,9	
4	70	30	0	49,4	44,5	34,9	20,3	4,2	0,0	0,0	0,0	
5	60	40	0	41,7	37,1	25,4	13,8	0,5	0,0	0,0	0,0	
6	50	50	0	35,8	29,0	18,5	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	
7	40	60	0	28,8	20,3	12,1	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
8	30	70	0	21,4	12,5	6,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	
9	0	30	70	63,0	59,7	55,5	51,4	46,6	40,8	34,6	28,8	
10	0	40	60	54,4	51,3	47,1	43,0	39,3	34,3	29,1	23,6	
11	0	50	50	45,9	42,7	39,3	35,8	31,8	27,3	22,9	18,7	
12	0	60	40	37,7	34,8	31,6	28,3	24,9	21,0	17,5	14,1	
13	0	70	30	28,9	26,3	23,6	20,8	17,8	14,9	12,2	9,7	

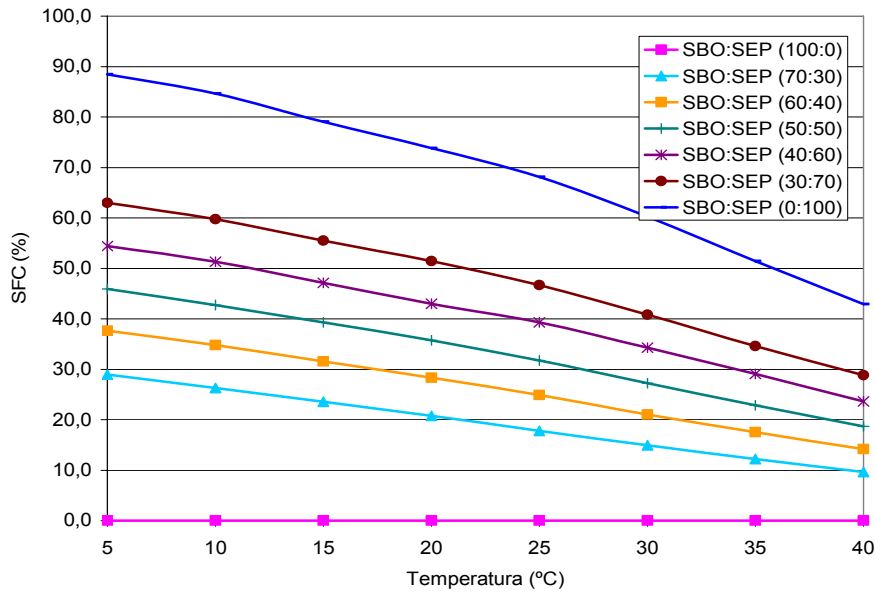


Figura 2.6 Curvas SFC para las mezclas binarias de aceite de soja y superestearina de palma (SBO:SEP)

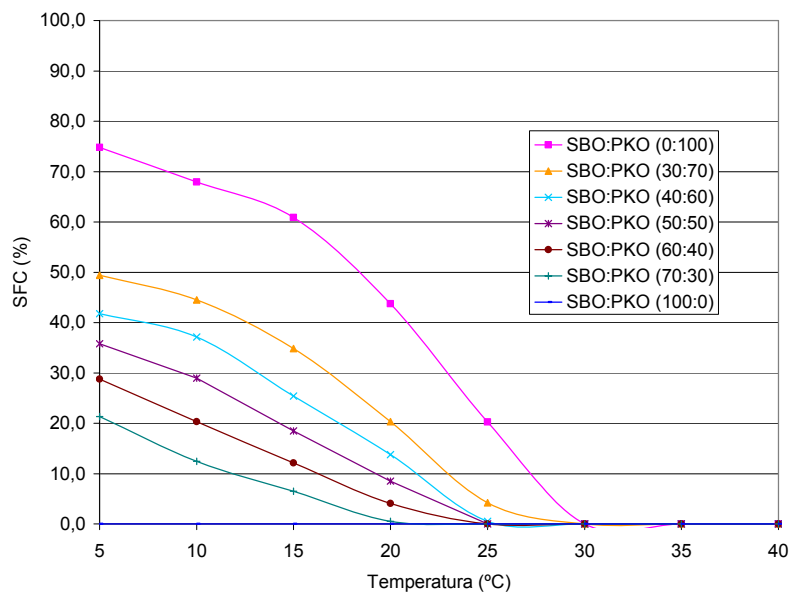


Figura 2.7 Curvas SFC para las mezclas binarias de aceite de soja y aceite de palmiste (SBO:PKO)

Los resultados muestran que el PKO es una grasa con alto contenido de sólidos a bajas temperaturas, el cual disminuye rápidamente al aproximarse la temperatura al punto de fusión (27 °C). Su perfil de fusión es muy agudo. Por su parte, la SEP mantiene un alto contenido de grasa sólida aún a 40 °C, mientras que el SBO se mantiene líquido en el rango de temperatura evaluado (0 a 40 °C). En las mezclas binarias los valores SFC, a diferentes temperaturas, disminuyen en la medida en que aumenta la participación de aceite de soya (SBO).

En resumen, se encuentra que todas las mezclas binarias SBO:PKO evaluadas funden a temperaturas inferiores o iguales a 25 °C y partir de 30 °C no presentan grasa en estado sólido, por lo tanto se podrían utilizar sin problemas de discriminación de masa (triacilgliceroles) en las reacciones de transesterificación a temperaturas superiores o iguales a 30 °C . Por su parte, las mezclas binarias SBO:SEP funden a temperaturas menores de 55 °C y se podrían utilizar en la reacciones de transesterificación a temperaturas superiores o iguales a 60 °C para evitar la discriminación de masa.

Una vez realizada la caracterización de las materias primas y la de las mezclas binarias, se procede a evaluar la reacción de interesterificación utilizando las enzimas inmovilizadas, tal como se muestra en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 3

3. OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS POR INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE DE SOYA Y ACEITE DE PALMISTE EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO- TANQUE AGITADO

3.1 INTRODUCCIÓN

Los lípidos estructurados (SL) se pueden definir como triacilgliceroles modificados que contienen en su estructura ácidos grasos de cadena corta (SCFA), o cadena media (MCFA) y ácidos grasos de cadena larga (LCFA), sobre una misma molécula de glicerol.

Son triacilgliceroles desarrollados para cumplir funciones específicas por lo que también se consideran compuestos “hechos a la medida” (Xu, *et al.*, 2001; Iwasake y Yamane, 2000). Proveen simultáneamente los efectos benéficos de los ácidos grasos de cadena larga (como fuente de ácidos grasos esenciales, EFA), liberados a una menor velocidad y los beneficios de los ácidos grasos de cadena media, liberados a mayor velocidad (Lai y Chen, 2000; Gollaher *et al.*, 1993; Lima *et al.*, 1988; Dennison *et al.*, 1986). Esto ha generado el desarrollo de nuevos conceptos sobre la administración de lípidos en nutrición parenteral y enteral de pacientes críticamente enfermos, como fuente rápida de energía (Wanted y Calder, 2007; Matulka *et al.*, 2006; Matsuo y Takeuchi, 2004).

Los SL se han propuesto para reemplazar las emulsiones lipídicas de uso endovenoso usadas en nutrición parenteral y enteral (Waitzberg *et al.*, 2006;

Dupon y Carpentier, 2000), producidas actualmente a partir de mezclas físicas de aceites vegetales ricos en TAG de cadena larga (LCT) con aceites ricos en TAG de cadena media (MCT). Adicionalmente, se han sugerido como el medio más efectivo para aportar FAs específicos para propósitos terapéuticos, en el cuidado metabólico de diversos tipos de pacientes y para el público en general, tomando en consideración que la tendencia actual es el desarrollo y consumo de alimentos funcionales para el mantenimiento de un buen estado de salud (Shinohara *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2000).

Dentro de las ventajas atribuidas a los SL con respecto a las mezclas físicas y emulsiones de LCT (Travedi y Singh, 2005; Mu y Porsgaard, 2005; Haman y Shahidi, 2005; Simoens, *et al.*, 2004; González, 2000; Montejo *et al.*, 2001), figuran:

- **Energía rápidamente disponible:** La velocidad de oxidación de los SL es elevada en pacientes postoperatorios en situaciones de estrés, sin efectos secundarios clínicos ni metabólicos.
- **Mejor economía proteica:** Los SL mejoran el balance nitrogenado en los pacientes postoperatorios
- **Concentraciones plasmáticas controladas de MCFA:** Las concentraciones plasmáticas de MCFA son más bajas con SL, en comparación con la administración de mezclas físicas de MCT/LCT y LCT.
- **Mejoran la función inmunológica:** Los SL están diseñados para aportar ácido linoleico en las proporciones adecuadas. El ácido linoleico interviene en el crecimiento de linfocitos, macrófagos y neutrófilos, pero su aporte en exceso tiene múltiples inconvenientes. Se recomienda el 3% del aporte calórico de la dieta, pero en la práctica representa del 10 al 20%, administrados por vía enteral o parenteral (Kew *et al.*, 2003; Osborn y Akoh, 2002; Rodríguez, 1999).

Existen en el mercado productos disponibles como mezclas físicas o emulsiones de LCT y algunos como SL, para aplicaciones médicas en pacientes con VIH/SIDA y en otras condiciones de salud crónica tales como: función gastrointestinal deteriorada, enfermedades hepáticas, deficiencia cardiaca congestiva, pacientes que se recuperan de cirugía e infantes con alergias a alimentos o problemas de digestión. Sin embargo, los SL ofrecen ventajas metabólicas como se mencionó anteriormente, por lo que su aplicación tiene un alto potencial de desarrollo (Hamam y Shahidi, 2007a, 2007b; Craig *et al.*, 1997; Wankel *et al.*, 1996).

Entre los productos que se comercializan actualmente figuran:

- El **Impact** de Novartis Nutrition, contienen SL aleatorizados por interesterificación química y se usa en pacientes que han sufrido traumas mayores o cirugía, sepsis, o cáncer.
- El **Betapol** es un SL desarrollado por Unilever (Inglaterra) para uso en formulaciones infantiles. Imita la distribución en ácidos grasos de la grasa de la leche humana (Osborn y Akoh, 2002; Haumann, 1997).
- **Structolipid e Intralip** (Pharmacia & Upjohn AB, Estocolmo, Suecia) son TAG compuestos de MCFA y LCFA en forma aleatoria, producidos para usos médicos en tratamiento con nutrición parenteral total.
- **Caprenin** producido por Procter & Gamble, es un SL de bajo valor calórico que contiene los MCFA y C22:0 ubicados aleatoriamente sobre el glicerol.
- **Salatrim®** producido por Nabisco Foods Group a partir de SCFA, C18:0 y glicerol. Es comercializado en la actualidad como **Benefat** por Cultor Food Science (Ardsley, N.Y., U.S.A.) provee 5 kcal/g.
- **Captex 810D** es un SL de valor calórico reducido, producido por Abitec Corp. (Columbus, Ohio, U.S.A).

La mayoría de estos productos tienen aplicaciones médicas; sin embargo, los SL se pueden sintetizar con el propósito de mejorar o modificar las características físicas (polimorfismo natural, punto de fusión, contenido de grasa sólida,

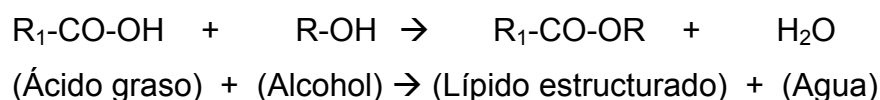
viscosidad y consistencia) o químicas (estabilidad oxidativa) de los triacilglicerolos para aplicaciones específicas de productos alimenticios, por ejemplo, en la obtención de sustitutos de la manteca de cacao (Arango *et al.*, 2004; Moreno y Perea, 2001; Bloomer *et al.*, 1990) y otros compuestos de interés (Chen *et al.*, 2007; Addo, *et al.*, 2005).

3.1.1 Obtención de lípidos estructurados

Los lípidos estructurados se pueden obtener, dependiendo del tipo de sustrato, por esterificación directa o por interesterificación.

3.1.1.1 Esterificación directa

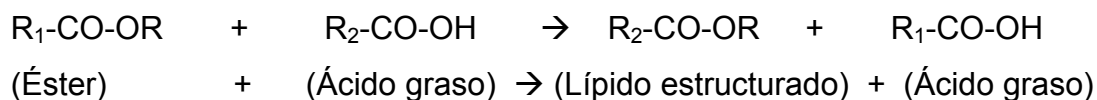
A partir de ácidos grasos y glicerol, como se muestra en la siguiente reacción:



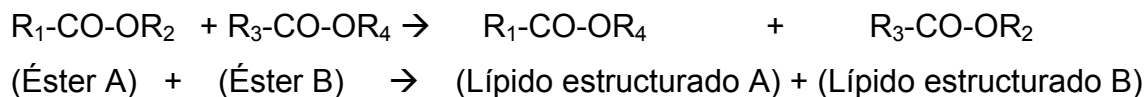
3.1.1.2 Interesterificación

Implica la redistribución de los ácidos grasos entre moléculas de éster, que puede ocurrir por intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido libre (*acidólisis*), o entre un éster y otro éster (*transesterificación*).

- Acidólisis: a partir de acilglicerol y ácidos grasos



- Transesterificación: a partir de acilgliceroles



El reordenamiento de los ácidos grasos en la estructura del triacilglicerol conduce a una alteración de las propiedades físicas y químicas de los aceites y grasas, pero contrario a lo que ocurre en la hidrogenación, en la interesterificación no se produce isomerización de los ácidos grasos *cis* a *trans*, convirtiéndose en una alternativa para obtener productos libres de grasa *trans* (Chen *et al.*, 2007; Liu y Lampert, 1999).

Estas reacciones pueden realizarse en presencia de catalizadores químicos o de enzimas, dando lugar a la interesterificación química o la enzimática, respectivamente.

3.1.1.2.1 Interesterificación química

La interesterificación química es económica y fácil de escalar; sin embargo, la reacción pierde especificidad y ofrece muy poco o ningún control sobre la distribución posicional de los ácidos grasos en los TAG del producto final. Este proceso usualmente envuelve la hidrólisis de una mezcla de MCT y LCT, y reesterificación después de que ha ocurrido una mezcla al azar de los ácidos grasos libres (Klinkesorn *et al.*, 2004; Norizazzah *et al.*, 2004; Osborn y Akoh, 2002; Lee y Akoh, 1998).

Industrialmente se puede realizar calentando el aceite a temperaturas de 200-300 °C, pero es un proceso demorado y normalmente acompañado de isomerización, polimerización y descomposición. Sin embargo, la utilización de compuestos de metales alcalinos y alquilatos de metales alcalinos como catalizadores, permite

reducir la temperatura de reacción a valores entre 50 y 100 °C. Los catalizadores más utilizados son los alquilatos metálicos (metóxido y etóxido de sodio), seguidos del sodio metálico y aleaciones de sodio-potasio así como los hidróxidos de sodio y potasio en combinación con glicerol, como se muestra en la **Tabla 3.1**.

El metilato de sodio se utiliza normalmente en proporción de 0.2 a 0.4% con relación al peso del aceite, es altamente reactivo y tóxico, por lo que debe manejarse con cuidado, evitando su contacto con la humedad y el aire. Los hidróxidos son menos reactivos y necesitan temperaturas más elevadas (150 °C), pero al igual que los anteriores catalizadores, promueven la migración no controlada y aleatoria de los ácidos grasos en los acilgliceroles, con lo que se generan productos colaterales no deseados, (D'agostini, 2001; Iwasaki y Yamane, 2000; De Greyt *et al.*, 1998; Schuchard *et al.*, 1998; Linden, 1996; Fenema, 1993).

Las concentraciones del catalizador deben ser bajas para evitar la formación de jabones, y el aceite que se va a modificar debe estar seco y bien refinado (bajos índices de acidez, peróxidos y jabones), debido a que el agua, los ácidos grasos libres y los peróxidos actúan como veneno de los catalizadores (Rodríguez y Gioiell, 2003; D'Agostini, 2001; De Greyt *et al.*, 1998).

Tabla 3.1 Catalizadores de interesterificación usados en catálisis homogénea.

Catalizadores	(%) (p/p_{aceite})	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Alquilatos metálicos (metóxido de sodio)	0.2-2.0	50-120	5-120
Metales alcalinos (Na, K, aleación Na/K)	0.1-1.0	25-270	3-120
Hidróxidos alcalinos + glicerol	0.05-0.2	60-160	30-45

3.1.1.2.2 Interesterificación enzimática

La interesterificación enzimática se realiza empleando lipasas de origen microbiano. Tiene la ventaja de permitir controlar la distribución de los ácidos grasos sobre la estructura del glicerol, gracias a su selectividad y especificidad. De esta forma, se pueden fabricar grasas “a la medida” con las propiedades funcionales y nutricionales deseadas y sintetizar compuestos ópticamente activos para usos químicos y farmacéuticos, entre otras aplicaciones. (Chon *et al.*, 2007; Osborn y Akoh, 2002; Iwasaki y Yamane, 2000; Xu *et al.*, 2000; Schuchardt *et al.*, 1998).

Adicionalmente, el uso de enzimas evita el empleo de altas temperaturas requeridas por los procesos no enzimáticos, que conducen a la degradación térmica de los productos (p.e., generación de sabores y colores desagradables) y por tanto la necesidad de refinación “aguas abajo” (Paiva *et al.*, 2000).

En comparación con la interesterificación química, los productos interesterificados enzimáticamente no requieren blanqueo ni lavado de la grasa, debido a que no se generan productos colaterales. Las enzimas al ser esteroespecíficas reordenan los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol, preservando el ácido ubicado en la posición *sn*-2, mientras que en el proceso químico las tres posiciones se modifican al azar. De esta forma, se puede obtener una amplia variedad de productos con perfiles de fusión y propiedades nutricionales específicos, así como mejores características sensoriales.

En los procesos enzimáticos los costos de inversión para el montaje de una planta son menores en comparación con los de los procesos de hidrogenación e interesterificación química, pues se requiere únicamente una columna o un tanque como equipo especial. Son además procesos ambientalmente limpios debido a que las enzimas no representan un riesgo para el medio ambiente (Volpato, 2004).

Sin embargo, el alto costo de las enzimas ha sido, quizás, el factor más influyente y limitante para su uso a escala industrial, por lo que en muchas investigaciones se han evaluado diferentes fuentes de lipasas, métodos de extracción y purificación e inmovilización en diferentes soportes, con el fin de disminuir el costo de las mismas (Husum *et al.*, 2005; D'Agostini, 2001; Macrae, 2000; Akoh, 1998). En este sentido, las empresas productoras de enzimas enfocan sus esfuerzos en producir lipasas comerciales de bajo costo que han hecho viables los procesos de interesterificación enzimática (Novozymes, 2003).

Las reacciones de interesterificación se pueden realizar en sistemas en discontinuo y en sistemas en continuo. Para la interesterificación enzimática, el principio de los procesos discontinuos es permitir suficiente tiempo de contacto entre el aceite y la enzima para lograr el grado de interesterificación deseado (Novozymes, 2003). Una vez se ha completado la reacción, se suspende el calentamiento y se separa la mezcla grasa (producto) de la enzima inmovilizada mediante filtración o decantación (Moreno, 2001; Novozymes, 2001). Se puede cargar nuevamente el reactor con sustrato fresco precalentado para un nuevo ciclo de la enzima. Estos reactores se pueden trabajar con dosis de enzima del 2-10% (p/p) respecto al sustrato, temperaturas alrededor de 40 –70 °C en ausencia de solvente y tiempos de reacción de 2 a 8 horas.

La enzima inmovilizada también permite trabajar en reactores continuos tipo lecho empacado o lecho fijo, con una caída de presión mínima a altas velocidades de flujo (Novozymes, 2003). En estos reactores, el sustrato entra en contacto con una gran cantidad de enzima, por lo que el tiempo de reacción se hace menor comparado con los reactores discontinuos, donde la alta relación sustrato/enzima demanda tiempos de reacción mayores para alcanzar el equilibrio.

Investigadores como Zhang *et al.*, 2006; Lai, *et al.*, 2005; Camacho Páez, *et al.*, 2002; Fomuso y Akoh, 2002; Mu *et al.*, 1998 y Xu *et al.*, 1998, evaluaron las reacciones de acidólisis en reactores continuos de lecho empacado, con y sin

solvente, encontrando que son los más promisorios para lograr con éxito la modificación industrial de lípidos catalizados por enzimas lipasas, a un precio razonable sobre una base comercial.

Las reacciones de transesterificación han sido evaluadas por pocos autores. Se encuentran los trabajos de Xu *et al.*, (2002), en la transesterificación de aceite de pescado con MCT; Nielsen *et al.*, (2006) utilizaron manteca de cerdo y aceite de soya como materias primas; Otero *et al.*, (2006), en la transesterificación de aceite de sésamo y una grasa completamente hidrogenada. Ronne *et al.*, (2005) en la transesterificación de grasa láctea con aceite de colza; Xu *et al.*, (2005) en transesterificación de aceite de palma y de palmiste. Las empresas utilizan tanto los reactores de tanque agitado como los de lecho empacado a escala industrial, pero su información no ésta disponible.

Tanto en el reactor continuo como en el discontinuo el catalizador y las condiciones de reacción son determinantes del tipo de producto obtenido y el rendimiento del proceso.

3.2 LAS LIPASAS COMO CATALIZADORES

Las lipasas utilizadas en el proceso de interesterificación (triacilglicerol-acilhidrolasas E.C 3.1.1.3), son enzimas activas en la interfase agua/lípido de las emulsiones. Poseen una capacidad intrínseca para romper o hidrolizar enlaces éster en triacilgliceroles, diacilgliceroles y monoacilgliceroles en presencia de un exceso de agua, liberando ácidos carboxílicos y alcoholes. También se pueden emplear en solventes orgánicos y además en condiciones de bajo contenido de agua (trazas) las lipasas pueden catalizar la reacción inversa, es decir la esterificación. Por otra parte, no necesitan cofactores para su actividad catalítica (Osborn y Akoh, 2002; Koskinen y Klivanov, 1996).

Las lipasas hidrolizan con velocidad decreciente triacilgliceroles > diacilgliceroles

>> monoacilgliceroles. Previa emigración de un grupo acilo; el tercer grupo ácido se libera después de una incubación más larga y la velocidad de la lipólisis depende de la longitud del resto acilo así como del tamaño de la gota de aceite, es decir, de la superficie interfacial agua/aceite, por tanto, entre menor sea el tamaño de la gota de aceite, tanto más actividad expresarán las lipasas (Ottosson *et al.*, 2001; Belitz y Grosch, 1997).

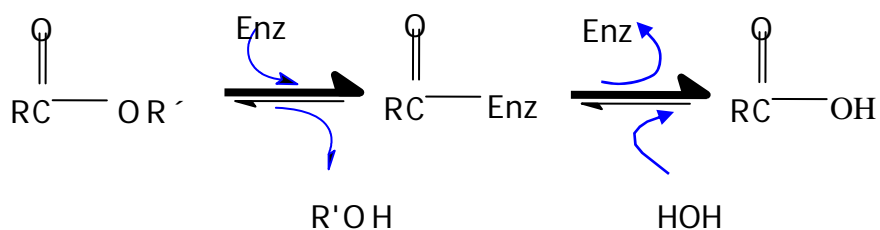
Desde el punto de vista de su especificidad se diferencian las enzimas que sólo hidrolizan el ácido graso esterificado con los grupos OH primarios del glicerol (*sn*-1,3-específicas), de aquellas que escinden a la misma velocidad los tres enlaces éster (no específicas), (Rotticci, 2000; Belitz y Grosch., 1997; Yamane 1987).

El mecanismo generalmente aceptado para la hidrólisis de un éster catalizado por lipasas se muestra en la **Figura 3.1**. Se cree que la reacción procede vía un intermediario acil-enzima. La reacción es reversible y en condiciones de baja actividad acuosa, la enzima puede funcionar “en reversa”, es decir, sintetizando enlaces éster (interesterificación) en lugar de hidrolizarlos (Miller *et al.*, 1988).

De esta manera, la interesterificación catalizada por lipasas se basa en la manipulación del equilibrio químico de una reacción termodinámicamente reversible, la cual requiere un bajo contenido de agua para el desplazamiento de la reacción. Éste se puede lograr con relativa facilidad usando solventes orgánicos. Sin embargo, la elección de un solvente adecuado que pueda solubilizar el sustrato, pero que no afecte la enzima, es de gran importancia (Ottosson, 2001; Mojovic *et al.*, 1993).

Hidrólisis enzimática de ésteres

HOH >> R'OH



Síntesis enzimática de ésteres

R'OH > HOH

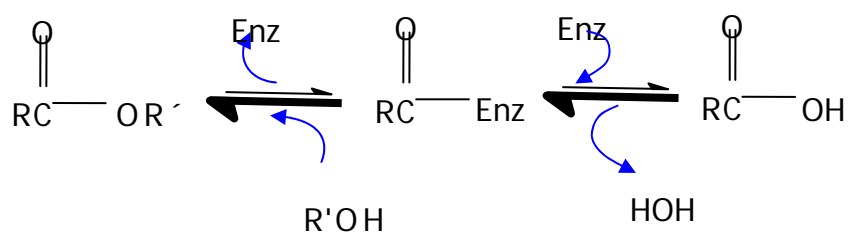


Figura 3.1 Hidrólisis de un éster catalizado por lipasas.

La actividad de las lipasas depende de diferentes factores de tipo químico y de tipo físico. Por ejemplo, los ácidos grasos libres y los alcoholes pueden inhibir la reacción de hidrólisis, debido a que la acumulación de estos compuestos en la interfase aceite/agua bloquea el acceso de las moléculas de triacilgliceroles al sitio activo de la enzima. Así también, el tipo de inmovilización, el soporte y las limitaciones de transferencia de masa, afectan la enantioselectividad y la velocidad de reacción (Ru *et al.*, 2001; Paiva *et al.*, 2000; Rotticci *et al.*, 2000; Xiu, 2001).

De otra parte, algunos solventes no acuosos pueden unirse específicamente a las lipasas; competir con la unión del sustrato, o inducir en la interfase la disociación de los polímeros de la enzima; desplazar el equilibrio entre los conformeros de la enzima o reaccionar con la enzima (Paiva *et al.*, 1992).

Los solventes miscibles en agua (alcoholes pequeños, acetona, acetonitrilo, entre otros) inactivan la enzima debido a que extraen el agua esencial de la proteína

provocando un cambio en su integridad estructural que resulta en una conformación inactiva, ver **Figura 3.2**.

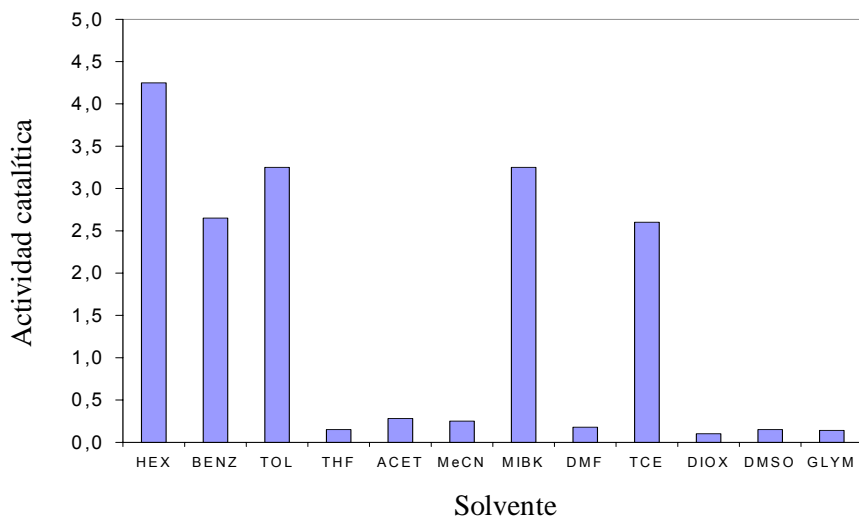


Figura 3.2 Efectos del tipo de solvente sobre la síntesis de miristil miristato (Miller *et al.*, 1988).

Los surfactantes pueden interferir con la actividad catalítica de las lipasas: activarlas a baja concentración o inhibirlas a concentraciones más altas. Mojovic *et al.*, (1993) encontraron que la lecitina de soya al 5% (respecto al peso de enzima) causaba un incremento de la actividad de lipasa, sin embargo, Moreno (2001) no encontró efectos significativos sobre la actividad en la reacción de acidólisis catalizada por lipasa de *Rhizomucor miehei* inmovilizada.

Los cationes metálicos pueden tener una acción dual sobre la actividad de las lipasas: ellos pueden unirse a los ácidos grasos y ayudar a remover productos de la interfase o desplegar un efecto opuesto, como sucede con una exposición prolongada de las lipasas a altas concentraciones de cationes de metales pesados, puede causar una inactivación irreversible (Paiva *et al.*, 1992). A su vez, las reacciones hidrolíticas se aceleran por la presencia de iones Ca^{+2} los cuales precipitan los ácidos grasos liberados en forma de sales de calcio insolubles.

Dentro de los parámetros físicos de mayor importancia en el proceso catalítico

están la temperatura y el pH. A medida que la temperatura aumenta, el incremento de la velocidad de reacción, resultante del incremento en el número de colisiones efectivas entre la enzima y el sustrato, es superado por la velocidad de desnaturalización de la enzima, atribuible a los cambios térmicamente inducidos en su topología tridimensional. Por esta razón, el concepto más conservador de temperatura óptima sería la temperatura máxima a la cual la enzima exhibe una actividad constante sobre un periodo de tiempo, por lo menos tan largo como el tiempo del ensayo (Paiva *et al.*, 2000; Turner y Vulfson, 2000). Para el caso del pH, los residuos de histidina del sitio activo deben estar en la forma iónica adecuada para habilitar la sustracción de un protón del grupo hidroxilo de la serina. Este es el paso preliminar necesario para dejar un par de electrones disponibles para el subsiguiente ataque nucleofílico sobre el residuo acilo del enlace éster. (Ottosson, 2001; Paiva *et al.*, 2000) (Véase **Figura 3.3**).

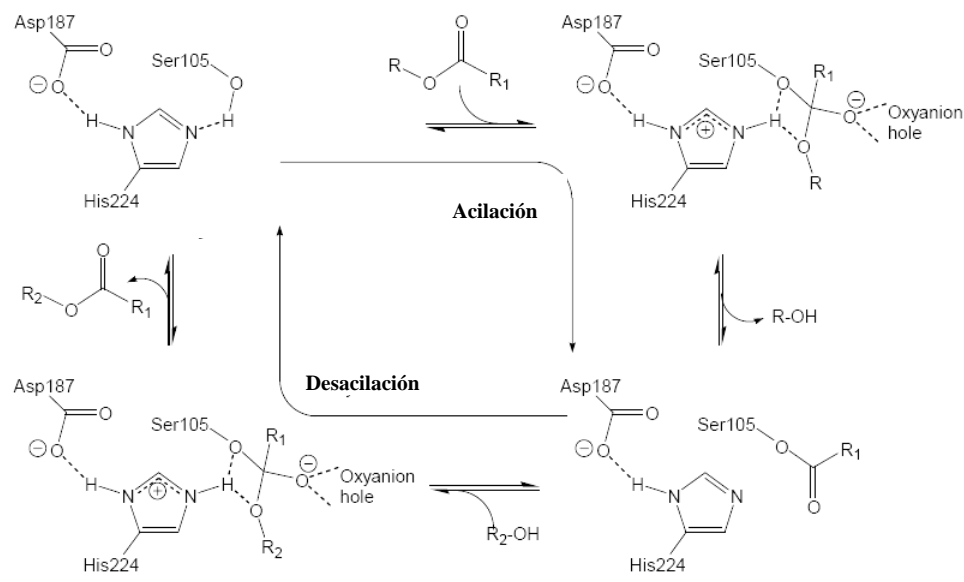


Figura 3.3 Mecanismo de transesterificación (R_2 = alquilo) o hidrólisis (R_2 = hidrógeno) catalizado por la lipasa B de *Cándida antarctica*.

El efecto de los factores mencionados puede variar dependiendo de la enzima y del sustrato, por lo que para desarrollar los procesos de obtención de lípidos estructurados a escala industrial éstos deben ser previamente evaluados y estandarizados, junto con la concentración de enzima y la relación enzima /sustrato.

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 Materia prima, solventes y equipos.

Materia Prima: El aceite de palmiste (PKO) y el aceite de soya (SBO), fueron suministrados por C.I. Saceites S.A.

Catalizadores: La enzima lipasa 1,3-específica conocida comercialmente como Lipozyme® RM-IM de *Rhizomucor miehei* lote LUX00115 (inmovilizada sobre resina de intercambio aniónico) y la enzima Lipozyme® TL-IM de *Thermomyces lanuginosa* lotes LA35000606 y LA350014401 (inmovilizada sobre gránulos de sílice), se compraron a Novozymes S.A. (Brasil); la lipasa 1,3-específica Lipozyme® de *Mucor miehei* Fluka 62350 lote LM70783 (Lipozyme® IM-20) se compró a Sigma-Aldrich.

Reactivos: Los solventes metanol, etanol, n-hexano, éter de petróleo, n-butanol, acetona, el NaOH, el KOH y los demás reactivos usados fueron grado analítico marca Merck.

Equipos: Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 (Palo Alto, California, USA) equipado con detector de ionización en llama (FID) y con inyector *split* e inyector *On column*, Columnas capilares para cromatografía de gases DB-WAX Ref. 122-

7032 (0.25 mm ID* 30 m * 0.25 μ m) y DB-17ht Ref. 123-1831 (0.32 mm ID * 30m * 0.15 μ m) compradas a J&W SCIENTIFIC, Columna capilar Mtx-65TG Cat # 17008 (0.25 mm ID * 30 m * 0.1 μ m) comprada a Restek Corporation. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 20 Mhz Bruker Minispec mq-20 Mhz (Rheinstetten, Germany). Bureta automática Dosimat 665 (Metrohn, Suiza), en modo pH-Stat. Viscosímetro para líquidos Visco Easy L, de Schott (Cambridge, UK). Penetrómetro con cono metálico de ángulo de 45°. Reactor de vidrio de 2 litros de capacidad y reactor en acero inoxidable con capacidad para 60 litros (gentilmente prestado por la empresa C.I. Saceites S.A.).

3.3.2 Desarrollo experimental

3.3.2.1 Procedimiento general de la reacción

En un reactor provisto de tapa, se calentó la mezcla de sustratos a la temperatura de reacción definida, se adicionaron la lipasa y el agua (5% respecto al peso de la enzima), se mezclaron y se incubó la mezcla a la temperatura y tiempo establecidos en el diseño experimental, manteniéndose en constante agitación. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, la enzima se recuperó del producto por filtración. El filtrado se recogió en un tubo de ensayo, separando los acilgliceroles por el procedimiento descrito por Senanayake y colaboradores (1999) y adaptado por Moreno (2001). El filtrado libre de FFA se conservó bajo refrigeración para posteriores análisis: acidez, determinación de la composición en ácidos grasos, acilgliceroles y contenido de grasa sólida.

3.3.2.2 Selección de las condiciones de reacción

La selección se efectuó mediante un diseño de composición central de segundo

orden, de cuatro factores y tres niveles, el cual constó de 26 experimentos individuales. Las variables independientes o factores estudiados fueron la cantidad de enzima, la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y la relación de sustratos. Las variables independientes y sus correspondientes niveles se presentan en el apartado de resultados (**Tabla 3.2**).

Los experimentos se efectuaron a escala de laboratorio, en reactores de 50 mL con agitación orbital, en las condiciones establecidas de acuerdo al diseño. Como catalizadores se emplearon las enzimas Lipozyme® RM-IM de *Rhizomucor miehei* y Lipozyme® TL-IM de *Thermomyces lanuginosa*.

Las variables de proceso o factores para controlar, así como los intervalos en los cuales se evaluaron dichas variables se eligieron con base en las investigaciones previas realizadas por Huang y Akoh (1996), Xu *et al.* (1998), Lee y Akoh (1998), Mu *et al.* (1998), Nieto *et al.* (1999), Zhou *et al.* (2001), Sellappan y Akoh (2001) y las realizadas en el CICTA por Moreno y Perea (2001) y Arango y Perea (2002).

En todos los casos, para evaluar el efecto de las variables de proceso sobre la producción de lípidos estructurados (RTA-2) y el incremento de la hidrólisis de los acilglicérols, se realizaron los siguientes análisis con ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (1998):

a) *Efectos Principales*, para evaluar la influencia de las variables de proceso, en forma individual, sobre la respuesta estudiada.

b) *Análisis de la varianza (ANOVA)*, para determinar cuales variables de proceso y/o las interacciones entre ellas tienen efectos estadísticamente significativos sobre la respuesta.

c) *Desarrollo de un modelo matemático*, que relacione las variables de proceso con la variable de respuesta estudiada, para predecir un resultado bajo un

conjunto dado de condiciones de proceso.

d) *Desarrollo de gráficos de superficies de respuesta*, para visualizar en forma rápida la combinación de condiciones que conducen a un resultado particular, al igual que el efecto de las interacciones entre las variables.

e) *Optimización multivariable*, para determinar las condiciones que reduzcan al máximo la reacción de hidrólisis e incrementen la reacción de transesterificación, teniendo en cuenta que durante el proceso se dan las dos reacciones simultáneamente.

3.3.2.3 Escalado a 1 kilogramo

Una vez seleccionadas las condiciones de reacción, se validaron los valores óptimos entregados por el modelo a escala de un kilogramo, en un reactor de vidrio de 2 litros de capacidad (**Figura 3.4a**), provisto de agitador mecánico, usando la metodología descrita en el apartado **3.3.2.1**. Esto se realizó así para eliminar los errores aleatorios que pueden ocurrir a escala de 5 g por una deficiente dispersión de la enzima en el medio de reacción.

3.3.2.4 Escalado a planta piloto

Los ensayos a escala de planta piloto (35 kg) se realizaron en reactores de 60 litros de capacidad, provistos de sistemas de calentamiento y enfriamiento con control automático de temperatura y agitador con velocidad variable, disponibles en las instalaciones de C.I. Saceites S.A (**Figura 3.4b**). Las condiciones de reacción se seleccionaron del diseño experimental a escala de laboratorio y de los ajustes que surgieron a raíz de los resultados del escalado a 1000 g.



Figura 3.4a Reactor utilizado para la reacción de transesterificación a escala de 1000 g de sustrato.

Figura 3.4b Reactor utilizado para la reacción de transesterificación a escala piloto 35 kg de sustrato.



3.3.2.5 Cinética de la reacción

El seguimiento de la reacción en el tiempo se efectuó en los ensayos a escala piloto, tomando para ello muestras a las 00:00, 00:15, 00:30, 01:00, 02:00, 03:00 04:00, 05:00 y 06:00 horas de iniciada la reacción.

3.3.2.6 Evaluación de la estabilidad de la enzima

La estabilidad operacional de la enzima en reactor de tanque agitado se evaluó utilizando la razón enzima/sustrato y de sustrato determinadas para el escalado a planta piloto, bajo las condiciones de reacción establecidas en este estudio. Una vez se completó el tiempo de reacción fijado, se reemplazó la mezcla de reacción por una cantidad igual de sustrato fresco y se analizó el grado de transformación alcanzado. Este procedimiento se repitió seis (6) veces.

3.3.3 Métodos de análisis

3.3.3.1 Propiedades fisicoquímicas de los sustratos y productos

Los análisis de ácidos grasos, acilgliceroles, ácidos grasos libres (FFA), perfiles de fusión y puntos de fusión de sustratos y productos de reacción, se efectuaron siguiendo los métodos descritos en el *numeral 2.2.2* del capítulo 2.

3.3.3.2 Análisis estructural de los triacilgliceroles

El análisis de la distribución espacial de los ácidos grasos en los triacilgliceroles se realizó siguiendo la metodología descrita por Dourtoglou, (2001), en la cual se utiliza una lipasa 1,3-específica (Lipozyme® IM20) en butanol para transformar los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn*-1,3 de los triacilgliceroles en sus correspondientes butilésteres, que se cuantifican posteriormente por GC. La metodología se detalla a continuación:

- **Formación de los ésteres butílicos (FA de las posiciones *sn*-1,3 de los TAG):** En un tubo de ensayo se adicionaron 200 mg del analito, 500 μ L de n-butanol y 250 mg de la enzima. La mezcla se dejó reaccionar durante 20 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos en un mezclador vórtice.

Posteriormente, la muestra fue extraída con 5 ml de hexano y la fase orgánica lavada con 2,0 ml de solución saturada de NaCl y luego con 2,0 ml de agua. Finalmente, la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y diluida a 5,0 ml con hexano para análisis por GC.

- **Análisis estereoespecífico:** La cuantificación de los FA (%mol) ubicados en la posición central (*sn*-2) de los TAG, se obtiene por el siguiente cálculo matemático:

$$FA(sn-2) = 3*FA(sn-1,2,3)-2*(FA sn-1,3)$$

Donde, los FA (%mol) ubicados en las posiciones *sn*-1,3 de los TAG corresponden a la composición de los butilésteres hallada por cromatografía de gases, en tanto que, los FA (%mol) de las posiciones *sn*-1,2,3 corresponden a la composición hallada por el método del KOH en metanol descrito en el *numeral 2.2.2.1* del capítulo 2.

3.3.3.3 Determinación de la actividad de interesterificación de la enzima

La actividad estearasa o de interesterificación de las enzimas Lipozyme RM-Im y Lipozyme TL-IM se determinó en unidades IUN (Interesterification Units Novo). Una unidad es equivalente a la cantidad de enzima que convierte 0.01% de triestearina por minuto bajo las siguientes condiciones de ensayo:

Sustrato: 20 gramos de una mezcla formada por 27% p/p de aceite de soya completamente hidrogenada y 73% p/p de aceite de soya refinado, blanqueado y desodorizado. Dosis de enzima: 10% p/p de enzima respecto al sustrato (2 g de enzima). Temperatura de reacción: 70 °C, agitación constante. Tiempo de reacción: 1 hora, tomando muestras cada 15 minutos, para analizar la conversión

(disminución de la concentración) de triestearina por cromatografía de gases de alta temperatura (También se podría determinar por HPLC). La pendiente de la recta que resulta de graficar el cambio en la concentración de triestearina (% p/p) contra el tiempo de reacción en minutos se utiliza para calcular la actividad de la enzima en Unidades IUN, como sigue:

$$\text{IUN} = [\text{pendiente (\%/min)} / 0.01\%] / (\text{peso enzima en gramos})$$

3.4 RESULTADOS

3.4.1 SISTEMA 1.

Aceite soya - aceite de palmiste (SBO:PKO)-Lipozyme® RM-IM

Para la evaluación y selección de las condiciones de reacción, los factores estudiados fueron: razón enzima / sustrato, temperatura de reacción, tiempo de reacción y relación de sustratos. Las variables independientes y sus niveles se presentan en la **Tabla 3.2**. Como variable respuesta se eligió el incremento en área relativa de los picos cromatográficos correspondientes a los TAG C42:2, C44:2, C46:2, C48:2, C48:3 y C48:4, expresado como un porcentaje del área relativa total de todos los picos cromatográficos, debido a que se espera que estas especies se generen por intercambio entre los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn-1* y *sn-3* de los principales TAG componentes del aceite de palmiste y del aceite de soya, como se ilustra en la **Tabla 3.3**. Esta variable en adelante se llamará RTA-2 y se usará como indicador del rendimiento de la reacción de transesterificación. Una segunda variable de respuesta evaluada fue la hidrólisis alcanzada en la reacción, medido como el incremento en la acidez.

Tabla 3.2 Variables independientes y niveles del diseño experimental

Variable	Unidad	Código del nivel de la variable				
		-2.06	-1	0	1	2.06
Razón enzima/sustrato	(% p/p**)	(2.5)	(5.0)	(7.5)	(10.0)	(12.5)
	IUN*/g aceite	9.45	18.9	28.35	37.8	47.25
Temperatura de reacción	°C	40	50	60	70	80
Tiempo de reacción	horas	2	4	6	8	10
Relación de sustratos,	SBO:PKO	30:70	40:60	50:50	60:40	70:30

*IUN: Interesterification Unit Novo (unidad de interesterificación Novo)

** %p/p: Porcentaje en peso respecto al peso del aceite.

Tabla 3.3 Posibles TAG generados por transesterificación del aceite de soya con el aceite de palmiste, utilizando una lipasa *sn*-1,3-específica.

TAG mayoritarios		TAG esperados			
TAG	CN:DB	TAG**	CN:DB	TAG**	CN:DB
Aceite de Soya (SBO)		CyPLa	C36:0	CyOL	C44:3
		CLaP	C38:0	CyLL	C44:4
LLL	C54:6	CyLaO	C38:1	LaPO	C46:1
LLO	C54:5	CyLaL	C38:2	MMO	C46:1
LOO	C54:4	LaLaP	C40:0	LaPL	C46:2
LLP	C52:4	CLaO	C40:1	MML	C46:2
POL	C52:3	CLaL	C40:2	COO	C46:2
		LaMP	C42:0	COL	C46:3
Aceite Palmiste (PKO)		LaLaO	C42:1	CLL	C46:4
		CyPL	C42:2	MPL	C48:2
LaLaLa	C36:0	LaLaL	C42:2	LaOL	C48:3
LaLaM	C38:0	MMP	C44:0	LaLL	C48:4
LaMM	C40:0	LaMO	C44:1	MOO	C50:2
MMM	C42:0	LaML	C44:2	MOL	C50:3
CLaLa	C34:0	CPL	C44:2	MLL	C50:4
CyLaLa	C32:0	CyOO	C44:2	POL	C52:3

** Cy= Ácido caprílico, C= ácido cáprico, La= ácido láurico, M= ácido mirístico, P= ácido palmítico, O= ácido oleico, L= ácido linoleico.

El orden de las letras en el TAG no indica la distribución espacial de los ácidos grasos en el esqueleto del glicerol.

En la **Tabla 3.4** se presentan las condiciones bajo las cuales se hicieron los 26 experimentos y sus réplicas y los resultados obtenidos para cada una de las variables respuestas analizadas (grado de hidrólisis y RTA-2).

Tabla 3.4 Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:PKO, utilizando Lipozyme® RM-IM como catalizador.

	Enzima		Temp.	Tiempo	Sustrato	Hidrólisis	RTA 2**
	[IUN]*	%p/p	°C	horas	SBO:PKO	(%)	(%)
1	18.9	5%	50	4	40:60	9.6	19,61
2	37.8	10%	50	4	40:60	15.2	22,22
3	18.9	5%	70	4	40:60	9.2	21,11
4	37.8	10%	70	4	40:60	14.1	20,80
5	18.9	5%	50	8	40:60	10.6	18,57
6	37.8	10%	50	8	40:60	18.6	22,90
7	18.9	5%	70	8	40:60	10.7	20,74
8	37.8	10%	70	8	40:60	15.2	21,31
9	28.4	7.5%	60	6	50:50	15.4	27,30
10	18.9	5%	50	4	60:40	9.6	26,06
11	37.8	10%	50	4	60:40	14.9	26,94
12	18.9	5%	70	4	60:40	9.0	28,80
13	37.8	10%	70	4	60:40	13.8	30,32
14	18.9	5%	50	8	60:40	12.0	29,77
15	37.8	10%	50	8	60:40	18.0	29,45
16	18.9	5%	70	8	60:40	9.2	31,50
17	37.8	10%	70	8	60:40	17.8	30,93
18	9.5	2.5%	60	6	50:50	7.6	17,26
19	47.3	12.5%	60	6	50:50	21.4	25,79
20	28.4	7.5%	40	6	50:50	13.5	25,83
21	28.4	7.5%	80	6	50:50	14.2	27,76
22	28.4	7.5%	60	6	50:50	12.6	28,66
23	28.4	7.5%	60	2	50:50	12.4	20,36
24	28.4	7.5%	60	10	50:50	17.8	27,20
25	28.4	7.5%	60	6	30:70	15.5	18,51
26	28.4	7.5%	60	6	70:30	15.4	33,23

*IUN: Interesterification Unit Novo (unidad de interesterificación Novo)

** RTA-2: Cambio en el área relativa de los TAG C42:2, C44:2, C46:2, C48:2, C48:3 y C48:4

3.4.1.1 Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación.

Al evaluar el efecto de cada una de las variables en forma independiente, se establece según el Diagrama de Pareto (véase la **Figura 3.5**) y el Diagrama de efectos principales (véase la **Figura 3.6**), que la relación de sustratos (D), la razón enzima/sustrato (A) y el tiempo de reacción (C) tienen efectos estadísticamente significativos sobre el rendimiento de la reacción (RTA-2), a un nivel de confianza del 95%, siendo el factor más influyente la relación de sustratos.

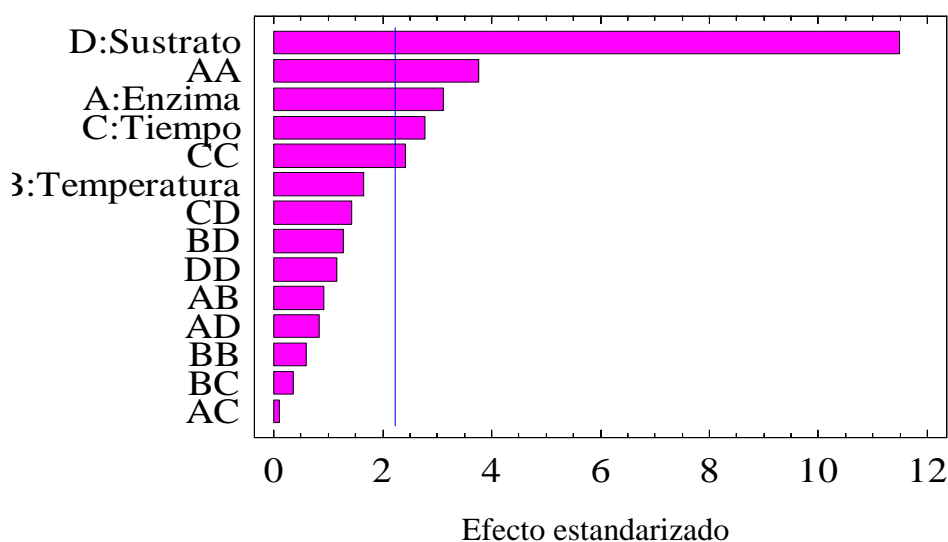


Figura 3.5 Diagrama de Pareto para la variable respuesta RTA- 2. Las barras que se extienden más allá de la línea azul corresponden a efectos significativos en un nivel de confianza del 95%

El efecto sobre la RTA-2 en todos los casos es positivo, es decir, el grado de transesterificación aumenta en la medida en que estos factores se desplazan del nivel más bajo al nivel más alto. Sin embargo, este incremento no es lineal para la razón enzima/sustrato, el tiempo de reacción y la temperatura, lo que indica que existe un valor óptimo dentro de los rangos evaluados (véase la **Figura 3.6**).

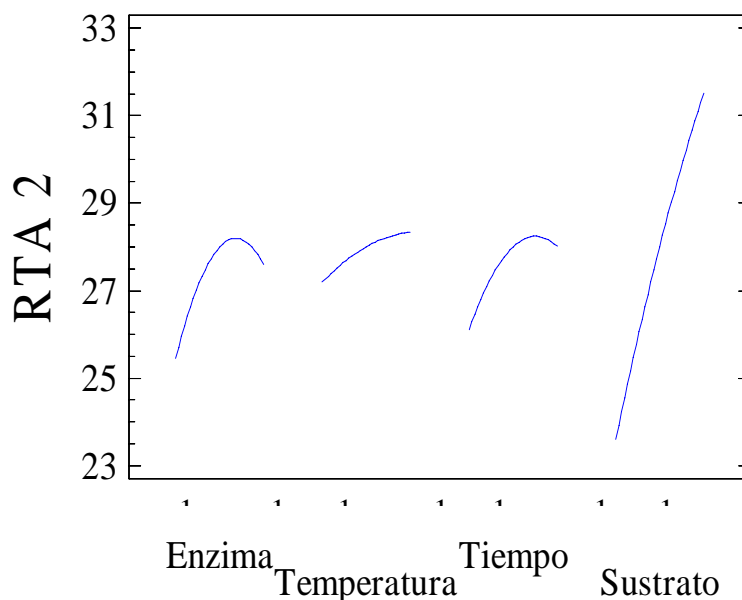


Figura 3.6 Diagrama de efectos principales para la variable respuesta RTA-2.

Para establecer el efecto de las interacciones entre las variables y la variación aleatoria debida a errores experimentales, se realizó el *Análisis de la Varianza* (ANOVA) en el cual se compara la suma del cuadrado medio de cada efecto (SCM) con el cuadrado medio del error total (CME), para obtener los valores F y P y establecer si los valores estimados para la varianza difieren significativamente.

De la **Tabla 3.5** se deduce que la relación de sustratos (D), la razón enzima/sustrato (A) y el tiempo de reacción (C) tienen efectos significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$) en un nivel de confianza del 95%, pero la interacción entre estas variables no es significativa ($p > 0.05$).

El análisis de los datos del diseño experimental por medio de la metodología de superficie de respuesta MSR, también permitió obtener un modelo matemático que involucra los factores que más influyen en el rendimiento de la reacción de transesterificación (RTA-2), en orden a la obtención de los lípidos estructurados.

El modelo matemático predicho para la variable respuesta RTA-2 corresponde a un polinomio de la forma general de la ecuación 3.1:

$$RTA2(\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. 3.1}$$

Donde β_0 , β_i , β_{ij} son los coeficientes de regresión predichos para el intercepto; los términos lineales, los términos cuadráticos y los términos de interacción, que mejor ajustan el modelo polinómico a los valores medidos para la RTA-2. X_i representa las variables independientes (A: Razón enzima/sustrato, B: Temperatura de reacción, C: Tiempo de reacción y D: Relación de sustratos).

Tabla 3.5 Análisis de la Varianza (ANOVA) para la RTA-2

Fuente	Suma de cuadrado	Grados libertad	Cuadrado medio	Relación F	Valor P
s					
A:Enzima	28,1901	1	28,1901	9,72	0,0109
B:Temperatura	7,96609	1	7,96609	2,75	0,1284
C:Tiempo	22,3506	1	22,3506	7,71	0,0196
D:Sustrato	382,946	1	382,946	132,06	0,0000
AA	41,1026	1	41,1026	14,17	0,0037
AB	2,47276	1	2,47276	0,85	0,3775
AC	0,02975	1	0,02975	0,01	0,9213
AD	2,02351	1	2,02351	0,70	0,4230
BB	1,02892	1	1,02892	0,35	0,5646
BC	0,36300	1	0,36300	0,13	0,7308
BD	4,69806	1	4,69806	1,62	0,2319
CC	16,8255	1	16,8255	5,80	0,0368
CD	5,94141	1	5,94141	2,05	0,1828
DD	3,84791	1	3,84791	1,33	0,2761
blocks	0,33990	1	0,33990	0,12	0,7392
Total error	28,9976	10	2,89976		
Total (corr.)	538,087	25			

En la **Tabla 3.6** se presentan los coeficientes de regresión para el modelo matemático. El valor estadístico R^2 -cuadrado³ indica que el modelo ajustado por grados de libertad (GL) explica el 94,61% de la variabilidad en la RTA-2.

Tabla 3.6 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Término (Variable)		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	28,0029
	A: Enzima	β_1	1,07331
	B: Temperatura	β_2	0,570559
	C: Tiempo	β_3	0,955703
	D: Sustrato	β_4	3,95591
Cuadrático	AA	β_5	-1,47818
	BB	β_6	-0,233876
	CC	β_7	-0,945753
	DD	β_8	-0,452279
Interacciones	AB	β_9	-0,393125
	AC	β_{10}	-0,043125
	AD	β_{11}	-0,355625
	BC	β_{12}	-0,150625
	BD	β_{13}	0,541875
	CD	β_{14}	0,609375

R^2 -cuadrado = 94,61 % R^2 -cuadrado (ajustado por GL) = 87,75%

Una vez establecido el modelo, se construyen los gráficos de superficie de respuesta usando la ecuación 3.1; se mantuvieron dos variables constantes y se variaron las otras dos. Las condiciones que en combinación producen los mejores resultados en cuanto al rendimiento de la transesterificación (RTA-2) se pueden ver con facilidad en los gráficos de superficie de respuesta y ubicar con más detalle en los mapas de contorno.

³ R^2 -cuadrado: Valor estadístico que mide la proporción de la variabilidad total explicada por el modelo de regresión planteado. Este valor varía entre 0 y 100 por ciento

En la **Figura 3.7**, se presentan la superficie de respuesta y el mapa de contorno obtenidos al graficar los efectos de la *razón enzima/sustrato* y la *relación de sustratos*, manteniendo la temperatura y el tiempo de reacción en un valor constante (nivel 0). En la **Figura 3.8**, se aprecian la superficie de respuesta y el mapa de contorno para los efectos combinados de la *razón enzima/sustrato* y *tiempo de reacción* y en la **Figura 3.9**, los mapas de contorno para el efecto combinado de las siguientes variables: a. *Relación de sustratos* y *tiempo de reacción* y b. *Temperatura reacción* y *razón enzima/sustrato*.

(A)

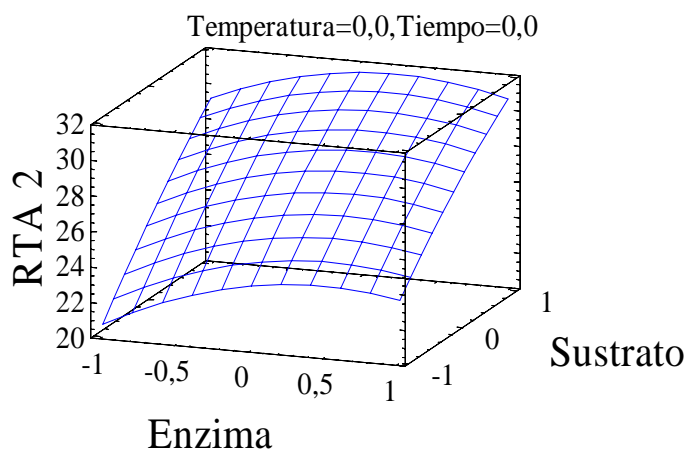
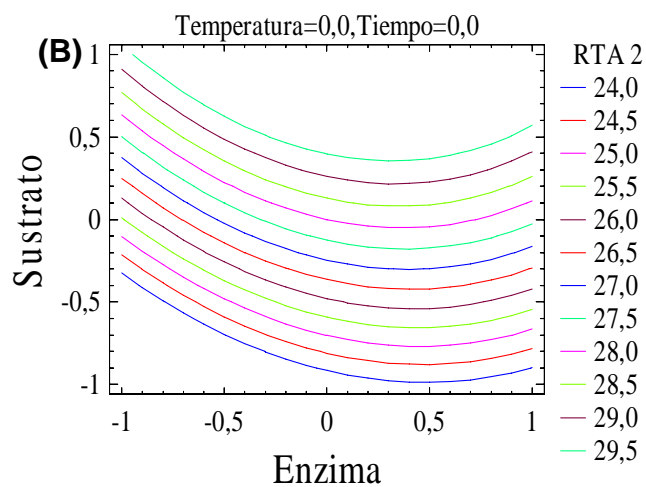


Figura 3.7 Efecto de variar la relación de sustratos y la razón enzima/sustrato sobre la variable RTA-2.



A. Superficie de respuesta.
B. Mapa de contorno.

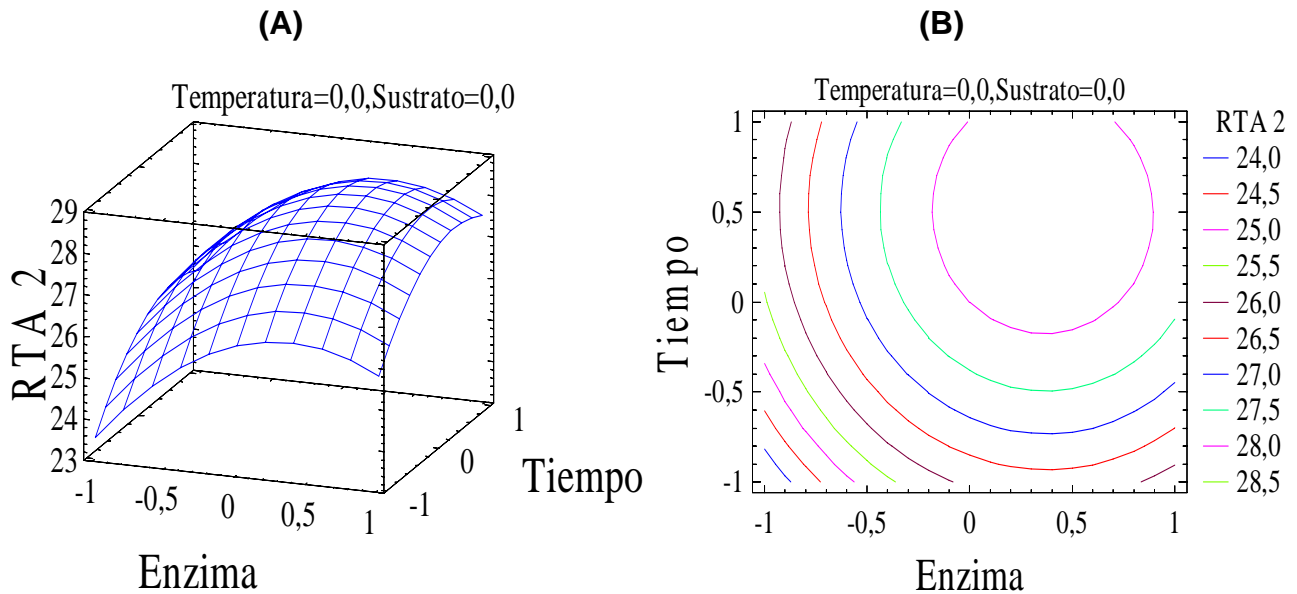


Figura 3.8 Efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la respuesta RTA-2. **A.** Superficie de respuesta. **B.** mapa de contorno.

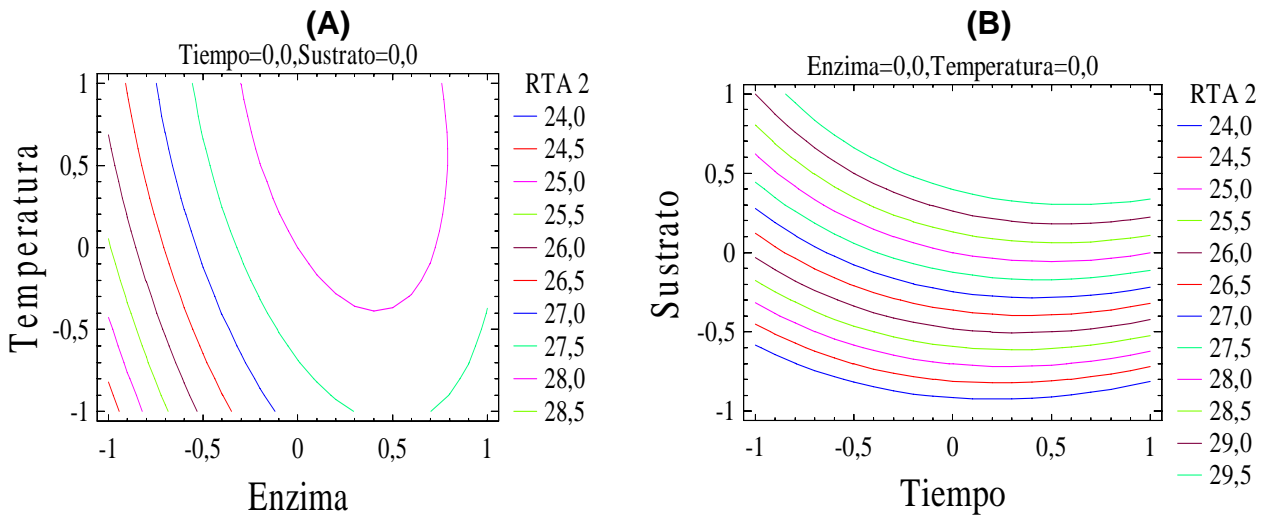


Figura 3.9 Mapas de contorno que muestran: **A.** Efecto de variar la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre la respuesta RTA-2 **B.** El efecto de variar la relación de sustratos y el tiempo de reacción sobre la respuesta RTA-2.

Del análisis de las superficies de respuesta y los mapas de contorno (**Figuras 3.7, 3.8 y 3.9**), se puede deducir que el rendimiento de la reacción aumenta cuando la relación de sustratos tiende hacia el nivel más alto evaluado, nivel 2 (SBO:PKO 70:30) y que la razón enzima/sustrato utilizada está entre el nivel 0 (7,5%) y el nivel 1 (10%). Sin embargo, también es posible alcanzar una buena eficiencia de transesterificación utilizando relaciones de sustratos más bajas y elevando la razón enzima/sustrato o el tiempo de reacción.

En este último caso, los niveles de las variables que conducirían a una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2 =37,7%) de acuerdo a la ecuación 3.1, son los que se resumen en la **Tabla 3.7**.

Tabla 3.7 Niveles de las variables independientes que conducirían a una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2)

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Razón enzima/sustrato	-2.06 (2,5%)	2.06 (12.5%)	-0.171 (7.1%)
Temperatura	-2.06 (40 °C)	2.06 (80 °C)	1.0 (70 °C)
Tiempo	-2.06 (2 horas)	2.06 (10 horas)	1.01 (6 horas)
Sustrato (SBO:PKO)	-2.06 (30:70)	2.06 (70:30)	2.06 (70:30)
RTA-2 (%)	-----	-----	37.7%

3.4.1.2 Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis.

En el caso de la reacción de hidrólisis, las **Figuras 3.10** (diagrama de Pareto) y **3.11** (efectos principales) muestran claramente que las variables que más influyen sobre la reacción son la razón enzima/sustrato utilizada y el tiempo de reacción. En los dos casos se observa una relación directa con el grado de hidrólisis.

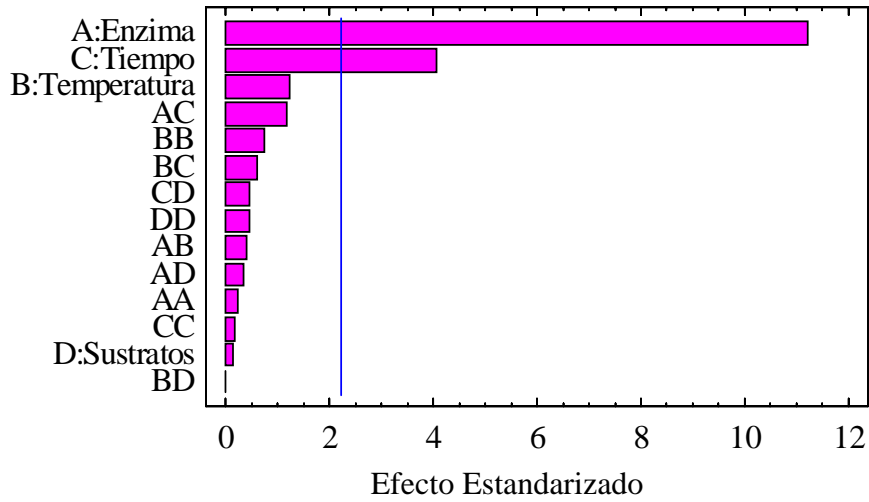


Figura 3.10 Diagrama de Pareto estandarizado para la variable respuesta grado de hidrólisis.

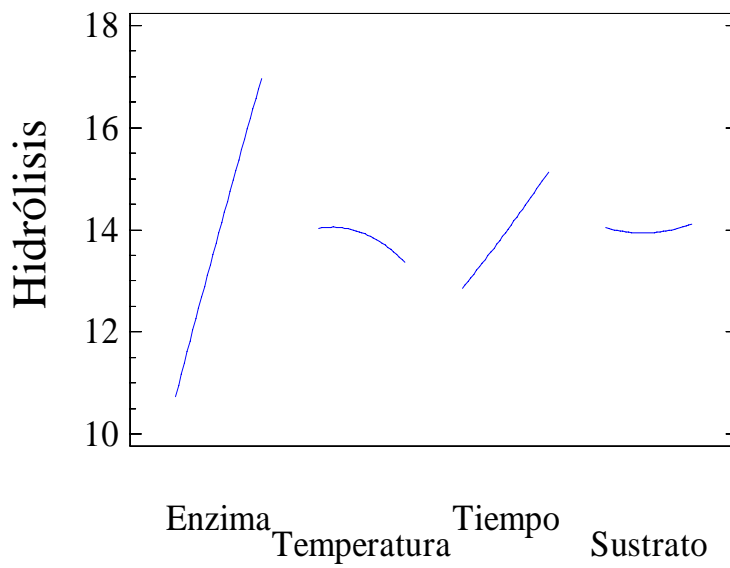


Figura 3.11 Diagrama de efectos principales para la variable grado de hidrólisis.

La variabilidad del grado de hidrólisis se confirma al realizar el análisis de la varianza (**Tabla 3.8**), de donde se deduce que únicamente las variables razón enzima/sustrato y tiempo de reacción tienen efectos significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$) en un nivel de confianza del 95%. Las interacciones entre las variables estudiadas no son significativas.

Tabla 3.8 Análisis de la Varianza (ANOVA) para el grado de hidrólisis

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio	Relación F	Valor P
A:Enzima	236,661	1	236,661	124,27	0,0000
B:Temperatura	2,65438	1	2,65438	1,39	0,2651
C:Tiempo	31,6122	1	31,6122	16,60	0,0022
D:Sustrato	0,0326759	1	0,0326759	0,02	0,8984
AA	0,153433	1	0,153433	0,08	0,7823
AB	0,275625	1	0,275625	0,14	0,7116
AC	2,64063	1	2,64063	1,39	0,2663
AD	0,180625	1	0,180625	0,09	0,7644
BB	1,11797	1	1,11797	0,59	0,4613
BC	0,600625	1	0,600625	0,32	0,5868
BD	0,000625	1	0,000625	0,00	0,9859
CC	0,0496082	1	0,0496082	0,03	0,8750
CD	0,455625	1	0,455625	0,24	0,6353
DD	0,337734	1	0,337734	0,18	0,6826
Total error	19,0446	10	1,90446		
Total (corr.)	308,327	25			

El modelo matemático predicho para el grado de hidrólisis corresponde a un polinomio de la forma general descrita en la **Ecuación 3.1**.

En la **Tabla 3.9** se presentan los coeficientes de regresión para el modelo matemático. El valor estadístico R^2 -cuadrado indica que el modelo desarrollado explica el 93,82% de la variabilidad en el grado de hidrólisis.

Tabla 3.9 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho para la variable respuesta grado de hidrólisis.

Términos		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	13,9403
	A: Enzima	β_1	3,10986
	B: Temperatura	β_2	-0,32935
	C: Tiempo	β_3	1,13659
	D: Sustrato	β_4	0,036542
Cuadrático	AA	β_5	-0,09031
	BB	β_6	-0,24379
	CC	β_7	0,051354
	DD	β_8	0,133993
Interacciones	AB	β_9	-0,13125
	AC	β_{10}	0,40625
	AD	β_{11}	0,10625
	BC	β_{12}	-0,19375
	BD	β_{13}	0,00625
	CD	β_{14}	0,16875

R^2 -cuadrado = 93,82% R^2 -cuadrado (ajustado por GL) = 85,96%

Los gráficos de superficie de respuesta para esta variable (**Figuras 3.12 y 3.13**) muestran que el grado de hidrólisis se incrementa con el tiempo de reacción y con la razón enzima/sustrato utilizada. Aunque la razón enzima/sustrato tiene un efecto mayor sobre la hidrólisis, el efecto del tiempo de reacción, que a bajas concentraciones de enzima es débil, se acentúa fuertemente a concentraciones más altas. La relación de sustratos no tiene un efecto significativo.

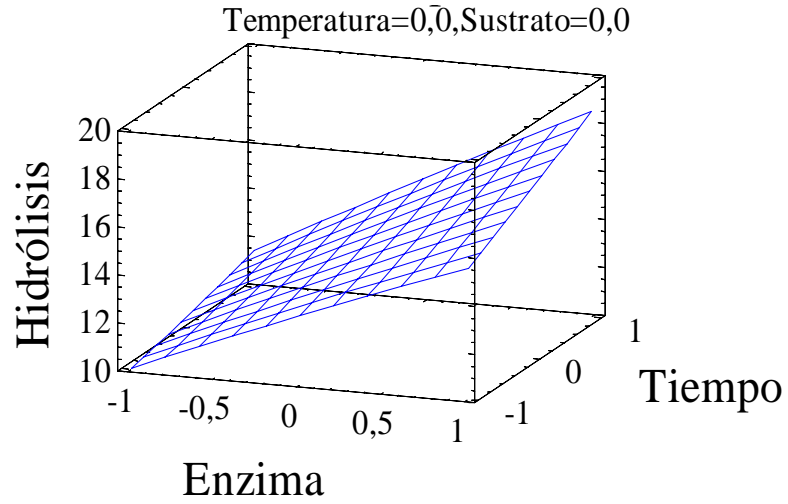


Figura 3.12 Superficie de respuesta que muestra el efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre el grado de hidrólisis alcanzado.

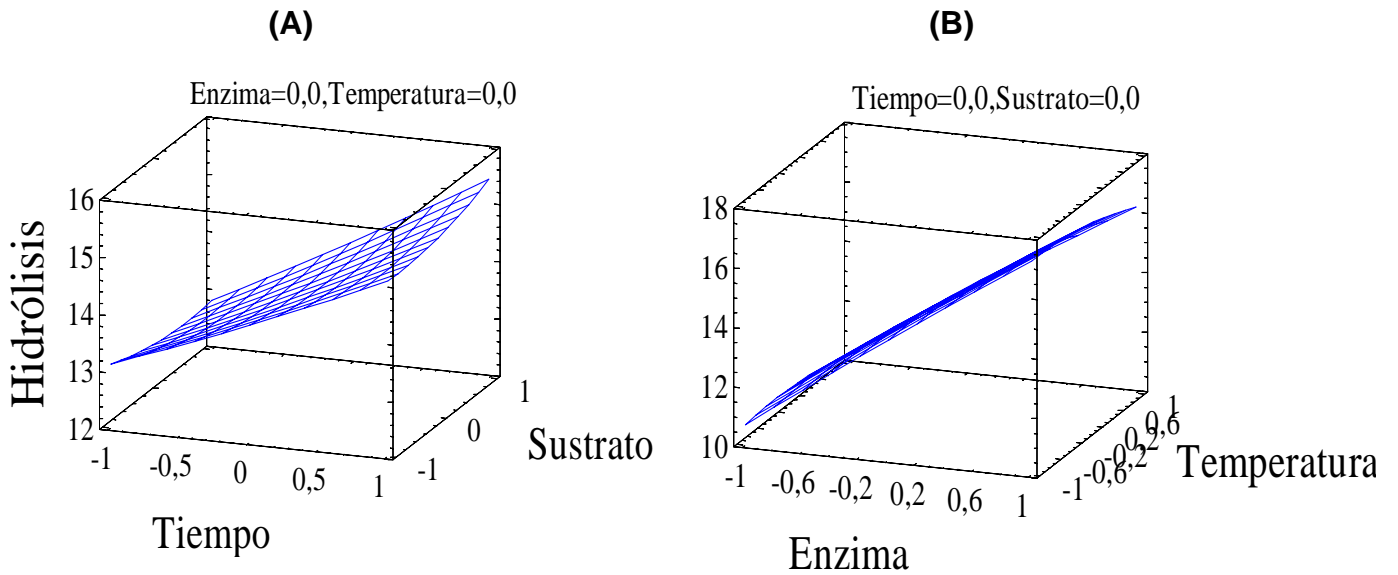


Figura 3.13 Superficie de respuesta que muestra: **A.** El efecto combinado del tiempo de reacción y la relación de sustratos sobre el grado de hidrólisis alcanzado. **B.** Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción.

En este caso los niveles de las variables independientes que conducen a un menor grado de hidrólisis, en la región experimental evaluada, se resumen en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10 Niveles de las variables independientes que conducen a un menor grado de hidrólisis

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Razón enzima/sustrato	-2.06 (2,5%)	2.06 (12.5%)	-2.06 (2.5%)
Temperatura	-2.06 (40 °C)	2.06 (80 °C)	-1.80 (42 °C)
Tiempo	-2.06 (2 horas)	2.06 (10 hora)	-2.06 (2 horas)
Sustrato (SBO:PKO)	-2.06 (30:70)	2.06 (70:30)	1.63 (66:34)
Hidrólisis (%)	-----	-----	4,83%

Se observa entonces que en el sistema 1, aceite de soya-aceite de palmiste-Lipozyme® RM-IM, las variables con efecto significativo sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación son la relación de sustratos, la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción. Estas dos últimas variables también son las más influyentes en la reacción de hidrólisis. En consecuencia, las condiciones experimentales que conducen a un menor grado de hidrólisis (4,83%) no se corresponden necesariamente con una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2).

3.4.1.3 Optimización de la reacción

Con base en los resultados anteriores y teniendo en cuenta que durante el proceso de interesterificación se dan simultáneamente, las reacciones de hidrólisis y de transesterificación y que lo ideal es reducir al máximo la reacción de hidrólisis e incrementar la reacción de transesterificación, se aplicó una herramienta estadística adicional, la *metodología de optimización multivariable*, la

cual permite analizar de forma simultánea los efectos de las variables independientes sobre las dos variables respuestas: grado de hidrólisis y RTA-2 y combinarlas en una sola que se denomina “DESEABILIDAD”, para lo cual se le dio mayor peso (2) a la variable RTA-2 y un menor peso (1) al grado de hidrólisis.

Los rangos dentro de los cuales se realizó la optimización y los niveles predichos para las variables, que en conjunto conducirían a los mejores resultados o mayores valores de “Deseabilidad”, se presentan en la **Tabla 3.11**. Estas condiciones se utilizarán para el escalado de la reacción de transesterificación a 1 kg de sustrato.

Tabla 3.11 Combinación de factores y niveles que maximizan la función “Deseabilidad”.

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel elegido
Razón enzima/sustrato	-2.06 (2,5%)	2.06 (12.5%)	-2.06 (2,5%)
Temperatura	-2.06 (40 °C)	2.06 (80 °C)	1.00 (70 °C)
Tiempo	-2.06 (2 horas)	2.06 (10 hora)	0.0 (6 horas)
Sustrato (SBO:PKO)	-2.06 (30:70)	2.06 (70:30)	1.00 (60:40)
Deseabilidad	-----	-----	0.83
%Hidrólisis	-----	-----	7.01
Rta-2	-----	-----	25.82

* Agua: 5,0% respecto al peso de la enzima utilizada.

En las **Figuras 3.14** y **3.15** se muestran las superficies de respuesta para la variable “deseabilidad” como una función de las variables independientes: razón enzima/sustrato, relación de sustratos, temperatura y tiempo de reacción.

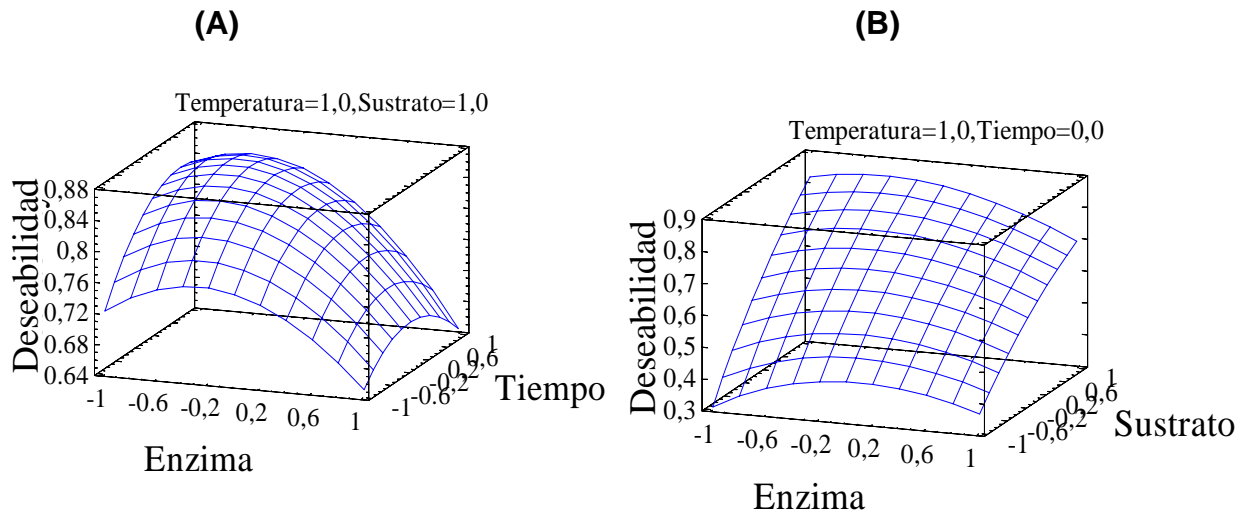


Figura 3.14 Efecto de las variables de proceso sobre la “deseabilidad” de la reacción: **A)** Efecto de la razón enzima/sustrato y del tiempo de reacción, **B)** Efecto de la razón enzima/sustrato y la relación de sustratos.

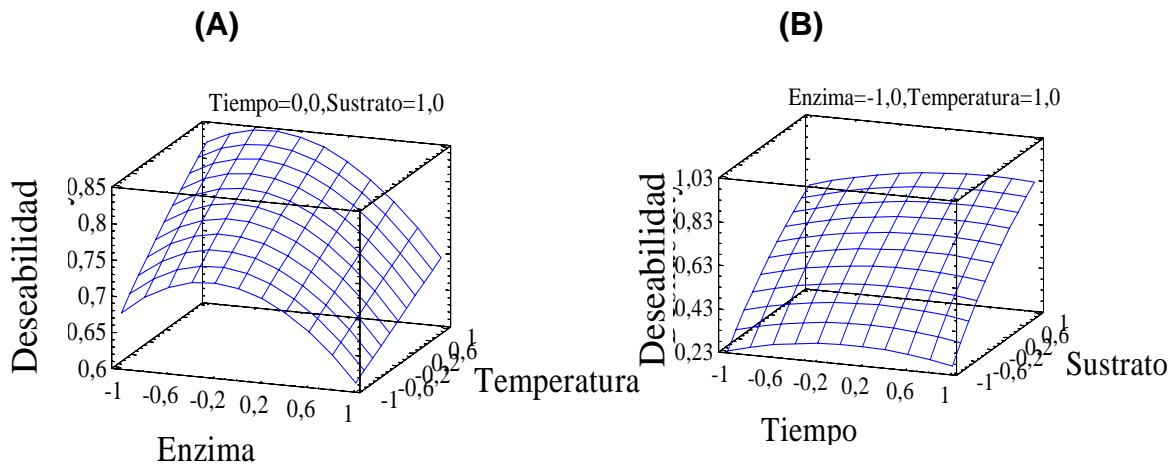


Figura 3.15 Efecto de las variables de proceso sobre la “deseabilidad” de la reacción: **A.** Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción, **B.** Efecto del tiempo de reacción y la relación de sustratos.

3.4.1.4 Escalado a 1 kilogramo

Para este proceso se utilizó el reactor mostrado en la **Figura 3.3** en las condiciones seleccionadas en la etapa anterior (**Tabla 3.11**). Otros parámetros establecidos para la reacción fueron: 5,0% de agua respecto al peso de la enzima y velocidad de agitación igual a 250 rpm (necesaria para mantener dispersa toda la enzima en el reactor). Bajo estas condiciones se espera que la RTA-2 alcance un valor de 25.8% y la hidrólisis un valor máximo de 7.0%.

Además de medir la evolución de las reacciones de transesterificación y de hidrólisis, se evaluó la variación en la concentración de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles durante la reacción. Durante la primera hora la reacción de hidrólisis tiene una fuerte participación debido al mayor contenido de agua en el medio de reacción, lo que conduce a una liberación mayor de FA, especialmente, en los primeros 15 minutos (8.0% /h). Sin embargo, a medida que transcurre la reacción, disminuye el agua del medio, y la velocidad de hidrólisis se hace menor y aproximadamente constante después de dos horas (0.05% /h).

El grado de hidrólisis después de 6 horas de reacción alcanza el valor de 3.4%, como se observa en la **Figura 3.16**. Este valor es inferior al predicho por el modelo y puede deberse en parte al hecho de que la reacción se realizó en un reactor abierto a la atmósfera que permite la liberación del agua del medio de reacción.

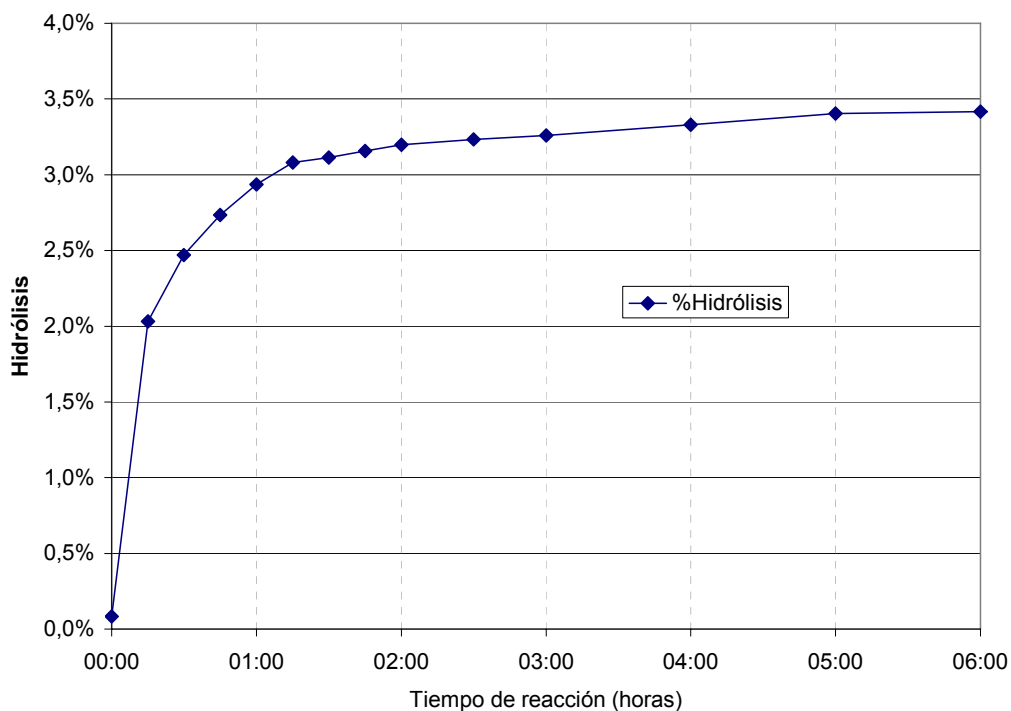


Figura 3.16 Evolución del grado de hidrólisis con el tiempo de reacción, en el proceso de transesterificación del sistema SBO:PKO a escala de 1 kg

La composición en ácidos grasos de los acilgliceroles de la mezcla de reacción, como se observa en la **Figura 3.17**, permanece aproximadamente constante, excepto en la primera hora de reacción, durante la cual inicialmente disminuye la concentración de los ácidos grasos saturados (láurico, mirístico, palmítico y esteárico, principalmente) por hidrólisis del esqueleto del glicerol. Posteriormente se da liberación de ácidos grasos insaturados (oleico y linoleico), hasta alcanzar paulatinamente una composición en ácidos grasos que se mantiene aproximadamente constante después de la segunda hora de reacción.

Es importante notar que los cambios más drásticos ocurren en las dos primeras horas de reacción, durante las cuales se presenta la mayor actividad de hidrólisis de la enzima con liberación en primera instancia de los ácidos grasos saturados.

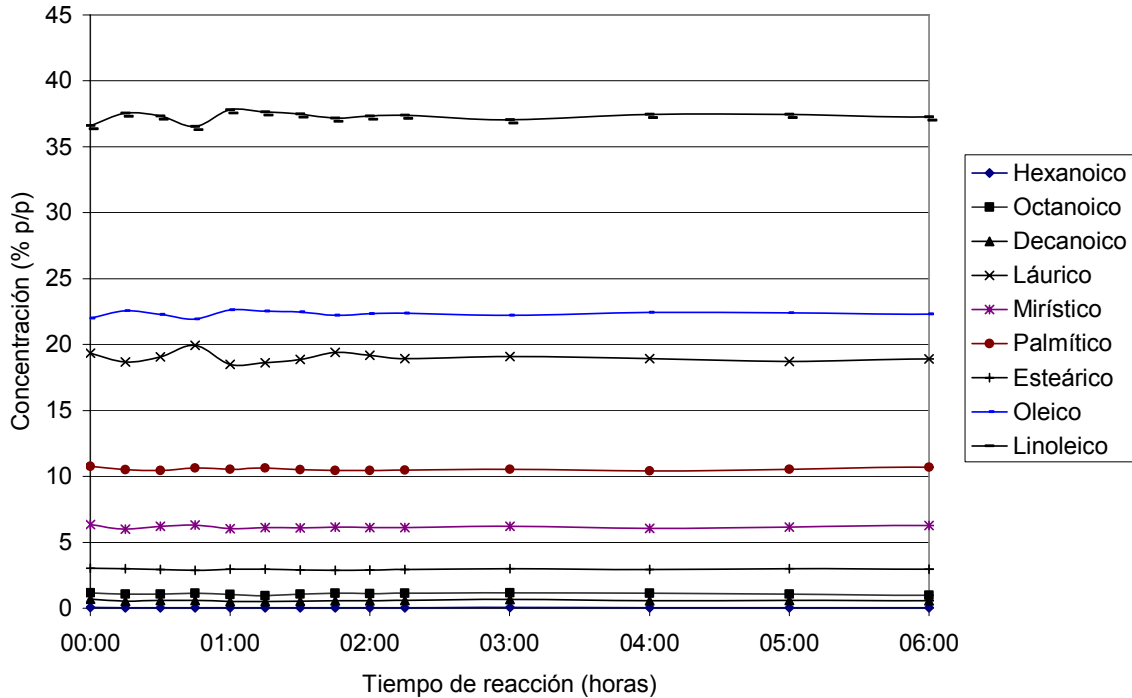


Figura 3.17 Variación en la composición en ácidos grasos del producto transesterificado (libre de acidez) con el tiempo de reacción.

En cuanto a la producción de lípidos estructurados, con el transcurso de la reacción de transesterificación entre el SBO y PKO se generan una serie de TAG, ausentes en la mezcla física o presentes en muy bajas concentraciones, tal y como se discutió en el *numeral 3.4.1*, y parte de los cuales se agruparon en la RTA-2 que se utiliza como parámetro para medir la evolución de la reacción de transesterificación y la consecuente generación de lípidos estructurados.

En la **Figura 3.18** se presenta la evolución de la RTA-2 con el tiempo de reacción, y permite observar que la velocidad de producción de SL disminuye con el tiempo en la medida en que la reacción se acerca al equilibrio.

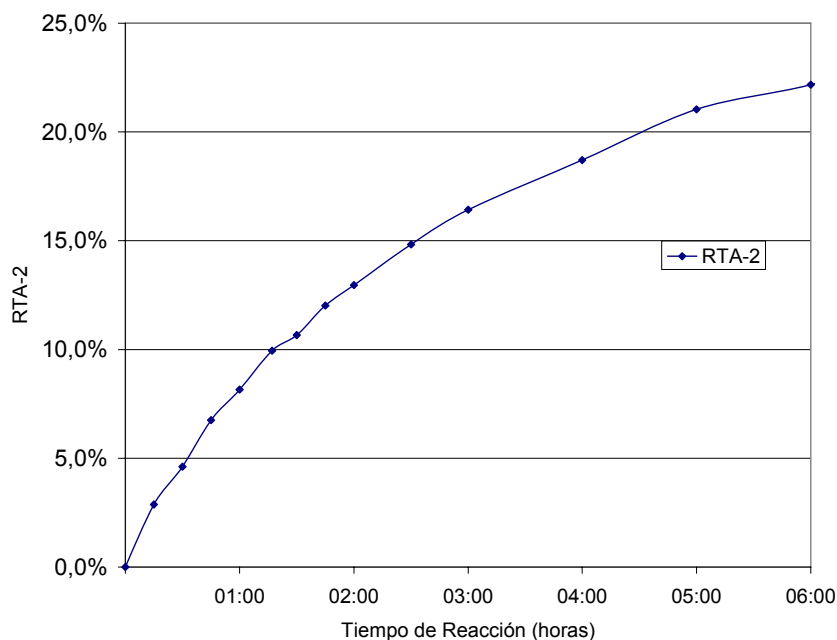


Figura 3.18 Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala de 1 kg, medido por el incremento en la RTA-2.

Aunque después de 6 horas de reacción la RTA-2 tiene un valor igual a 22.2%, menor al valor predicho (25.8%) y la hidrólisis un valor de 3.4% también menor que el predicho (7.0%). Estos valores indican que el modelo desarrollado permite hacer una buena aproximación para maximizar la producción de lípidos estructurados y minimizar la hidrólisis de los sustratos.

3.4.1.5 Escalado a planta piloto (35 kg)

Los ensayos a escala de planta piloto (35 kg) se realizaron en reactores de 60 litros de capacidad, provistos de agitador de propela de tres aspas (**Figura 3.4**), bajo las condiciones de reacción seleccionadas para la escala a 1 kg. La velocidad de agitación se elevó de 250 a 350 rpm, para mantener dispersa la enzima en el medio de reacción.

En este caso, tal como se observó en el escalado a 1 kg, durante la primera hora del proceso, la reacción de hidrólisis tiene una fuerte participación debido al mayor contenido de agua en el medio de reacción. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, disminuye el agua del medio y la velocidad de hidrólisis se hace menor, manteniéndose aproximadamente constante después de la primera hora. A las 6 horas de reacción, alcanza el valor de 3.45%, similar al obtenido a escala de 1 kg (3.4%) y menor al valor predicho del diseño experimental.

En la **Figura 3.19** se presenta la evolución de la RTA-2 con el tiempo de reacción. Se observa que la velocidad de producción de los lípidos estructurados disminuye con el tiempo hasta que la reacción se acerca al equilibrio y la RTA-2 alcanza un valor igual a 27.0% en 6 horas de reacción, valor cercano al predicho por la *metodología de optimización multivariable*.

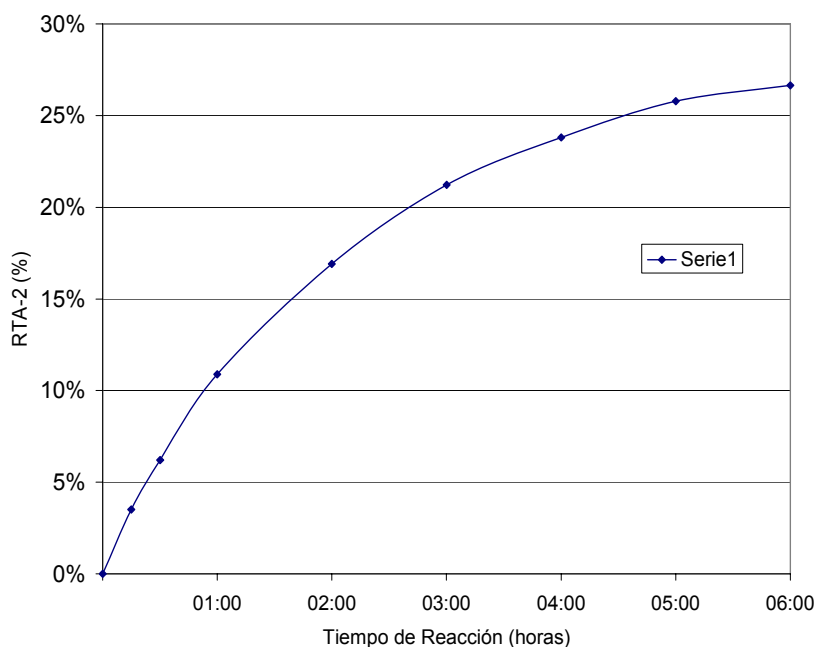


Figura 3.19 Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg), medido por el incremento en la RTA-2.

En términos generales, la producción de lípidos estructurados a escala piloto sigue el patrón determinado a escala de 1 kg y a su vez es consecuente con los resultados predichos por el modelo matemático resultante del diseño experimental y se acerca a las condiciones que maximizan la producción de lípidos estructurados y minimizan la reacción de hidrólisis.

La **Tabla 3.12** muestra otros parámetros como el punto de fusión y el contenido de grasa sólida (SFC) a 15 °C usados como indicadores del avance de la reacción de interesterificación en el escalado a planta piloto.

Tabla 3.12 Resultados seguimiento de la reacción a escala piloto: 35 kg aceite (SBO:PKO 60:40 p/p), 0.875 kg enzima, 0.044 kg agua, 70 °C

Tiempo hh:mm	$t_b \cdot w_b / V_b$ [minutes]	Hidrólisis (%)	p.f. (°C)	SFC (15 °C) (%)	SFC (15 °C) Modelo	(Dif) ²
00:00	0,00	0,15	21,0	11,8	11,29	0,2589
00:15	0,38	2,61	19,0	8,6	9,12	0,2708
00:30	0,75	2,93	18,0	7,0	7,48	0,2352
01:00	1,50	3,10	17,0	5,6	5,32	0,0758
02:00	3,00	3,21	16,0	4,0	3,40	0,3569
03:00	4,50	3,29	15,5	3,0	2,78	0,0469
04:00	6,00	3,37	15,0	2,7	2,58	0,0135
05:00	7,50	3,38	14,5	2,4	2,52	0,0143
06:00	9,00	3,48	14,5	2,3	2,50	0,0320
08:00*	12,00	3,60	14,4	2,3	2,49	0,0362

* La reacción se extendió dos horas más para obtener datos suficientes para el desarrollo del modelo exponencial en función de los valores de SFC.

De acuerdo con Novozymes (2004), al suponer que la inactivación de la enzima durante el lote de reacción es despreciable, la relación inversa, f^{-1} entre el contenido de grasa sólida y la cantidad de aceite procesado por razón enzima/sustrato y por unidad de tiempo, puede describirse mediante el modelo exponencial descrito por la Ecuación 3.2.

$$sfc = f^{-1} \left[\frac{t_b * w_b}{V_b} \right] = A_0 + \Delta A * \left[1 - \exp \left[-k \left(\frac{t_b * w_b}{V_b} \right) \right] \right] \quad \text{Ec. 3.2}$$

Donde:

k (0.7552), A_0 (11.2912) y ΔA (-8.8020) son constantes del modelo que se determinan a partir de los datos del experimento por lotes (**Tabla 3.12**).

t_b : Tiempo de reacción en el reactor por lotes, en minutos;

w_b : Razón enzima/sustrato en el reactor por lotes, kg;

V_b : Cantidad de aceite en el reactor por lotes, kg;

Sfc: Contenido de grasa sólida en el tiempo t_b .

En la **Figura 3.20** correspondiente al modelo exponencial para los datos de la **Tabla 3.12** muestra que el modelo descrito en la ecuación 3.2 es adecuado para describir los valores de SFC observados experimentalmente a 15 °C. Por lo tanto es posible establecer que las lecturas de SFC a 15 °C pueden utilizarse como indicadores del avance de la reacción de transesterificación.

Este aspecto es de gran relevancia en caso de no disponer de un equipo de cromatografía gaseosa ya que los análisis por RMN para determinar las curvas de SFC son, en general, más económicos y sencillos de realizar para la industria.

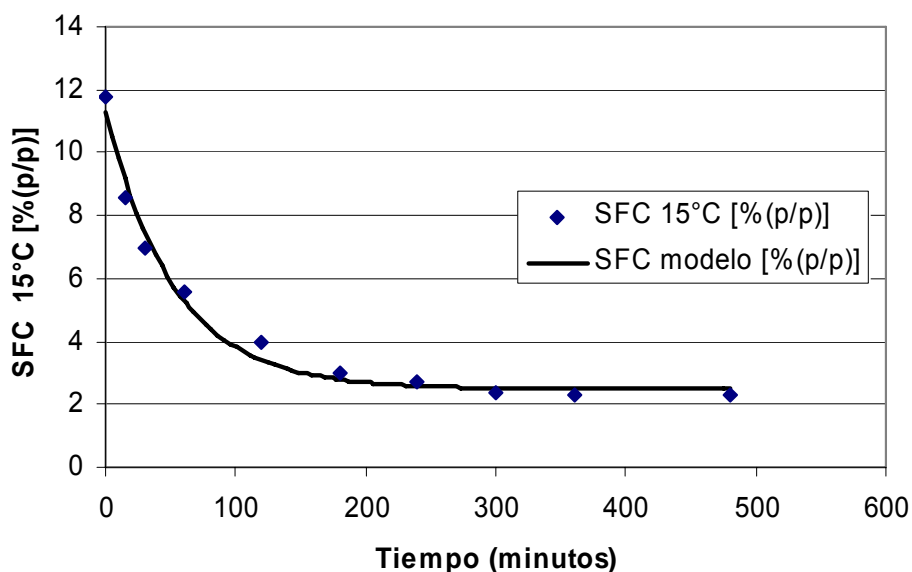


Figura 3.20 Valores de SFC medidos experimentalmente a 15 °C y valores SFC predichos por el modelo matemático desarrollado (Ec. 3.2) para la reacción por lotes.

3.4.1.6 *Estudio cinético de la reacción de transesterificación. Cambios en los triacilgliceroles con el transcurso de la reacción.*

Con el transcurso de la reacción de transesterificación, disminuyen la concentración de los TAG presentes inicialmente en alta proporción en el aceite de palmiste (C30 a C40, saturados) y en el aceite de soya (C52 y C54, insaturados), para dar origen a triacilgliceroles estructurados (C42, C44, C46, C48 y C50) que combinan ácidos grasos de cadena media con ácidos grasos de cadena larga. En las **Figuras 3.21** y **3.22** se muestran los perfiles cromatográficos de la mezcla SBO:PKO (60:40) antes y después de la reacción de transesterificación, respectivamente.

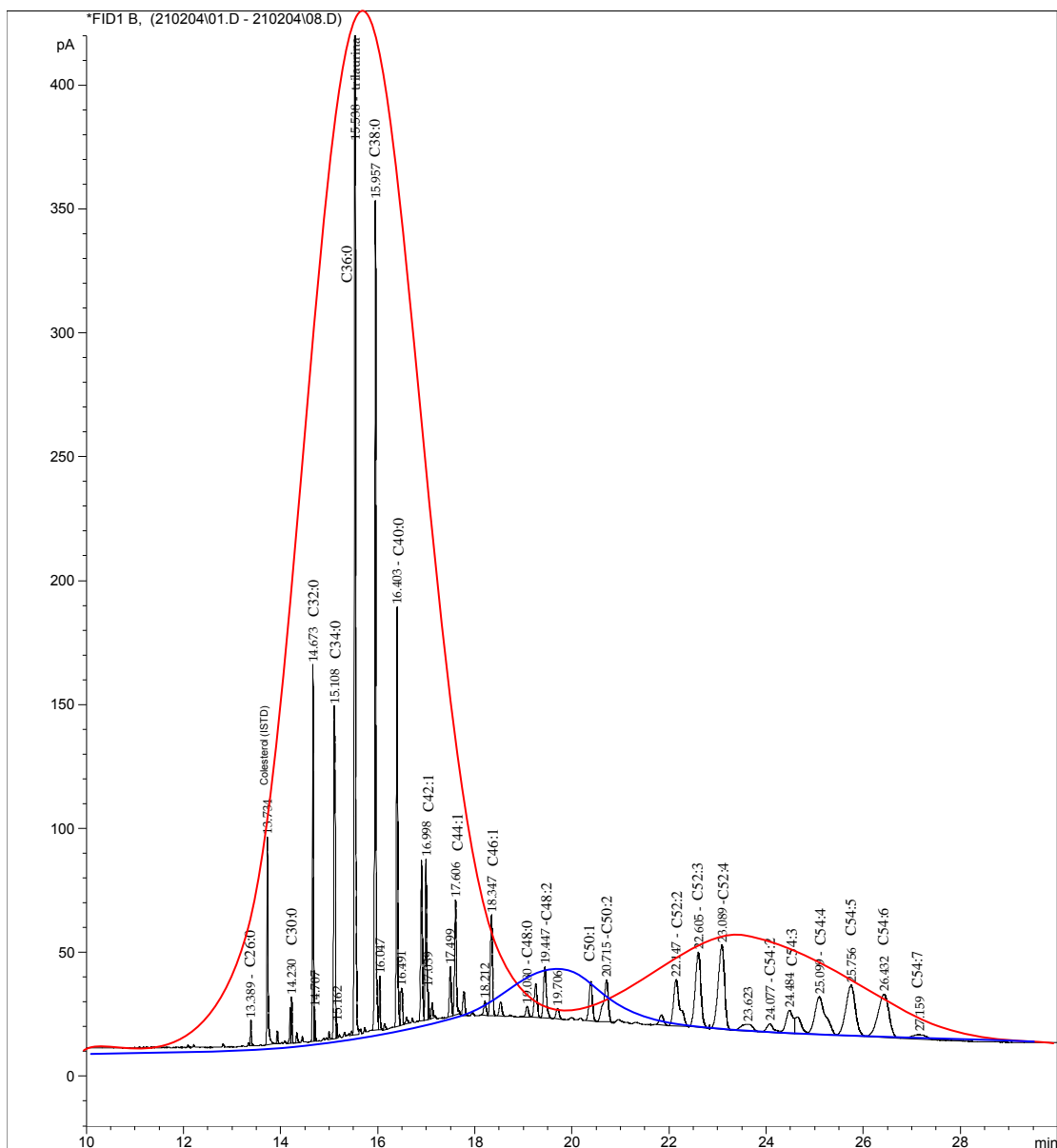


Figura 3.21 Perfil cromatográfico de la mezcla inicial SBO:PKO 60:40 (0 horas). Condiciones: Columna MXT-65TG: 30 m, 0.25 mm ID, 0.1 μ m. Gas de arrastre: Helio a 40 cm/s. Horno: 240 $^{\circ}$ C (1 min) a 360 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C/min) mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID, a 370 $^{\circ}$ C, Nitrógeno como *make up* a 30 ml/min. La línea roja agrupa los TAG que disminuyen durante la reacción y la azul los que se generan.

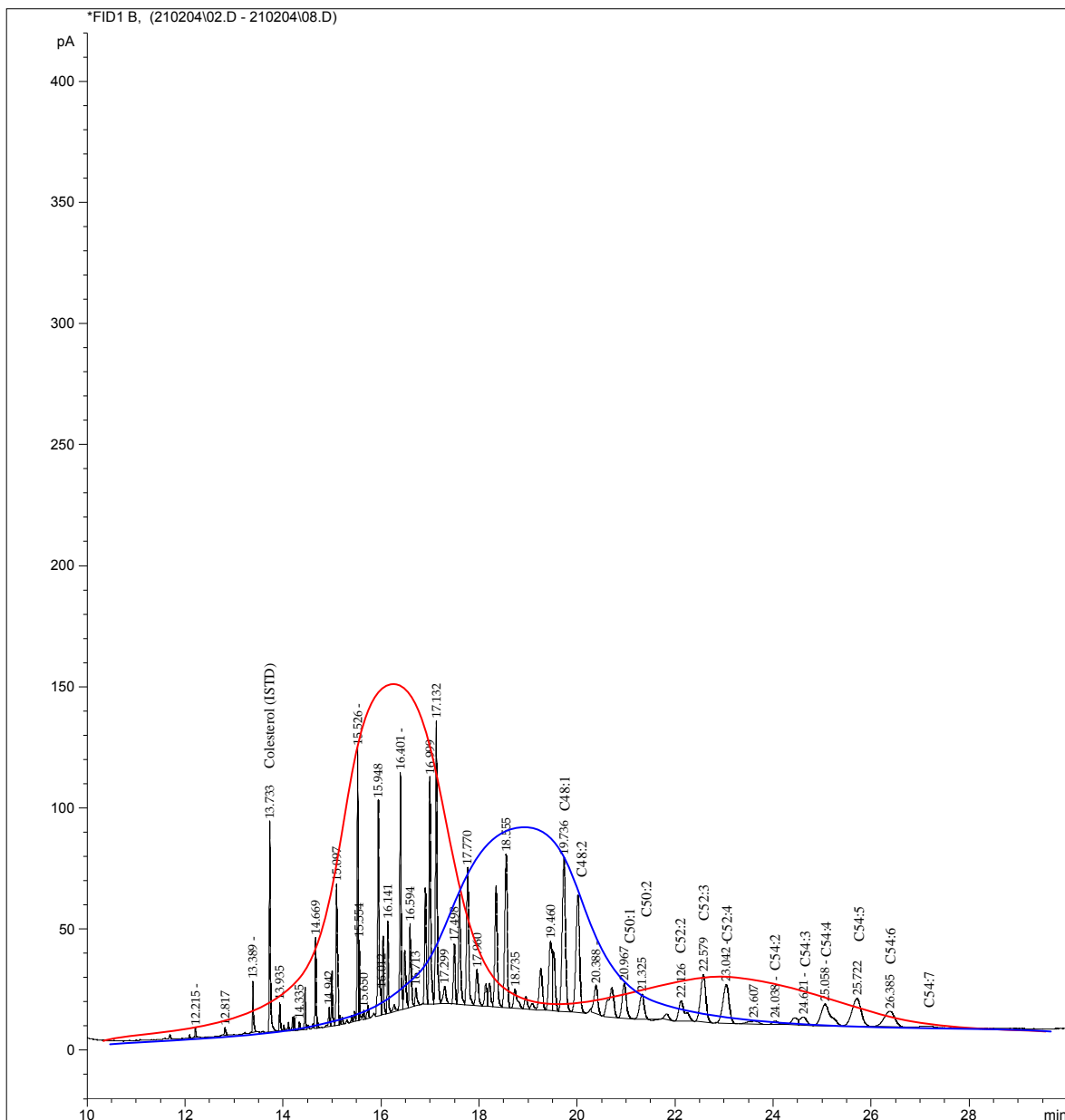


Figura 3.22 Cromatograma HTGC de la mezcla SBO:PKO (60:40) después de 6 horas de reacción. Condiciones: Columna MXT-65TG: 30 m, 0.25 mm ID, 0.1 μ m. Gas de arrastre: Helio a 40 cm/s. Horno: 240 $^{\circ}$ C (1 min) a 360 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C/min). mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID, a 370 $^{\circ}$ C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min. La línea roja agrupa los TAG que disminuyen durante la reacción y la azul los que se generan.

Los cambios más importantes en la composición de TAG ocurren dentro de las cuatro (4) primeras horas de reacción, durante las cuales los triacilgliceroles presentes en mayor concentración en el aceite de palmiste (C36 y C38) y el aceite de soya (C52 y C54), se consumen por intercambio de los ácidos grasos unidos a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de las moléculas de triacilgliceroles que se combinan (Véase las Figuras 3.23 y 3.24). A continuación se hace un análisis detallado de su evolución:

TAG C38: Este grupo está conformado por el TAG C38:0 (LaLaM) que se consume en la reacción, y los TAG estructurados C38:1 (CyLaO) y C38:2 (CyLaL) que se generan (Figura 3.25). La formación de los TAG C38:1 y C38:2 es baja debido a que la concentración del ácido caprílico (Cy) es baja en la mezcla de reacción.

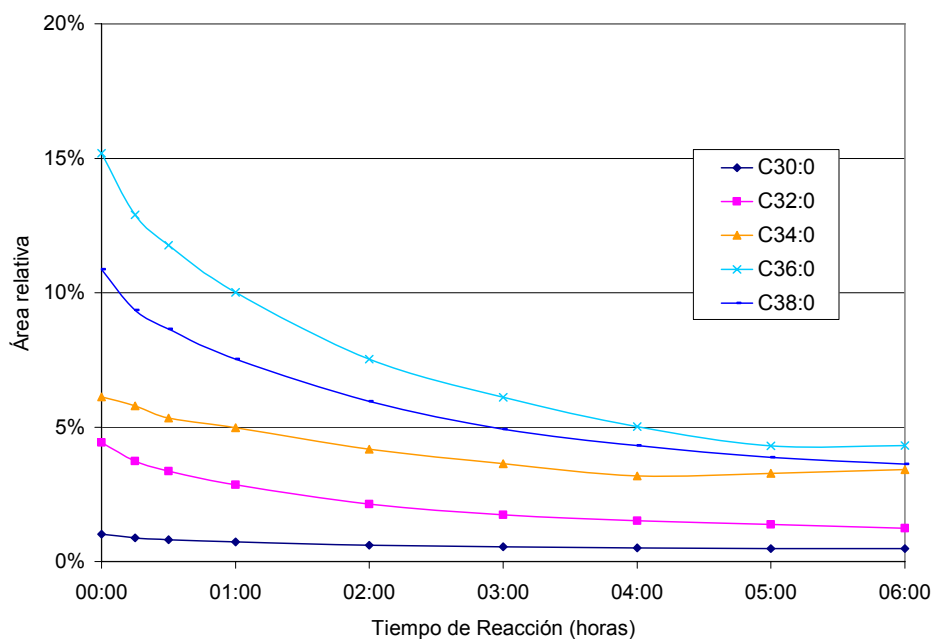


Figura 3.23 Cambio en la concentración de los TAG saturados con ACN 30 a 38, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.

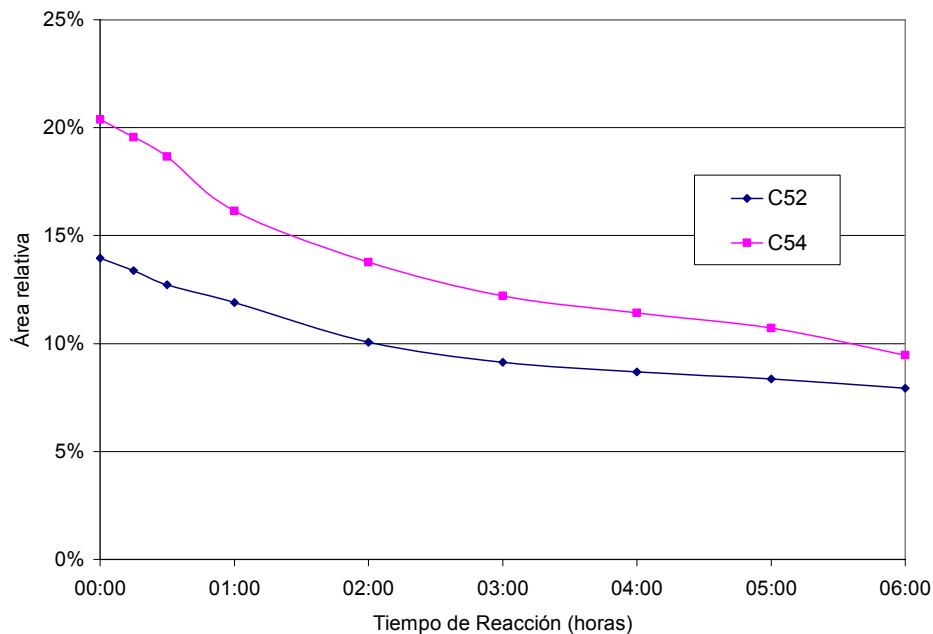


Figura 3.24 Cambio en la concentración de los TAG insaturados con ACN 52 y 54, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.

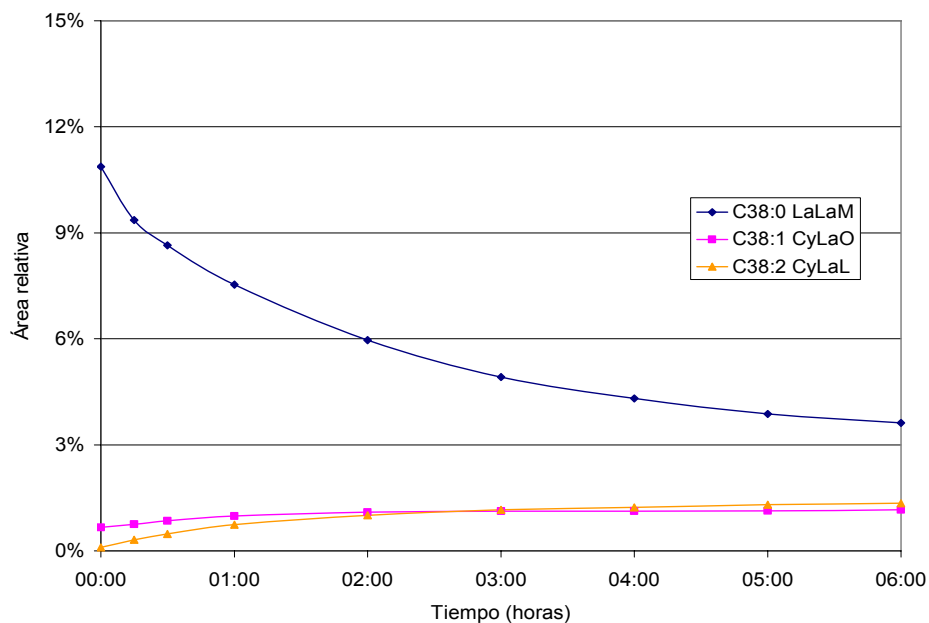


Figura 3.25 Cambio en la concentración de los TAG C38:0, C38:1 y C38:2, con el tiempo de reacción. Expresado como el cambio en el área relativa de los picos.

TAG C40: Está conformado por el TAG C40:0 (LaMM) que se consume en la reacción y los TAG estructurados C40:1 (CLaO), C40:2 (CLaL) y C40:3 (CLaLn), los cuales se producen durante la transesterificación. El TAG C40:2, es el que se produce en mayor proporción, como se observa en la **Figura 3.26**.

TAG C42: Conformado por los TAG C42:0 (MMM), C42:1 (LaLaO), C42:2 (LaLaL, CyPL) y C42:3 (LaLaLn). De este grupo los TAG estructurados C42:2 y C42:3, prácticamente ausentes en la mezcla inicial, empiezan a incrementar su concentración con el avance de la reacción, hasta la sexta hora, donde alcanzan una concentración aproximadamente constante (véase la **Figura 3.27**).

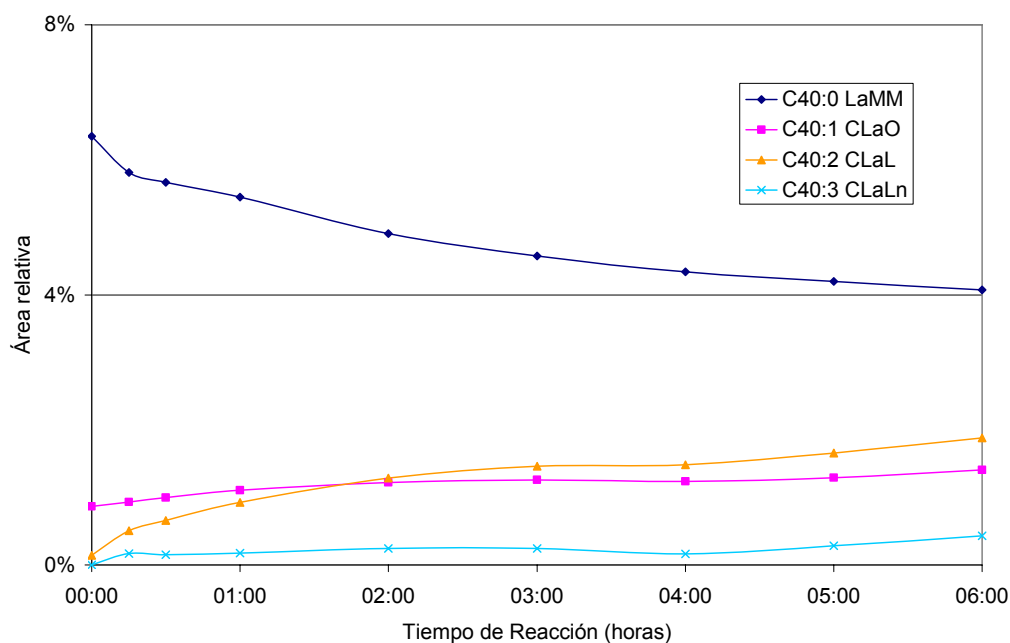


Figura 3.26 Cambio en la concentración de los TAG C40:0, C40:1, C40:2 y C40:3 con el tiempo de reacción. Expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes.

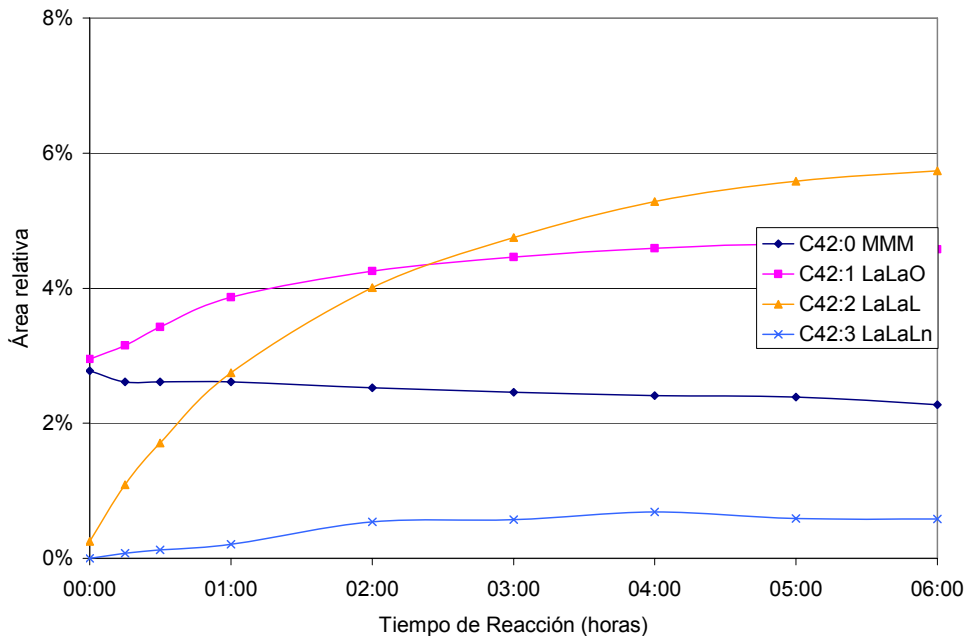


Figura 3.27 Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1, C42:2 y C42:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos

TAG C44: Respecto a los TAG C44, se observa que los principales cambios los presentan los TAG estructurados C44:2 (LaML, CPL, CyOO) y el TAG C44:3 (CyOL, LaMLn) que incrementan su concentración a una velocidad relativamente alta desde el inicio de la reacción hasta la cuarta hora del proceso, tiempo a partir del cual presentan cambios muy leves. Los TAG C44:0 y C44:1 no sufren cambios significativos, como puede verse en la **Figura 3.28**.

TAG C46: Del grupo de TAG con ACN C46, el TAG estructurado C46:2 (LaPL, MML, COO) tiene el incremento más significativo en el transcurso de la reacción, seguido del TAG C46:3 (COL, MMLn, LaPLn), como se observa en la **Figura 3.29**.

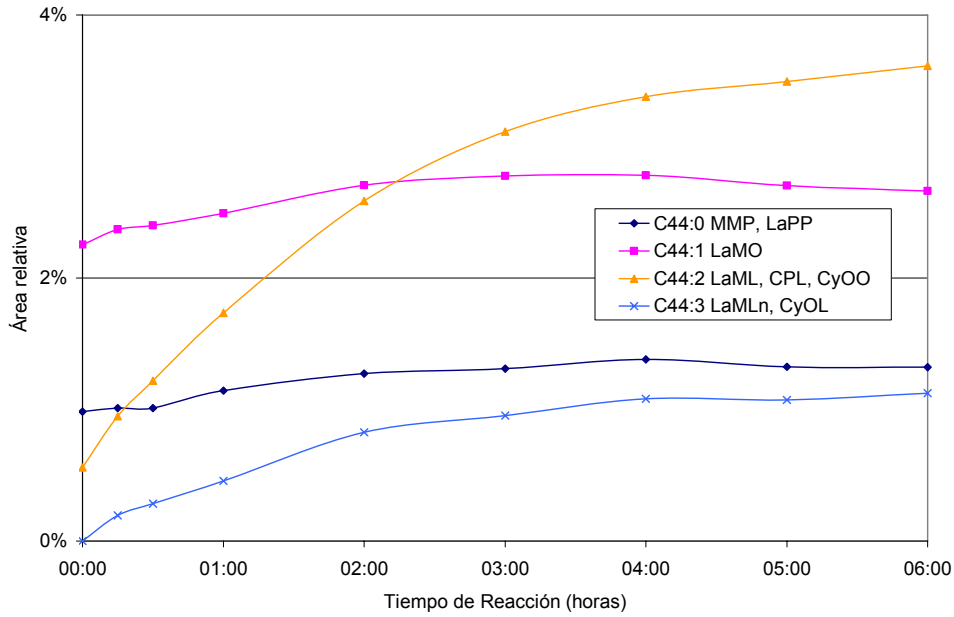


Figura 3.28 Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y C44:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.

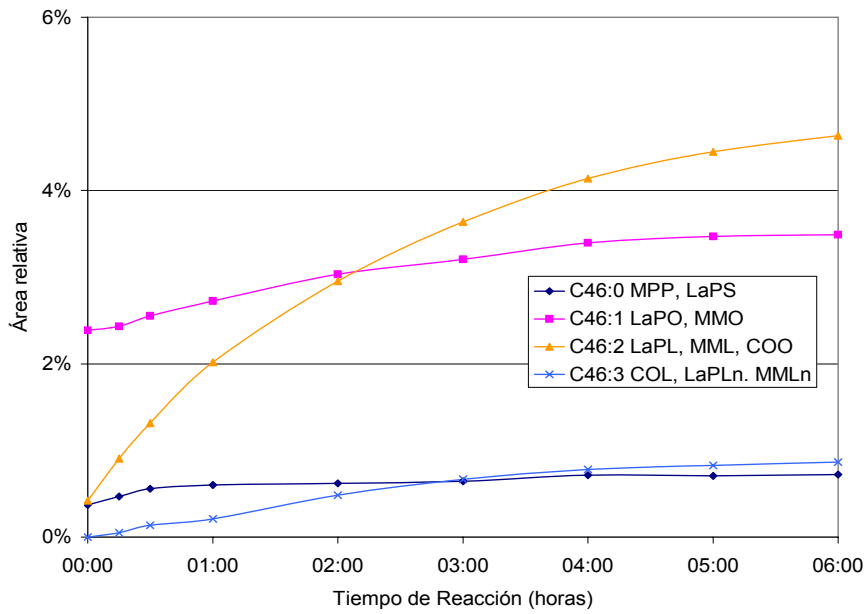


Figura 3.29 Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1, C46:2 y C46:3, con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.

TAG C48: De este grupo, la concentración de los TAG estructurados C48:2 (MPL, LaOO), C48:3 (LaOL) y C48:4 (LaLL, LaOLn) sufren un incremento significativo con el transcurso de la reacción. El TAG C48:1 (MPO) incrementa levemente (véase la **Figura 3.30**).

TAG C50: De este grupo, solamente incrementan su concentración los TAG C50:3 (MOL) y C50:4 (MLL, MOLn); los TAG C50:1 (PPO) y C50:2 (MOO, PPL) permanecen aproximadamente constante, como se observa en la **Figura 3.31**.

Los resultados anteriores muestran que durante la reacción de transesterificación entre los aceites de soya y de palmiste (60:40 p/p) catalizada por Lipozyme® RM-IM, se producen cambios en la estructura y composición de la mezcla. Se forman los TAG C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4, principalmente, en tanto que se consumen TAG saturados C30:0, C32:0, C34:0, C36:0, C38:0 y C40:0. Lo anterior trae como consecuencia la disminución del contenido de grasa sólida y del punto de fusión de la mezcla, en la medida en que avanza la reacción.

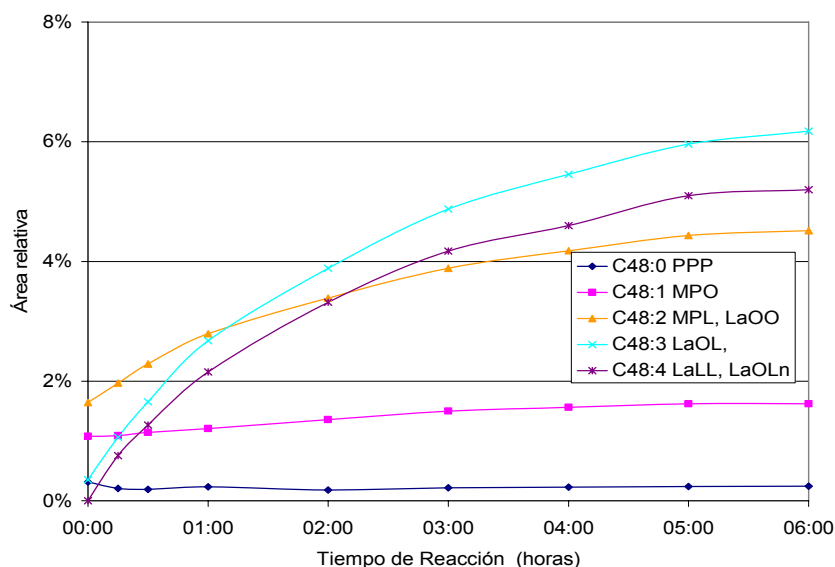


Figura 3.30 Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4, con el tiempo de reacción. Expresado como el cambio en el área relativa.

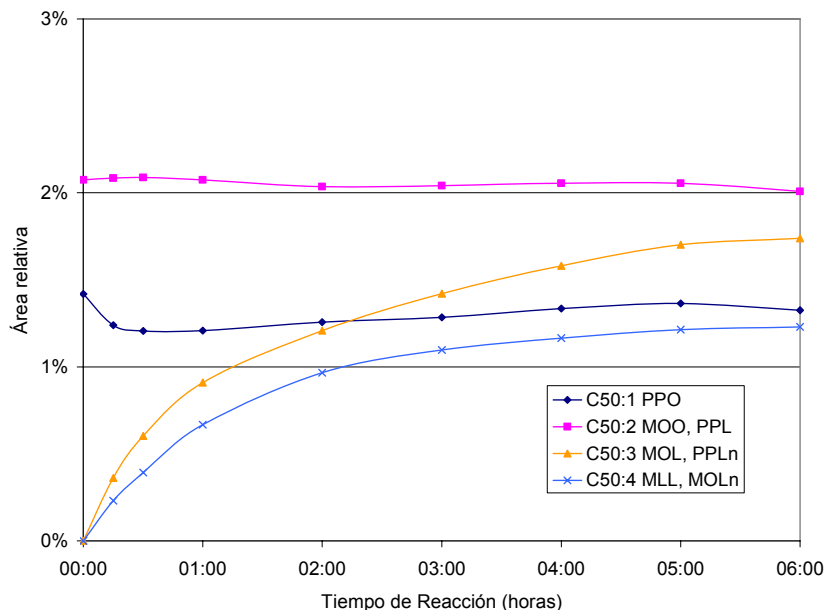


Figura 3.31 Cambio en la concentración de los TAG C50:1, C50:2, C50:3 y C50:4, con el tiempo de reacción. expresado como el cambio en el área relativa.

3.4.2 SISTEMA 2.

Aceite soya - aceite de palmiste (SBO:PKO)-Lipozyme® TL-IM

En este caso, la evaluación y selección de las condiciones de reacción se realizó de acuerdo a un diseño experimental de composición central de segundo orden, de tres factores y tres niveles y con 18 experimentos individuales. Los factores estudiados fueron: razón enzima/sustrato, temperatura de reacción y tiempo de reacción. La relación de sustratos SBO:PKO se mantuvo constante en 60:40 p/p. Como variables respuestas se eligieron el grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (RTA-1) y el incremento en el área relativa de los TAG C42:2, C44:2, C46:2, C48:2, C48:3 y C48:4, (RTA-2), al igual que con el sistema catalizado por Lipozyme® RM-IM. Las variables independientes y sus niveles se presentan en la **Tabla 3.13** y los 18 experimentos individuales en la **Tabla 3.14**.

Tabla 3.13 Variables independientes y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:PKO utilizando Lipozyme ® TL-IM como catalizador.

Variable	Símbolo	Código del nivel de la variable				
		-1.79	-1	0	1	1.79
Razón enzima/sustrato, IUN*/g aceite, (%p/p**)	Ec	1.3 (0.5%)	6.3 (2.5%)	12.5 (5.0%)	18.8 (7.5%)	23.8 (9.5%)
Temperatura de reacción (°C)	Tr	40	50	60	70	80
Tiempo de reacción (horas)	t	3	4	5	6	7

*IUN: Interesterification Unit Novo (unidad de interesterificación Novo)

** %p/p: Porcentaje en peso respecto al peso del aceite

Tabla 3.14 Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:PKO utilizando Lipozyme ® TL-IM como catalizador.

Exp.	Enzima		Temp.	Tiempo	Hidrólisis	Rta-2
	IUN	Nivel	Nivel	Nivel	(%)	(%)
1	12.5	0	0	0	3,85%	26,2%
2	6.3	-1	-1	-1	1,50%	22,5%
3	18.8	1	-1	-1	4,14%	26,4%
4	6.3	-1	1	-1	3,80%	23,1%
5	18.8	1	1	-1	4,41%	26,3%
6	6.3	-1	-1	1	1,99%	23,0%
7	18.8	1	-1	1	4,39%	24,6%
8	6.3	-1	1	1	2,35%	29,8%
9	18.8	1	1	1	4,74%	29,6%
10	12.5	0	0	0	3,79%	28,2%
11	12.5	0	0	0	3,52%	26,6%
12	1.3	-1,79	0	0	2,66%	20,2%
13	23.8	1,79	0	0	5,45%	28,0%
14	12.5	0	-1,79	0	2,79%	19,6%
15	12.5	0	1,79	0	6,58%	28,2%
16	12.5	0	0	-1,79	3,85%	26,2%
17	12.5	0	0	1,79	3,49%	28,5%
18	12.5	0	0	0	4,00%	26,2%
19	6.3	-1	0	0	2,65%	24,9%

** RTA-2: Incremento en área relativa de los picos cromatográficos de los TAG C42:2, C44:2, C46:2, C48:2, C48:3 y ΔC48:4.

3.4.2.1 Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación.

Al utilizar como catalizador de la reacción la Lipozyme® TL-IM, en el sistema SBO:PKO, todas las variables evaluadas (temperatura de reacción, razón enzima/sustrato y tiempo de reacción) tienen un efecto positivo y estadísticamente significativo sobre la RTA-2, a un nivel de confianza del 95%, es decir, el grado de interesterificación aumenta en la medida en que estos factores se desplazan del nivel más bajo al nivel más alto, como se deduce de los diagramas de Pareto (**Figura 3.32**) y de Efectos principales (**Figura 3.33**).

Similares resultados se obtuvieron al hacer el análisis de la varianza en donde, además, se pudo establecer que los términos cuadráticos de las variables independientes, enzima y temperatura, tienen efectos significativos sobre la variable respuesta RTA-2 en un nivel de confianza del 95%, al igual, que la interacción temperatura-tiempo (**Tabla 3.15**).

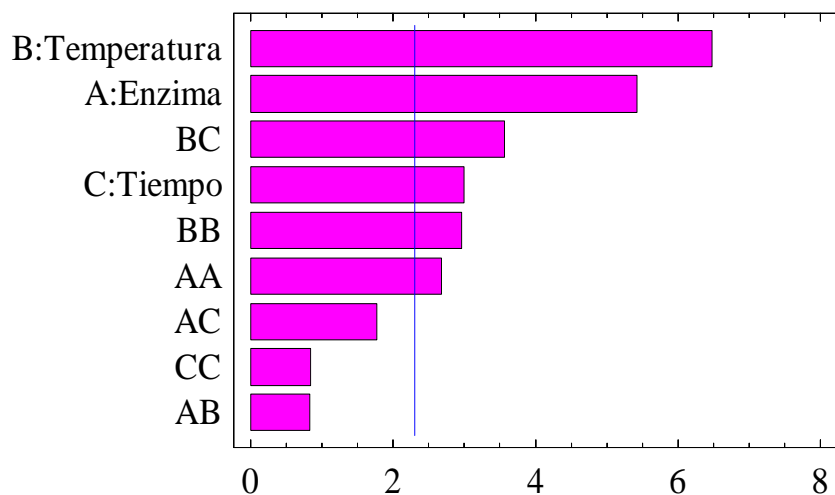


Figura 3.32 Diagrama de Pareto para la variable RTA- 2.

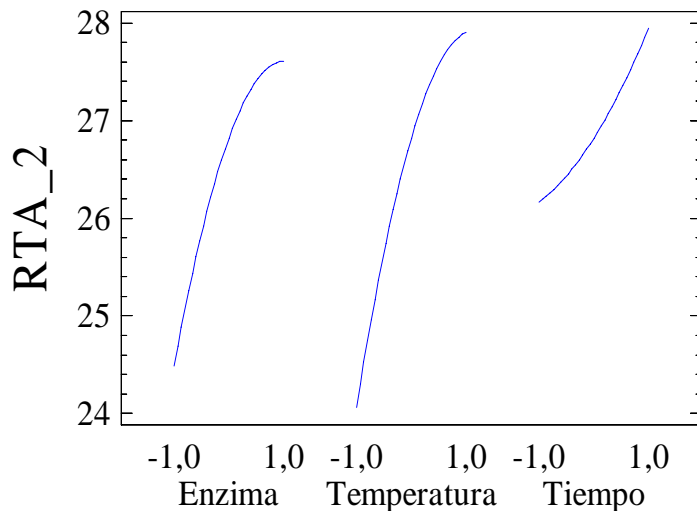


Figura 3.33 Diagrama de efectos principales para la variable respuesta RTA-2.

Tabla 3.15 Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2.

Fuente	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio (SCM)	Relación F	Valor P
A:Enzima	37.2073	1	37.2073	29.41	0.0006
B:Temperatura	53.1018	1	53.1018	41.97	0.0002
C:Tiempo	11.3846	1	11.3846	9.00	0.0171
AA	9.08578	1	9.08578	7.18	0.0279
AB	0.85805	1	0.85805	0.68	0.4341
AC	3.9762	1	3.9762	3.14	0.1142
BB	11.0775	1	11.0775	8.76	0.0182
BC	16.0745	1	16.0745	12.71	0.0074
CC	0.89997	1	0.89997	0.71	0.4235
Total error	10.1209	8	1.26511		
Total (corr.)	154.098	18			

El modelo matemático predicho en este caso para la respuesta RTA-2 corresponde a un polinomio de la forma general de la **Ecuación 3.3**. En la tabla **Tabla 3.16** se presentan los coeficientes de regresión ($\beta_0, \beta_i, \beta_{ij}$). X_i representa las variables independientes (A, B, C y D).

$$RTA - 2 (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. 3.3}$$

El valor estadístico R²-cuadrado, el cual es adecuado para medir el grado de ajuste del modelo, fue igual a 93.43% lo que indica que el modelo logra explicar el 93.43% de la variabilidad en la RTA-2.

Tabla 3.16 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Términos		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	26.8197
	A: Enzima	β_1	1.56279
	B: Temperatura	β_2	1.92032
	C: Tiempo	β_3	0.88916
Cuadrático	AA	β_4	-0.77431
	BB	β_5	-0.83534
	CC	β_6	0.23810
Interacciones	AB	β_7	-0.32750
	AC	β_8	-0.7050
	BC	β_9	1.41750

R²-cuadrado =93.43% R²-cuadrado (ajustado por GL) = 86.86%

Al realizar los gráficos de superficie de respuesta para ver el efecto sobre la RTA-2, de variar simultáneamente: a) la *razón enzima/sustrato* y la *temperatura de reacción* manteniendo el tiempo en el nivel cero (0) (**Figura 3.34**), b) la *Razón enzima/sustrato* y el *Tiempo de reacción* manteniendo la *Temperatura* en un valor constante (nivel uno) (**Figura 3.35**), y c) el *Tiempo* y la *Temperatura reacción* manteniendo la *Razón enzima/sustrato* en el nivel 0 (**Figura 3.36**), se puede deducir que la RTA-2 se incrementa cuando la temperatura de reacción tiende hacia el nivel más alto evaluado, nivel 1 (70 °C) y la razón enzima/sustrato utilizada está entre el nivel 0 (5.0%) y el nivel 1 (7.5%). Con el aumento del tiempo de reacción también se consigue elevar la RTA-2.

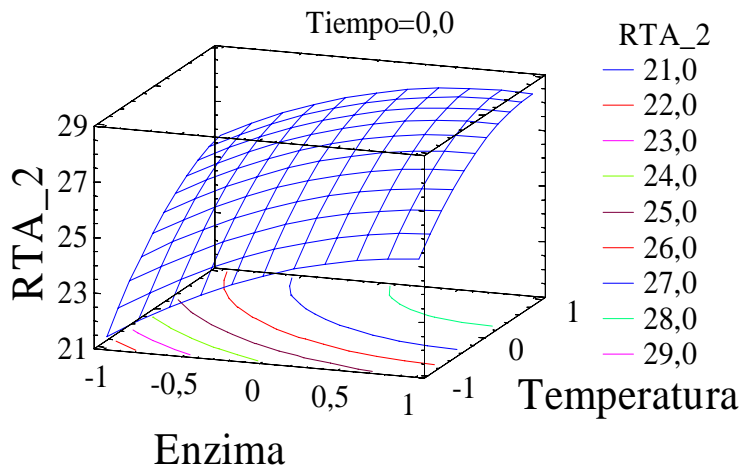


Figura 3.34 Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar simultáneamente la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre la respuesta RTA-2.

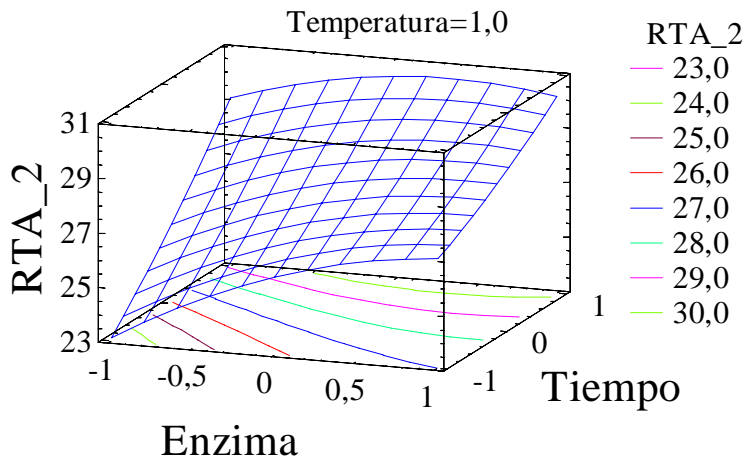


Figura 3.35 Efecto sobre la respuesta RTA-2, al variar simultáneamente la razón enzima/sustrato y el tiempo e reacción.

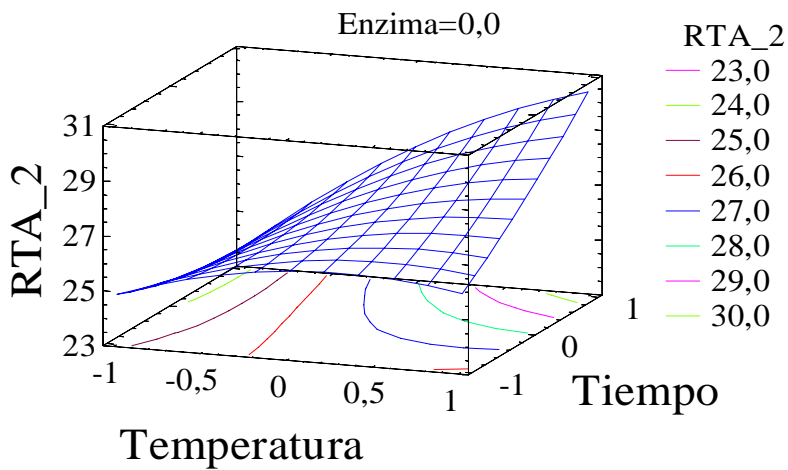


Figura 3.36 Efecto sobre la respuesta RTA-2, al variar simultáneamente el tiempo y la temperatura de reacción.

En este sentido, los niveles de las variables que conducirían a una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2 =34,5%) de acuerdo a la Ecuación 3.3, son los que se presentan en la **Tabla 3.17**.

Tabla 3.17 Niveles de las variables que conducen a una mayor producción de lípidos estructurados.

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Enzima	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	0.0 (5.0%)
Temperatura	-1.79 (40 °C)	1.79 (80 °C)	1.79 (80 °C)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 hora)	1.79 (7 horas)
RTA-2 (%)	-----	-----	34.47%

3.4.2.2 Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis.

Las variables que tienen un efecto significativo e influyen sobre la reacción de hidrólisis son la razón enzima/sustrato utilizada y la temperatura de reacción (**Figuras 3.37** y **3.38**). A valores altos de estas variables se produce mayor hidrólisis de los TAG. El efecto del tiempo de reacción es menos pronunciado debido a que el menor nivel evaluado fue de tres (3) horas y la reacción de hidrólisis procede más eficientemente en las dos primeras horas de reacción, cuando la disponibilidad de agua en el soporte de la enzima y en el medio de reacción es mayor.

El efecto de cada una de las variables independientes, de las interacciones entre ellas y la variación aleatoria debida a errores experimentales se refleja en el análisis de la varianza (Véase la **Tabla 3.18**), encontrándose que las interacciones entre las variables no fueron significativas ($p > 0.05$).

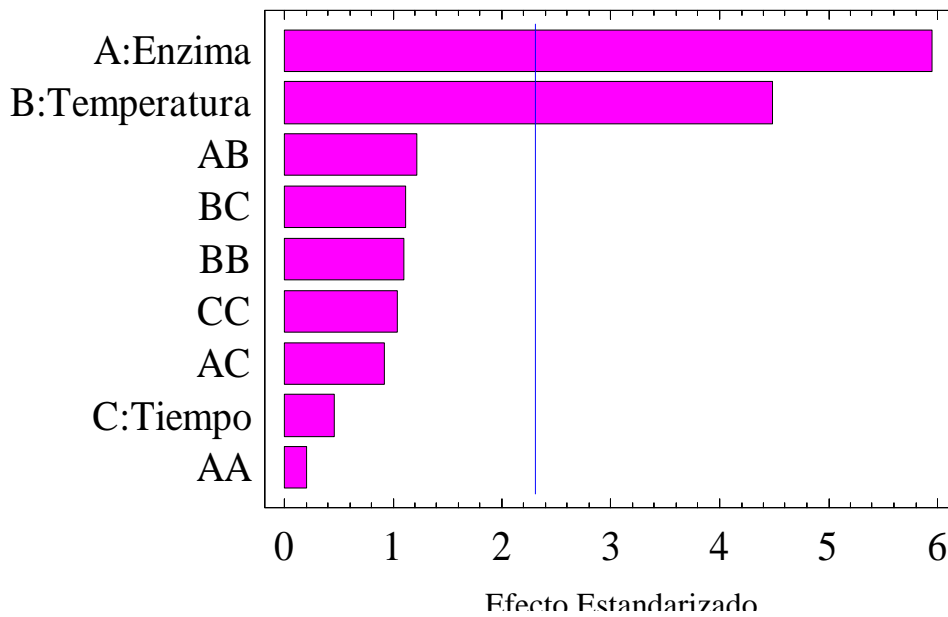


Figura 3.37 Pareto estandarizado para la variable respuesta grado de hidrólisis.

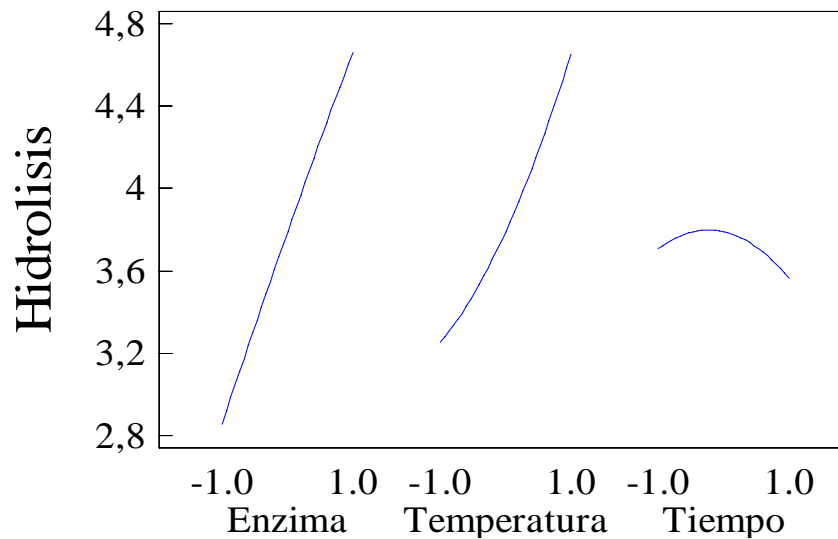


Figura 3.38 Diagrama de Efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis.

Tabla 3.18 Análisis de la Varianza para la respuesta grado de hidrólisis

Fuente	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio (SCM)	Relación F	Valor P
A:Enzima	12.3577	1	12.3577	35.36	0.0003
B:Temperatura	7.0277	1	7.0277	20.11	0.0020
C:Tiempo	0.0728	1	0.0728	0.21	0.6602
AA	0.0145	1	0.0145	0.04	0.8434
AB	0.5202	1	0.5202	1.49	0.2572
AC	0.2965	1	0.2965	0.85	0.3840
BB	0.4212	1	0.4212	1.21	0.3042
BC	0.4325	1	0.4325	1.24	0.2983
CC	0.3780	1	0.3780	1.08	0.3288
Total error	2.7960	8	0.3495		
Total (corr.)	26.4343	18			

Para la respuesta grado de hidrólisis, el modelo matemático (Ecuación 3.3) desarrollado para describir la variación de la hidrólisis en función de las variables independientes, mostró un valor para el R^2 -cuadrado igual a 89.42%, lo que indica un buen ajuste del modelo. Los coeficientes de regresión predichos para el intercepto, los términos lineales, los términos cuadráticos y los términos de interacción (β_0 , β_{ix} , β_{ij}) del modelo se presentan en **Tabla 3.19**.

Tabla 3.19 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho.

Términos	Coeficientes		
	constante	β_0	3.79025
Lineal	A: Enzima	β_1	0.90065
	B: Temperatura	β_2	0.69860
	C: Tiempo	β_3	-0.07111
Cuadrático	AA	β_4	-0.03098
	BB	β_5	0.16289
	CC	β_6	-0.15430
Interacciones	AB	β_7	-0.25500
	AC	β_8	0.19250
	BC	β_9	-0.23250

$R^2 = 89.42\%$ R^2 (ajustado por G.L.) = 78.85%

Basados en las constantes del modelo matemático se establecieron los gráficos de superficie, manteniendo una variable constante y variando las otras dos. En las **Figuras 3.39 y 3.40** se observa que el grado de hidrólisis se incrementa con la razón enzima/sustrato utilizada y con el tiempo de reacción. Aunque la razón enzima/sustrato tiene un efecto mayor sobre la hidrólisis, el efecto del tiempo de reacción, que a bajas concentraciones de enzima es débil, se acentúa a concentraciones más altas. La relación de sustratos no tiene un efecto significativo.

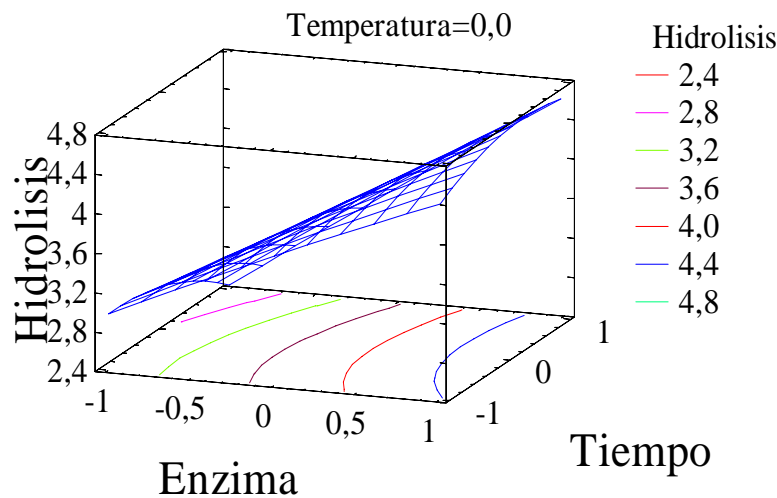


Figura 3.39 Efecto de la razón enzima/sustrato y el tiempo sobre el grado de hidrólisis.

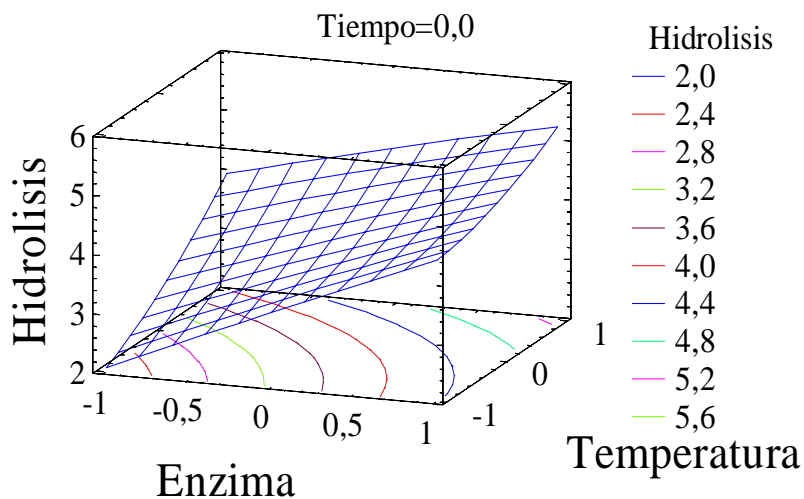


Figura 3.40 Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura sobre el grado de hidrólisis.

En estas condiciones, los niveles de las variables independientes o factores evaluados que conducen a un menor grado de hidrólisis (0.5%), en la región experimental evaluada, se resumen en la **Tabla 3.20**.

Tabla 3.20 Valores que conducen a un menor grado de hidrólisis.

Factor	Nivel Mínimo	Nivel Máximo	Nivel Óptimo
Enzima	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	-1.79 (0.5%)
Temperatura	-1.79 (40 °C)	1.79 (80 °C)	-1.79 (40 °C)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 hora)	-1.79 (3 horas)
Hidrólisis (%)	-----	-----	0.05%

3.4.2.3 Optimización de la reacción

Como se discutió para la reacción con Lipozyme® RM-IM, un proceso de transesterificación eficiente será el que maximice la producción de lípidos estructurados (RTA-2) y minimice la reacción de hidrólisis. En la **Tabla 3.21** se relacionan los niveles óptimos escogidos para alcanzar estos objetivos simultáneamente “Deseabilidad”, aplicando la metodología de optimización multivariable. Estos parámetros fueron utilizados para escalar la reacción a 1 kilogramo.

En términos generales, para el sistema aceite de soya-aceite de palmiste en presencia de Lipozyme® TL-IM, las variables de reacción que tienen efecto significativo sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación son la temperatura, la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción. En tanto que, para la reacción de hidrólisis son determinantes las variables razón enzima/sustrato y temperatura de reacción.

Tabla 3.21 Combinación de factores y niveles que maximizan la “Deseabilidad”.

Factor	Nivel Mínimo	Nivel Máximo	Nivel Óptimo
Razón enzima/sustrato	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	-1.00 (2.5%)
Temperatura	-1.79 (40 °C)	1.79 (80 °C)	0.85 (68,5 °C)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 hora)	1.00 (6 horas)
Deseabilidad	-----	-----	0.996
%Hidrólisis	-----	-----	1.59%
Rta-2	-----	-----	29.83%

3.4.2.4 Escalado a 1 kilogramo.

Para escalar la reacción a 1 kg se emplearon las condiciones descritas en la **Tabla 21**, ajustando la temperatura de reacción a 70 °C (Nivel 1) y la velocidad de agitación a 300 rpm. La relación de sustratos SBO:PKO utilizada fue 60:40 p/p.

Los resultados después de 6 horas de reacción muestran un valor de hidrólisis igual 1,12% y una RTA-2 igual a 29.2%, valores muy cercanos a los predichos por el modelo matemático.

El punto de fusión de la mezcla, así como los valores de SFC medidos a 15 °C disminuyeron con el avance de la reacción, como se observa en la **Tabla 3.22** y fueron usados como indicadores del grado de transesterificación alcanzado.

La **Figura 3.41** muestra el modelo exponencial para el reactor de tanque agitado el cual se ajusta a los valores SFC medidos a 15 °C (datos de la **Tabla 3.22**). Este modelo (Ecuación 3.4) describe el valor SFC como una función del tiempo de reacción (t_b) para un lote experimental que consta de una cantidad de aceite (V_b) y de enzima Lipozyme® TL-IM (w_b), si se supone que la pérdida de actividad durante el lote es despreciable.

Tabla 3.22 Resultados del seguimiento de la reacción a escala de 1 kg de aceite, con Lipozyme® TL-IM (2.5%), 70°C y 300 rpm

Tiempo hh:mm	Hidrólisis, %	p.f., (°C)	SFC, % (15°C)	SFC (15°C) Modelo	(Dif) ²
00:00	0.16	21.0	10.8	11,97	1,3796
00:15	0.76	19.0	4.3	7,52	3,3065
00:30	0.92	18.0	3.7	5,07	1,8852
01:00	1.01	17.0	3.3	2,99	0,0932
02:00	1.10	15.5	2.2	2,18	0,0004
03:00	1.15	15.0	2.4	2,11	0,0860
04:00	1.17	15.0	2.1	2,10	0,0000
05:00	1.11	15.0	2.2	2,10	0,0101
06:00	1.12	14.9	2.1	2,10	0,0000
08:00*	1.14	14.9	2.3	2,10	0,0403

*La reacción se extendió a 8 horas para obtener datos suficientes para establecer un modelo matemático que relacione el SFC con el avance de la reacción

$$sfc = f^{-1} \left[\frac{t_b * w_b}{V_b} \right] = A_0 + \Delta A * \left[1 - \exp \left[-k \left(\frac{t_b * w_b}{V_b} \right) \right] \right] \quad \text{Ec. 3.4}$$

Donde: k (1.6003), A₀ (11.9746) y ΔA (-9.8752) son constantes del modelo.

t_b: Tiempo de reacción en el reactor por lotes, en minutos

w_b: razón enzima/sustrato en el reactor por lotes, kg

V_b: Cantidad de aceite en el reactor por lotes, kg

Sfc: Contenido de grasa sólida en el tiempo t_b

De los datos de la **Tabla 3.22** y de la **Figura 3.41** también se deduce que después de 4 horas de proceso (240 min), la reacción prácticamente ha llegado al equilibrio y en consecuencia no hay un descenso posterior del contenido de grasa sólida (SFC), ni del punto de fusión de la mezcla transesterificada.

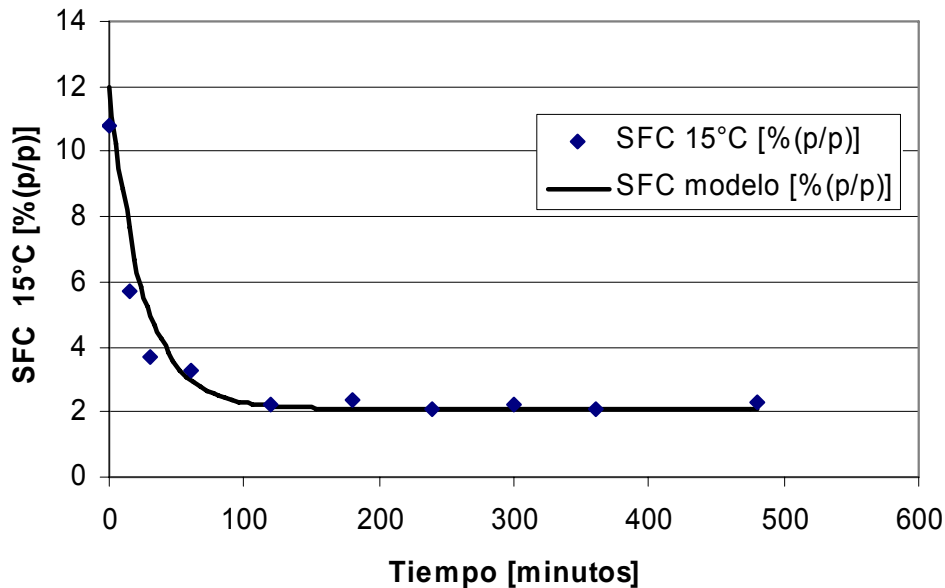


Figura 3.41 Valores de SFC medidos experimentalmente a 15 °C y valores SFC de acuerdo al modelo matemático desarrollado (Ec.3.2) para la reacción por lotes.

3.4.2.5 Escalado a planta piloto (35 kg)

La reacción se realizó en reactores de 60 litros de capacidad, provistos de agitador de propela de tres aspas, bajo las condiciones utilizadas al escalar a 1 kg. El tiempo de reacción se redujo a 4 horas debido a que no se observó una disminución del valor de SFC después de este tiempo. La velocidad de agitación se elevó de 300 a 400 rpm, para mantener dispersa la enzima en el medio de reacción.

En este sistema, durante la primera hora de reacción, la actividad hidrolítica de la enzima es alta debido al mayor contenido de agua en el soporte de la enzima. Sin embargo, al transcurrir el tiempo, la velocidad de hidrólisis se hace menor y se mantiene aproximadamente constante después de la segunda hora. A las 4 horas de reacción la hidrólisis alcanza el valor de 0,9%, más bajo que el obtenido a escala de 1 kg (1.12%) y que el predicho por el modelo (1.59%) (**Figura 3.42**).

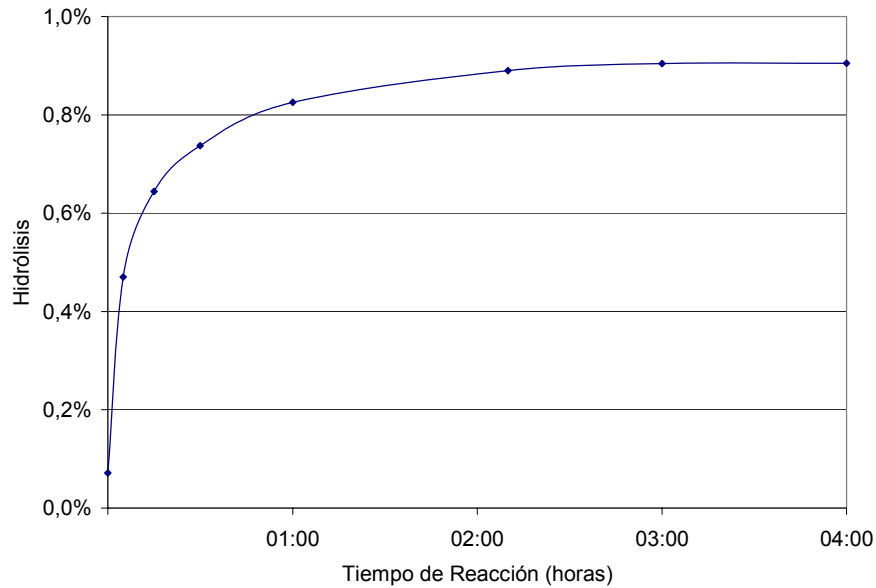


Figura 3.42 Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción, en el proceso de transesterificación del sistema SBO:PKO a escala piloto (35 kg)

La velocidad de producción de los lípidos estructurados (RTA-2) es relativamente alta al inicio de la reacción pero disminuye con el avance de la misma hasta que la reacción se aproxima al equilibrio y la RTA-2 al valor de 28.1% (4 horas), como se observa en la **Figura 3.43**. Estos resultados son similares a los observados a escala de 1 kg, y a su vez, consecuentes con los predichos por la *metodología de optimización multivariable*, la cual buscaba maximizar la producción de lípidos estructurados y minimizar la reacción de hidrólisis.

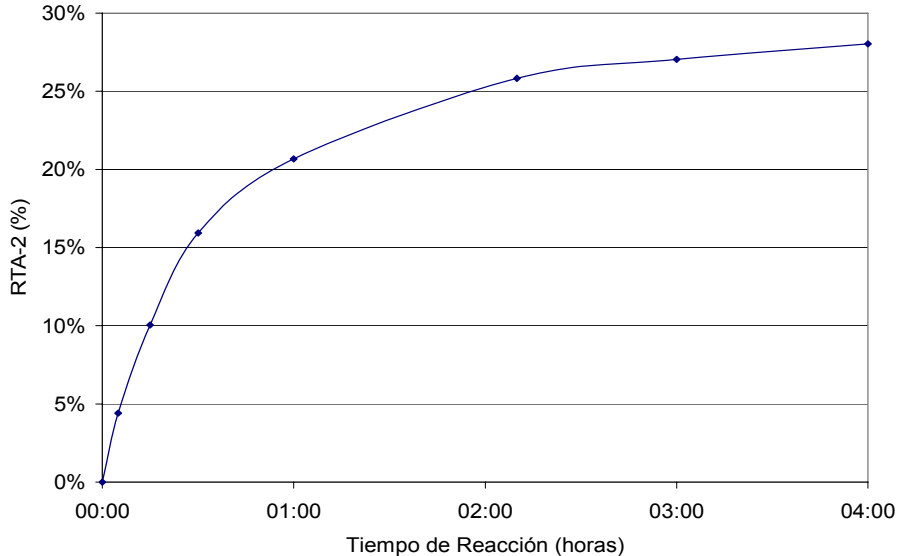


Figura 3.43 Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg) medido por el incremento en la RTA-2

3.4.2.6 *Estudio cinético de la reacción de transesterificación. Cambios en la composición de triacilgliceroles con el transcurso de la reacción.*

La concentración de los TAG, presentes inicialmente en alta proporción en el aceite de palmiste (C30 a C40, saturados) y los TAG componentes del aceite de soya (C52 y C54, insaturados), disminuyen con el avance de la reacción para dar origen a triacilgliceroles estructurados (C42, C44, C46, C48 y C50) que combinan ácidos grasos de cadena media con ácidos grasos de cadena larga, gracias al intercambio de los ácidos grasos unidos a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 entre las moléculas de triacilgliceroles que se combinan.

En la **Figura 3.44** se presenta el cambio en la concentración de los TAG saturados C30 a C38 con el avance de la reacción (expresado como cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes). A continuación, se hace un análisis de evolución de los TGA.

TAG C38: El TAG C38:0 (LaLaM) se consume en la reacción, en tanto que se originan los TAG estructurados C38:1 (CyLaO) y C38:2 (CyLaL) por intercambio de ácidos grasos entre los TAG componentes del aceite de soya y los TAG del aceite de palmiste, como se describió en el Capítulo 3, numeral 3.4.1, **Figura 3.45**.

TAG C40: El TAG C40:0 (LaMM) se consume en la reacción y los TAG estructurados C40:1 (CLaO), C40:2 (CLaL) y C40:3 (CLaLn), se generan en ella. El comportamiento de estos compuestos es similar al observado en la reacción con Lipozyme® RM-IM, donde el TAG C40:2, se produce en mayor proporción, como se observa en la **Figura 3.46**.

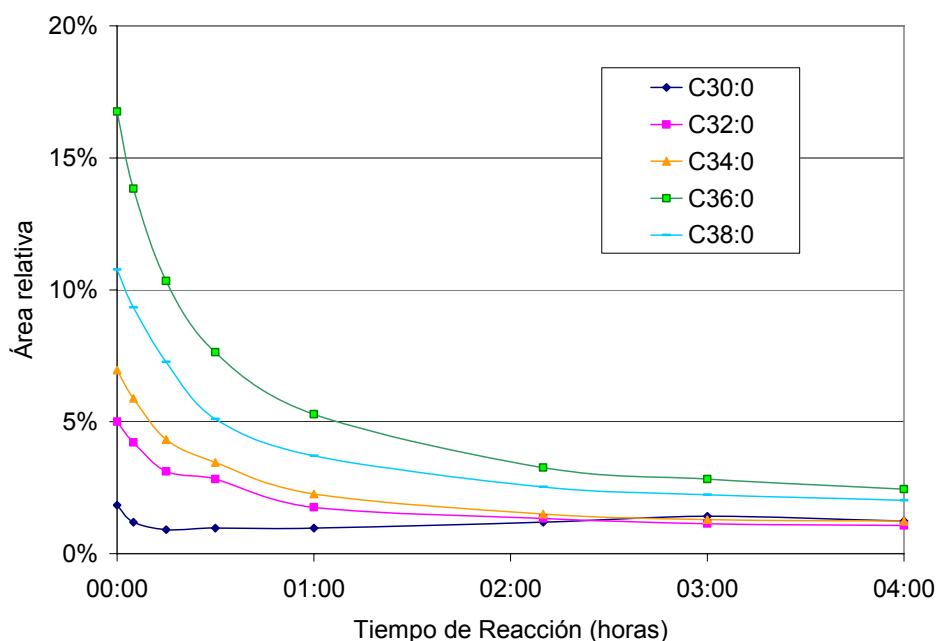


Figura 3.44 Cambio en la concentración de los TAG saturados con ACN 30 a 38, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes.

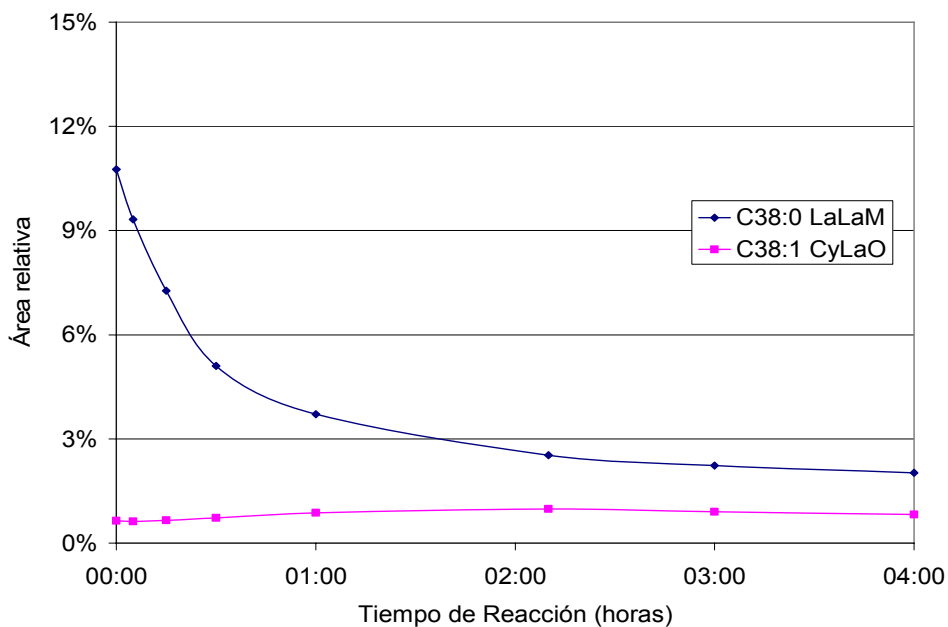


Figura 3.45 Cambio en la concentración de los TAG C38:0 y C38:1, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG.

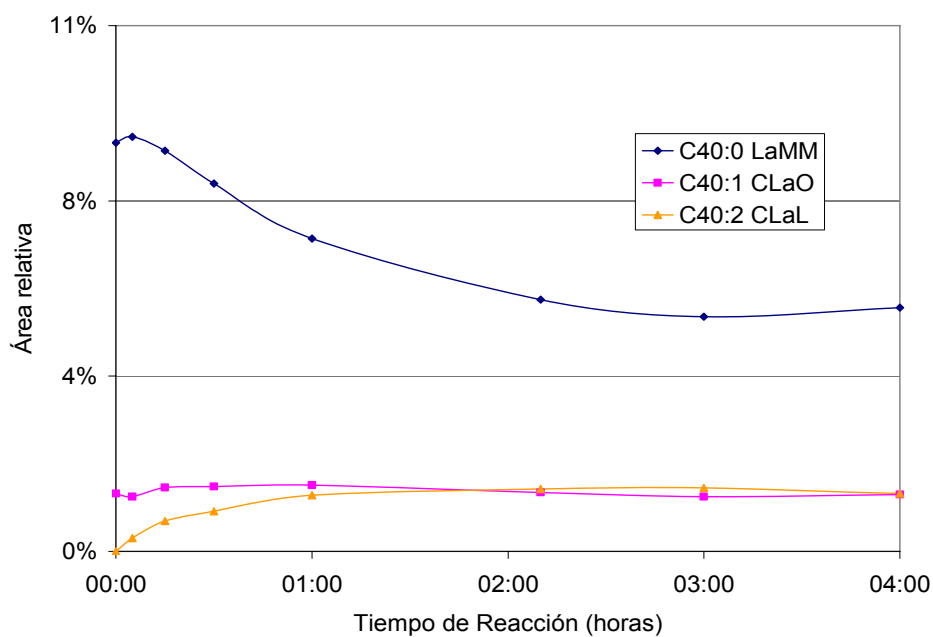


Figura 3.46 Cambio en la concentración de los TAG C40:0, C40:1 y C40:2 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los TAG.

TAG C42: Los TAG estructurados C42:1 (LaLaO) y C42:2 (LaLaL, CyPL), presentes en muy baja concentración en la mezcla inicial, empiezan a incrementar con el avance de la reacción hasta la segunda hora, tiempo después del cual su concentración permanece aproximadamente constante. Por el contrario, el TAG C42:0 disminuye levemente, como se observa en la Figura 3.47.

TAG C44: Los TAG estructurados C44:2 (LaML, CPL, CyOO) y C44:3 (CyOL, LaMLn) se forman a velocidad alta hasta la primera hora de reacción y a partir de la tercera hora su concentración se hace aproximadamente constante. Los TAG C44:0 y C44:1 se incrementan levemente en la primera hora (véase la **Figura 3.48**).

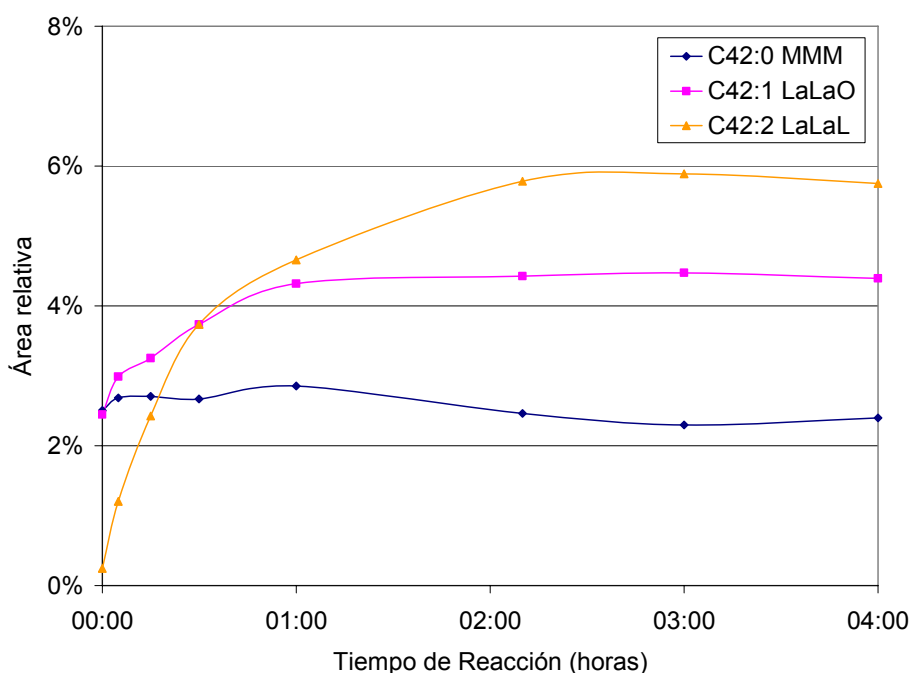


Figura 3.47 Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1 y C42:2 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes.

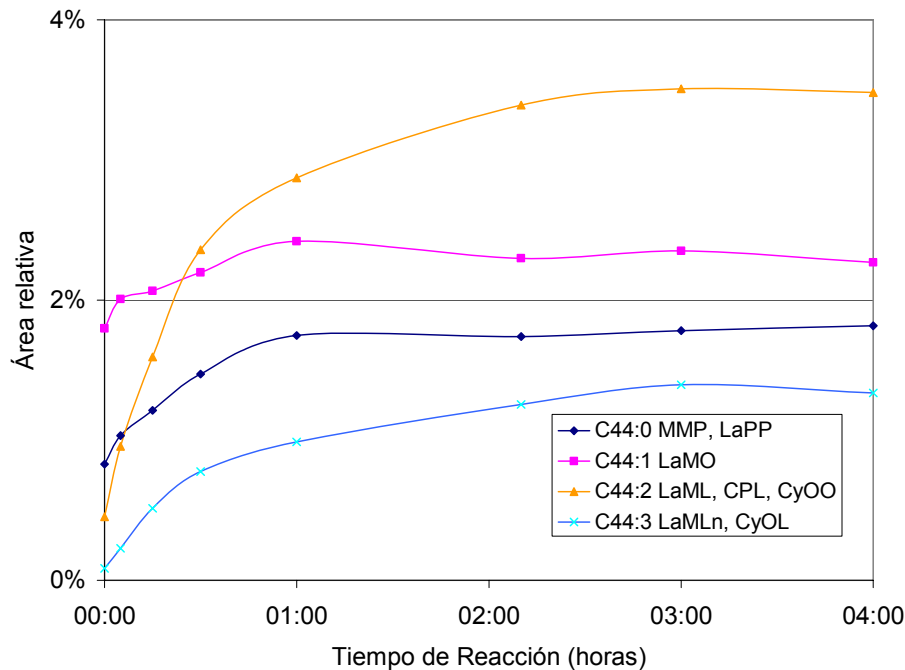


Figura 3.48 Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y C44:3 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes

TAG C46: Los TAG estructurados C46:1 (MMO, LaPO) y C46:2 (LaPL, MML, COO) tienen el incremento más significativo en la primera hora de reacción pero a partir de la tercera hora su concentración se hace aproximadamente constante. El TAG C46:0 se incrementa levemente en la primera hora como se observa en la **Figura 3.49**.

TAG C48: Los TAG estructurados C48:2 (MPL, LaOO), C48:3 (LaOL) y C48:4 (LaLL, LaOLn) sufren un incremento significativo en la primera hora de reacción y continúan incrementándose después de este tiempo pero a velocidad menor. El TAG C48:1 (MPO) incrementa levemente, en tanto que el C48:0 permanece aproximadamente constante (Véase la **Figura 3.50**).

TAG C50: De este grupo, solamente se incrementan los TAG estructurados C50:3 (MOL, PPLn) y C50:4 (MLL, MOLn), en tanto que el TAG C50:2 (MOO, PPL) disminuye, como se observa en la **Figura 3.51**.

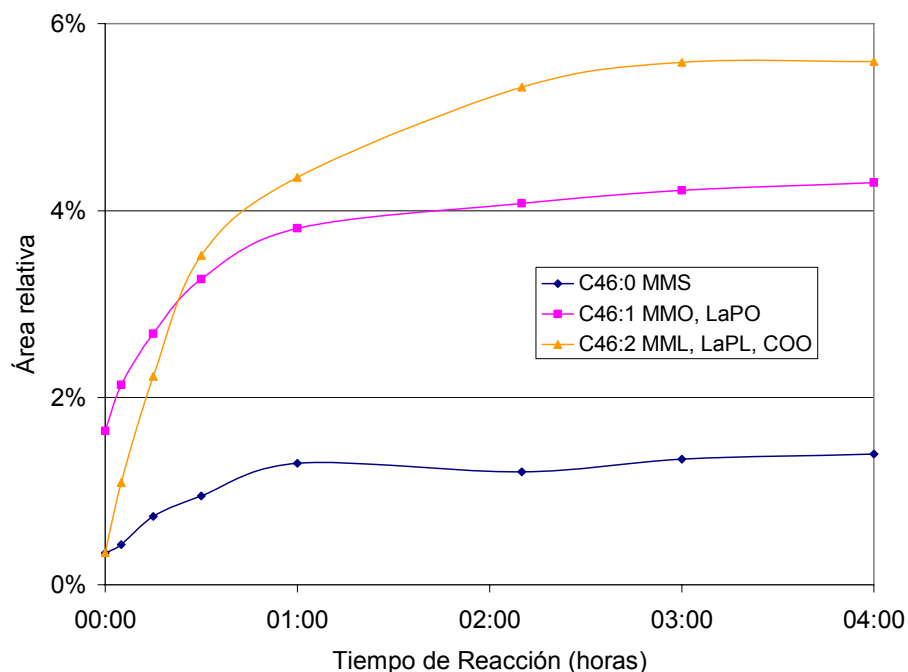


Figura 3.49 Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1 y C46:2 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos de los TAG correspondientes

En resumen, al igual que con Lipozyme® RM-IM, en la reacción de transesterificación entre el aceite de soya y el aceite de palmiste (60:40 p/p) catalizado por Lipozyme® TL-IM se forman los TAG C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4, a expensas de los TAG saturados C30:0, C32:0, C34:0, C36:0, C38:0 y C40:0, pero a una mayor velocidad. Estos cambios conducen a una disminución del contenido de grasa sólida y del punto de fusión de la mezcla, los cuales se hacen cada vez menores en la medida en que la reacción se acerca al equilibrio.

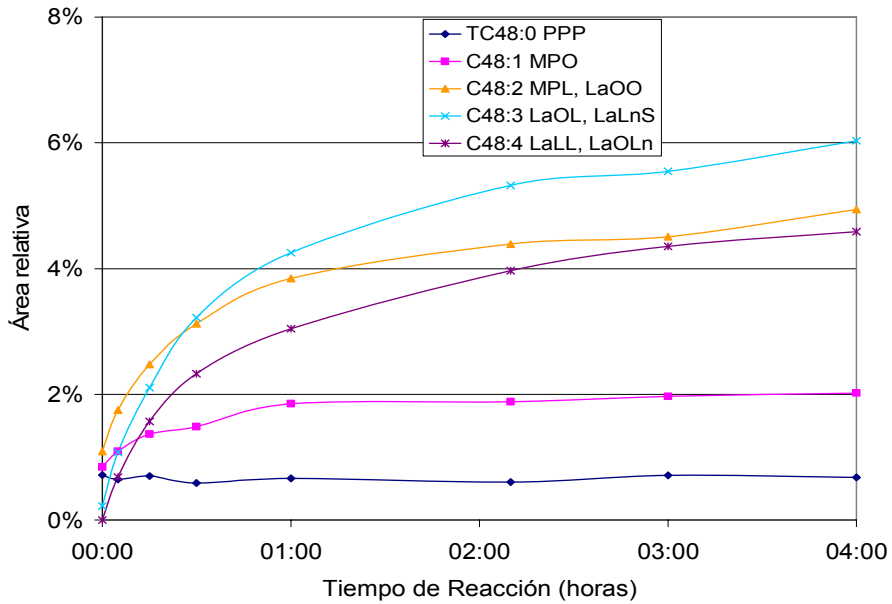


Figura 3.50 Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.

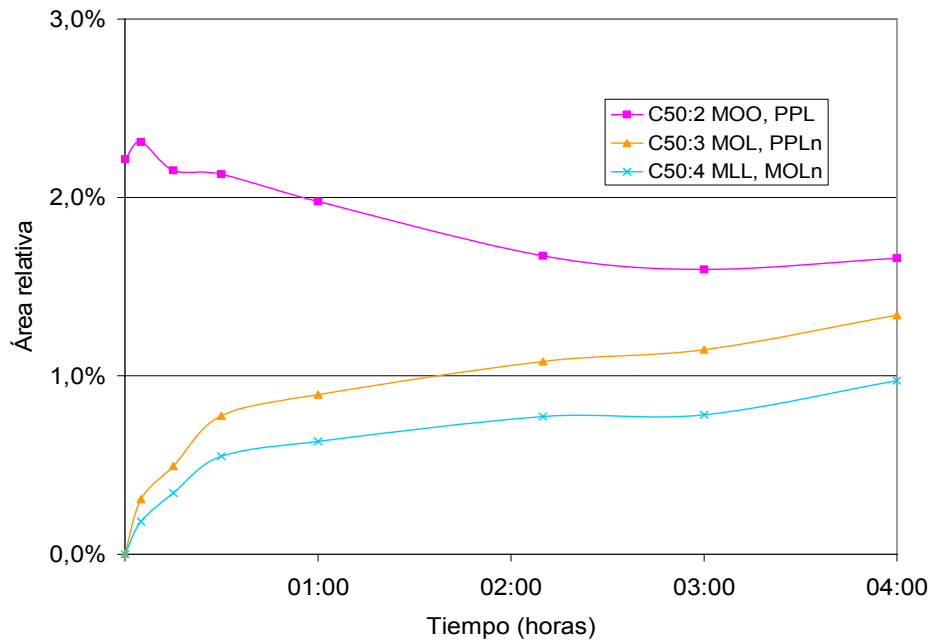


Figura 3.51 Cambio en la concentración de los TAG C50:2, C50:3 y C50:4 con el tiempo de reacción, expresado como el cambio en el área relativa.

De otra parte, la mezcla transesterificada queda con un SFC a 15°C de 2.1% y un punto de fusión de 14.9 °C, que le confieren la característica de líquido a temperatura ambiente (temperaturas superiores a 15 °C).

3.4.3 Evaluación de la estabilidad operacional de las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM.

Se evaluó la estabilidad operacional de los preparados enzimáticos Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM en la reacción de transesterificación entre el aceite de soya y el aceite palmiste a escala de planta piloto, bajo las condiciones de reacción adoptadas para cada sistema, como se describe en el *numeral 3.3.2.6* de este capítulo.

Como criterio para determinar la actividad de la enzima se utilizó el cambio en la concentración de los TAG C42:2, C44:2, C46:2, C48:2, C48:3 y C48:4, que para el sistema Aceite de soya/Aceite de palmiste (SBO:PKO 60:40) se denominó RTA-2.

En la **Figura 3.52** se comparan las estabildades de las enzimas respecto al número de usos (6 horas cada uno con Lipozyme® RM-IM y 4 horas cada uno con Lipozyme® TL-IM), medida como actividad relativa a la desplegada por la enzima en el primer uso, la cual se asumió como el 100%.

Si se analizan los resultados teniendo en cuenta el número de usos, se establece que la pérdida de actividad para los dos sistemas enzimáticos es mayor en la Lipozyme® RM-IM (20% en 6 usos) que en la Lipozyme® TL-IM (17% en 6 usos). Sin embargo, si se compara la pérdida de actividad con el tiempo de uso se podría decir que Lipozyme® TL-IM es menos estable ya que pierde 17% en 24 horas (0.71%/h) de uso continuo en tanto que Lipozyme® RM-IM pierde 13% en el mismo tiempo (24 h).

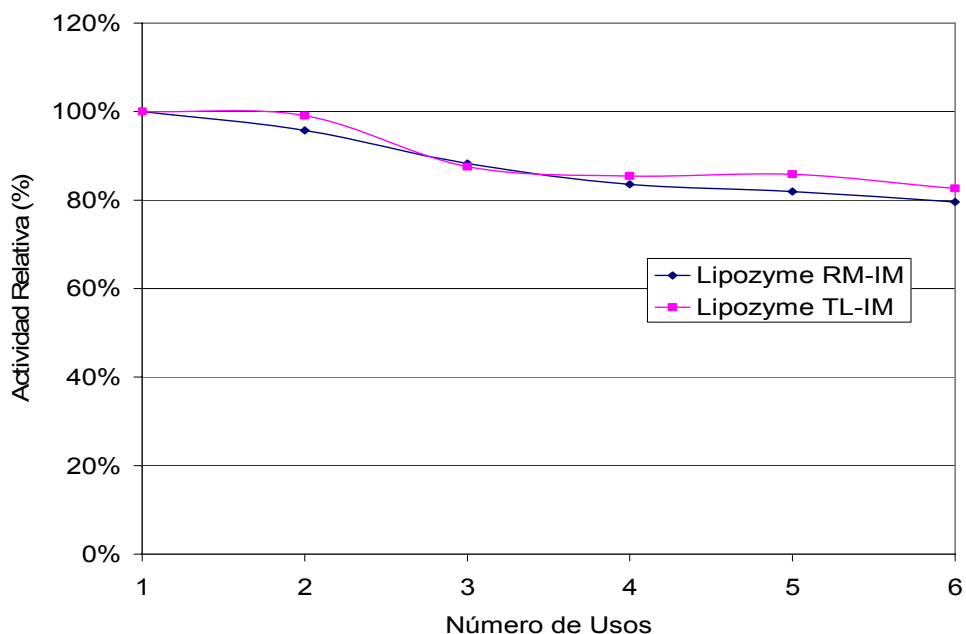


Figura 3.52 Actividad relativa de la enzima respecto al número de usos (de 6 h/lote para lipozyme RM-IM y 4 horas/lote para Lipozyme TL-IM).

No obstante, desde el punto de vista de la productividad, Lipozyme® TL-IM resulta más efectiva debido a que se puede procesar una cantidad mayor de aceite, 7.5 lotes con Lipozyme® TL-IM vs 5.9 lotes con Lipozyme® RM-IM, en un tiempo menor (30 horas con Lipozyme® TL-IM vs 35.4 horas Lipozyme® RM-IM). Además, con Lipozyme TL-IM la respuesta RTA-2.

Por otra parte, con el número de usos de la enzima, la actividad hidrolítica se hace menor, de forma que al cabo del sexto uso el grado de hidrólisis alcanzado en la mezcla de reacción fue de 2,5%, usando como catalizador Lipozyme® RM-IM, y 0.5% usando Lipozyme® TL-IM, como se observa en la **Figura 3.53**. Estas diferencias se deben, en parte, al hecho de que al sistema Lipozyme® RM-IM se adiciona una cantidad fija de agua en cada lote, en tanto que para el sistema que utiliza Lipozyme ® TL-IM no se necesita, y la cantidad de agua adsorbida en el soporte va disminuyendo con cada uso.

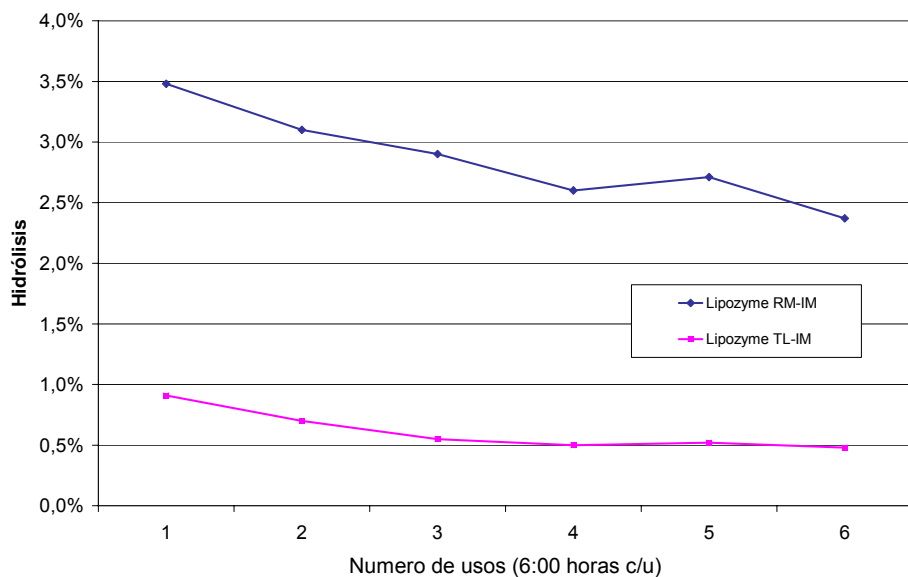


Figura 3.53 Actividad hidrolítica de la enzima respecto al número de usos

La reutilización de la enzima también contribuye a disminuir la actividad hidrolítica de los dos sistemas enzimáticos, pero al mismo tiempo conduce a una pérdida de actividad que para el caso de Lipozyme® TL-IM resulta menor que para Lipozyme® RM-IM, explicado en parte por el menor tiempo de reacción requerido para lograr el mismo grado de transesterificación. La reacción de transesterificación para este sistema catalizado por la enzima Lipozyme® TL-IM procede más rápido, ayudando de esta forma a elevar su productividad.

3.4.4 Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:PKO 60:40 p/p

En la **Tabla 3.23** se presenta la composición molar (%) de los FA presentes en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2 de la mezcla SBO:PKO antes y después de la transesterificación catalizada con Lipozyme® RM-IM y con Lipozyme® TL-IM.

Los resultados indican que en la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p transesterificada con Lipozyme® RM-IM se mantienen en mayor proporción los FA originalmente presentes en la posición central de las moléculas de TAG. Por ejemplo, C12:0 pasa de 21.5% a 23.7% y C18:2 pasa de 40.8% a 38.5%.

En la mezcla transesterificada con Lipozyme® TL-IM, en contraste, hay mayor intercambio: por ejemplo, C12:0 pasa de 21.5% a 29% y C18:2 de 40.8% a 33.7%, como se deduce de los datos de la **Tabla 3.23**.

Tabla 3.23 Distribución de los FA (%mol) en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2, de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación con Lipozyme® TL-IM y Lipozyme® RM-IM.

Ácido CN:DB	Mezcla Inicial (00:00 horas reacción)			Lipozyme® TL-IM 04:00h de reacción		Lipozyme® RM-IM 06:00 h de reacción	
	<i>sn</i> -1,2,3	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2
C6:0	0,4	0,3	0,6	0,3	0,5	0,3	0,5
C8:0	3,8	5,6	0,3	5,1	1,3	6,0	-
C10:0	2,6	3,0	1,7	2,7	2,3	3,1	1,5
C12:0	26,7	29,3	21,5	25,6	29,0	28,2	23,7
C14:0	7,1	8,0	5,3	6,9	7,4	7,5	6,3
C16:0	10,0	13,4	3,1	13,3	3,4	12,9	4,0
C18:0	3,0	3,9	1,0	4,0	0,9	3,8	1,2
C18:1n9c	15,5	12,7	21,0	14,3	17,8	13,2	20,0
C18:2n6c	27,0	20,1	40,8	23,7	33,7	21,3	38,5
C18:3n3	3,7	3,2	4,8	3,8	3,6	3,2	4,6
C20:0	0,3	0,5	--	0,4	0,1	0,4	0,1
Total	100,0	100,0	100,1	100,0	100,0	100,0	100,4%

Tomando en consideración que los sustratos utilizados y la temperatura de reacción en ambos sistemas son iguales, y que además, el tiempo de reacción para el sistema catalizado por Lipozyme TL-IM es menor (4 horas) que el utilizado con Lipozyme® RM-IM (6 horas), es factible suponer que las diferencias halladas en la composición de FA ubicados en la posición *sn*-2 de las grasas transesterificadas se deban principalmente a diferencias en la especificidad

intrínseca del sistema enzima-soporte, más que a migración de grupos acilo por efectos de la relación de sustratos, temperatura o tiempo de reacción.

Según Carrin y Crapiste (2007), la migración de grupos acilo está influenciada por la relación molar de sustratos, la temperatura y el tiempo de reacción. Sin embargo, Du *et al.*, (2005) encontraron que, además de estos factores, la sílice que se utiliza como soporte para inmovilizar la enzima TL contribuye en gran medida a la migración de grupos acilo en las reacciones de transesterificación.

Lo anterior significa que la estereoespecificidad hacia las posiciones *sn-1,3* exhibida por Lipozyme® RM-IM es mayor que la exhibida por Lipozyme® TL-IM; no obstante, ambas enzimas presentan especificidad suficiente para la síntesis de lípidos con propiedades funcionales, en donde se desee preservar los FA insaturados en la posición central de la molécula, cambiando sólo los FA presentes en las posiciones primarias (*sn-1,3*) de los acilglicérols.

Teniendo en cuenta entonces los resultados anteriores y la composición en TGA de las mezclas de SBO:PKO interesterificadas ya sea por catálisis con Lipozyme® RM-IM o con Lipozyme® TL-IM, se establece que estos productos tendrían una amplia gama de aplicaciones alimenticias.

En primer lugar, pueden ser utilizadas como un aceite de cocina saludable, debido a que los TAG estructurados que combinan ácidos grasos de cadena media y larga en una misma molécula tienen punto de humo (temperatura a la cual el aceite empieza a desprender humo) mayor (210 °C) que los triacilglicérols de cadena media (143 °C) o las mezclas físicas de triacilglicérols de cadena media con triacilglicérols de cadena larga (Matulka *et al.*, 2006). Esto representa una gran ventaja para la industria de grasas y aceites debido a que el uso de MCT como aceite de cocina estaba limitado por su bajo punto de humo.

En segundo lugar, las mezclas SBO:PKO transesterificadas son grasas saludables que preservan los ácidos grasos esenciales Omega-6 (33.7% con Lipozyme® TL-IM y 38.5% con Lipozyme® RM-IM) y Omega-3 (3.6% con Lipozyme® TL-IM y 4.6% con Lipozyme® RM-IM) en la posición central de los TAG, en tanto que los ácidos grasos de cadena media se ubicaron preferentemente en las posiciones primarias, como se deduce de los datos presentados en la **Tabla 3.23**. Adicionalmente, en todos los casos la relación Omega-6/Omega-3 en la posición *sn-2* de los TAG (9.36 con Lipozyme TL-IM y 8.37 con Lipozyme® RM-IM) está dentro de los rangos que se han considerado ideales (5:1 y 10:1) para promover un buen estado de salud (Nielsen *et al.*, 2006; Simopoulos, 2003; Valenzuela *et al.*, 2002; FAO/OMS, 1994).

La ventaja de tener ácidos grasos de cadena media localizados en las posiciones *sn-1,3* y ácidos grasos esenciales en la posición *sn-2*, radica en que una vez hidrolizados los ácidos grasos de cadena media de las posiciones primarias y utilizados como fuente rápida de energía, quedan los ácidos grasos esenciales en forma de *sn-2* monoacilglicérol, forma en que mejor son absorbidos por el organismo en cantidad suficiente para evitar la aparición del síndrome de carencia de ácidos grasos esenciales.

En este sentido la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p transesterificada, al ser líquida a temperaturas superiores a 15 °C, reúne los requisitos para preparación de emulsiones lipídicas para uso terapéutico. La proporción SBO:PKO 60:40 p/p está de acuerdo con las sugeridas por Schwartz *et al.*, (1987) como más adecuadas para este propósito (MCT/LCT entre el 40% y 60% de ambos). Thonart *et al.*, (1984) y Dennison *et al.*, (1988) sugieren razones MCT/LCT 50:50 p/p.

Finalmente, de los resultados relacionados en el presente capítulo se puede establecer que en los dos sistemas enzimáticos evaluados para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO :

- La variable que más influyó sobre la reacción de transesterificación y la

reacción colateral de hidrólisis fue la razón enzima/sustrato.

- La relación de sustratos elegida para la producción de lípidos estructurados fue SBO:PKO 60:40 p/p y está de acuerdo a las sugeridas por otros autores.
- Los TAGs que se forman en mayor proporción son el C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4.
- Los dos sistemas enzimáticos evaluados presentaron especificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG que se combinan, sin embargo fue mayor la exhibida por Lipozyme® RM-IM.
- La mezcla SBO:PKO transesterificada presenta menor punto de fusión y contenido de grasa sólida que la mezcla física y permanece líquida a temperaturas superiores a 15 °C.
- Esta mezcla encuentra aplicación como aceite de cocina especializado, pero su mejor potencial de aplicación es la preparación de emulsiones lipídicas para uso terapéutico en nutrición enteral y parenteral.
- Lipozyme® TL-IM pierde menos actividad con el número de usos que Lipozyme® RM-IM.
- La reacción catalizada con Lipozyme® TL-IM alcanza el equilibrio en menor tiempo (4 horas), comparada con la reacción catalizada con Lipozyme® RM-IM (6 horas), lo que finalmente se traduce en una mayor productividad.
- Lipozyme® TL-IM es menos hidrolítica que Lipozyme RM-IM y conduce a una respuesta RTA-2 mayor que Lipozyme RM-IM. Ésta característica es importante a escala industrial, porque permite mayor rendimiento de SL y se reducen los costos que conlleva el proceso de eliminación de los ácidos grasos libres sumado a las pérdidas de rendimiento por este aspecto.

En conclusión, la síntesis enzimática de lípidos estructurados a partir de la mezcla SBO:PKO, usando como catalizador lipasas Lipozyme® TL-IM o Lipozyme® RM-IM, es una manera viable de producir lípidos específicos para fines metabólicos definidos. Adicionalmente, los usos de los lípidos estructurados y sus mezclas pueden ser tan amplios como la imaginación de los diseñadores de alimentos lo permita. Adicional a los usos clínicos, los lípidos estructurados se pueden aplicar

en la confección de margarinas, *shortening*, postres, salsas y aderezos, confitería, bebidas y barras energéticas para deportista y militares, snacks, caramelos y productos lácteos, entre otros.

CAPÍTULO 4

4. OBTENCIÓN DE LÍPIDOS ESTRUCTURADOS POR INTERESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE ACEITE DE SOYA Y SUPERESTEARINA DE PALMA EN UN SISTEMA EN DISCONTINUO - REACTOR DE TANQUE-AGITADO

4.1 INTRODUCCIÓN

En la leche humana y en las formulaciones infantiles la grasa representa cerca del 50% de la energía. Aproximadamente el 98% del total de la grasa está en forma de triacilgliceroles y, aunque la composición en ácidos grasos de la leche varía con la composición en ácidos grasos de la dieta de la madre, los niveles de los principales ácidos grasos son muy constantes (Yuhas *et al.*, 2006; Kuiper *et al.*, 2007).

En la leche materna el ácido graso saturado más abundante es el palmítico (C16:0) y representa cerca del 20-25% del total de ácidos grasos, entre 10-12% de la energía total ingerida. Aproximadamente el 70% del ácido palmítico se encuentra en la posición *sn*-2 de las moléculas de triacilgliceroles (Nielsen *et al.*, 2006), mientras que en las grasas vegetales, más del 80% se encuentra esterificado en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 (ver **Tablas 4.1 y 2.2**). Esto significa que el ácido palmítico en las fórmulas basadas en aceites vegetales se hidroliza del esqueleto del glicerol por acción de la lipasa pancreática presente en el intestino. Este ácido en forma libre puede formar jabones insolubles de calcio que se excretan con las heces, produciendo pérdidas innecesarias de energía dietética y calcio, así como un aumento indeseable en el estreñimiento y dureza del excremento (Valenzuela *et al.*, 2002; Lien 1994).

Por su parte, el ácido graso monoinsaturado mayoritario es el ácido oleico (C18:1) y representa entre 30-40% de los ácidos grasos, mientras que los ácidos linoleico y linolénico representan 8-12% y 1-2% del total de los ácidos grasos, respectivamente.

Tabla 4.1 Distribución espacial de los ácidos grasos (mol%) esterificados en los triacilglicérols de las grasas de la leche de varias especies*

Especie	posición	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	1C8:2	C18:3
Vaca	1	-	-	1	2	5	10	34	2	10	30	2	-
	2	-	1	1	3	6	18	32	4	10	19	4	-
	3	35	13	4	6	1	6	5	1	1	23	2	-
Humana	1	-	-	-	tr	1	3	16	4	15	46	11	tr
	2	-	-	-	tr	2	7	58	5	3	13	7	1
	3	-	-	-	1	6	7	6	8	2	50	15	1
Rata	1	-	-	3	10	10	10	20	2	5	24	14	1
	2	-	-	6	20	16	18	29	2	1	3	5	1
	3	-	-	10	26	15	9	13	2	2	12	12	1
Cerdeja	1	-	-	-	-	-	2	22	7	7	50	11	1
	2	-	-	-	-	-	7	58	11	1	14	8	1
	3	-	-	-	-	-	4	15	10	6	54	12	2

tr= trazas (<5%)

*Tomado de Christie, 1986.

Es decir, la distribución de los FA en los TAG de la leche materna no es al azar. La mayoría de C16:0 está esterificado en la posición *sn-2* mientras que C18:0, C18:1 y C18:2 están esterificados en las posiciones *sn-1,3*. Estos resultados son consistentes con los hallados por Kallio y Rúa (1994), quienes analizaron los TAG de la leche humana por espectrometría de masas *tandem* y encontraron que las mayores polarizaciones se observan para los ácidos grasos C18:1 (81-92% en *sn-1,3*), C18:0 (80-83% en *sn-1,3*), C18:2 (67-84% en *sn-1,3*), C18:3 (77% en *sn-1,3*), C16:0 (70-86% en *sn-2*) y C14:0 (41-81% en *sn-2*). Además en los TAG de bajo

peso molecular (ACN 44 o menor) los ácidos grasos C14:0, C12:0 y aún C10:0 ocupan la posición central (*sn*-2), pero con el aumento del ACN se concentran más en las posiciones primarias.

Decker (1996), al estudiar el papel de la distribución estereoespecífica de los ácidos grasos saturados sobre la nutrición lipídica, encontró que los ubicados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 pueden exhibir patrones metabólicos diferentes debido a su baja absorción por formación de sales de calcio, como se comentó anteriormente. Esto significa que las dietas a base de grasas que contengan ácidos grasos saturados ubicados principalmente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, pueden tener consecuencias biológicas muy diferentes de las grasas que los contienen ubicados principalmente en la posición central *sn*-2, como la grasa de la leche (D'Agostini, 2001; Ramírez et al., 2001; Bracco U., 1994). Por esta razón, se debe dar una importancia considerable a las diferencias en la localización estereoespecífica de los ácidos grasos en la planificación e interpretación de los estudios de nutrición lipídica y en la elaboración de productos alimenticios especiales (Mu y Porsgaard, 2005; Nelson y Innis, 1999).

El **Betapol** es un lípido estructurado, desarrollado por los científicos de Unilever (Londres, Inglaterra) por interesterificación enzimática de tripalmitina con ácidos grasos insaturados, para uso en formulaciones infantiles, pues tiene una distribución de ácidos grasos semejante a la de la grasa de la leche humana. Contiene hasta un 60% de ácido palmítico en la posición *sn*-2 (Haumann, 1997; Osborn y Akoh, 2002; Sahin et al., 2005). Recientemente Maduko et al., (2007a, 2007b), sintetizaron una grasa similar a la grasa láctea humana por interesterificación enzimática de tripalmitina, aceite de coco, aceite cártamo y aceite de soya en hexano, utilizando Lipozyme® RM-IM como catalizador.

Es posible desarrollar una grasa similar a partir de la superestearina de palma, una fracción del aceite de palma rica en el triacilglicerol tripalmitina (PPP C48:0), y aceite de soya rico en ácidos grasos mono- y poliinsaturados, mediante

transesterificación enzimática haciendo uso de enzimas *sn-1,3* específicas.

En la **Tabla 4.2** se presentan los posibles TAG generados por interesterificación de la superestearina de palma y el aceite de soya, en donde el intercambio de los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn-1,3* de los principales TAG componentes de las dos grasas conduciría a los TAG descritos en la columna derecha.

Tabla 4.2 Posibles TAG generados por interesterificación del aceite de soya y la superestearina de palma, utilizando una lipasa *sn-1,3*-específica.

Sistema		TAG esperados	
		TAG**	CN:DB
Aceite de Soya (SBO)		PPP	48:0
LLL	C54:6	PPO	50:1
LLO	C54:5	PPL	50:2
LOO	C54:4	PSO	52:1
LLP	C52:4	POO	52:2
POL	C52:3	PSL	52:2
		POL	52:3
Superestearina (SEP)		PLL	52:4
		SOO	54:2
PPP	C48:0	OOO	54:3
POP	C50:1	SOL	54:3
POO	C52:2	OOL	54:4
PPS	C50:0	SLL	54:4
		OLL	54:5

** P= ácido Palmítico, O= ácido Oleico, L= ácido Linoleico. El orden de las letras en el TAG no indica la distribución espacial de los ácidos grasos en el esqueleto del glicerol.

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Materia prima, solventes y equipos.

Materia Prima: La superestearina de palma (SEP) y el aceite de soya (SBO), mezcla identificada como SEP:SBO, fueron suministrados por C.I. SACEITES S.A.

Catalizadores: La enzima lipasa 1,3-específica conocida comercialmente como Lipozyme® RM-IM de *Rizomucor miehei* lote LUX00115 (inmovilizada sobre resina de intercambio aniónico) y la Lipozyme® TL-IM de *Thermomyces lanuginosa* lotes LA35000606 y LA350014401 (inmovilizada sobre gránulos de sílice), se compraron a Novozymes S.A. (Brasil); la lipasa 1,3-específica Lipozyme® de *Mucor miehei* Fluka 62350 lote LM70783 se compró a Sigma-Aldrich.

Solventes: Los solventes metanol, etanol, n-hexano, éter de petróleo, n-butanol, acetona, el NaOH, el KOH y los demás reactivos usados fueron grado analítico marca Merck.

Equipos: Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 (Palo Alto, California, USA) equipado con detector de ionización en llama (FID) e inyector *split* e inyector *On column*, Columnas capilares para cromatografía de gases DB-WAX Ref. 122-7032 (0.25 mm ID * 30 m * 0.25 µm) y DB-17ht Ref. 123-1831 (0.32 mm ID * 30m * 0.15 µm) compradas a J&W SCIENTIFIC, Columna capilar Mtx-65TG Cat # 17008 (0.25 mm ID * 30 m * 0.1 µm) comprada a Restek Corporation. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 20 MHz Bruker Minispec mq-20 MHz (Rheinstetten, Germany).

Equipos menores: Bureta automática Dosimat 665 (Metrohn, Suiza), en modo pH-Stat. Viscosímetro para líquidos Visco Easy L, de Schott (Cambridge, UK). Penetrómetro con cono metálico de ángulo de 45°. Reactor de vidrio de 2 litros de

capacidad y reactor en acero inoxidable con capacidad para 60 litros (suministrado por la empresa C.I. Saceites S.A.).

4.2.2 Desarrollo experimental.

El procedimiento para la reacción de transesterificación del sistema SEP- SBO, fue similar al empleado para el sistema SBO-PKO descrito en el Capítulo 3. Para la selección de las condiciones de la reacción se utilizó un diseño experimental de tres niveles con 18 experimentos individuales. Las variables independientes o factores estudiados fueron la razón enzima/sustrato (E_c), el tiempo de reacción (t_r) y relación de sustratos (S_r). La temperatura en todos los casos se mantuvo constante en un valor de 70 °C. Las variables independientes y sus correspondientes niveles se presentan en el apartado de resultados (**Tabla 4.3**).

Como variable respuesta (RTA-2) se eligió el incremento en los TAG C50:2, C52:3 y C52:4, teniendo en cuenta que se espera se formen por intercambio entre los ácidos grasos ubicados en las posiciones $sn-1$ y $sn-3$ de los principales TAG componentes del aceite de soya y la superestearina de palma, como se ilustra en la **Tabla 4.2**. La segunda variable de respuesta evaluada fue el grado de hidrólisis.

Los experimentos se efectuaron a escala de laboratorio, 1 kg de sustrato y a escala de planta piloto (35 kg de sustrato), tal como se describe en los apartados 3.3.2.2, 3.3.2.3 y 3.3.2.4, del Capítulo 3.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó la metodología de superficie de respuesta con ayuda del software estadístico STATGRAPHICS Plus 4.0 para Windows (1998). En todos los casos, para evaluar el efecto de las variables de proceso sobre la producción de lípidos estructurados (RTA-2) y el incremento del grado de hidrólisis de los acilgliceroles se aplicó el análisis de efectos principales, el análisis de varianza, el desarrollo de un modelo matemático y de gráficos de

superficie de respuesta, seguido de la optimización multivariable.

El seguimiento de la reacción en el tiempo se efectuó en los ensayos a escala piloto, tomando para ello muestras a las 00:00, 00:15, 00:30, 01:00, 02:00, 03:00, 04:00, 05:00 y 06:00 horas de iniciada la reacción.

4.2.3 Métodos de análisis

El análisis de acilgliceroles, ácidos grasos libres, perfiles de fusión, puntos de fusión se efectuaron siguiendo los métodos descritos en el Numeral 2.2.2 del Capítulo 2 y el análisis estereoespecífico siguiendo el método descrito en el *Numeral 3.3.3.2 del Capítulo 3*.

4.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.3.1 SISTEMA 3. Aceite soya – Superestearina de palma (SBO:SEP)-Lipozyme® RM-IM

La evaluación y selección de las condiciones de reacción para este sistema se realizó de acuerdo con un diseño experimental de composición central de segundo orden, de tres factores y tres niveles (véase la **Tabla 4.3**), el cual constó de 18 experimentos individuales, que se describen en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.3 Variables y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:SEP.

Variable	Código del nivel de la variable				
	-1.79	-1	0	1	1.79
Razón enzima/sustrato, IUN*/g aceite (% p/p**)	1.9 (0.5)	9.5 (2.5)	18.9 (5.0)	28.4 (7.5)	37.8 (9.5)
Tiempo de reacción (horas)	3	4	5	6	7
Relación de sustratos (SBO:SEP)	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70

*IUN: Interesterification Unit Novo (unidad de interesterificación Novo)

** %p/p: Porcentaje en peso respecto al peso del aceite.

Tabla 4.4 Arreglos y respuestas del diseño experimental.

Exp.	Bloque	Enzima	Tiempo	Sustratos	Hidrólisis	RTA-2*
					(%)	(%)
1	1	0	0	0	10.6	13.9
2	1	-1	-1	-1	4.3	5.1
3	1	1	-1	-1	11.0	4.0
4	1	-1	1	-1	6.1	20.0
5	1	1	1	-1	15.3	20.4
6	1	-1	-1	1	4,8	8.0
7	1	1	-1	1	10.8	3.6
8	1	-1	1	1	5.2	24.5
9	1	1	1	1	14.7	7,5
10	1	0	0	0	9.6	13.7
11	2	0	0	0	11.6	18.6
12	2	-1.79	0	0	2.5	3.5
13	2	1.79	0	0	14.8	4.8
14	2	0	-1.79	0	8.4	6.7
15	2	0	1.79	0	13.1	21.5
16	2	0	0	-1.79	10.6	20.2
17	2	0	0	1.79	12.7	9.3
18	2	0	0	0	12.3	18.8

*RTA-2: Incremento en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes a los TAG C50:2, C52:3 y C52:4.

4.3.1.1 Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación

En la **Tabla 4.4** se presentan los valores para RTA-2 y grado de hidrólisis obtenido para cada uno de los experimentos del diseño experimental planteado. De las tres variables evaluadas solo el tiempo de reacción y la razón enzima/sustrato tienen efectos estadísticamente significativos sobre la RTA-2 a un nivel de confianza del 95%. Para el caso del tiempo de reacción, el grado de transesterificación aumenta en la medida en que este factor se desplaza del nivel más bajo al nivel más alto, en tanto que para la razón enzima/sustrato existe un valor óptimo entre el nivel más bajo y el nivel más alto, como se deduce de la **Figura 4.1**

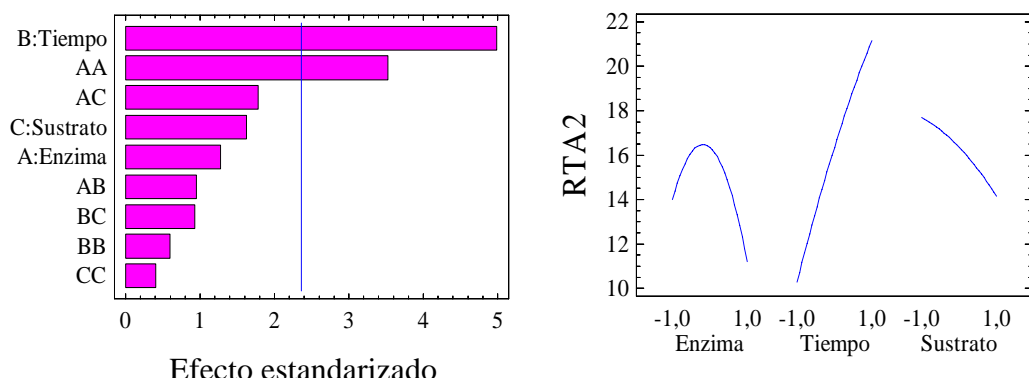


Figura 4.1 A. Diagrama de Pareto para la variable RTA-2; B. Efectos principales.

La interacción entre las tres variables evaluadas no fue significativa ($p > 0.05$), según se desprende del análisis de la varianza, sin embargo, el término cuadrático para la razón enzima/sustrato (AA) tiene un efecto significativo (véase la **Tabla 4.5**).

Tabla 4.5 Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2

Fuente	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio (SCM)	Relación F	Valor P
A:Enzima	27.8005	1	27.8005	1.62	0.2431
B:Tiempo	424.7080	1	424.7080	24.82	0.0016
C:Sustratos	44.9646	1	44.9646	2.63	0.1490
AA	212.663	1	212.663	12.43	0.0097
AB	15.5125	1	15.5125	0.91	0.3727
AC	54.1841	1	54.1841	3.17	0.1184
BB	6.0686	1	6.0686	0.35	0.5702
BC	14.8512	1	14.8512	0.87	0.3825
CC	2.8013	1	2.8013	0.16	0.6978
Total error	119.7590	7	17.1084		
Total (corr.)	923.453	17			

La ecuación 4.1 muestra el modelo matemático predicho para la respuesta RTA-2. Los coeficientes de regresión (β_0 , β_i , β_{ij}) calculados para el modelo matemático se presentan en la **Tabla 4.6**. X_i representa las variables independientes (A, B, y C). En este caso, el valor R^2 -cuadrado indica que el modelo matemático explica el 87.03% de la variabilidad en la RTA-2, valor que se considera aceptable.

$$RTA - 2 (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. 4.1}$$

Los niveles de las variables independientes o condiciones de reacción que en combinación conducen a la mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2) se pueden deducir con facilidad de los gráficos de superficie de respuesta.

Tabla 4.6 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Términos		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	16.3531
	A: Enzima	β_1	-1.3895
	B: Tiempo	β_2	5.4308
	C: Sustratos	β_3	-1.7671
Cuadrático	AA	β_4	-3.7508
	BB	β_5	-0.6336
	CC	β_6	-0.4305
Interacciones	AB	β_7	-1.3925
	AC	β_8	-2.6025
	BC	β_9	-1.3625

R^2 -cuadrado =87.03% R^2 -cuadrado (ajustado por GL) = 72.44%

De la **Figura 4.2** se establece que al mantener la razón enzima/sustrato en el nivel central y el tiempo de reacción en el nivel más alto se maximiza la RTA-2. En la **Figura 4.3** se muestra el efecto de variar la relación de sustratos y la razón enzima/sustrato manteniendo el tiempo en el nivel cero (0), indicando nuevamente que la mejor respuesta se logra con la razón enzima/sustrato en el nivel central.

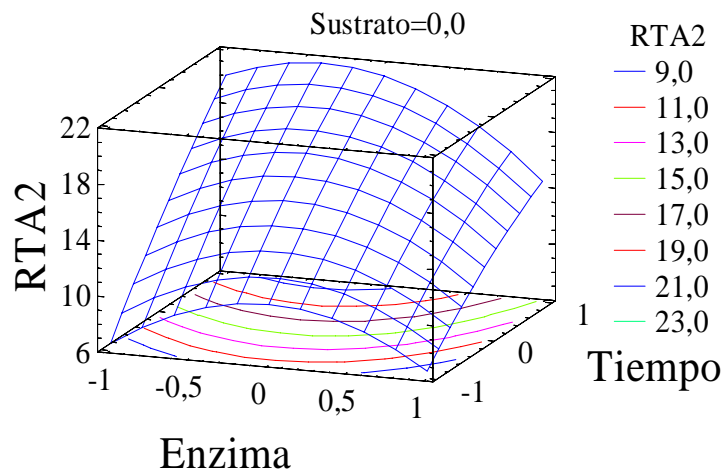


Figura 4.2 Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta RTA-2.

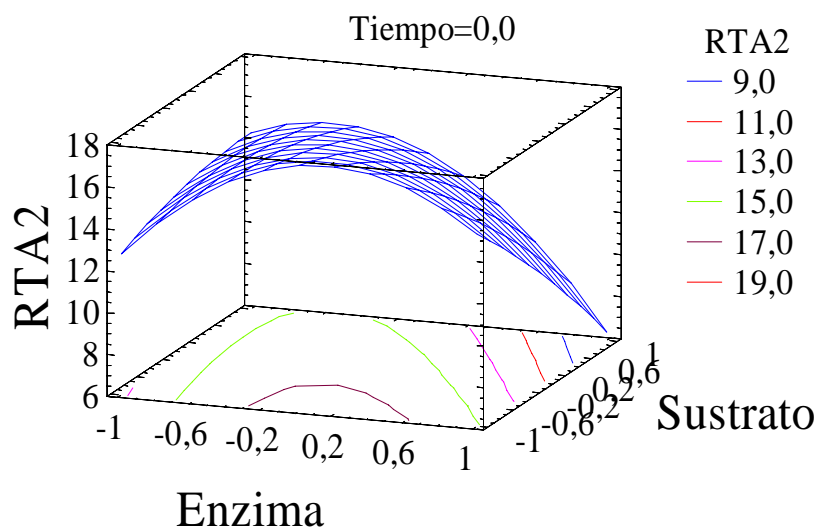


Figura 4.3 Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la razón enzima/sustrato y la relación de sustratos sobre la variable de respuesta RTA-2.

Por consiguiente, las condiciones que en combinación maximizan la RTA-2 (30.22%) para la reacción de transesterificación del sistema SBO:SEP, de acuerdo a la ecuación 4.1 son: Tiempo de reacción 1.79 (7 horas), Razón enzima/sustrato 0.10 (5.1%) y relación de sustratos SBO:SEP -1.79 (70:30 p/p).

4.3.1.2 Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis.

En la **Tabla 4.4** se presentan los valores de hidrólisis (%) generados durante los procesos de transesterificación para cada uno de los 18 experimentos planteados para el sistema Aceite de soya - Superestearina de palma (SBO:SEP).

La **Figura 4.4** muestra que en este sistema las variables que más influyen sobre la reacción de hidrólisis son la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción, las cuales aumentan el grado de hidrólisis al pasar del nivel más bajo al nivel más

alto. Las interacciones entre las variables razón enzima/sustrato – tiempo de reacción también tienen efecto significativos a un nivel de confianza del 95%.

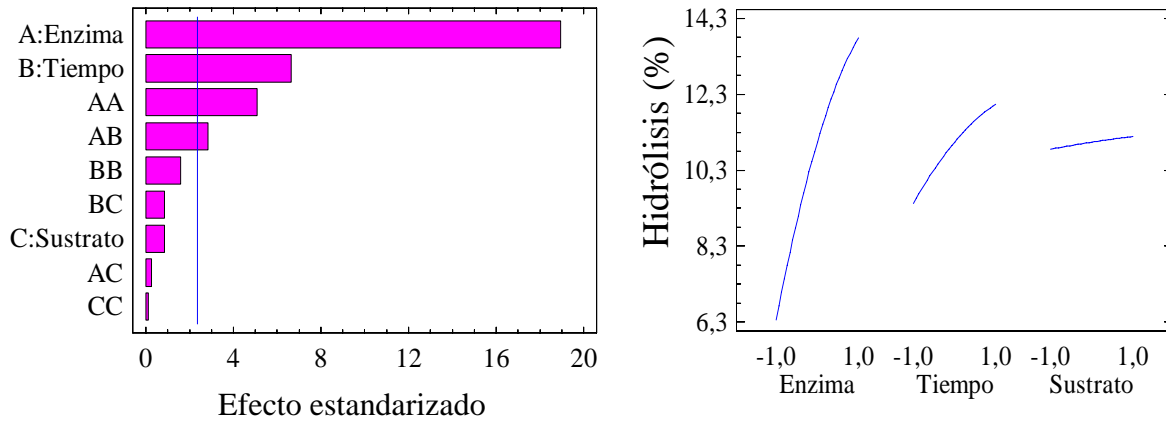


Figura 4.4 A. Análisis de Pareto para la variable de respuesta grado de hidrólisis, del sistema SBO:SEP. La línea azul indica un nivel de confiabilidad del 95%. B. Diagrama de efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis.

El modelo matemático predicho para la variable respuesta grado de hidrólisis tiene forma general de la ecuación 4.2:

$$Hidrólisis (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec. 4.2}$$

Los coeficientes de regresión predichos para el intercepto, los términos lineales, los términos cuadráticos y los términos de interacción (β_0 , β_i , β_{ij}) se presentan en **Tabla 4.7** X_i representa las variables independientes (A, B, y C). El valor estadístico R^2 -cuadrado indica que el modelo explica el 98.51% de la variabilidad en la hidrólisis.

Tabla 4.7 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Términos		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	11.0379
	A: Enzima	β_1	3.71309
	B: Tiempo	β_2	1.30162
	C: Sustrato	β_3	0.16775
Cuadrático	AA	β_4	-0.97358
	BB	β_5	-0.30420
	CC	β_6	-0.02029
Interacciones	AB	β_7	0.74625
	AC	β_8	-0.0650
	BC	β_9	-0.2273

R^2 - cuadrado= 98.50 %; R^2 – cuadrado (ajustado por G.L.) = 96,81 %

Los gráficos de superficie construidos usando la ecuación 4.2, manteniendo un factor constante y variando los otros dos, muestran que en la reacción de transesterificación para el sistema SBO:SEP el grado de hidrólisis se incrementa con el aumento del tiempo de reacción, pero principalmente con el incremento de la razón enzima/sustrato. En consecuencia, los mayores valores se obtienen a altas cargas de enzima y tiempos prolongados de reacción (véase la **Figura 4.5**).

En la **Figura 4.6** el efecto de la cantidad de enzima también se hace evidente, observándose además que la relación de sustratos no reviste mayor importancia sobre la reacción de hidrólisis.

De acuerdo con el estudio anterior las condiciones o niveles de las variables independientes que conducen al menor grado de hidrólisis en la región experimental evaluada son: Razón enzima/sustrato: -1,79 (0.5%), Temperatura de reacción: -1,79 (40 °C) y relación de sustratos SBO:PKO: -0.66 (57:43).

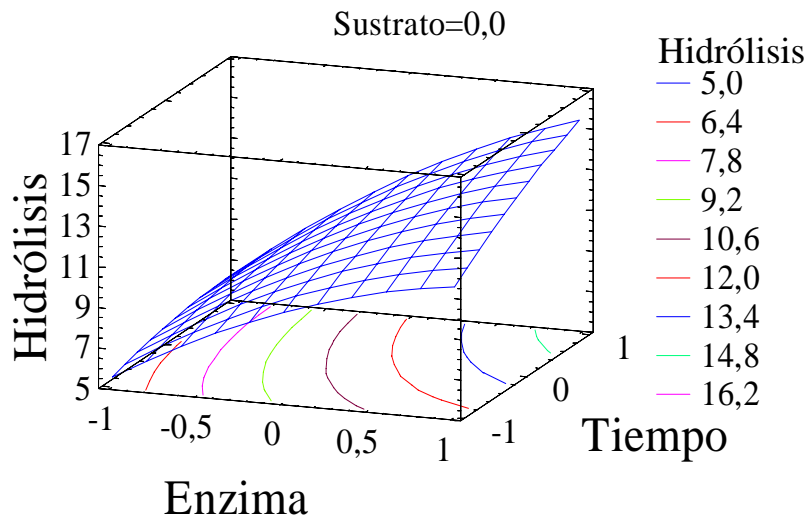


Figura 4.5 Efecto del tiempo y la razón enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis alcanzado al final del proceso de transesterificación.

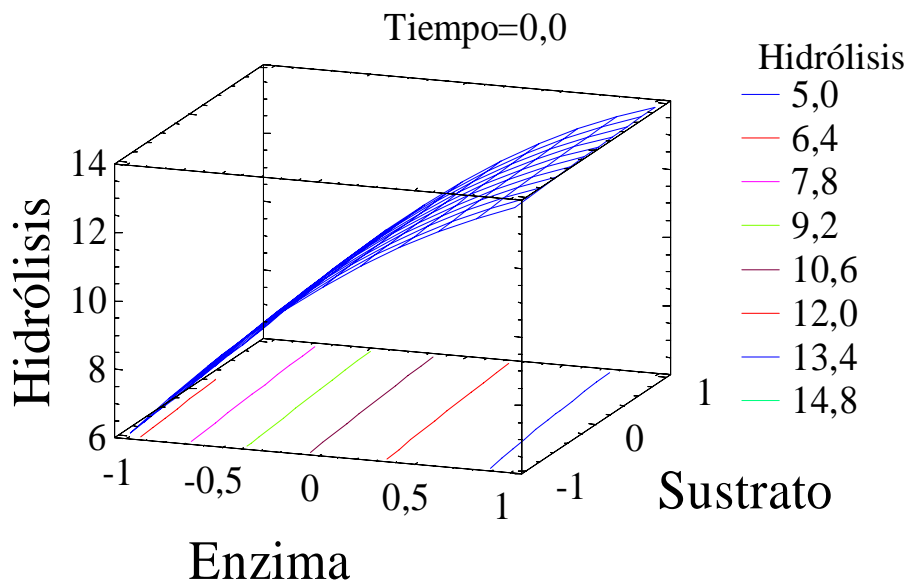


Figura 4.6 Efecto de la razón enzima/sustrato y la relación de sustratos sobre el grado de hidrólisis alcanzado al final del proceso de transesterificación.

Estos resultados coinciden con los hallados para el sistema SBO:PKO utilizando como catalizador la misma enzima (Lipozyme [®] RM-IM), indicando que independiente del sustrato utilizado, una mayor razón enzima/sustrato y un tiempo prolongado de reacción favorecen la reacción de hidrólisis de los sustratos.

4.3.1.3 Optimización de la reacción

Como en los casos anteriores, la optimización de la reacción “Deseabilidad” requiere maximizar la producción de lípidos estructurados (RTA-2) y minimizar la reacción de hidrólisis. Aplicando la metodología de *optimización multivariable* se encuentra el conjunto de condiciones que permiten alcanzar este objetivo simultáneamente, tal como se presentan en la **Tabla 4.8**.

Tabla 4.8 Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Razón enzima/sustrato	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	-1.13 (2.4%)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 horas)	1.00 (6 horas)
Sustratos, SBO:SEP	-1.79 (70:30)	1.79 (30:70)	-1.32 (63:37)
Deseabilidad	-----	-----	0.93
%Hidrólisis	-----	-----	5.62
Rta-2	-----	-----	24.55

En la **Figura 4.7** se muestra el efecto de variar simultáneamente la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la función “Deseabilidad”.

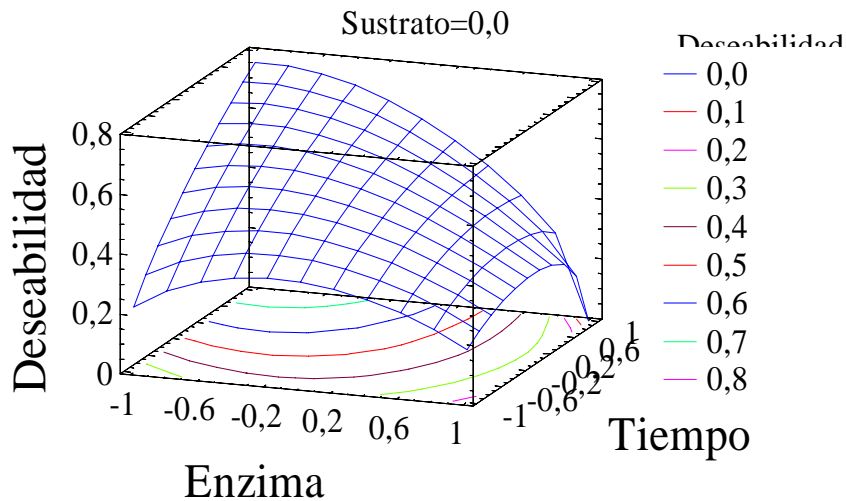


Figura 4.7 Efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la función deseabilidad de la reacción.

En las condiciones seleccionadas se procedió a hacer el escalado en reactores de 1 y de 60 kg. de capacidad

4.3.1.4 Escalado a 1 kilogramo.

Para el escalado de la reacción a 1 kg se emplearon las siguientes condiciones: razón enzima/sustrato 2,5% (Nivel -1.0), tiempo de reacción 6 horas (Nivel 1.0), relación de sustratos SBO:SEP 60:40 p/p (nivel -1.0), temperatura de reacción 70 °C, velocidad de agitación 300 rpm y agua: 5% respecto al peso de la enzima.

Los resultados después de 6 horas de reacción muestran un valor de hidrólisis de 3.0%, inferior al predicho por el modelo matemático al realizar la optimización multivariable (5.6%) y una RTA-2 igual a 21.5%, valor inferior al predicho. En el primer caso este resultado es aceptable porque se produce menor cantidad de ácidos grasos libres, en el segundo caso se obtiene un rendimiento 3% menor, pero esto está dentro de los límites esperados al escalar, situación en la cual una

variación del 10% es aceptable.

El punto de fusión de la mezcla así como los valores de SFC medidos a 25 °C disminuyeron con el avance de la reacción, como se presentan en la **Tabla 4.9**, y sirven como indicadores del grado de interesterificación alcanzado.

Tabla 4.9 Resultados de seguimiento de la reacción a escala de 1 kg.

Tiempo (hh:mm)	Hidrólisis, (%)	Punto fusión, (°C)	SFC, % (25 °C)
00:00	0.07	48.0	24.8
00:15	2.18	45.9	21.1
00:32	2.51	44.1	20.4
01:00	2.73	43.0	19.0
02:00	2.91	41.5	16.8
03:00	2.93	40.9	15.4
04:00	2.98	40.5	14.0
05:00	3.01	40.3	13.3
06:00	3.00	40.2	13.0

4.3.1.5 Escalado a planta piloto.

Teniendo en cuenta los resultados del escalado a un kilogramo se procedió a escalar en planta piloto bajo las siguientes condiciones: razón enzima/sustrato 2,5%, tiempo de reacción 6 horas, relación de sustratos SBO:SEP 60:40 p/p, temperatura 70 °C, agua: 5% respecto al peso de la enzima y velocidad de agitación de 300 a 400 rpm para mantener dispersa la enzima en el medio.

A escala de planta piloto la hidrólisis de los TAG ocurre principalmente en la primera hora de reacción, debido al mayor contenido de agua en el medio de reacción y en el soporte mismo, como se explicó en el capítulo 3. Al transcurrir el tiempo la velocidad de hidrólisis disminuye drásticamente, de manera que después de 6 horas de reacción la hidrólisis alcanza el valor de 2.3%, como se observa en la Figura 4.8.

Al igual que lo observado para el sistema SBO:PKO, la velocidad de producción de los lípidos estructurados es relativamente alta al inicio de la reacción y disminuye con el avance de la misma. A las 6 horas de reacción la RTA-2 alcanza el valor de 21% (véase la **Figura 4.9**), valor igual al obtenido al escalar a 1 Kg.

Podría considerarse que los resultados obtenidos son consecuentes con los valores predichos por la metodología de optimización multivariable, en donde se busca maximizar la producción de lípidos estructurados y minimizar la reacción de hidrólisis.

En las **Figuras 4.10 y 4.11** se muestran los perfiles cromatográficos de la mezcla SBO:SEP (60:40 p/p) antes y después de la reacción de transesterificación, respectivamente. En ellos se observa la disminución del TAG tripalmitina (C48:0), representado por el pico que eluye a un tiempo de 19.1 minutos, para dar lugar a la formación de los lípidos estructurados.

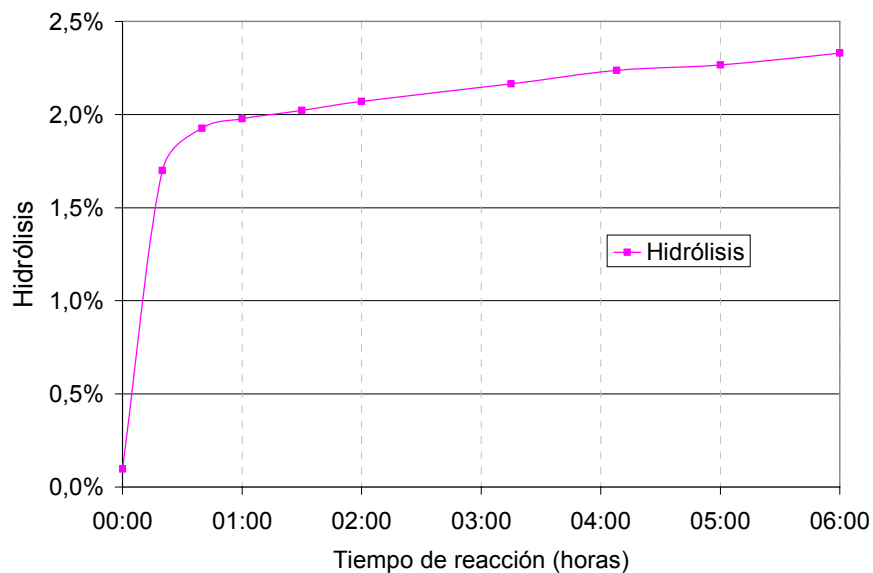


Figura 4.8 Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción para el sistema SBO:SEP (60:40 p/p) a escala piloto (35 kg).

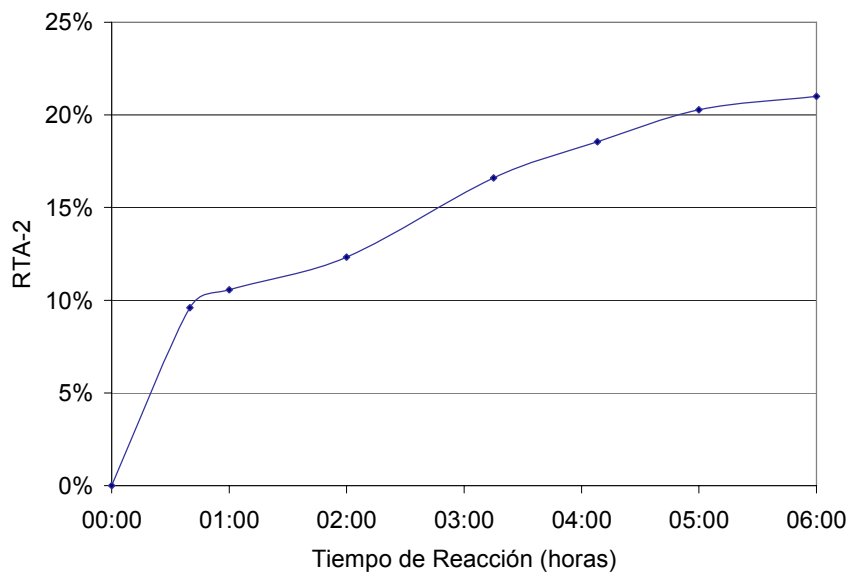


Figura 4.9 Producción de lípidos estructurados durante la reacción a escala piloto (35 kg) del sistema SBO:SEP, medido por el incremento en la RTA-2.

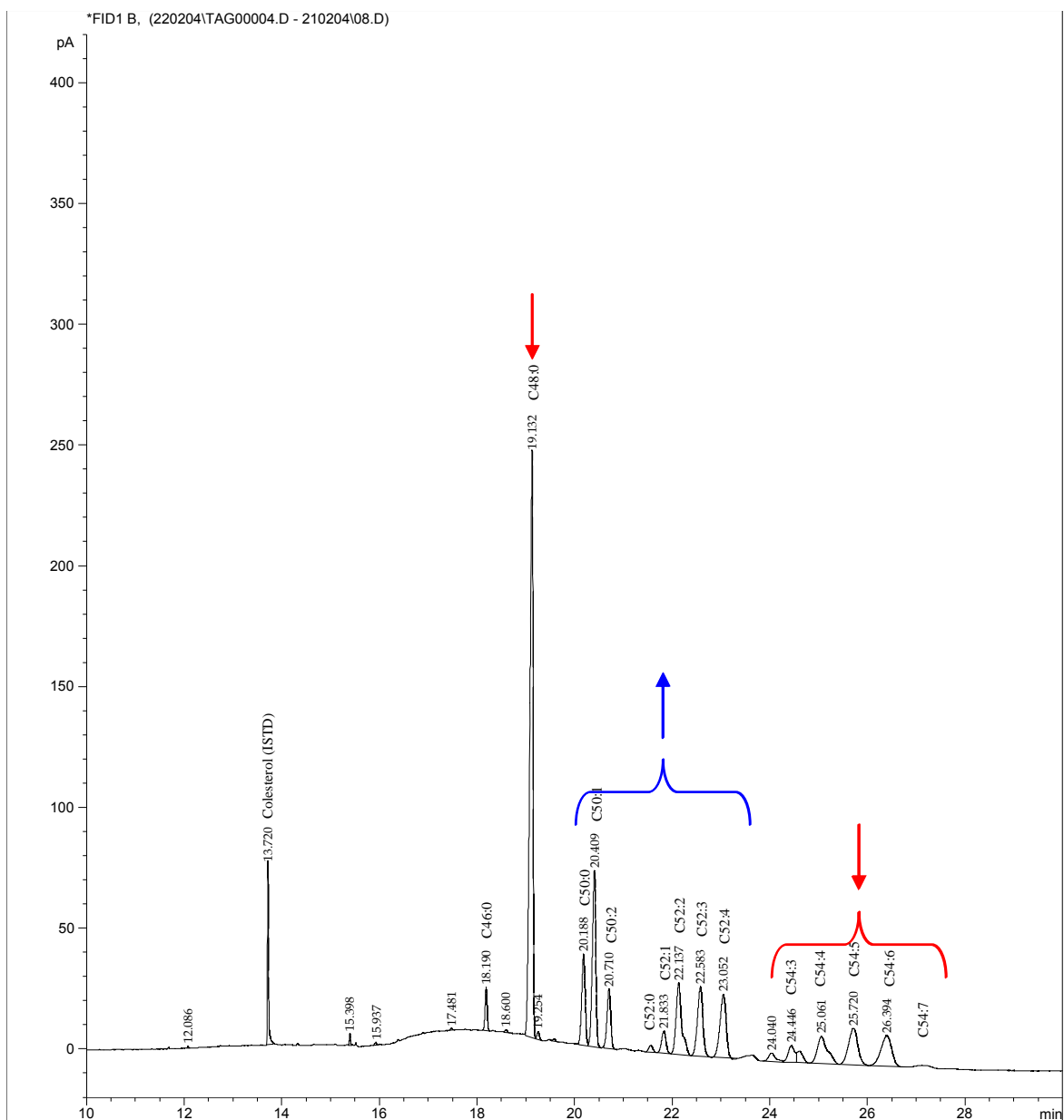


Figura 4.10 Cromatograma HTGC de la mezcla inicial SBO:SEP 60:40 p/p (0 horas de reacción). Columna MXT-65TG: 30 m, 0.25 mm ID, 0.1 μ m film. Gas de arrastre: Helio a 40 cm/s. Horno: 240 $^{\circ}$ C (1 min) a 360 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C/min) mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID, a 370 $^{\circ}$ C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min. La línea roja agrupa los TAG que disminuyen durante la reacción y la azul los que se generan.

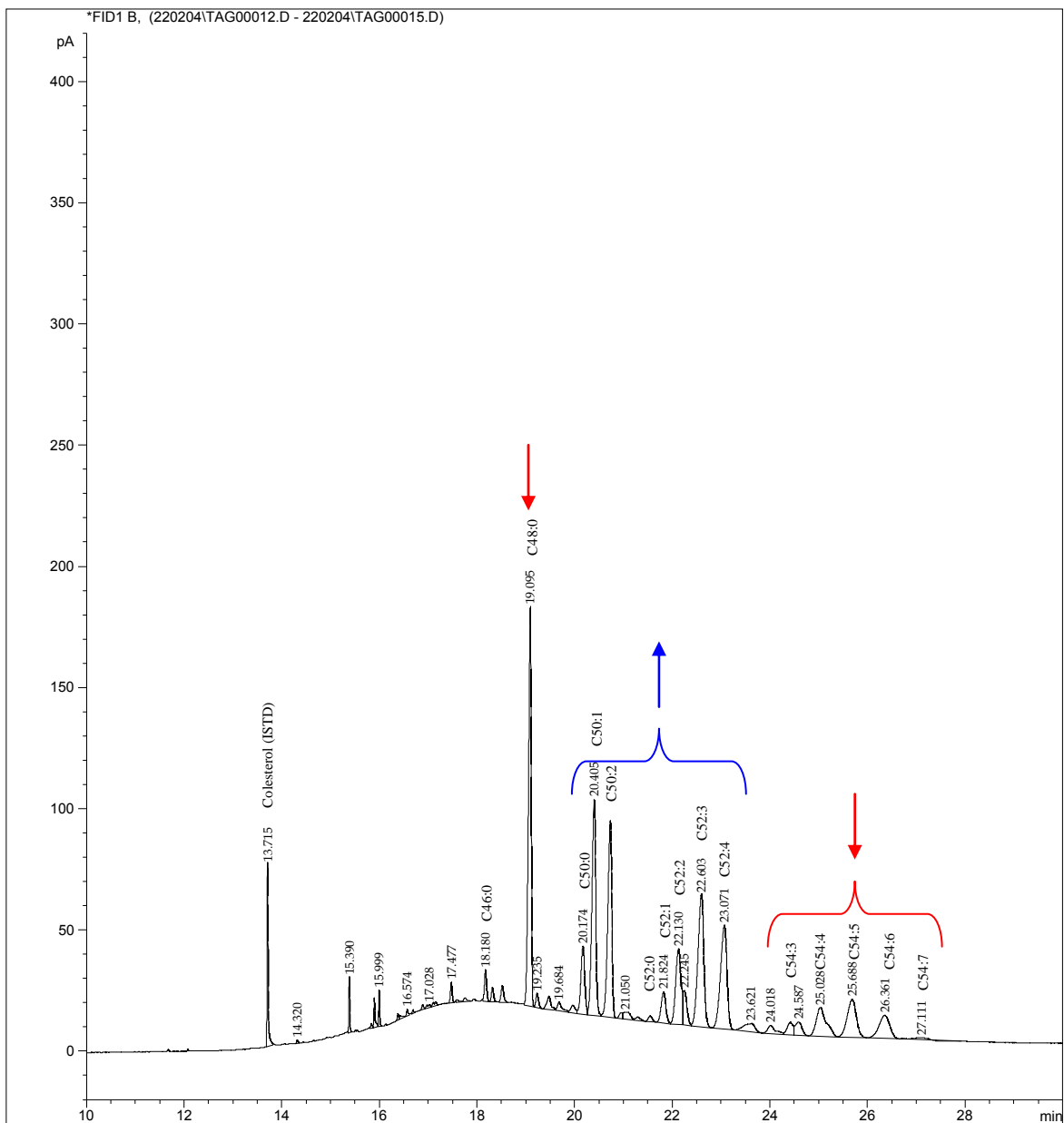


Figura 4.11 Cromatograma HTGC de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p después de 6 horas de reacción. Columna MXT-65TG: 30 m, 0.25 mm ID, 0.1 μ m film. Gas de arrastre: Helio a 40 cm/s. Horno: 240 $^{\circ}$ C (1 min) a 360 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C/min) mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID, a 370 $^{\circ}$ C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min. La línea roja agrupa los TAG que disminuyen durante la reacción y la azul los que se generan.

4.3.1.6 Estudio cinético de la reacción. Cambios en la composición de TAG con el avance de la reacción.

Los TAG presentes inicialmente en alta proporción en la superestearina de palma (C48 y C50) y el aceite de soya (C52 y C54, insaturados), disminuyen con el avance de la reacción para dar origen a triacilgliceroles estructurados (C50:2, C52:3, C52:4, entre otros) por intercambio de los ácidos grasos unidos a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de las moléculas que se combinan, como puede verse en las Figuras 4.12, 4.13 y 4.14.

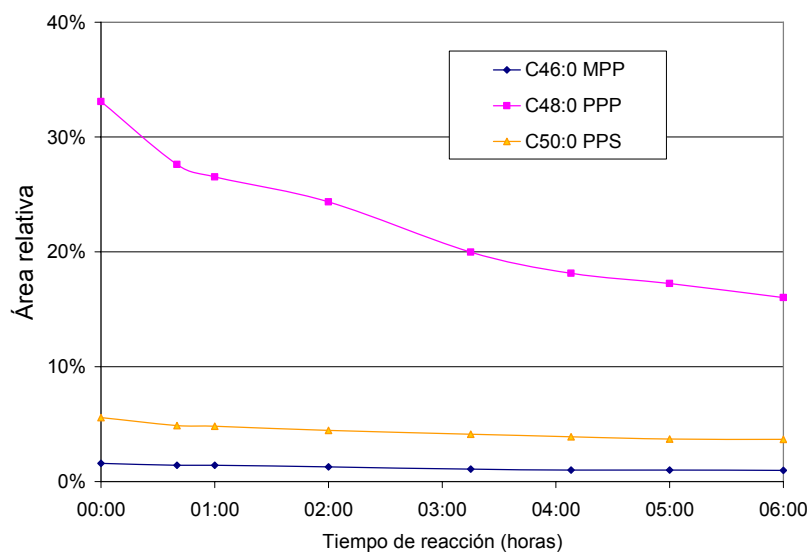


Figura 4.12 Cambio en la concentración de los TAG C46:0 a C50:0, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

De los TAG generados el TAG C50:2 (PPL, MOO) es el que se forma en mayor proporción, seguido del C52:3 (POL), el C52:4 (PLL) y, finalmente, el C52:2 (POO).

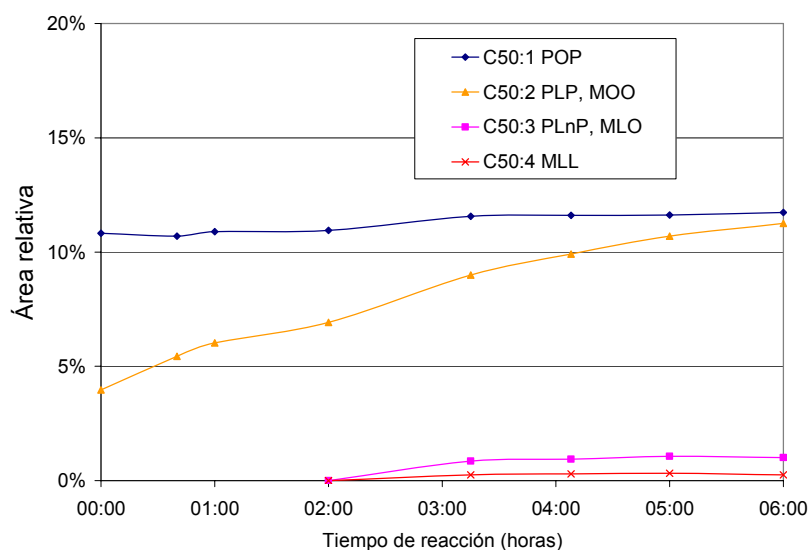


Figura 4.13 Cambios en la concentración de los TAG C50:1, C50:2, C50:3 y C50:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.

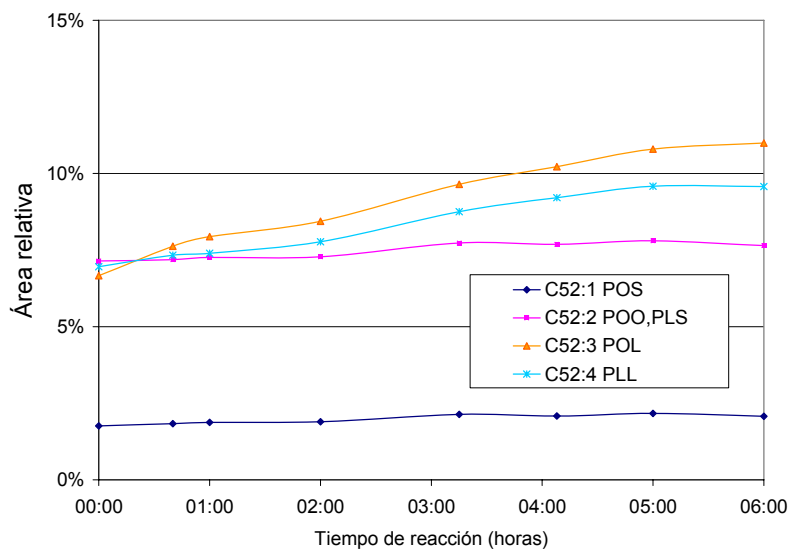


Figura 4.14 Cambios en la concentración de los TAG C52:1, C52:2, C52:3 y C52:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos.

De la información anterior se puede establecer que la enzima Lipozyme® RM-IM fue hábil para catalizar la reacción de transesterificación de la mezcla SBO:SEP, con lo cual se disminuyen los triacilgliceroles de alto punto de fusión (principalmente PPP C48:0) para generar triacilgliceroles estructurados que combinan ácidos grasos saturados e insaturados en una misma molécula.

El cambio en la composición de TAG de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p trae como consecuencia directa la disminución del punto de fusión y el contenido de grasa sólida (SFC), permitiendo transformar la superestearina de palma, una grasa saturada que no se puede emplear directamente para uso alimenticio debido a su alto punto de fusión, en una grasa más suave que podría encontrar aplicación en la industria alimenticia. El contenido de grasa sólida del producto transesterificado (~13%) a 25 °C sugiere que se puede utilizar para la fabricación de grasas esparcibles, margarinas y *shortenings*, grasas para confitería, etc., o por inclusión con otras grasa para obtener mezclas especializadas.

4.3.2 SISTEMA 4. Aceite soya – Superestearina de palma (SBO:SEP)-Lipozyme® TL-IM

La selección de las condiciones de reacción para el sistema SBO:SEP, utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador, se realizó de acuerdo con un diseño experimental de composición central de segundo orden con tres factores y tres niveles, el cual constó de 18 experimentos individuales. En la **Tabla 4.10** se presentan las variables independientes y los niveles evaluados y, en la **Tabla 4.11** los 18 experimentos individuales y sus respuestas.

Tabla 4.10 Variables independientes y niveles del diseño experimental para el sistema SBO:SEP 60:40 p/p, utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador

Variable	Código del nivel de la variable				
	-1.79	-1	0	1	1.79
Razón enzima/sustrato, IUN*/g aceite (%p/p**)	1.3 (0.5%)	6.3 (2.5%)	12.5 (5.0%)	18.8 (7.5%)	23.8 (9.5%)
Temperatura de reacción, (°C)	40	50	60	70	80
Tiempo de reacción, (horas)	3	4	5	6	7

*IUN: Interesterification Unit Novo (unidad de interesterificación Novo)

** %p/p: Porcentaje en peso con respecto al peso del aceite

Tabla 4.11 Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO:SEP 60:40 p/p utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador

Exp.	Enzima		Temp. Nivel	Tiempo Nivel	Hidrólisis (%)	Rta-2 (%)
	IUN	Nivel				
1	12.5	0	0	0	3,47	32,4
2	6.3	-1	-1	-1	2,02	20,9
3	18.8	1	-1	-1	4,50	27,4
4	6.3	-1	1	-1	1,95	31,8
5	18.8	1	1	-1	12,15	33,2
6	6.3	-1	-1	1	2,49	22,9
7	18.8	1	-1	1	6,00	27,9
8	6.3	-1	1	1	6,13	31,6
9	18.8	1	1	1	8,91	33,9
10	12.5	0	0	0	3,50	32,5
11	12.5	0	0	0	3,50	33,0
12	1.3	-1,79	0	0	1,93	23,9
13	23.8	1,79	0	0	8,50	33,7
14	12.5	0	-1,79	0	2,10	17,9
15	12.5	0	1,79	0	6,50	29,9
16	12.5	0	0	-1,79	2,81	34,8
17	12.5	0	0	1,79	3,34	35,3
18	12.5	0	0	0	4,11	32,7
19	6.3	-1	0	0	2,12	32,0

** RTA-2: Incremento en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes a los TAG C50:2, C52:3 y C52:4.

4.3.2.1 Efecto de las variables de proceso sobre el rendimiento de la reacción de transesterificación.

Los efectos de las variables de reacción sobre el rendimiento de la transesterificación se evaluaron a través del incremento en los TAG con ACN:DB C50:2, C52:3 y C52:4, que se ha llamado RTA-2.

De las variables evaluadas en este sistema sólo la temperatura de reacción y la razón enzima/sustrato tienen efectos estadísticamente significativos sobre la RTA-2 a un nivel de confianza del 95%, es decir, el grado de transesterificación aumenta en la medida en que estos factores se desplazan del nivel más bajo al nivel más alto. Por el contrario, las interacciones enzima-enzima y enzima-temperatura desfavorecen la reacción, haciendo que haya un valor óptimo de enzima y temperatura entre los niveles más bajos y más altos evaluados, como se observa en los diagramas de Pareto y de efectos principales (ver la **Figura 4.15**).

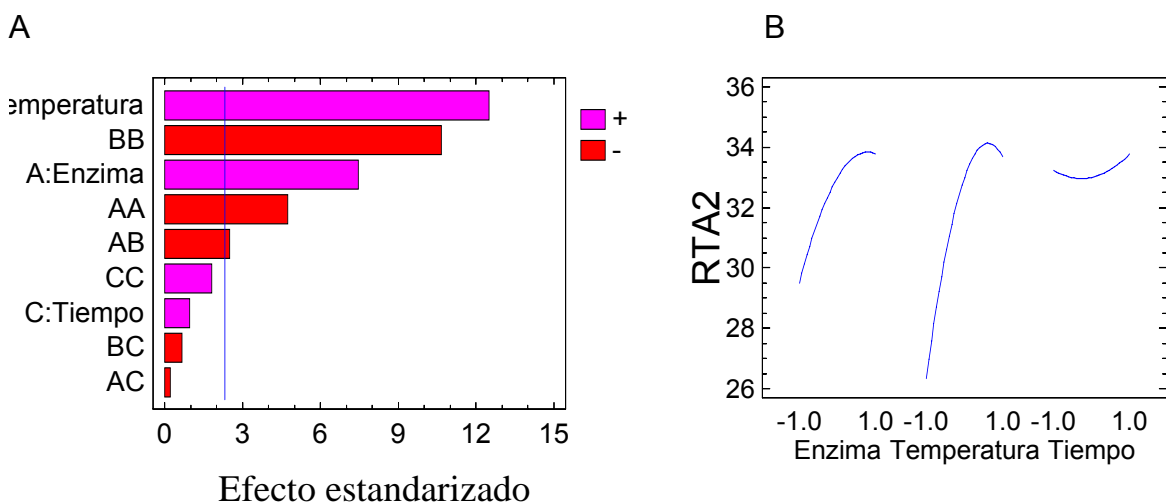


Figura 4.15 A. Diagrama de Pareto y B. Efectos principales para la variable RTA- 2.

El análisis de la varianza muestra que la temperatura de reacción, la razón enzima/sustrato y sus términos cuadráticos tienen efectos significativamente diferentes de cero ($p < 0.05$) para la variable respuesta RTA-2 en un nivel de confianza del 95% (véase la Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta RTA-2

Fuente	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado medio (SCM)	Relación F	Valor P
A:Enzima	69.2410	1	69.2410	55.45	0.0001
B:Temperatura	194.0860	1	194.0860	155.42	0.0000
C:Tiempo	1.0532	1	1.0532	0.84	0.3853
AA	27.8340	1	27.8340	22.29	0.0015
AB	7.605	1	7.605	6.09	0.0388
AC	0.0450	1	0.0450	0.04	0.8542
BB	141.302	1	141.302	113.15	0.0000
BC	0.500	1	0.500	0.40	0.5445
CC	3.9568	1	3.9568	3.17	0.1129
Total error	9.9902	8	1.24877		
Total (corr.)	456.1120	18			

El modelo matemático predicho para la respuesta RTA-2, tiene la forma general de la Ecuación 4.3 y los coeficientes de regresión ($\beta_0, \beta_i, \beta_{ij}$) se presentan en la **Tabla 4.13**. Como en los casos anteriores, X_i representa las variables independientes (A: Razón enzima/sustrato, B: Temperatura de reacción y C: tiempo de reacción)

$$RTA - 2 (\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Ec 4.3}$$

El valor estadístico R^2 -cuadrado indica que el modelo explica el 97.81% de la variabilidad en la RTA-2.

Tabla 4.13 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho.

Términos		Coeficientes	
Lineal	constante	β_0	32.9984
	A: Enzima	β_1	2.1331
	B: Temperatura	β_2	3.6713
	C: Tiempo	β_3	0.2705
Cuadrático	AA	β_4	-1.3553
	BB	β_5	-2.9849
	CC	β_6	0.4995
Interacciones	AB	β_7	-0.9750
	AC	β_8	-0.0750
	BC	β_9	-0.2500
R ² -cuadrado =97.81%		R ² -cuadrado (ajustado por GL) = 95.62%	

De las **Figuras 4.16** y **4.17** se deducen las condiciones que en combinación conducen al mayor valor RTA-2: En ellas se presenta gráficamente a) el efecto de variar la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre la RTA-2 y b) el efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción, respectivamente.

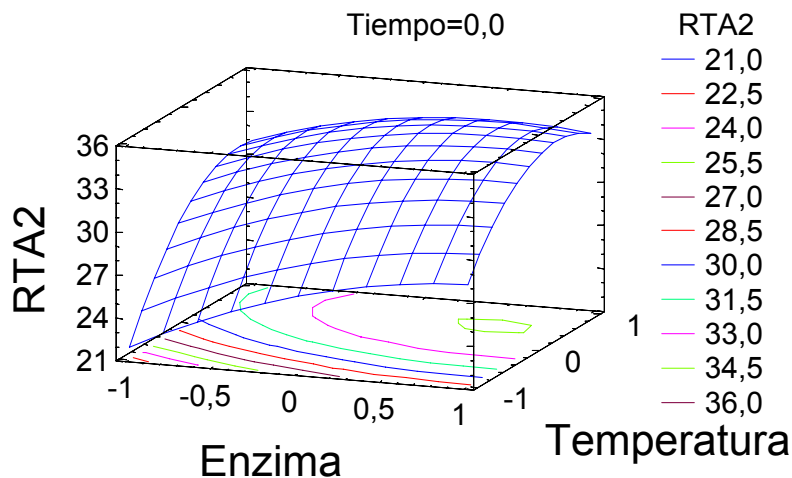


Figura 4.16 Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre la respuesta RTA-2.

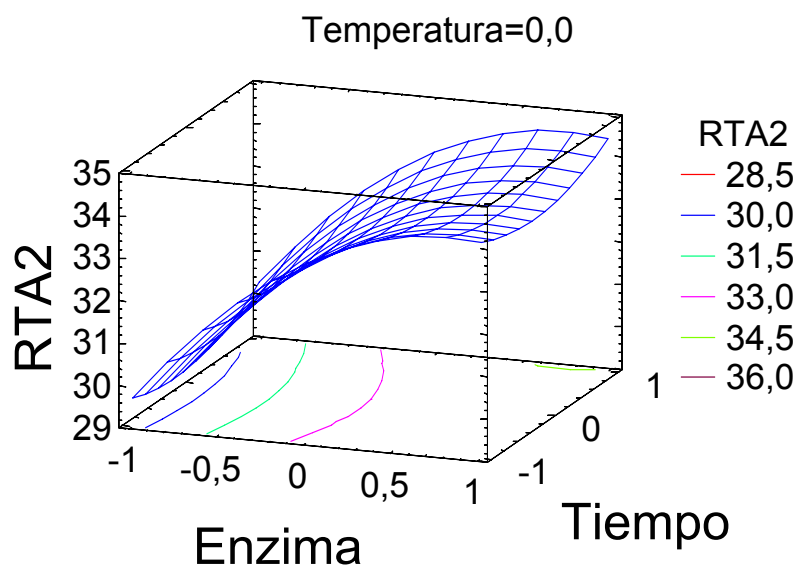


Figura 4.17 Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta RTA-2.

De las gráficas anteriores se deduce que las mayores eficiencias se logran a altas cargas de enzima y temperaturas de reacción comprendidas entre el nivel 0 (60 °C) y el nivel 1 (70 °C) y tiempos de reacción mayores a tres (3) horas.

4.3.2.2 Efecto de las variables de proceso sobre la reacción de hidrólisis.

La razón enzima/sustrato utilizada y la temperatura de reacción tienen efectos estadísticamente significativos sobre el grado de hidrólisis alcanzado. A valores altos de estas variables se produce mayor hidrólisis de los TAG, como se deduce de la **Figura 4.18**. El efecto del tiempo de reacción no fue significativo para este grupo de experimentos debido a que la hidrólisis de los TAG ocurre con mayor extensión en las dos primeras horas de reacción, cuando la disponibilidad de agua en el soporte de la enzima y en el medio es superior y en el diseño experimental usado para éste sistema el menor tiempo evaluado fue 3 horas.

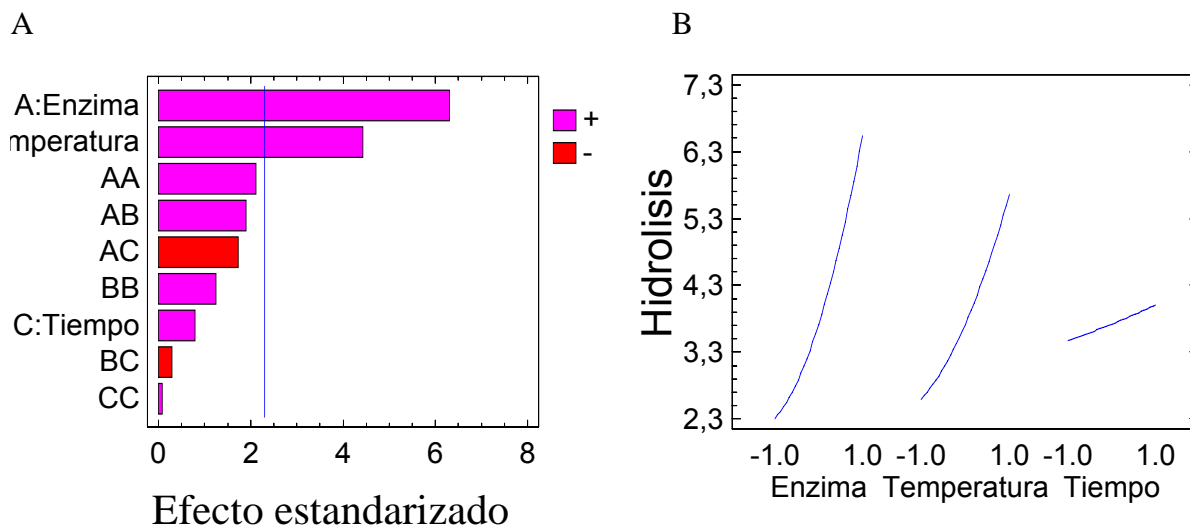


Figura 4.18 A. Diagrama de Pareto estandarizado y B. Diagrama de efectos principales para la variable respuesta grado de hidrólisis.

Contrario a la reacción de transesterificación, en la reacción de hidrólisis las interacciones entre las variables de proceso no fueron significativas como se deduce del análisis de varianza presentado en la **Tabla 4.14**.

El modelo matemático predicho para describir este comportamiento cuando se utiliza como catalizador Lipozyme® TL-IM, fue similar al obtenido con Lipozyme® RM-IM. Los coeficientes de regresión predichos para el intercepto, los términos lineales, los términos cuadráticos y los términos de interacción, $(\beta_0, \beta_i, \beta_{ij})$, se presentan en **Tabla 4.15**, donde X_i representa las variables independientes (A: razón enzima/sustrato, B: Temperatura de reacción y C: Tiempo de reacción).

El valor estadístico R^2 -cuadrado indica que el modelo desarrollado explica el 90.53% de la variabilidad en la hidrólisis.

Tabla 4.14 Análisis de la Varianza (ANOVA) para la respuesta grado de hidrólisis

Fuente	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado Medio (SCM)	Relación F	Valor P
A:Enzima	67.9349	1	67.9349	39.60	0.0002
B:Temperatura	33.6141	1	33.6141	19.59	0.0022
C:Tiempo	1.0337	1	1.0337	0.60	0.4600
AA	7.5342	1	7.5342	4.39	0.0694
AB	6.1075	1	6.1075	3.56	0.0959
AC	5.1040	1	5.1040	2.97	0.1228
BB	2.5972	1	2.5972	1.51	0.2535
BC	0.1326	1	0.1326	0.08	0.7880
CC	0.0076	1	0.0076	2.61	0.9486
Total error	13.7252	8	1.7156		
Total (corr.)	145.0	18			

Tabla 4.15 Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Términos	Coeficientes		
Lineal	constante	β_0	3.7186
	A: Enzima	β_1	2.1129
	B: Temperatura	β_2	1.5279
	C: Tiempo	β_3	0.2679
Cuadrático	AA	β_4	0.7051
	BB	β_5	0.4047
	CC	β_6	0.0219
Interacciones	AB	β_7	0.8738
	AC	β_8	-0.7988
	BC	β_9	-0.1288

R^2 -cuadrado = 90.53% R^2 – cuadrado (ajustado por G.L.) = 81.07%

Los gráficos de superficie construidos a partir del modelo muestran que el grado de hidrólisis incrementa con el aumento de la temperatura de reacción y la razón enzima/sustrato utilizada (véase la **Figura 4.19**). El efecto de variar el tiempo de reacción y la razón enzima/sustrato se muestran en la **Figura 4.20** y las observaciones son las mismas: la razón enzima/sustrato eleva la hidrólisis de los sustratos en tanto que el tiempo de reacción no tiene un efecto significativo.

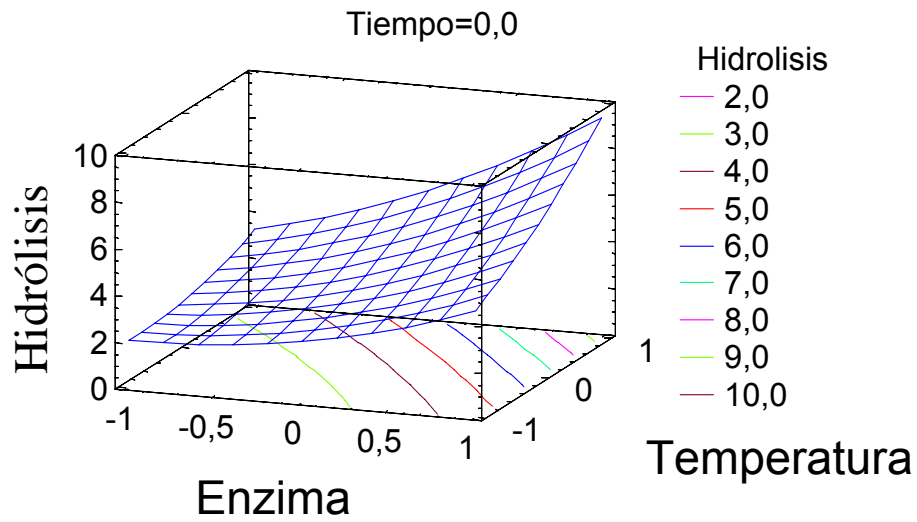


Figura 4.19 Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis.

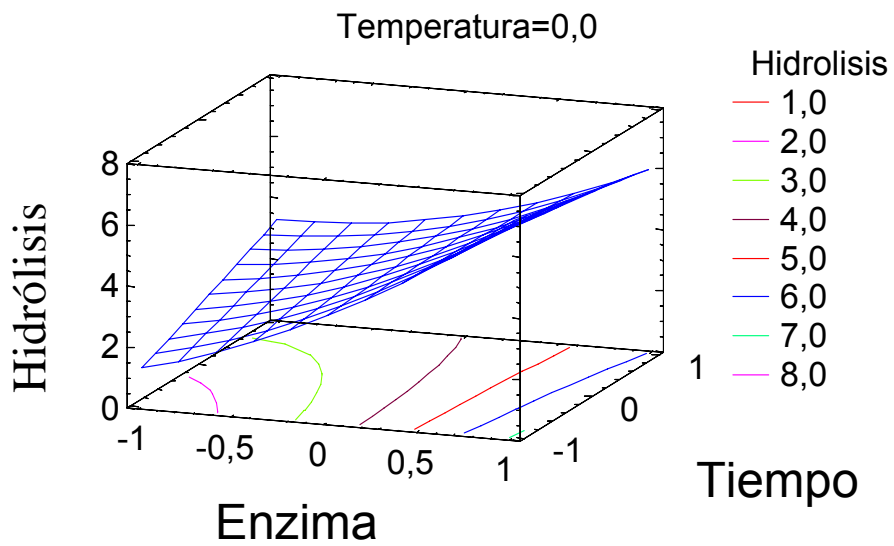


Figura 4.20 Efecto de la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre el grado de hidrólisis.

Bajo estas consideraciones, los niveles de las variables independientes evaluadas que conducen a un menor grado de hidrólisis en la región experimental evaluada, implican la menor cantidad posible de enzima y temperatura y tiempo de reacción bajos, como se resumen en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.16 Combinación de factores que minimizan la reacción de hidrólisis

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Enzima	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	-1.79 (0.5%)
Temperatura	-1.79 (40 °C)	1.79 (80 °C)	-0.24 (57.5 °C)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 horas)	-1.79 (3 horas)
Hidrólisis (%)	-----	-----	0.0%

4.3.2.3 Optimización de la reacción

Una vez aplicada la metodología de optimización multivariable se encontró que los niveles de las variables que conducirían a una mayor producción de lípidos estructurados (RTA-2 =34.0%) y menor hidrólisis (2.2%), son los presentados en la **Tabla 4.17** y la **Figura 4.21**.

Tabla 4.17 Combinación de factores y niveles que maximizan la deseabilidad

Factor	Nivel mínimo	Nivel máximo	Nivel óptimo
Enzima	-1.79 (0,5%)	1.79 (9.5%)	-1.00 (2.5%)
Temperatura	-1.79 (40 °C)	1.79 (80 °C)	0.50 (65 °C)
Tiempo	-1.79 (3 horas)	1.79 (7 hora)	-1.79 (3 horas)
Deseabilidad	-----	-----	0.94
RTA-2 (%)	-----	-----	33.97%
Hidrólisis	-----	-----	2.24%

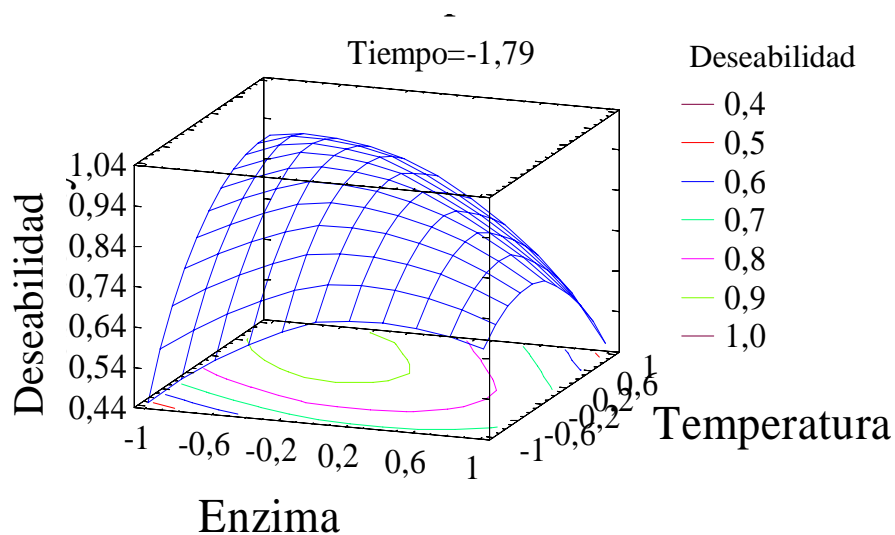


Figura 4.21 Efecto de la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción que conducen a la menor hidrólisis y mayor valor de RTA-2 (Deseabilidad).

4.3.2.4 Escalado de la reacción a 1 kg

El escalado de la reacción a 1 kg se efectuó bajo las siguientes condiciones: razón enzima/sustrato 2.5%, tiempo de reacción 3 horas, relación de sustratos SBO:SEP 60:40 p/p, temperatura de reacción 70 °C, velocidad de agitación 300 rpm. No obstante, una vez completadas las 3 horas de reacción, se tomaron muestras para los respectivos análisis y se dejó proceder la reacción hasta alcanzar las 6 horas (nivel 1.00), para verificar la información predicha en la optimización multivariable.

Los resultados de 6 horas de reacción se presentan en la **Tabla 4.18** e indican un valor de hidrólisis igual 0.76%, bastante menor al predicho por el modelo matemático para las condiciones óptimas (deseables).

El punto de fusión de la mezcla, así como los valores de SFC medidos a 25 °C disminuyeron con el avance de la reacción hasta alcanzar los valores de 40.5 °C y

13.5%, respectivamente, en la cuarta hora de reacción, manteniéndose aproximadamente constantes después de este tiempo.

Tabla 4.18 Resultados seguimiento de la reacción a escala de 1 kg

Tiempo (hh:mm)	Hidrólisis, (%)	p.f., (°C)	SFC, % (25 °C)
00:00	0,10	48,0	25,3
00:15	0,39	46,9	19,8
00:30	0,53	46,3	18,3
01:00	0,61	45,0	17,0
02:00	0,65	43,6	16,0
03:00	0,69	42,0	14,5
04:00	0,73	40,5	13,5
05:00	0,75	40,4	13,0
06:00	0,76	40,5	12,8

4.3.2.5 Escalado a planta piloto (35 kg)

En este caso las condiciones de reacciones fueron las señaladas anteriormente para el escalado a un kilogramo, con la diferencia de que se aumento la velocidad de agitación de 300 a 400 rpm para lograr una mejor dispersión de la enzima.

En este sistema la mayor actividad hidrolítica de la enzima se observa en los primeros 15 minutos de reacción. Con el transcurso del tiempo la velocidad de hidrólisis se hace menor, manteniéndose aproximadamente constante después de la primera hora. Después de 6 horas de reacción se alcanza un valor de hidrólisis de 0.55%, más bajo que el obtenido a escala de 1 kg (0.76%) y que el valor predicho por el modelo (véase la **Figura 4.22**).

Los lípidos estructurados (RTA-2), por su parte, se producen a una velocidad relativamente alta hasta la segunda hora de reacción, pero disminuyen con el avance de la misma hasta que la reacción alcanza el equilibrio y la RTA-2 el valor de 28.9% después de 4 horas (véase la **Figura 4.23**). Los resultados son similares a los observados a escala de 1 kg y, a su vez consecuentes con los predichos por la metodología de optimización multivariable.

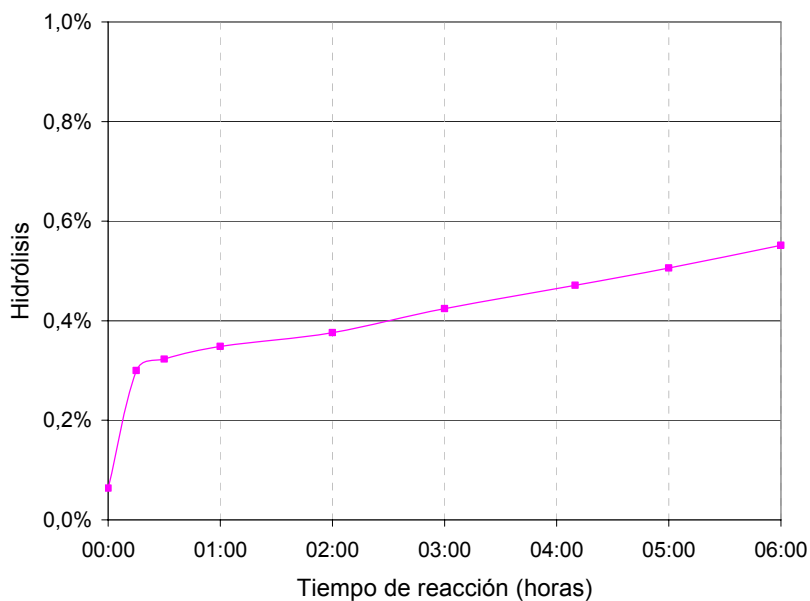


Figura 4.22 Evolución de la hidrólisis con el tiempo de reacción durante la transesterificación del sistema SBO:SEP 60:40 p/p a escala piloto (35 kg).

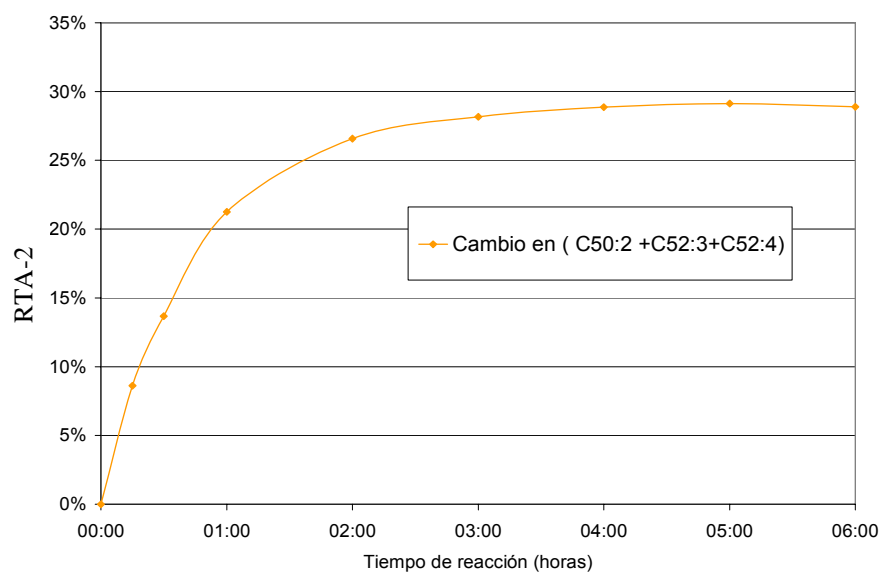


Figura 4.23 Producción de lípidos estructurados durante la reacción de transesterificación a escala piloto (35 kg), medido por el incremento en la RTA-2.

Con la producción de lípidos estructurados disminuye el punto de fusión y el contenido de grasa sólida de la mezcla transesterificada (véase la **Figura 4.24**), haciéndose más suave y con mayores posibilidades de aplicación en productos alimenticios.

Estos resultados están de acuerdo con los hallados por Lai, *et al.*, (1999), quienes utilizando las enzimas lipasas inmovilizadas Lipozyme IM-60 y *Pseudomonas sp* como catalizadores para la transesterificación de estearina de palma con aceite de girasol en proporción 60:40 (p/p), lograron disminuir el punto de fusión de la mezcla a 37- 40 °C y el contenido de grasa sólida a 3.9% a 40 °C. Farmani, *et al.*, (2007) encontraron además, que no hay diferencias significativas entre el punto de fusión de la mezcla transesterificada por vía enzimática y la de vía química.

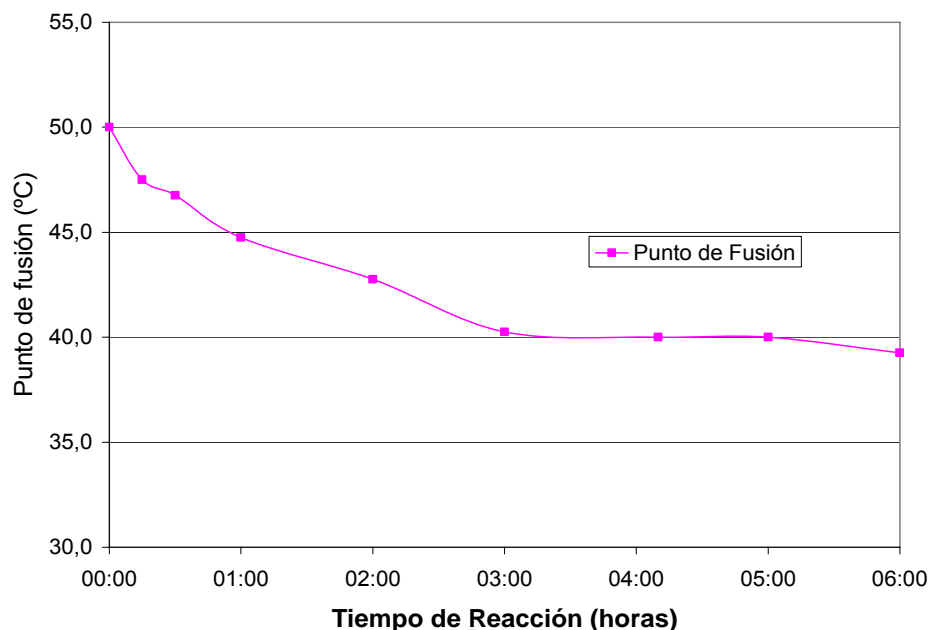


Figura 4.24 Cambio en el punto de fusión de la mezcla transesterificada con el avance de la reacción.

Como sucedió en la reacción con Lipozyme® RM-IM, en la transesterificación catalizada por Lipozyme® TL-IM la concentración de los TAG presentes en mayor proporción en la superestearina, C48 y C50, disminuyen con el avance de la reacción (**Figura 4.25**) para dar origen a los TAG estructurados (C50:2, C52:3 y C52:4) por intercambio de los ácidos grasos ubicados en las posiciones primarias del glicerol (véase las **Figuras 4.26 y 4.27**).

De los TAG formados, el que se genera en mayor proporción es el C50:2 (PPL, MOO), seguido del C52:3 y el C52:4.

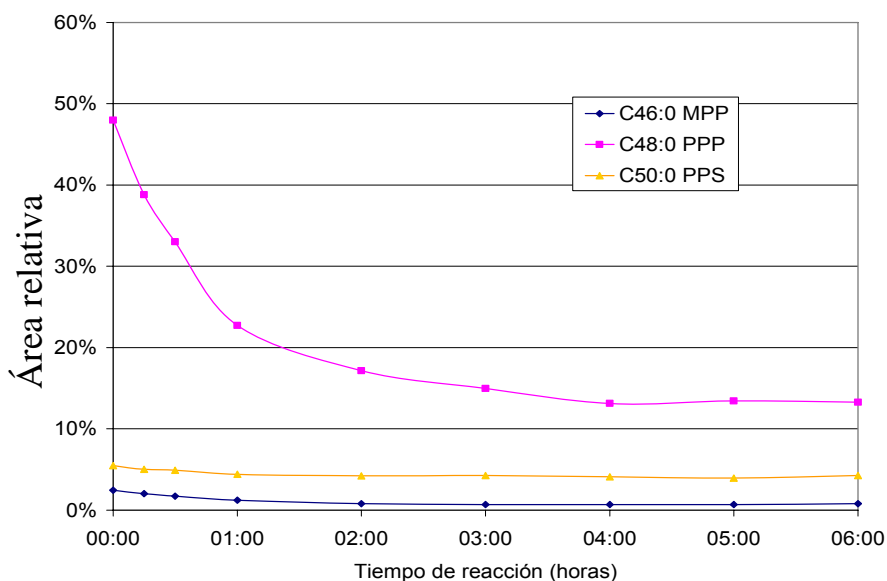


Figura 4.25 Cambio en la concentración de los TAG C46:0 a C50:0, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondiente.

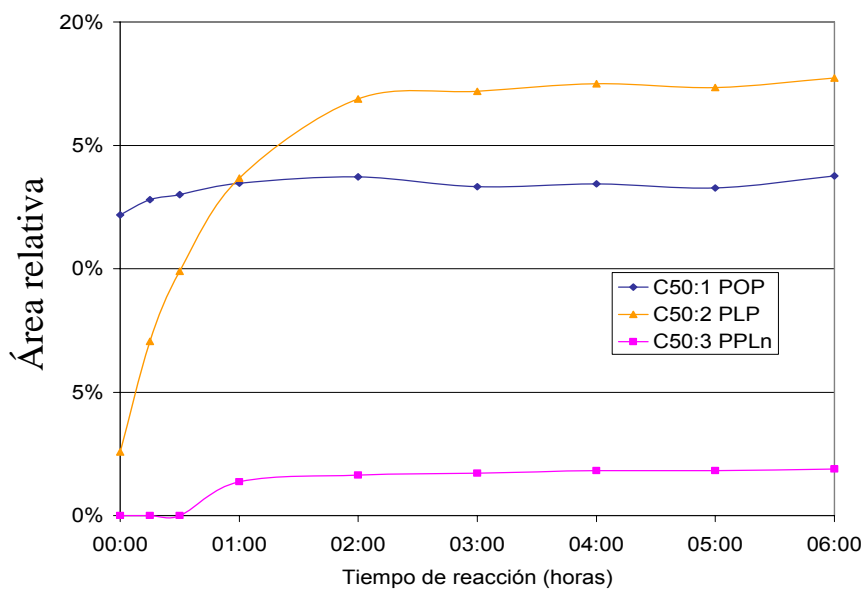


Figura 4.26 Cambios en la concentración de los TAG C50:1, C50:1, C50:2, C50:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

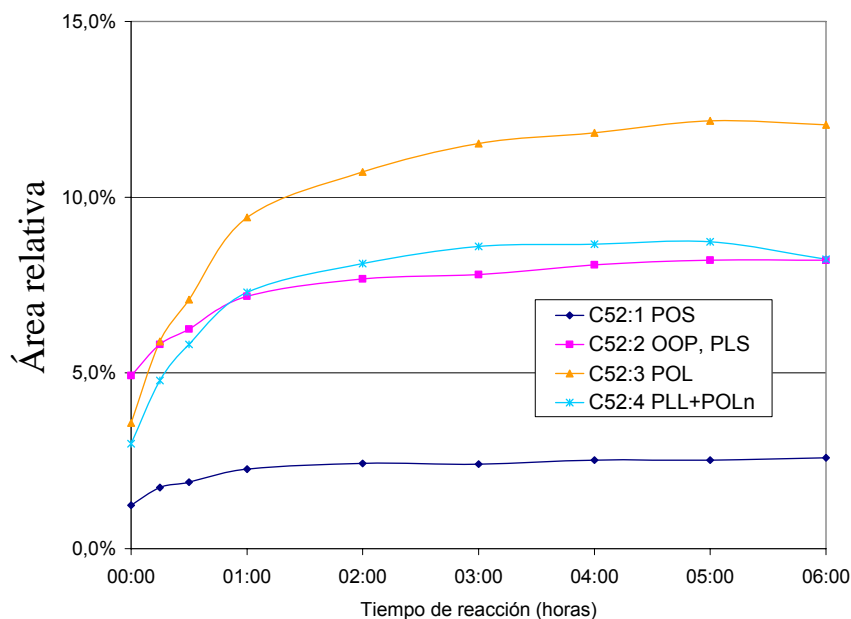


Figura 4.27 Cambios en la concentración de los TAG C52:1, C52:2, C52:3 y C52:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

Comparado con el sistema catalizado por Lipozyme® RM-IM, la mezcla de reacción SBO:SEP 60:40 p/p transesterificada usando Lipozyme® TL-IM alcanza el equilibrio en menor tiempo.

4.3.3 Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:SEP 60:40 p/p

En la **Tabla 4.19** se presenta la composición (%mol) de los FA presentes en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2 de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p antes y después de la transesterificación con Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM.

Tabla 4.19 Distribución de los FA (%mol) en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2, de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación con Lipozyme® TL-IM y Lipozyme® RM-IM

Ácido	Mezcla inicial (00:00 h de reacción)			Lipozyme TL-IM (04:00 de reacción)		Lipozyme RM-IM (06:00h de reacción)	
	<i>sn</i> -1,2,3	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2
C14:0	0,7%	0,8%	0,4%	0,7%	0,5%	0,8%	0,4%
C16:0	37,1%	45,4%	20,5%	41,8%	27,5%	44,6%	21,9%
C18:0	4,4%	6,0%	1,4%	6,0%	1,3%	5,8%	1,7%
C18:1n9c	20,8%	17,6%	27,1%	18,4%	25,6%	17,9%	26,5%
C18:2n6c	32,3%	25,6%	45,5%	28,2%	40,3%	26,3%	44,2%
C18:3n3	4,4%	4,1%	4,9%	4,3%	4,6%	4,0%	5,1%
C20:0	0,4%	0,5%	0,2%	0,6%	0,0%	0,5%	0,2%
Total	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Al igual que con el sistema SBO:PKO 60:40 p/p, los resultados de la **Tabla 4.19** indican que en la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p la enzima Lipozyme® RM-IM exhibe mayor especificidad hacia las posiciones *sn*-1,3 que la exhibida por Lipozyme® TL-IM, no obstante, la especificidad hacia las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de los TAG desplegada por ambas enzimas es suficiente para sintetizar lípidos estructurados con propiedades funcionales, en donde se desee mantener los FA insaturados en la posición central de las moléculas de TAG que se combinan.

Comparando la distribución de los ácidos grasos en los TAG de la mezcla SBO:SEP transesterificada, respecto a la distribución hallada por Nielsen, *et al.*, (2006) para la grasa láctea humana y el sustituto comercial Betapol-45 (Loders Crokiaan, Wormerveer - Holland) (véase las **Tablas 4.19** y **4.20**), se encuentra que, la obtenida en este trabajo presenta un mayor contenido de ácido palmítico (37.1%) que la grasa láctea humana (31.1%) y que Betapol-45 (31.7%). No obstante, la cantidad de ácido palmítico ubicado en la posición central es menor (21,9%) que la hallada para Betapol-45 (31.7%) y prácticamente igual a la de la mezcla sin transesterificar. Este hecho obedece a que en la reacción de

transesterificación utilizando enzimas *sn*-1,3 específicas, la composición en ácidos grasos permanece prácticamente invariable y los ácidos grasos que se intercambian pasan a ocupar nuevamente las posiciones primarias en los TAG donde finalmente se ubican. Sin embargo, es posible cambiar la composición de esta mezcla sometiendo la grasa a un fraccionamiento controlado para retirar la tripalmitina (C48:0) que no reaccionó y parte de los TAG disaturados que se hayan formado.

En una reacción de acidólisis como la usada para fabricar Betapol-45, la composición en ácidos grasos de la mezcla de reacción cambia sustancialmente porque se sustituyen los ácidos grasos de las posiciones primarias por nuevos ácidos grasos y los que estaban originalmente presentes en esas posiciones primarias se retiran finalmente de la mezcla de reacción como ácidos grasos libres en una etapa posterior de refinación (neutralización física o química).

Por otra parte, en la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p transesterificada la concentración de ácidos grasos esenciales (Omega-6 y Omega-3) ubicados en la posición *sn*-2 es mayor que la reportada para Betapol-45. Este hecho es muy importante desde el punto de vista nutricional por los efectos metabólicos benéficos de estos ácidos y la relevancia de su ubicación en la posición central para una absorción eficiente, como se discutió en los capítulos 1 y 2.

También cabe anotar que la relación Omega-6/Omega-3 del producto obtenido está en 8.7:1, similar a la hallada para Betapol-45 (8.2:1). Idealmente, esta relación debe estar entre 5:1 y 10:1 para la promoción de un buen estado de salud (Nielsen *et al.*, 2006; Simopoulos, 2003; Valenzuela *et al.*, 2002; FAO/OMS, 1994).

El contenido de ácido oleico fue similar para la mezcla SBO:SEP transesterificada (25.6 a 26.5%) y Betapol-45 (28.7%).

Tabla 4.20 Composición en ácidos grasos (%mol) de la grasa láctea humana y Betapol 45, ubicados en las posiciones *sn*-2 y *sn*-1,3 de los TAG.

Nomenclatura	Leche humana*	Betapol 45*		
		<i>sn</i> -1,2,3	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2
CN:BD				
C12:0	5,4%	12,7%	12,1%	14,0%
C14:0	8,1%	4,6%	4,6%	4,7%
C16:0	31,1%	22,3%	17,6%	31,7%
C18:0	8,0%	2,9%	3,7%	1,4%
C18:1n9c	36,5%	38,3%	43,1%	28,7%
C18:2n6c	10,1%	13,6%	12,2%	16,4%
C18:3n3	0,7%	1,3%	1,0%	2,0%
C20:0	-	-	-	-

* Datos reportados por Nielsen *et al.*, (2006).

Finalmente, comparando los resultados obtenidos al transesterificar la mezcla de aceites superestearina de palma-aceite de soya con las lipasas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM se puede establecer que:

- Las variables que tienen un efecto significativo sobre la reacción de esterificación y la colateral de hidrólisis son diferentes en los dos casos. En presencia de Lipozyme® RM-IM las más representativas son razón enzima/sustrato y tiempo de reacción, mientras que en presencia de Lipozyme® TL-IM lo son la razón enzima/sustrato y la temperatura reacción.
- En los dos sistemas la variable más influyente es la razón enzima/sustrato adicionada al medio de reacción.
- La relación de sustratos más adecuada para la producción de lípidos estructurados en este sistema fue SBO:SEP 60:40 p/p.
- Los TAG que se forman en mayor proporción son el C50:2, C52:3 y C52:4.
- La Mezcla SBO:SEP transesterificada presenta un contenido alto de ácido

palmítico, linoleico y linolénico en la posición central del glicerol (*sn*-2), lo que permite predecir un buen desempeño desde el punto de vista nutricional.

- Los dos sistemas enzimáticos evaluados presentaron alta especificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG que se combinan, permitiendo la fabricación de “grasas a la medida”.
- Las grasas transesterificadas presentan menor punto de fusión y contenido de grasa sólida que habilitan su aplicación en la elaboración de productos alimenticios especializados.
- Al aumentar de escala disminuye el grado de hidrólisis de los sustratos, pero el grado de transesterificación alcanzado se mantiene.
- La reacción catalizada con Lipozyme® TL-IM se acerca al equilibrio en menor tiempo comparada con la reacción catalizada con Lipozyme® RM-IM, lo que finalmente se traduce en una mayor productividad.
- Con Lipozyme® TL-IM el grado de hidrólisis generado fue menor y así mismo, la estereoespecificidad hacia las posiciones *sn*-1,3 fue menor, no obstante el valor para la respuesta RTA-2 fue mayor.

CAPÍTULO 5

5. REACCIÓN DE TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICA EN UN SISTEMA EN CONTINUO - REACTOR DE LECHO EMPACADO

5.1 INTRODUCCIÓN

En los procesos discontinuos (reactor de tanque agitado) que emplean enzimas como biocatalizadores, una de las limitantes es que al disminuir la velocidad de la reacción por inactivación de las enzimas con el número de usos, el tiempo de proceso se hace muy largo lo que disminuye la productividad, y la otra limitante es que el proceso es más inestable térmicamente.

La inmovilización de enzimas permite trabajar en reactores continuos tipo lecho empacado (PBR), con una caída de presión mínima a altas velocidades de flujo (Novozymes, 2003) y permiten, además, la reutilización eficiente del sistema biocatalítico, favorecen un alto grado de conversión y facilitan la operación lo que se traduce en menores costos del proceso (Corredor y Caicedo, 2005).

En estos reactores, el sustrato entra en contacto con una gran cantidad de enzima, por lo que el tiempo de reacción se hace menor comparado con el de los reactores discontinuos, donde la elevada relación sustrato/enzima demanda tiempos de reacción mayores para alcanzar el equilibrio. Este hecho reviste gran importancia debido a que a mayor tiempo de reacción, mayor migración de grupos acilo y por tanto reducción de la pureza de los lípidos estructurados, aun cuando la lipasa utilizada sea *sn*-1,3-específica (Mu *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2005, Nielsen *et al.*, 2006, Carrín y Crapiste, 2007).

Investigadores como Xu *et al.* (1998, 1999, 2000), Fomuso y Akoh (2002), Camacho *et al.* (2002), Lai *et al.*, (2005), Kim y Akoh, (2006) y Nielsen *et al.* (2006) evaluaron las reacciones de acidólisis y de transesterificación en reactores continuos de lecho empacado, con y sin solvente, utilizando la lipasa Lipozyme® RM-IM como catalizador. Estos autores coinciden en que los reactores de lecho empacado son promisorios para lograr con éxito la modificación industrial de lípidos catalizados por enzimas lipasas, a un precio razonable sobre una base comercial.

La utilización de Lipozyme® TL-IM como catalizador en un reactor de lecho empacado se encuentra en los trabajos de Xu *et al.*, (2002) sobre la transesterificación de aceite de pescado y triacilglicéridos de cadena media, en el que se determina que el grado de reacción está influenciado en gran medida por el tiempo de residencia y la temperatura, mientras que la formación de productos de hidrólisis fue significativamente baja. En contraste, Torres *et al.*, (2002) en la reacción de acidólisis de triestearina con CLA, encontraron un alto grado de hidrólisis (8.3%) además de la migración de los grupos acilos ubicados en las posiciones *sn*-2.

Rønne *et al.* (2005) Interesterificaron grasa láctea con aceite de colza y encontraron que con Lipozyme® TL-IM la reacción alcanza el equilibrio en la mitad del tiempo de residencia requerido con Lipozyme® RM-IM, y que el efecto de la temperatura de reacción sobre el grado de interesterificación es más significativo para Lipozyme® RM-IM. Sin embargo, las características del producto interesterificado fueron similares con ambas enzimas. El avance de la reacción en el reactor de lecho empacado puede ser monitoreado en línea por espectroscopia de infrarrojo cercano (FT-NIR) entre 5269-4513 cm^{-1} (Zhang *et al.*, 2006).

Lipozyme® TL-IM también ha sido utilizada en reactor de lecho empacado para la transesterificación de aceite de sésamo con aceite de soya hidrogenada (Otero *et al.*, 2006) y otras aplicaciones como la producción de alfa-butilglucósidos

(Bousquet *et al.*, 2000), fosfolípidos estructurados (Vikbjerg *et al.*, 2005), Monoacilgliceroles (Xu *et al.* 2005); diacilgliceroles (Lo *et al.*, 2007) y biodiesel (Hernández-Martín y Otero, 2007), entre otras.

Entre las ventajas de realizar la transesterificación en un reactor de lecho empacado, se pueden mencionar:

- **Bajos costos de inversión:** Estos procesos enzimáticos requieren únicamente una columna como equipo especial, por lo que los costos de inversión se hacen mucho más bajos.
- **Es un proceso simple y fácil:** Con sólo pasar una vez el aceite o grasa a través de la columna de enzima se puede lograr un perfil de fusión específico o el grado de transesterificación deseado.
- **La higiene y seguridad industrial mejoran:** La enzima permanece fija en la columna durante la producción, ya que sólo se manipula cuando se requiere cambiarla después de la producción de un gran número de toneladas de grasa. Las enzimas no representan un riesgo para el medio ambiente y son muy poco peligrosas para manipular, pues son proteínas.
- **Es un proceso simple de empezar y fácil de escalar.**
- **El mantenimiento es mínimo.**
- **El estrés mecánico en la enzima es mínimo.**
- **El control de proceso es más fácil:** Existe la posibilidad de controlar fácilmente el grado de transesterificación cambiando el tiempo de contacto en el reactor de lecho empacado (flujo de aceite).

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Materia prima, solventes y equipos.

Materia Prima: El aceite de palmiste (PKO) y el aceite de soya (SBO) fueron suministrados por C.I. Saceites S.A.

Catalizadores: La enzima lipasa 1,3-específica Lipozyme® RM-IM de *Rhizomucor miehei* lote LUX00115 y la enzima Lipozyme® TL-IM de *Thermomyces lanuginosa* lotes LA35000606 y LA350014401 se compraron a Novozymes S.A. (Brasil). La lipasa 1,3-específica Lipozyme® de *Mucor miehei* Fluka 62350 lote LM70783 se compró a Sigma-Aldrich.

Reactivos y Solventes: El Metanol, etanol, n-hexano, éter de petróleo, n-butanol, acetona, NaOH, KOH y demás reactivos grado analítico se compraron a Merck.

Equipos: Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890 (Palo Alto, California, USA) equipado con detector de ionización en llama (FID) e inyector *split* e inyector *On column*, Columnas capilares para cromatografía de gases DB-WAX Ref. 122-7032 (0.25 mm ID * 30 m * 0.25 µm) y DB-17ht Ref. 123-1831 (0.32 mm ID * 30m * 0.15 µm) compradas a J&W SCIENTIFIC, Columna capilar Mtx-65TG Cat # 17008 (0.25 mm ID * 30 m * 0.1 µm) comprada a Restek Corporation. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de 20 MHz Bruker Minispec mq-20 Mhz (Rheinstetten, Germany). Bureta automática Dosimat 665 (Metrohn, Suiza). Reactor de lecho empacado fabricado en vidrio y con capacidad para 500 g de enzima y reactor en acero inoxidable con capacidad para 10 kg de enzima, gentilmente prestado por la empresa Novozymes S.A, (Brasil).

5.2.2 Desarrollo experimental

En esta etapa se emplearon dos reactores de lecho empacado. Para el sistema aceite de palmiste-aceite de soya- Lipozyme® RM-IM⁴ se utilizó el reactor de 500

⁴ En el sistema continuo de lecho empacado sólo se evaluó la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p por las dificultades

gramos de enzima, mientras que cuando se utilizó como catalizador Lipozyme® TL-IM se empleó un reactor de 10 kg. En ambos sistemas la temperatura de reacción fue de 70 °C y la relación de sustratos SBO:PKO 60:40 p/p.

En los dos casos, el reactor se llenó con la cantidad de enzima establecida y se pasó la mezcla de sustratos a través de la columna de enzima a diferentes flujos, seleccionando el que produjo una transformación similar a la alcanzada en reactor de tanque agitado y el producto se analizó en cuanto a contenido de grasa sólida para determinar el grado de transformación alcanzado.

5.2.3 Evaluación de la estabilidad de la enzima – Cálculo de la actividad residual

Para determinar la pérdida de actividad de la enzima inmovilizada con el transcurso del tiempo o cinética de inactivación, se pasó sustrato fresco a través de la columna de enzima, al flujo y la temperatura fijados en los experimentos anteriores. Luego, suponiendo que la inactivación de la enzima durante la reacción en tanque agitado es despreciable y que para cierta cantidad de aceite procesado por unidad de enzima y de tiempo, el valor de SFC es igual al obtenido en la operación del reactor PBR, con enzima de igual actividad, se puede entonces, determinar el grado de inactivación de la enzima en la operación de reactor PBR como una función del tiempo de operación (Novozymes, 2004). Esta información se utiliza para determinar posteriormente la productividad de la enzima.

técnicas que implicaba el trabajar una mezcla de grasa (SBO:SEP 60:40 p/p) de alto punto de fusión ((50.5

5.2.4 Métodos de análisis

El análisis de acilgliceroles, ácidos grasos libres, perfiles de fusión, y puntos de fusión de sustratos y productos de reacción, así como el análisis estereoespecífico de los productos, se efectuaron siguiendo los métodos descritos en el *Numeral 3.3.3* del Capítulo 3.

5.3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.3.1 Reactor de lecho empacado con Lipozyme® RM-IM

Para este ensayo se utilizó un reactor de lecho empacado para 500 g de enzima, construido en vidrio. El reactor consistió en un cilindro con chaqueta de calentamiento, de 10 cm de diámetro interno por 15 cm de altura, con tabique poroso en la parte inferior para retener la enzima y permitir el flujo de aceite (véase la **Figura 5.1**). El aceite se alimentó por la parte superior del cilindro haciendo uso de una bomba de flujo variable.

Para determinar las mejores condiciones de reacción, el reactor se llenó con 500 g de enzima y se pasó la mezcla de sustratos (SBO:PKO 60:40 p/p) a 70 °C a través de la columna de enzima a diferentes flujos. Se analizó el producto (efluente) en cuanto a composición en acilgliceroles (RTA-2) y se determinó el grado de transformación obtenido (véase la **Tabla 5.1**).

°C), sin el debido aislamiento de las tuberías por donde circula la grasa.



Figura 5.1. Reactor de lecho empacado para 500 g de enzima

Como se observa en la **Figura 5.2** un flujo de aceite igual o menor de 15.7 kg/kg.E*h conduce a un grado de interesterificación similar al alcanzado en la reacción en el sistema en discontinuo, no obstante, el mayor valor para la RTA-2 y el menor grado de hidrólisis se logra a 9.36 kg.O/kg.E*h. Flujos menores a este valor no conducen a una mayor productividad puesto que la transesterificación ya ha alcanza el equilibrio, en tanto que la reacción de hidrólisis podría ser mayor.

Tabla 5.1. Efecto del flujo de aceite sobre el grado de hidrólisis y la RTA-2

FLUJO (kg.O/kgE·h)*	Hidrólisis (%)	RTA-2 (%) ***
Alimento**	0,07	0,0
0,71	1,61	25,2
2,05	0,94	25,7
4,36	0,89	26,8
9,36	0,73	27,0
15,65	0,67	25,6
32,48	0,62	18,4
62,00	0,10	2,3

* kg.O/kgE·h = kg de aceite por kg de enzima por hora

** Alimento: mezcla fresca de SBO:PKO 60:40 p/p.

*** Cambio en los TAG C42:2+C44:2+C46:2+C48:2+C48:3+C48:4

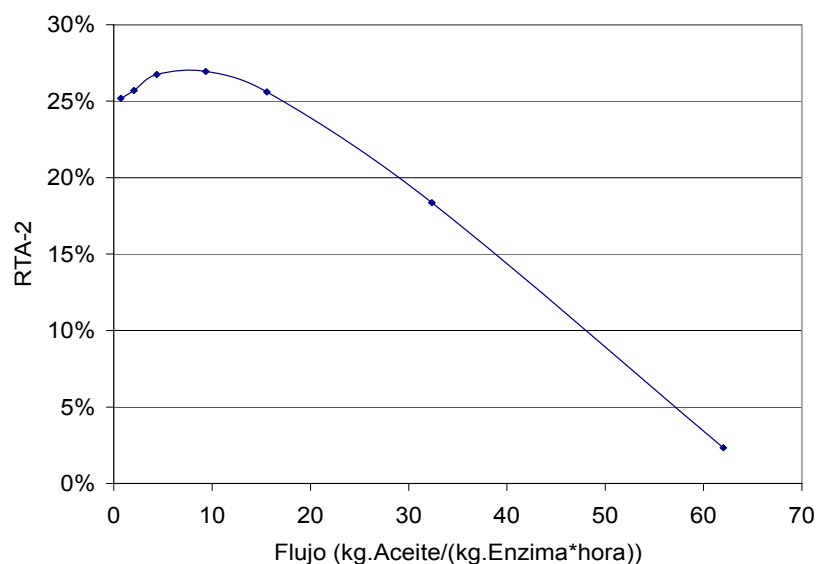


Figura 5.2. Efecto del flujo de aceite sobre la RTA-2.

En las **Figuras 5.3 a 5.7** se muestra el cambio en la concentración de los TAG en función del flujo de aceite que pasa a través de la columna de enzima. De ellas se observa que al disminuir el flujo disminuye la concentración de los TAG saturados (C30:0 a C40:0) y se incrementan los lípidos estructurados C42:1, C42:2, C44:2,

C44:4, C46:1, C46:2 C48:2, C48:3 y C48:4. La razón de este comportamiento obedece a que a menor flujo, el tiempo de contacto enzima-sustratos aumenta permitiendo mayor oportunidad de interacción y por tanto de intercambio de grupos acilo entre moléculas de TAG diferentes.

A un flujo menor de 15 kg.aceite/kg.Enzima*h el incremento de los TAG estructurados no es significativo al igual que la disminución de los TAG saturados, indicando que la reacción se acerca al equilibrio. Por lo tanto un flujo menor podría afectar la productividad del sistema y mejorar muy poco la producción de lípidos estructurados, como se discutió anteriormente.

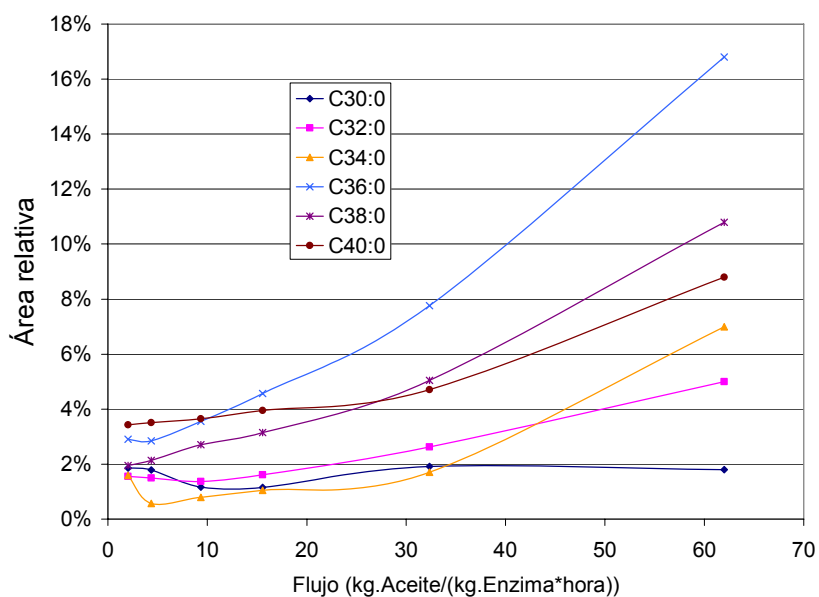


Figura 5.3. Cambio en la concentración (área relativa) de los TAG C30 a C40 en función del flujo de aceite a través de la columna de enzima.

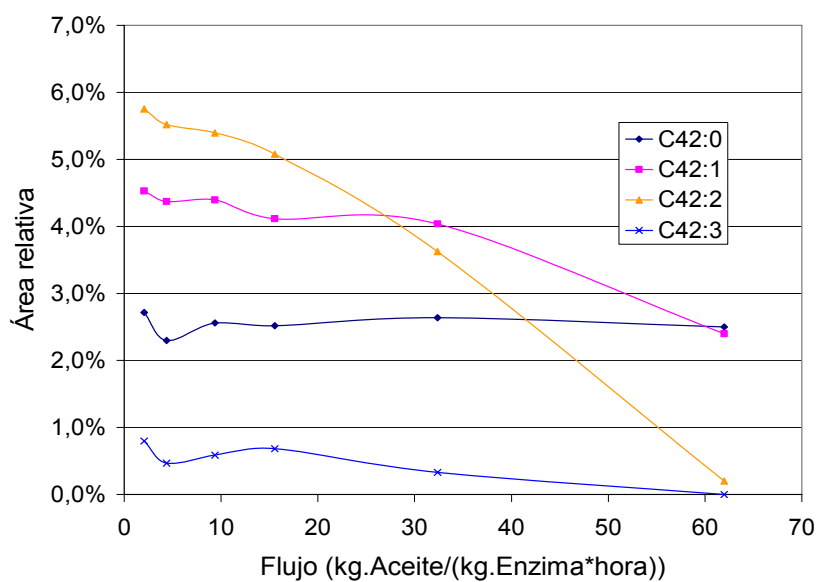


Figura 5.4. Cambio en la concentración de los TAG C42:0, C42:1, C42:2 y C42:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

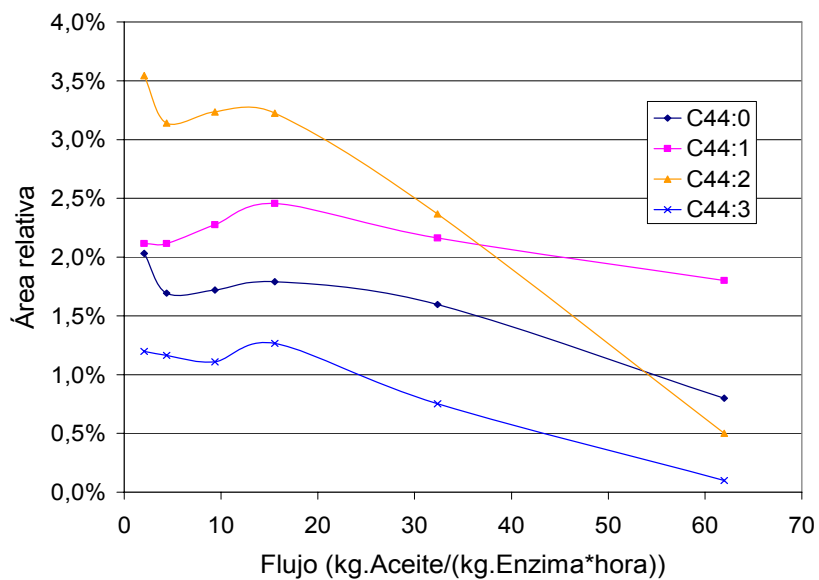


Figura 5.5. Cambio en la concentración de los TAG C44:0, C44:1, C44:2 y C44:3, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

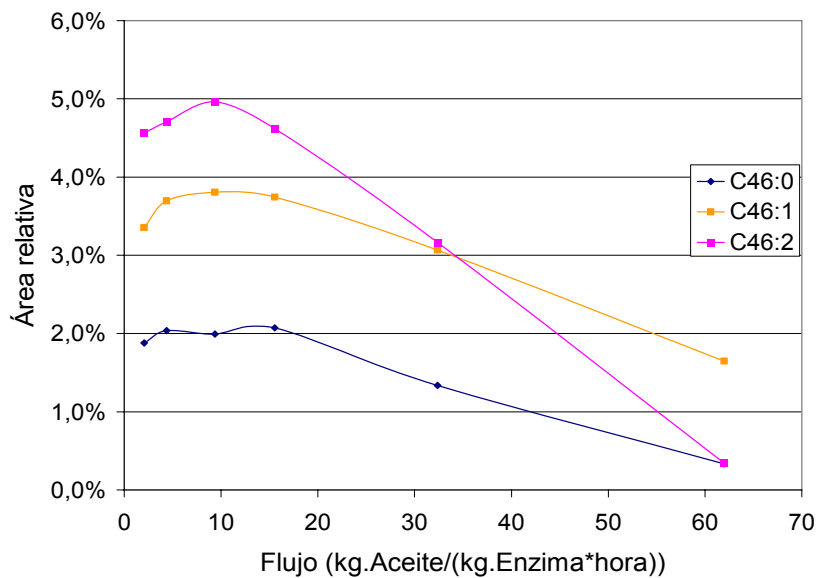


Figura 5.6. Cambio en la concentración de los TAG C46:0, C46:1 y C46:2, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

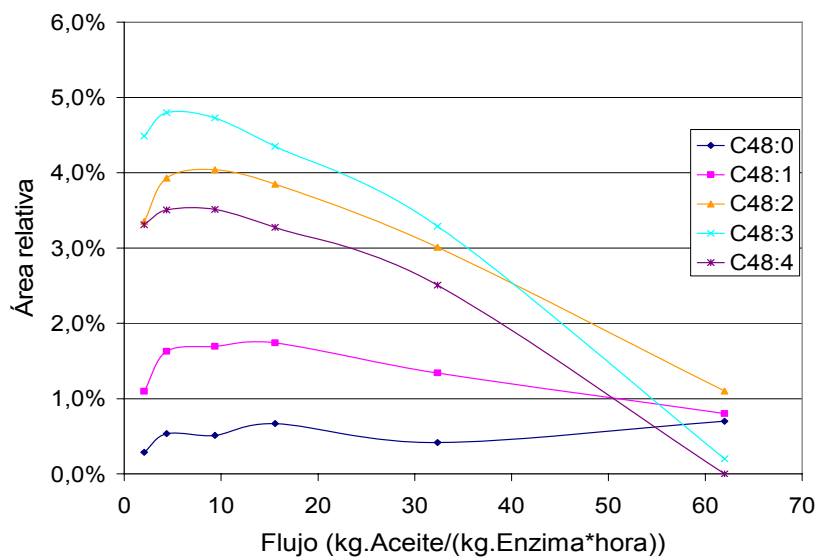


Figura 5.7. Cambio en la concentración de los TAG C48:0, C48:1, C48:2, C48:3 y C48:4, expresado como el cambio en el área relativa de los picos cromatográficos correspondientes

En consecuencia, la estabilidad de la enzima Lipozyme® RM-IM se evaluó a una temperatura de reacción de 70 °C y un flujo de 9.3 kg.aceite/kg Enzima*h.

El objetivo de esta medición experimental fue determinar la productividad que se podría esperar de la lipasa Lipozyme® RM-IM para la producción de lípidos estructurados, cuando se utiliza en la operación de un reactor de lecho empacado.

Debido a la complejidad que impone cuantificar el gran número de TAG generados en estos sistemas, y teniendo en cuenta que la intención es su aplicación industrial, la extensión de la transesterificación, en este sistema, se cuantificó mediante el contenido de grasa sólida (SFC) de la mezcla de reacción, la cual varía con el avance de la misma como se describió en el *numeral 3.4.1.5*, del capítulo 3 (véase la **Tabla 3.12**).

5.3.1.1 Cálculo de la actividad residual de la enzima inmovilizada

Para el cálculo de la actividad residual, se hizo pasar la mezcla SBO:PKO (60:40 p/p) a un flujo de 9.3 kg aceite/kg enzima* h a 70 °C. Se tomaron muestras del efluente a intervalos apropiados de tiempo durante la operación del reactor y se registraron los datos de SFC (**Tabla 5.2**), para cuantificar la pérdida de actividad.

De acuerdo a Novozymes (2004), el grado de inactivación de la enzima en la operación de lecho empacado puede determinarse como una función del tiempo de operación combinando los datos obtenidos en la operación en discontinuo (reactor de tanque agitado, con 100% de actividad enzimática) y los datos obtenidos de la operación del reactor de lecho empacado. La relación utilizada para calcular la actividad residual de la enzima inmovilizada (α) en el reactor de lecho empacado al tiempo t_p fue:

$$\alpha(t_p) = \frac{F_p}{w_p} * \frac{1}{k} * \ln\left(\frac{\Delta A}{\Delta A + A_o - sfc}\right) \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde: k (0.7552), A_o (11.2912) y ΔA (-8.8020) son las constantes para el modelo de la reacción por lotes ...numeral 3.4.2.4 del capítulo 3...

W_p = cantidad de enzima en el reactor de flujo empacado (0.5 kg)

F_p = flujo másico de aceite (1.55 kg/min)

t_p = tiempo desde el inicio del reactor de flujo tapón

X= SFC al tiempo t_p

El modelo de disminución que se ajusta a los datos de actividad residual α(t_p) calculado con la ecuación 5.1 (**Tabla 5.2**) corresponde a una cinética de primer orden (ecuación 5.2) que es función del tiempo de vida media observado (t_{1/2}).

$$\alpha(t_p) = \alpha_0 * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right) \quad \text{Ec. 5.2}$$

Donde: α₀ = actividad residual estimada en el tiempo cero

t_{1/2} = tiempo de vida medio estimado

De acuerdo con la ecuación que describe la línea de tendencia exponencial mostrada en la **Figura 5.8**, la cual se ajusta a los datos experimentales, α₀ = 47,65% y t_{1/2} = 7,67 días [-0.0904 = -ln(2)/7,67], en consecuencia, la ecuación que describe la actividad residual de Lipozyme® RM-IM en el reactor de lecho empacado en función del tiempo es:

$$\alpha(t_p) = 47.65 * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{7.67}\right) \quad \text{Ec. 5.3}$$

Este modelo (ecuación 5.3) se ajusta muy bien a la pérdida de actividad de la

enzima del día 4 al día 33, pero no para los primeros días de operación del reactor PBR. Los valores obtenidos aplicando este modelo se presentan en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO (60:40) a 70 °C con Lipozyme® RM-IM en reactor PBR, operado a un flujo de 9.3 kg aceite/kg Enzima*hora).

Tiempo, t (días)	SFC (15 °C) [%(p/p)]	Actividad residual α [%]*	Modelo α [%]**
1	3,11	54,76	43,53
2	3,60	42,48	39,77
4	4,30	32,45	33,19
6	5,03	25,50	27,70
8	5,30	23,47	23,12
10	6,06	18,55	19,29
12	6,81	14,63	16,10
15	7,20	12,83	12,27
17	7,86	10,14	10,24
19	8,10	9,26	8,55
22	8,68	7,22	6,52
24	9,20	5,57	5,44
25	8,90	6,51	4,97
26	9,40	4,96	4,54
29	9,60	4,38	3,46
31	10,10	2,98	2,89
32	9,70	4,09	2,64
33	9,98	3,31	2,41

** Calculado usando la ecuación 5.1.

** Valores predichos por el modelo exponencial, ecuación 5.3

Los resultados indican que la enzima pierde gran parte de su actividad enzimática en los primeros días de reacción, quizás porque se desprende parte de la enzima que no está suficientemente adherida al soporte.

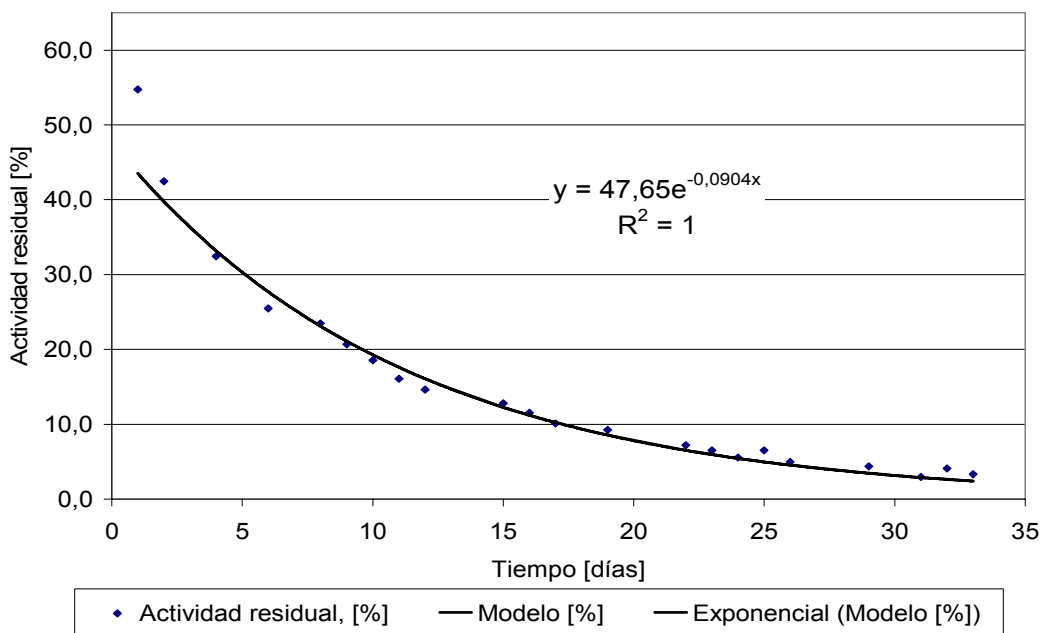


Figura 5.8. Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial.

5.3.1.2 Cálculo de la productividad de la enzima Lipozyme® RM-IM

Estimar la productividad de Lipozyme® RM-IM es de gran utilidad, y se debe realizar con el producto específico de interés. La productividad (P) definida como “la cantidad total de aceite interesterificado hasta cuando la actividad residual de la enzima ha alcanzado el 5% del valor inicial”, se puede calcular como sigue:

$$P(\alpha = 5\%) = \int_{t_0}^{t_i} F_p * \frac{\alpha(t_p)}{\alpha_0} . dt_p \quad \text{Ec. 5.4}$$

Reemplazando la ecuación 5.2 en la ecuación 5.4 se tiene:

$$P(\alpha = 5\%) = \int_{t_0}^{t_i} F_p * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right) .dt_p \quad \text{Ec. 5.5}$$

Donde: $P(\alpha=5\%) =$ Productividad total
 $t_0 =$ 0 días (tiempo inicio de operación del reactor de flujo)
 $t_i =$ 33 días (tiempo en que $\alpha(t_p) = 5\%$ de la actividad inicial)
 $F_p =$ 223.2 kg aceite/día (1.55 kg/min).
 $t_{1/2} =$ 7.65 días

$$P(\alpha = 5\%) = \int_0^{33} F_p * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right) .dt_p \quad \text{Ec. 5.6}$$

Desarrollando la integral:

$$P(\alpha = 0.05\%) = \frac{F_p * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right)}{\frac{-\ln(2)}{t_{1/2}}} \Bigg|_0^{33} = 2344 \quad \text{Ec. 5.7}$$

Los datos anteriores indican que la enzima Lipozyme® RM-IM operada bajo las condiciones del reactor de lecho empacado para el sistema SBO:PKO (60:40 p/p) alcanza una productividad máxima de 2344 kg aceite transesterificado por kilogramo de enzima inmovilizada.

5.3.2 Reactor de lecho empacado con Lipozyme® TL-IM

Se utilizó el reactor de lecho empacado piloto para 10 kg de enzima, traído de Brasil y suministrado por la empresa Novozymes S.A. (véase la **Figura 5.9**), que consistió de un cilindro de 15.25 cm de diámetro interno por 100 cm de altura, el cual tiene dentro un cartucho removible para depositar la enzima. Este cartucho

tiene un volumen de 31.42 litros, de los cuales el 75.8% se ocupa con 10 kilogramos Lipozyme® TL-IM y el resto con un lecho de 7 kilogramos de esferitas de vidrio, que regulan una buena distribución del aceite alimentado sobre el lecho de enzima.

El reactor está provisto de chaqueta de calentamiento para ajustar la temperatura del lecho de enzima y de una bomba de flujo variable que permite alimentar el aceite por la parte superior del cilindro. Como sustrato de reacción se utilizó la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p. La temperatura de la reacción fue de 70 °C.



Figura 5.9. Reactor piloto de lecho empacado para 10 kg de enzima.

Para la selección de las condiciones de reacción, el reactor se llenó con 10 kg de enzima, a través de la cual se pasó la mezcla de sustratos (SBO:PKO 60:40 p/p) a tres flujos diferentes, seleccionando como el más adecuado 12 kg de aceite por kg

de enzima por hora (kg.O/kg.E*h), el cual produjo una transformación similar a la obtenida en el reactor de tanque agitado después de 3 horas de reacción (SFC a 15 °C = 2.2%), como se muestran en la **Tablas 3.22** del capítulo 3 y en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3. Efecto del flujo de aceite sobre el grado de transesterificación alcanzado (medido como disminución en el valor SFC a 15 °C).

FLUJO (Kg.O/kgE·h)*	Hidrólisis (%)	SFC (15 °C) ***
Alimento**	0,05	10.7
9.02	0,55	2.2
12.10	0.52	2.2
15.05	0.44	2.5

* kg de aceite por kg de enzima por hora

** Alimento: mezcla fresca de SBO:PKO 60:40 p/p.

*** Contenido de Grasa Sólida medida a 15 °C.

5.3.2.1 Evaluación de la estabilidad de la enzima *Lipozyme*® TL-IM

Para cuantificar la actividad residual de la enzima inmovilizada en función del tiempo de operación $\alpha(t_p)$, Ecuación 5.8, se hizo pasar la mezcla SBO:PKO (60:40 p/p) a un flujo de 12 kg aceite/kg enzima* hora y a 70 °C a través del lecho de enzima. Se tomaron muestras del efluente cada 24 horas y se registraron los valores de SFC medidos a 15 °C (véase la **Tabla 5.4**). Los valores para las constantes k, A_o y ΔA , para la Ecuación 5.8 corresponden a los hallados en la reacción de tanque agitado a escala de 1 kg ...ecuación 3.4 del capítulo 3.

$$\alpha(t_p) = \frac{F_p}{w_p} * \frac{1}{k} * \ln\left(\frac{\Delta A}{\Delta A + A_o - sfc}\right) \quad \text{Ec. 5.8}$$

Donde: k (1.6003), A_o (11.9746) y ΔA (-9.8752).

W_p = cantidad de enzima en el reactor de flujo tapón (10 kg)
 F_p = flujo másico de aceite (2.0 kg/min) \equiv 12kg/kg.enzima*h
 t_p = tiempo desde el inicio del reactor de flujo tapón
 sfc = Contenido de Grasa Sólida al tiempo t_p

El modelo de disminución de primer orden (Ecuación 5.9) que se ajusta a los datos de actividad residual, calculados con la ecuación 5.8 como una función del tiempo de proceso (t_p) se muestra en la **Figura 5.10**, donde, de acuerdo a la ecuación que describe la línea de tendencia exponencial mostrada, $\alpha_0 = 59.58\%$ y $t_{1/2} = 11.26$ días [$-0.062 = -\ln(2)/11.26$].

$$\alpha(t_p) = \alpha_0 * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right) \quad \text{Ec. 5.9}$$

Donde: α_0 = actividad residual estimada en el tiempo cero (59.58%)
 $t_{1/2}$ = tiempo de vida medio estimado (11.26 días = $-\ln(2)/0.062$)

Al comparar la actividad residual en función del tiempo de proceso para las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® TL-IM, se encuentra que Lipozyme® TL-IM es más estable puesto que su tiempo de vida medio es mayor (11.3 días) que el hallado para Lipozyme® RM-IM (7.7 días). Estos resultados también indican que al cambiar de reactor de tanque agitado a reactor de lecho empacado se aumenta la estabilidad de Lipozyme® TL-IM por encima de la de Lipozyme® RM-IM.

Tabla 5.4. Actividad residual calculada y predicha por el modelo exponencial para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO (60:40) a 70 °C con Lipozyme® TL-IM en reactor PBR, operado a un flujo de 12 kg aceite/kg enzima*hora.

Tiempo, t (días)	SFC (15°C) [% (p/p)]	Actividad residual α [%]*	Modelo α [%]**
1	2,20	57,31	56,03
2	2,22	55,05	52,68
3	2,34	46,42	49,54
4	2,40	43,64	46,58
5	2,38	44,50	43,80
6	2,50	40,05	41,19
8	2,60	37,27	36,42
10	2,83	32,54	32,20
11	2,88	31,71	30,28
12	2,96	30,50	28,47
13	3,30	26,33	26,77
14	3,50	24,41	25,18
15	3,41	25,24	23,67
16	3,61	23,46	22,26
17	4,20	19,34	20,93
18	4,05	20,27	19,68
19	4,40	18,21	18,51
20	4,66	16,87	17,40
22	5,25	14,28	15,39
23	5,39	13,73	14,47

** Calculado usando la Ecuación 5.8.

** Valores predichos por el modelo exponencial, Ec. 5.9

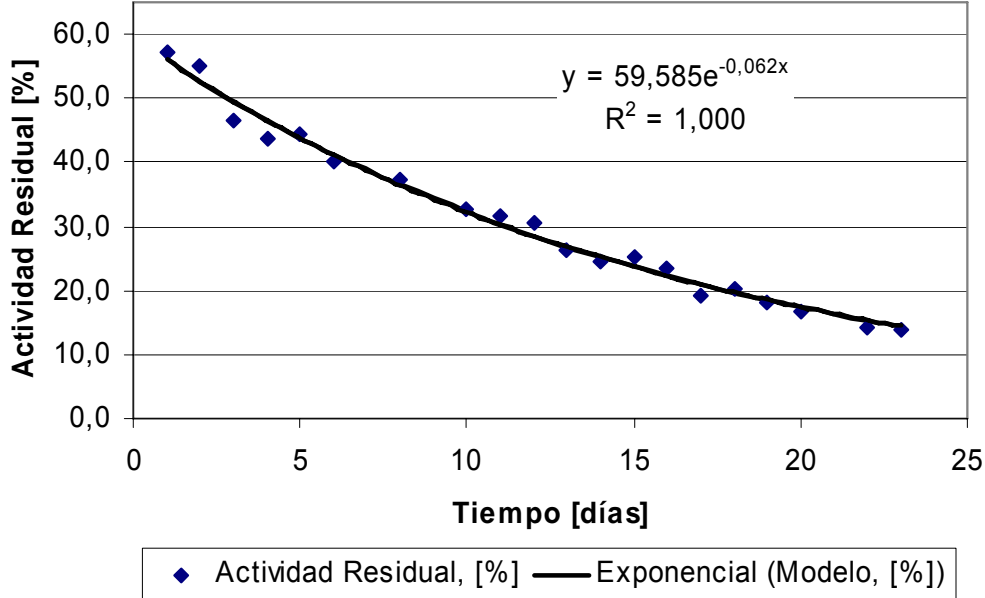


Figura 5.10. Modelo exponencial para la actividad residual la enzima Lipozyme® TL-IM en el reactor de lecho empacado, en función del tiempo.

5.3.2.2 Cálculo de la productividad de la enzima Lipozyme® TL-IM

Al aplicar la Ecuación 5.9 se encuentra que la enzima Lipozyme® TL-IM, en el reactor de lecho empacado, bajo las condiciones de operación antes descritas, alcanza una actividad residual igual al 5% después de 40 días de operación; por consiguiente, la productividad total se puede obtener aplicando la siguiente ecuación:

$$P(\alpha = 5\%) = \int_{t_0=0}^{t_i=40} F_p * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right) .dt_p \quad \text{Ec. 5.10}$$

Al desarrollar la integral se tiene que:

$$P(\alpha = 5\%) = \frac{F_p * \exp\left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}}\right)}{\frac{-\ln(2)}{t_{1/2}}} \Bigg|_0^{40} = 4281 \text{ kg aceite/kg.E} \quad \text{Ec. 5.11}$$

Donde: $P(\alpha=5\%)$ = Productividad total hasta que la actividad residual de la enzima es el 5% de la actividad inicial.

t_0 = 0 días (tiempo inicio de operación del reactor de flujo)

t_i = 40 días (tiempo en que $\alpha(t_p) = 5\%$ de la actividad inicial)

F_p = 288 kg aceite/día (12 kg/kg Enzima*hora).

$t_{1/2}$ = 11.26 días

Los datos anteriores indican que la enzima Lipozyme® TL-IM, operada bajo las condiciones del reactor de lecho empacado para el sistema SBO:PKO (60:40 p/p), alcanza una productividad máxima de 4281 kg aceite transesterificado por kilogramo de enzima inmovilizada. Esta productividad es aproximadamente el doble de la esperada para el mismo sistema graso cuando se utiliza como catalizador Lipozyme® RM-IM (2344 kg/kg enzima).

5.3.2.3 Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos del sistema SBO:PKO 60:40 p/p, en reactor de lecho empacado.

En la **Tabla 5.5** se presenta el análisis de los ácidos grasos presentes en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2, de los TAG componentes de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la reacción de transesterificación en reactor de lecho empacado. Los resultados allí consignados indican que tanto Lipozyme® TL-IM como Lipozyme® RM-IM, exhiben alta especificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG, bajo este sistema de reacción.

Tabla 5.5. Distribución de los FA (%mol) en las posiciones *sn*-1,3 y *sn*-2, de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación en reactor de lecho empacado.

Ácido	Mezcla inicial			Lipozyme® TL-IM		Lipozyme® RM-IM	
	<i>sn</i> -1,2,3	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -1,3	<i>sn</i> -2
C6:0	0,4	0,3	0,6	0,2	0,7	0,3	0,6
C8:0	3,8	5,6	0,3	4,9	1,8	5,1	1,3
C10:0	2,6	3,0	1,7	2,7	2,2	2,8	2,1
C12:0	26,7	29,3	21,5	30,0	20,2	28,6	22,9
C14:0	7,1	8,0	5,3	9,3	2,6	8,3	4,6
C16:0	10,0	13,4	3,1	13,7	2,4	14,2	1,5
C18:0	3,0	3,9	1,0	4,1	0,6	4,3	0,2
C18:1n9c	15,5	12,7	21,0	12,5	21,4	11,9	22,5
C18:2n6c	27,0	20,1	40,8	19,3	42,4	20,4	40,2
C18:3n3	3,7	3,2	4,8	3,0	5,1	3,1	5,0
C20:0	0,3	0,5	0,0	0,4	0,1	0,7	-0,5*

* Resultado de cálculo matemático

La migración de grupos acilo, que en el reactor de tanque agitado fue relativamente alta para la reacción catalizada con Lipozyme® TL-IM, se redujo drásticamente cuando la transesterificación se efectuó en el reactor de lecho empacado, como se deduce de los datos presentados en la **Tabla 5.5**.

Los anteriores resultados son importantes desde el punto de vista del costo-beneficio para las reacciones catalizadas con Lipozyme® TL-IM en reactor de lecho empacado, debido a que este catalizador además de expresar alta productividad, también exhibe especificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG, similar a la expresada por Lipozyme® RM-IM, haciendo factible la obtención de lípidos estructurados a menor costo.

5.3.2.4 Caracterización de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla Aceite de soya – Aceite de palmiste (60:40 p/p) y Aceite de soya – Superestearina de palma 60:40 p/p.

En la **Tabla 5.9** se presentan los resultados de la caracterización de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación enzimática del aceite de soya con el aceite de palmiste (SBO:PKO) en proporción 60:40 p/p, en reactor de tanque agitado a escala piloto, utilizando como catalizador Lipozyme® RM-IM. En la **Tabla 5.7** se presenta la caracterización de los lípidos estructurados obtenidos de la mezcla de aceite de soya con superestearina de palma (SBO:SEP) en proporción 60:40 p/p. Los datos allí consignados son importantes al evaluar las aplicaciones potenciales de estas grasas novedosas.

5.3.3 Aplicaciones potenciales de las grasas especiales obtenidas

Antiguamente el concepto de la grasa era único y universal. Hoy eso ha dejado de ser así. La tecnología empleada en el desarrollo de los productos para alimentos permite, en muchos casos la diversificación y las aplicaciones especializadas que garantizan un óptimo funcionamiento y valor nutricional.

Sin embargo, al elegir una materia prima, las consideraciones de tipo técnico siguen siendo las que determinan la utilización de una alternativa u otra. Por tanto, conocer las características de los productos desarrollados es esencial para orientarlos hacia aplicaciones particulares en la industria.

Tabla 5.6. Características fisicoquímicas de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p

Perfil de fusión o contenido de grasa sólida (SFC):

Temperatura	SFC (%)
5 °C	20.5 ± 0.5
10 °C	9.8 ± 0.3
15 °C	2.4 ± 0.2
20 °C	0.0 ± 0.1

Punto de fusión, °C: 14.5 -15.0

Viscosidad a 25 °C: < 25 cp

Índice de yodo:

Composición en ácidos grasos y triacilglicerolos:

Ácido graso	%	Triacilglicerolos (%)			
C6:0	0,1	C30:0	0,3%	C46:3	0,6%
C8:0	1,5	C32:0	0,9%	C48:0	0,2%
C10:0	1,2	C34:0	1,8%	C48:1	1,3%
C12:0	19,2	C36:0	2,9%	C48:2	3,6%
C14:0	6,3	C38:0	2,4%	C48:3	5,0%
C16:0	9,9	C38:1	0,8%	C48:4	4,4%
C18:0	3,3	C38:2	0,9%	C50:1	1,2%
C18:1n9c	19,6	C40:0	2,6%	C50:2	1,9%
C18:2n6c	35,0	C40:1	0,9%	C50:3	1,7%
C18:2n6t	0,4	C40:2	1,2%	C50:4	1,3%
C18:3n6	0,8	C40:3	0,3%	C52:0	0,0%
C18:3n3	2,6	C42:0	1,5%	C52:1	0,3%
C20:0	0,1	C42:1	3,1%	C52:2	1,9%
C22:0	0,1	C42:2	3,9%	C52:3	4,4%
		C42:3	0,4%	C52:4	5,4%
		C44:0	0,9%	C54:1	1,0%
		C44:1	1,9%	C54:2	0,6%
		C44:2	2,5%	C54:3	2,9%
		C44:3	0,8%	C54:4	6,7%
		C46:0	0,5%	C54:5	9,1%
		C46:1	2,5%	C54:6	6,7%
		C46:2	3,4%	DAG	2.6%

Tabla 5.7. Características fisicoquímicas de los lípidos estructurados obtenidos por transesterificación de la mezcla SBO:SEP 60:40 p/p

Perfil de fusión o contenido de grasa sólida (SFC):

Temperatura	SFC (%)
10 °C	25.0 ± 2.5
15 °C	18.0 ± 2.0
20 °C	15.6 ± 0.6
25 °C	12.5 ± 0.5
30 °C	9.3±0.2
35 °C	6.8±0.2
40 °C	4.1±0.2

Punto de fusión, °C: 40.0 - 41.0

Viscosidad a 50 °C: < 25 cp

Composición en ácidos grasos y triacilgliceroles:

Ácido graso	%	Triacilgliceroles (%)			
C6:0*	-	C38:0	0,2%	C50:0	2,3%
C8:0	-	C40:0	0,1%	C50:1	7,5%
C10:0	-	C40:1	0,0%	C50:2	7,6%
C12:0	-	C40:2	0,1%	C50:3	0,7%
C14:0	0,2	C42:0	0,1%	C50:4	0,2%
C16:0	39,7	C42:1	0,1%	C52:0	0,3%
C18:0	4,7	C42:2	0,1%	C52:1	1,8%
C18:1n9c	16,7	C44:0	0,3%	C52:2	7,0%
C18:2n6c	34,6	C44:2	0,2%	C52:3	11,7%
C18:2n6t	0,4	C46:0	0,5%	C52:4	12,5%
C18:3n6	0,8	C46:1	0,2%	C54:0+C54:1	2,3%
C18:3n3	2,6	C46:2	0,3%	C54:2	1,5%
C20:0	0,1	C48:0	8,8%	C54:3	4,2%
C22:0	0,1	C48:1	0,3%	C54:4	7,9%
		C48:2	0,5%	C54:5	10,4%
		C48:3	0,3%	C54:6	8,2%
		C48:4	0,3%	C54:7	0,7%
		DAG	0.7%		

Para el caso de margarinas de mesa e industriales, mayonesas, aderezos, grasas para rellenos de galletas, bombones, etc., la consistencia es una característica muy importante que depende de varios factores, la mayoría de ellos relacionados con la fase grasa y en particular con la relación entre la grasa que se encuentre sólida y la que se encuentra líquida a una temperatura dada. Esa relación se puede determinar por RMN y se expresa como el contenido de grasa sólida o SFC (sigla en inglés de *Solid Fat Content*).

A continuación se describen las aplicaciones potenciales que pueden tener estos productos, teniendo en cuenta las características de los productos finales obtenidos.

5.3.3.1 Producción de emulsiones lipídicas para uso en nutrición parenteral.

Las características fisicoquímicas de la mezcla SBO:PKO transesterificada (**Tabla 5.6**) permiten predecir que se puede utilizar sin inconvenientes para la producción de emulsiones lipídicas para nutrición enteral o parenteral, similares a Lipofundin MCT (lípidos de segunda generación) descrita en la **Tabla 5.8**, pero con la ventaja adicional de que los triacilgliceroles que la forman están compuestos por ácidos grasos de diferente longitud de cadena (MCFA + LCFA), que constituyen los denominados lípidos estructurados o de tercera generación.

A estas emulsiones se les atribuyen mejores efectos nutricionales en nutrición parenteral de pacientes estresados porque permiten cumplir con dos objetivos fundamentales: suministrar ácidos grasos esenciales en cantidades suficientes para prevenir el *síndrome de carencia de ácidos grasos esenciales* y servir como fuente energética de fácil utilización, dadas las altas demandas calóricas de estos pacientes, además de evitar los inconvenientes del uso exclusivo de LCT y todos los demás beneficios resaltados en la revisión de la literatura (Capítulos 1 y 3).

Bajo las consideraciones anteriores, queda claro que todas las proporciones de SBO:PKO evaluadas en este estudio para la producción de los triacilglicerolos estructurados se podrían emplear para la fabricación de emulsiones lipídicas. Sin embargo, la mezcla SBO:PKO 60:40 presenta concentraciones adecuadas de MCFA y LCFA para la formulación de emulsiones para uso en nutrición enteral y parenteral. Sus características fisicoquímicas, especialmente el perfil de contenido de grasa sólida (SFC) indica que esta grasa es líquida a partir de 15 °C y por tanto se podría usar para producir dichas emulsiones lipídicas.

Estos lípidos también se podrían utilizar como aceite para cocina y aderezos y en general en la preparación de las diferentes dietas alimenticias en los hospitales, centros geriátricos y restaurantes especializados, pero no deben ser usados como aceite para freído a profundidad, en donde el aceite se utiliza más de una vez.

Tabla 5.8. Emulsiones lipídicas comerciales para uso endovenoso

Emulsión tipo INTRALIPID	Emulsión tipo LIPOSYN I	Emulsión tipo LIPOSYN II	Emulsión tipo LIPOFUNDIN	Emulsión tipo LIPOFUNDIN MCT / LTC
Soya 100%	Cártamo 100%	Soya 50% Cártamo 50%	Soya 100%	Soya 50% Coco 50%
Emulsionante	Emulsionante	Emulsionante	Emulsionante	Emulsionante
Fosfolípidos de huevo	Fosfolípidos de huevo	Fosfolípidos de huevo	Fosfolípidos de soya	Fosfolípidos de soya
Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol	Glicerol

5.3.3.2 Producción de margarinas funcionales y formulaciones infantiles.

Las características fisicoquímicas de la mezcla SBO:SEP transesterificada (**Tabla 5.7**) muestran que cumple con los requisitos necesarios para la producción de margarinas de mesa y cocina, pues su perfil de fusión (SFC) sigue el patrón

determinado para este tipo de aplicación y por tanto se podría usar como componente de la fase grasa, ya sea sola o mezclada con otros aceites.

Igualmente se podría usar para la formulación de las leches sustitutas de la materna retirándole la fracción de tripalmitina (C48:0, PPP) que quedó sin reaccionar, para disminuir su punto de fusión y suavizar el perfil de fusión. La separación del PPP sin reaccionar se puede hacer por fraccionamiento en seco, una técnica sencilla muy usada en la industria de grasas y aceites, que consiste en cristalizar los TAG de alto punto de fusión mediante un descenso controlado de la temperatura de la grasa fundida y posterior separación de los cristales formados (PPP) por filtración. Para esta aplicación es importante el contenido de triacilglicerol con ácidos palmítico en la posición sn-2 sea alto y del tipo ácido insaturado-ácido palmítico-acido insaturado (p.e., OPO. OPL, LPL).

Otras aplicaciones potenciales evaluadas incluyen las grasas de relleno para bombonería, panadería, pastelería, etc., debido a que el perfil de fusión (curva SFC) es similar al requerido para estas aplicaciones.

En conclusión, la transesterificación en reactor de lecho empacado permite aumentar la productividad de la enzima Lipozyme® RM-IM de 1200 kg de aceite procesado (reactor de tanque agitado) a 2344 kg aceite procesado/kg enzima inmovilizada, En tanto que para la enzima Lipozyme® TL-IM la productividad calculada se eleva de 1412 kg aceite a 4281 kg aceite procesado/kg enzima inmovilizada, permitiendo de esta forma reducir sustancialmente el costo de producción de lípidos estructurados asociados al precio de la enzima, respecto a los procesos en reactor de tanque agitado.

Los productos (lípidos estructurados) obtenidos por transesterificación enzimática tienen aplicación potencial en producción de emulsiones lipídicas para nutrición enteral y parenteral, así como para fabricación de productos alimenticios como margarinas, leches sustitutas de la leche materna, rellenos de galletas, entre otras.

CAPÍTULO 6

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. Los valores de consistencia de la superestearina de palma (SEP) y el aceite de palmiste (PKO) indican que son grasas muy duras a 7 °C, en tanto que el aceite de soya (SBO) continúa siendo líquido. Las mezclas binarias SBO:PKO y SBO:SEP resultan en grasas más blandas en la medida que se incrementa la participación del aceite de soya. A 60 °C las mezclas binarias SBO:SEP y SBO:PKO evaluadas son líquidas, con una viscosidad promedio de 23 ± 3 cp, lo cual significa que se pueden trabajar sin problema de discriminación de masa, por cristalización de los TAG de más alto punto de fusión de la grasa, en las reacciones de transesterificación.
2. Los principales TAG componentes del aceite de soya son el LLL (C54:6, 22.9%), LLO (C54:5, 20.5%), LLP (C52:4, 13.2%), LOO (54:4, 13.8%) y POL (52:3, 8.1%), los cuales representan más del 70% del total. Para la superestearina de palma lo son: PPP (C48:0, 45.7%), POP (C50:1, 15.8%), POO (C52:2, 9.6%) y PPS (C50:0, 8.7%) que representan cerca del 80% del total y, para el aceite de palmiste LaLaLa (C36:0, 22.6%), LaLaM (C38:0, 16.7%), LaMM (C40:0, 9.8%) y LaCyCy (C32:0, 6.9%) los cuales representan cerca del 56% del total. De las tres grasas analizadas, el aceite de palmiste presentó la mayor dispersión de TAGs.
3. La relación de sustratos elegida para la producción de lípidos estructurados a partir de SBO:PKO y SBO:SEP fue de 60:40 p/p. En el sistema SBO:PKO los TAG que se formaron en mayor proporción fueron el C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4 , mientras que en el sistema SBO:SEP fueron los TGA C50:2, C52:3 y

el C52:4. Los TGA formados combinan ácidos grasos de cadena larga y cadena media, dando lugar a lípidos estructurados.

4. Para un mismo sustrato con diferente enzima, las variables que presentan influencia significativa en las reacciones de transesterificación e hidrólisis, difieren, haciéndose necesario caracterizar cada sistema de reacción.
5. En el reactor de tanque agitado, las condiciones de reacción optimizadas para los dos sistemas grasos evaluados, en presencia de la misma enzima, son similares. Al emplear SBO:PKO y SBO:SEP, en presencia de Lipozyme RM-IM, fueron: cantidad de enzima 2.5% (p/p), temperatura 70 °C, tiempo de reacción 6 horas. Mientras que para el los sistemas SBO:PKO y SBO:SEP en presencia de Lipozyme TL IM fueron: cantidad de enzima 2.5% (p/p), temperatura 70 °C, tiempo de reacción 4 horas.
6. La cantidad de SL producidos al escalar los procesos, se correspondieron con los establecidos por el diseño experimental. En todos los casos, el grado de hidrólisis disminuyó al aumentar de escala la reacción.
7. Para el sistema SBO:PKO, el grado de transesterificación alcanzado a en reactor piloto de tanque agitado (35 kg), fue similar con Lipozyme® RM-IM (RTA-2= 27%) y con Lipozyme® TL-IM (RTA-2=28.0%). Sin embargo, con Lipozyme® RM-IM hay mayor hidrólisis (3.5%) que con Lipozyme® TL-IM (0.9%).
8. Para el sistema SBO:SEP, el grado de transesterificación alcanzado a escala piloto con Lipozyme® TL-IM fue más alto (RTA-2 = 28.9%) que

el obtenido utilizando Lipozyme® RM-IM (RTA-2 = 21.0%), pero con menor hidrólisis (2.3%) que con Lipozyme® TL-IM (0.55%).

9. La reacción catalizada con Lipozyme® TL-IM en un reactor de tanque se aproxima al equilibrio en menor tiempo (4 horas), que la reacción catalizada con Lipozyme® RM-IM (6 horas), lo que finalmente se traduce en una mayor productividad.
10. En el reactor de tanque agitado, Lipozyme® RM-IM presentó mayor especificidad por las posiciones *sn*-1,3 de los TAG, que Lipozyme® RM-IM.
11. La estabilidad operacional de las enzimas evaluadas, muestra un comportamiento similar, con una pérdida de actividad entre 18-20%, al cabo de seis usos.
12. La reacción de transesterificación en reactor de lecho empacado y en el reactor de tanque agitado, permitieron obtener lípidos estructurados.
13. En el reactor de lecho empacado, la productividad de la enzima Lipozyme® RM-IM fue de 2344 kg aceite /kg enzima, y la de Lipozyme® TL-IM fue de aceite a 4281 kg /kg enzima.
14. Debido al menor precio de Lipozyme® TL-IM y a su mayor productividad, el costo de los lípidos estructurados obtenidos con esta enzima deben resultar inferiores a los obtenidos con Lipozyme® RM-IM, y en este sentido sería la opción para la producción industrial en los eventos en que una menor especificidad hacia las posiciones *sn*-1,3 sea tolerable.

15. Las mezclas SBO:PKO y SBO:SEP transesterificadas presentan menor punto de fusión y contenido de grasa sólida que la mezcla física. La mezcla SBO:PKO, tiene aplicación potencial como aceite de cocina especializado, aceite para aderezos y salsas, así como para la preparación de emulsiones lipídicas de uso terapéutico en nutrición enteral y parenteral. La mezcla SBO:SEP transesterificada encuentra aplicación como base grasa para la fabricación de margarinas, rellenos y leches sustitutas y fórmulas infantiles que incluyan grasa vegetal como un ingrediente.
16. La síntesis enzimática de lípidos estructurados a partir de las mezclas SBO:PKO y SBO:SEP, usando como catalizador lipasas Lipozyme® TL-IM o Lipozyme® RM-IM, permite producir lípidos específicos que pueden ser utilizados para fines metabólicos definidos y como alimentos funcionales.
17. El uso potencial de los SL permitirá darle mayor valor agregado a los productos de la palma de aceite como son el aceite de palmiste y la superestearina de palma, teniendo en cuenta que se han utilizado para su elaboración en una proporción del 40%.
18. Con base en los resultados obtenidos de este estudio la empresa C.I. SACEITES S.A., inició la implementación de la interesterificación enzimática a nivel industrial para la producción de grasas especiales, teniendo en cuenta las ventajas que implica el uso de tecnologías limpias y en trabajo en condiciones de operación económicamente factibles.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGYARE, K.K.; XIONG, Y.L.; ADDO, K.; et al.** Effect of structured lipid on alveograph characteristics, baking and sensory properties of soft wheat flour. En: *Journal of Cereal Science*. **2005**; 42(3): 309-316. doi:10.1016/j.jcs.2005.03.008.
2. **AKOH, C.C.** Structured lipids—enzymatic approach. En: *Inform.* **1995**; 6(9):1055-1061.
3. **AKOH, C.C.** Fat replacers. En: *Food Technol.* **1998**; 52(3): 47-53.
4. **AKOH, C.C.; LEE, K.T.; FOMUSO L.B., et al.** Structural modified food fats: Synthesis, biochemistry and use 46 AOCS Press, IL, **1998**, citado por: Iwasaki y Yamane, **2000**.
5. **AKOH, C.C.** Structured lipids. *United States Patent No. 6,369,252*. April 9, **2002**.
6. **ARANGO, L.M. y PEREA, J.A.** Producción a escala de planta piloto de grasas especiales por interesterificación enzimática a partir de aceite de palma africana. Tesis (Maestría en Química). Bucaramanga, Colombia, Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, **2004**.
7. **ARANGO, L.M.; PEREA, J.A.; MORENO, N.; et al.** XIV Conferencia Internacional sobre Palma de Aceite. En: *Palmas*. **2004**; 25(1): 370-375.

8. **BABAYAN, V.K.; BLACKBURN, G.L. and BISTRAN, B.R.** Triglyceride preparations for the prevention of catabolism. *United States Patent* 4.847.296, July 11, **1989**.
9. **BABAYAN, V.K.; BLACKBURN, G.L. and BISTRAN, B.R.** Structured lipid containing dairy fat. *United States Patent* 4.952.606, Agosto 28, **1990**.
10. **BALCÃO, V.M. and MALCATA, F.X.** Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **1997**; 3:161-169.
11. **BALCÃO, V.M. and MALCATA, F.X.** Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. En: *Enzyme and Microbial Technology*. **1998**; 22:511-519.
12. **BEERMANN, C.; JELINEK, J.; REINECKER, T.; et al.**, Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. En: *Lipids in Health and Disease*. **2003**: 2-10. doi: 10.1186/1476-511X-2-10.
13. **BELITZ, H. D. and GROSCH, W.** Química de los alimentos, 2 ed. Zaragoza, España: Acribia, **1997**, p. 175-266. ISBN: 84-200-0835-4.
14. **BISTRAN, B.R.; BABAYAN, V.R. and BLACKBURN, G.L.** Nutritional supplement for treatment of cancer cachexia. *United States Patent* 4.906.664, March 6, **1990**.
15. **BISTRAN, B.R.** Method of treating cancer using structured lipids. *United States Patent* 5.081.105, January 14, **1992**.

16. **BLACKBURN, G.L.** Controlled triglyceride nutrition for hypercatabolic mammals. *United States Patent No. 4.528.197*, July 11, **1985**.
17. **BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P. and MATTIASSON, B.** Triglyceride intersterification by lipases. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1990**; 67(8):519-524.
18. **BOUSQUET, M.P.; WILLEMOT, R.M.; MONSAN P.; et al.**, Enzymatic synthesis of alpha-butylglucoside linoleate in a packed bed reactor for future pilot scale-up. En: *Biotechnol Prog*. **2000**; 16(4):589-594.
19. **BRACCO, U.** Effect of triglyceride structure on fat absorption. En: *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**; 60(6):1002S-1009S.
20. **BUCHGRABER, M.** Structural analysis of triacylglycerols. En: *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* **2004**;106:621.
21. **CAMACHO, B.; ROBLES, M.; CAMACHO F.; et al.** Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. En: *Chemical Engineering Science*. **2002**; 57: 1237-1249.
22. **CARNIELLI V.P.; SULKERS, E.J.; MORETI, C.; et al.** Conversion of octanoic acid into long chain saturated fatty acids in premature infants fed a formula containing medium chain triglycerides. En: *Metabolism*. **1994**; 43(10):1287-1292.
23. **CARRÍN, M.E. and CRAPISTE, G.H.** Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture. En: *Journal of Food Engineering* [Online]. **2008**; 84(2):243-249. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.05.016.

24. **CERT, A.; MOREDA, W. and PEREZ-CAMINO, M. C.** Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assessment of the precision characteristics from a collaborative trial. En: *Grasas y Aceites*. **2000**; 51(6): 447-456 . ISSN 0017-3495.
25. **CHANDLER, I. C.; QUINLAN, P. T. and McNEIL, G. P.** Lipase-catalized synthesis of chiral triglycerides. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**; 75:1513-1518.
26. **CHEN, C.W.; CHONG, C.L.; GHAZALI, H.M.; et al.** Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. En: *Food Chemistry*. **2007**; 100:178-191. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.44
27. **CHONG, C. N.; HOH, Y.M. and WANG, C.B.** Fractionation procedures for obtaining cocoa butter-like fat from enzymatically interesterified palm olein. En: *Journal American Oil Chemistry Society. Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1992**; 69(2):137-140. ISSN 0003-021X.
28. **CHRISTIE, W.W.** The positional distributions of fatty acids in triglycerides. En: HAMILTON R.J. and ROSELL J.B. *The analysis of oils and fats*. London: Elsevier Applied Science, **1986**; 313-339.
29. **CORREDOR, D. and CAICEDO L.A.** Modelos matemáticos para reactores biológicos de lecho empacado (PBR): Una revisión bibliográfica. En: *Revista Investigación e Ingeniería*. **2005**; 25(3): 101-110.
30. **CRAIG GB, DARNELL BE, WEINSIER RL, et al.** Decreased fat and nitrogen losses in patients with AIDS receiving medium-chain-triglyceride-enriched formula vs those receiving long-chain-triglyceride-containing formulas. En: *J Am Diet Assoc*. **1997**; 97:605–611.

31. **D'AGOSTINI, D.** Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. Tese (Doutor). São Paulo,. Universidad de São Paulo. Facultad de Ciências Farmacêuticas. Área de Tecnologia de Alimentos. **2001**, 151 p.
32. **D'AGOSTINI, D. ; CIMA FERRAZ, R. ; GIOIELLI L.A. ; et al.** Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación de las mezclas binarias y ternarias de las grasas de palma, semilla de palma y triglicéridos de cadena media. En: *Grasas y Aceites*. **2001**; 52(3-4) :214-221.
33. **DeGREYT, W.; HUYGHEBAERT, A. and KELLENS M.** Chemical and physicochemical modification of lipids. En: CHRISTOPHE A.B. Structural modified foods fats: Synthesis, biochemistry, and use. Champaign, Illinois: AOCS Press, **1998**; p. 1 – 20.
34. **DECKER, EA.** The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition (Review). En: *Nutrition Reviews*. 1996; 54(4): 108-110.
35. **DEMAN, J.M.** Consistency of fats: A review. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1983**; 60(1): 82-87. ISSN 0003-021X. doi:10.1007/BF02540897
36. **DeMICHELE, S.; KARLSTAD, M.; BISTRAN, B.** Structured lipid containing gama-linolenic or dihogamma-linolenic fatty acid residue, a medium chain (C6 -C12) fatty acid residue, and a n-3 fatty acid residue. *United States Patent No. 5.661.180*, august 26, **1997**.
37. **DeMICHELE, S. and WOOD S.** Product and method to reduce stress induced immune suppression. *United States Patent No. 6.130.244*, october 10, **2000**.

38. **DeMICHELE, S.; LEE, T. and TSO P.** Method for enhancing the absorption and transport of lipid soluble compounds using structured glycerides. *United States Patente No. 6.013.665*, January 11, **2000**.
39. **DENNISON, A.R.; BALL, M.; CROWE, P.J.; et al.** The metabolic consequences of infusing emulsions containing medium chain triglycerides for parenteral nutrition: a comparative study with conventional lipid. En: *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **1986**; 68 (3):119-121.
40. **DENNISON, A.; BALL, M.; CROWE, P.; et al.** Total parenteral nutrition using conventional and medium chain triglycerides. En: *J. Parenter. Enter. Nutr.* **1988**; 12-15.
41. **DIAZ G.O. and GIOIELLI, A.** Structured lipids obtained by chemical and enzymatic interesterification from fish oil and palm kernel fat. En: *Grasas y Aceites.* **2003**; 54(2): 161-168.
42. **DOURTOGLOU, T.; STEFANOUE, E.; LALAS, S.; et al.** Regioespecific analysis of fatty acids in triacylglycerols with GC using 1,3-specific lipase in butanol. En: *Analyst*, **2001**; 126:1032-1036.
43. **DOYHAMBEHERE E.** Visión futura del negocio de grasas y aceites en Latinoamérica. En: X CONGRESO LATINOAMERICANO AOCS DE LOS ACEITES Y GRASAS (2003: Manta). Ponencias del X Congreso Latinoamericano AOCS de los Aceites y Grasas. Manta Ecuador, **2003**.
44. **DU, W.; XU, Y.Y.; LIU, D.H. et al.,** Study on acyl migration in immobilized Lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* **2005**; 37:68-71.

45. **DUN, M.L.** Interesterification of butteroil/oleic acid mixtures catalyzed by *Mucor miehei* lipase. Cornell. Thesis (PHD). Cornell University. Agriculture, Food Science and Technology. AAC 9624879 ProQuest-Dissertation Abstracts. DAI-B 57/03, **1996**. p. 1522.
46. **DUPON, I.E. y CARPENTIER, Y.A.** El uso clínico de emulsiones de lípidos. En: *Lecturas sobre nutrición*. **2000**; 7(1): 48-58.
47. **ESTEBAN, M.J.; VICARIO, M.J. CAMPILLO, L., et al.** Prescripción y elaboración de nutrición parenteral en los hospitales españoles. En: *Farm Hosp.* **2006**; 30(1):6-11.
48. **FARMANI, A.; HAMED, M.; SAFARI, M.; et al.** Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. En: *Food Chemistry*. **2007**; 102(3): 827-833
49. **FATS AND OILS IN HUMAN NUTRITION.** Report of a Joint Expert Consultation FAO/OMS. FAO Food and Nutrition Paper No. 57. **1994**.
50. **FEDEPALMA.** Desempeño del sector palmero colombiano en 2006. *Unidad de Economía y Comercio de Fedepalma*. Marzo de **2007a**.
51. **FEDEPALMA.** Oferta y consumo mundial de aceite de palma. En: Estructura del mercado mundial de aceites y grasas (Anual). **2007b**. [Online] < http://www.fedepalma.org/eco_mercado_mundial.shtm#ofer >
52. **FENEMA, O.R.** Química de los alimentos. Madrid: Acribia, **1993**. p. 250-254.
53. **FERREIRA, A.M.D.; BARBOSA, P.E.B. and CEDDIA, R.B.** The influence of medium-chain triglycerides supplementation in ultra-endurance exercise

performance. En: *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* [online]. **2003**; 9(6): 413-419. ISSN 1517-8692. Disponible en internet: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922003000600006&lng=en&nrm=iso>.

54. **FITCH, B.** Estructured lipids allow fat tailoring. En: *INFORM.* **1997**; 8(10):1004-1011.
55. **FOMUSO, L.B. and AKOH, C.C.** Enzymatic modification of high-laurate canola to produce margarine fat. En: *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49:4482-4487.
56. **FOMUSO, L.B. and AKOH, C.C.** Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. En: *Food Research International.* **2002**; 35: 15-21
57. **FORSSELL, P.; KERVINEN, R.; LAPPI, M.; et al.** Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rape seed oil (LEAR) mixture. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **1992**; 69 (2):126-129. ISSN 0003-021X.
58. **GEERAERT, E. and SANDRA, P.** Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high-temperature phenylmethylsilicone phase. Part II. The analysis of chocolate fats. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **1987**; 64 (1):100-105.
59. **GHOTRA, B.; DYAL, S.O. AND NARINE, S.S.** Lipid shortenings: a review. En: *Food Research International.* **2002**; 35(10): 1015-1048. doi: 10.1016/S0963-9969(02)00163-1.

60. **GLEW, R.H. ; OKOLO, S.N. ; CHUANG L.T. ; et al.** Fatty acid composition of Fulani "Butter oil" made from cow's milk. En: *Journal of Food Composition and Analysis*. **1999**; 12:235-240.
61. **GOH, E.M.** Applications and uses of palm and palm kernel oils in specialty products. En: *Malaysian Oil Science and Technology*. **2002**; 11(1): 42-50.
62. **GOLLAHER, C.J.; FECHNER K.; KARLSTAD M.; et al.** The effect of increasing levels of fish oil-containing structured triglycerides on protein metabolism in parenterally fed rats stressed by burn plus endotoxin. En: *J. Parenter Entereral Nutr.* **1993**; 17 (3):247-253.
63. **GONZÁLEZ, J.G.; VALENZUELA, F. y VALLEJO, L.** Nutrientes específicos en el paciente séptico (II): nucleótidos, lípidos: ácidos grasos omega-3 y lípidos estructurados. En: *Archivos de la SAMIUC* [Online], **2000**. Disponible en Internet <<http://membres.lycos.fr/trinche/nutriseptico1.html>>
64. **HAIGHTON, A.J.** The measurements of hardness of margarine and fats with cone penetrometers. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1959**; 36(8): 345-348.
65. **HAMAM, F.; SHAHIDI, F.** Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipids. En: *Food Chemistry*. **2005**; 91: 583-591.
66. **HAMAM; F. and SHAHIDI, F.** Enzymatic Incorporation of Selected Long-Chain Fatty Acids into Triolein. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2007**; 84: 533-541.

67. **HAMAM; F. and SHAHIDI, F.** Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin. En: *Food Chemistry*. **2007**, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.05.038.
68. **HAUMANN, B.F.** Structured lipids allow fat tailoring. En: *Inform.* **1997**; 8(10):1004-1011.
69. **HEALTH CANADA.** Nutraceuticals/Functional foods and health claims on foods, Policy Paper. Therapeutic Products Programme and the Food Directorate from the Health Protection Branch, En: *Health Canada*, **1998**. Disponible en internet: http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut/zfiles/english/ffn/nutra_pol_e.pdf
70. **HERNÁNDEZ-MARTÍN, E. and OTERO, C.** Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL-IM. En: *Bioresour Technol.* **2007**; doi:10.1016/j.biortech.2006.12.024
71. **HITA, H.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; et al.** Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. En: *Process Biochemistry*. **2007**; 24(3): 415-422.
72. **HUANG K.H. y AKOH C.** Optimization and scale-up of enzymatic synthesis of structured lipids using RSM. En: *Journal of Food Science*. **1996**; 61(1):137-141.
73. **HUMPHREY, K.L.; MOQUIN, P.H.L and NARINE, S.S.** Phase behavior of a binary lipid shortening system: From molecules to rheology. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2003**; 80(12): 1175-1182. ISSN 0003-021X. doi: 10.1007/s11746-003-0838-2.

74. **HUSUM, T.L.; PEDERSEN, L.S.; NIELSEN, P.M.; et al.** Enzymatic interesterification: Process advantages and product benefits. En: *Palm Oil Developments*.2005; 39:1-10.
75. **IBRAHIM, N.A.B.; XU, X.** Functional palm oil-based margarine by enzymatic interesterification. Conference contribution. En: *Malaysian Palm Oil Board International Palm Oil Congress*, Kuala Lumpur, Malaysia, **2005**.
76. **ISAACS, C.E.; THOMAR, H.; KIM, K.S. et al.,** Antiviral and antibacterial activity of fatty acids and monoglycerides. *United States Patent Number 4.997.851*, March 5, **1991**.
77. **IUPAC.** Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th edition. Method 2.301: Preparation of fatty acid methyl esters and Method 2.302: Gas liquid chromatography of fatty acid methyl esters. **1987**.
78. **IWASAKI, Y. and YAMANE, T.** Enzymatic synthesis of structural lipids. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2000**;10:129-140.
79. **JÁCOME, F. y PEREA, J.A.** Evaluación de la enzima Lipozyme TL IM en reacciones de transesterificación enzimática. Tesis (Química). Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. **2001**.
80. **JENNINGS, B.H. and AKOH, C.C.** Lipase-catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric acid. En: *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48:4439-4443.
81. **KABARA, J.J.** Monolaurin as an antimicrobial agent. *United States Patent Number 4.002.775*, January, **1977**.
82. **KABARA, J.J.** Synergistic microbiocidal composition and method. *United*

States Patent Number 4.067.997, January 10, **1978**.

83. **KABARA, J.J.** Antimicrobial compositions. *United States Patent Number 4.189.481*, February 19, **1980**.
84. **KABARA, J.J.** Nutri-Ceutical™ Products from tropical oils. AOCs LATIN AMERICAN SECTION MEETING. En: *Memoirs of The 9th Latin American AOCs Congress and Exhibition*, San José, Costa Rica. **2001**.
85. **KALLIO, H. and RUA, P.** Distribution of the major fatty acids of human milk between *sn*-2 and *sn*-1,3 positions of triacylglycerols. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1994**; 71(9): 985-992. ISSN 0003-021X. doi: 10.1007/BF02542266.
86. **KANJILAL, S.; PRASAD, R. B. N.; KAIMAL, T. N. B.; et al.** Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat. En: *Lipids*. **1999**; 34(10): 1045-1055. doi: 10.1007/s11745-999-0456-7. ISSN: 0024-4201
87. **KARABULUT, I.; TURAN, S. and ERGIN, G.** Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. En: *European Food Research and Technology*. **2004**; 218(3): 224-229. doi:10.1007/s00217-003-0847-4
88. **KEW, S.; GIBBONS E.S.; THIES F.; et al.** The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. En: *British Journal of Nutrition*. **2003**; 90(6): 1071-1080. doi:10.1079/BJN2003996
89. **KIM, B.H. and AKOH, C.C.** Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a

- bench-scale continuous packed bed reactor. En: *J. Agric. Food Chem.* **2006**; 54(14): 5132-5141.
90. **KLINKESORN, U.; H-KITTIKUN, A.; CHINACHOTI, P. et al.** Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. En: *Food Chemistry.* **2004**; 87: 415-421.
91. **KO, S.N.; KIM, H.; LEE, K.T. et al.** Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. En: *Food Science and Biotechnology.* **2003**; 12(3):253-256.
92. **KOSKINEN, A.M.P. and KLIVANOV, A.M.** Enzymatic reactions in organic media. 1 ed. London UK: Blackie Academic & Profesional. **1996**. 314 p. ISBN 0-7514-0259-1.
93. **KRUIMEL, J.W.; NABER T.H.; VAN DER VLIET, A.; et al.** Parenteral structured triglyceride emulsion improves nitrogen balance and is cleared faster from the blood in moderately catabolic patients. En: *JPEN.* **2001**; 25:237-244.
94. **KUIPERS, R.S.; SMIT, E.N.; VAN DER MEULEN, J.; et al.** Milk in the island of Chole [Tanzania] is high in lauric, myristic, arachidonic and docosahexaenoic acids, and low in linoleic acid reconstructed diet of infants born to our ancestors living in tropical coastal regions. En: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **2007**; 76(4):221-33.
95. **LAI, H., and CHEN, W.** Effects of medium-chain and long-chain triglycerols in pediatric surgical patients. En: *Nutrition.* **2000**; 16(6):401-

96. **LAI, O.M.; GHAZALI, H.M.; and CHONG, C.L.** Physical properties of *Pseudomonas* and *Rhizomucor miehei* lipase-catalyzed transesterified blends of palm stearin:palm kernel olein. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**; 75 (6):953-959.
97. **LAI, O.M.; LOW, C.T. and AKOH, C.C.** Lipase Catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor. En: *Food Chemistry*. **2005**; 92(3):527-533.
98. **LEE, C.S. and PARKIN, K.L.** Comparative fatty acid selectivity of lipases in esterification reactions with glycerol and diol analogues in organic media. En: *Biotechnol. Prog.* **2000**; 16 (3):372-377.
99. **LEE, K.T. and AKOH, C.C.** Solvent-free enzymatic synthesis of structural lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**; 75 (11):1533-1537.
100. **LEE, K.T.; AKOH C.C.; and DAWE D.L.** Effects of structured lipid containing omega-3 and medium chain fatty acids on serum lipids and immunological variables in mice. En: *Journal of Food Biochemistry*. **1999**; 23(2), 197–208. doi:10.1111/j.1745-4514.1999.tb00014.x
101. **LEE, K.T.; FOGLIA, T.A. and OH, M.J.** Medium-long-medium and medium-long-long chain acyl glycerols from beef tallow and caprylic acid. En: *Journal of Food Science*. **2002**; 67 (3):1016-1020.
102. **LIEN, E.** The role of fatty acid composition and positional distribution in fat absorption in infants. En: *J Pediatr*. **1994**; 125: S62-S68.
103. **LIMA, L.A.; MURPHY, J.F.; STANSBIE, D.; et al.** Neonatal parenteral

- nutrition with a fat emulsion containing medium chain triglycerides. En: *Acta Paediatr. Scand.* **1998**; 77(3):332-339.
104. **LINDEN, G. and LORIENT, D.** Bioquímica Agroindustrial. España: Acribia S.A., **1996**. 427 p. ISBN: 84-200-0805-2.
105. **LINDGREEN, B.F.; RUOKONEN, E.; MAGNUSSON-BORG K.; et al.** Nitrogen sparing effect of structured triglycerides containing both medium- and long- chain fatty acids in critically ill patients; a double blind randomized controlled trial. En: *Clin. Nutr.* **2001**; 20:43-48.
106. **LIST G.R., MOUNTS T.L., ORTHOEFER F. et al.** Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides. En: *J. Am. Oils Chem. Soc.* **1995**; 72 (3):379-384.
107. **LIST, G.R.; NEFF, W.E.; HOLLIDAY, R.I. et al.** Hydrogenation of soybean oil triglycerides: Effect of pressure on selectivity. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **2000**; 77(3): 311-314.
108. **LIU, L. and LAMPERT, D.** Monitoring chemical interesterification. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **1999**; 76(4):783-789.
109. **LO, S.K.; CHEONG L.Z.; ARIFIN N.; et al.** Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface-optimized process for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor. En: *J Agric Food Chem.* **2007**; 55(14):5595-5603.
110. **MACRAE A.** Enzymatic interesterification, LPS117. En: *Society of Chemical Industry, SCI lectures paper series.* **2000**:. ISSN 1353-114x

111. **MADUKO C.O.; AKOH C.C. and PARK Y.W.** Enzymatic interesterification of tripalmitin with vegetable oil blends for formulation of caprine milk infant formula analogs. En: *J. Dairy Sci.* **2007**; 90:594-601.
112. **MADUKO, C.O.; AKOH, C.C.; and PARK, Y.W.** Enzymatic production of infant milk fat analogs containing palmitic acid: optimization of reactions by response surface methodology. En: *J. Dairy Sci.* **2007**; 90:2147-2154. doi:10.3168/jds.2006-686.
113. **MARANGONI A.G.** The nature of fractality in fat crystal networks. En: *Trends in Food Science & Technology.* **2002**; 13: 37–47.
114. **MATALX, J. and GIL, A.** Libro Blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Granada- España: Puleva Food. **2002**.
115. **MATSUO, T.; MATSUO, M.; KASAI, M.; et al.** Effects of a liquid diet supplement containing structured medium- and long-chain triacylglycerols on body fat accumulation in healthy young subjects. En: *Asia Pac J. Clin. Nutr.* **2001**; 10:46-50.
116. **MATSUO, T.; and TAKEUCHI, H.** Effects of structured medium-. and long-chain triacylglycerols in diets with various levels of fat on body fat accumulation in rats. En: *The British Journal of Nutrition.* **2004**; 91:219-225.
117. **MATULKA, R.A.; NOGUCHI, O. and N. NOSAKA.** Safety evaluation of a médium- and long-chain triacylglycerol oil produced from médium-chain triacylglycerols and edible vegetable oil. En: *Food and Chemical toxicology.* **2006**; 44: 1530-1538.

118. **MATULKA, R.A.; NOGUCHI, O. and NOSAKA, N.** Safety evaluation of a medium- and long-chain triacylglycerol oil produced from medium-chain triacylglycerols and edible vegetable oil. En: *Food Chem Toxicol.* **2006**; 44(9):1530-8.
119. **MAZER, T.B.; ANDERSON, S.N.; GUZMAN-HARTY, M.; et al.** Water-miscible esters of monoglycerides having antimicrobial activity. *United States Patent Number 5.912.372.* June 15, **1999**.
120. **MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; et al.** Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society.* **1988**; 65 (6): 927-931.
121. **MOGI, K.C., NAKAJIMA, M. and MUKATAKA, S.** Transesterification reaction between medium-and long-chain fatty acid triglycerides using surfactant-modified lipase. En: *Biotechnology and Bioengineering.* **2000**; 67(5):513-519.
122. **MOJOVIC, L.; SLAVICA SILER-MARINKOVIC, S.; KUKIC, G.; et al.** Rhizopus arrhizus lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. En: *Enzyme and Microbial Technology.* **1993**; 15(5): 438-443.
123. **MONTEJO, J.C.** Empleo de nuevas infusiones lipídicas en la nutrición parenteral de pacientes críticos. En: *Revista Electrónica de Medicina Intensiva* [online]. **2001**; 1(6): artículo 131. Disponible en internet: <<http://remi.uninet.edu/2001/06/REMI0131.htm>>. ISSN: 1578-7710.
124. **MONTEJO, J.C.** Lípidos estructurados en la nutrición parenteral. En: *Revista Electrónica de Medicina Intensiva* [online]. **2001**; 1(9): artículo 227. Disponible en internet: <<http://remi.uninet.edu/2001/09/REMI0227.htm>>. ISSN: 1578-7710

125. **MORENO S.N.** Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma: Producción de equivalentes de la manteca de cacao por interesterificación enzimática. Bucaramanga, Colombia, **2001**, 109 p. Tesis (Maestría en Química), Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
126. **MORENO, J.M.; FERNÁNDEZ, C.F.; MUÑOZ, J. et al.** Encuesta sobre la variabilidad en la elaboración de la nutrición parenteral en pediatría. En: *Nutr. Hosp.* **2002**; 17(5):251-255.
127. **MORENO, N.** Búsqueda de nuevas alternativas para la utilización del aceite de palma. Producción de equivalentes de la manteca de cacao por interesterificación enzimática.. Tesis (Maestría en Química). Bucaramanga, Colombia, Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, **2001**.
128. **MORENO, N. y PEREA, J.A.** Utilización de lipasas inmovilizadas en la producción de lípidos estructurados. En: Memorias del XIII Congreso Colombiano de Química. Cartagena, Colombia. **2004**.
129. **MORENO, N.; PEREA, J.A.; MANTILLA, C.** Modificación de aceites vegetales con lipasas microbianas para la obtención de alimentos funcionales. En: XI CONGRESO LATINOAMERICANO DE GRASAS Y ACEITES (11avo:2005: Rosario, Argentina). Memorias del XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Rosario, Argentina. **2005**.
130. **MU, H. and PORSGAARD, T.** The metabolism of structured triacylglycerols. En: *Progress in Lipid Research.* **2005**; 44(6):430-448.
131. **MU, H., XU X. and HOY, C.E.** Production of specific-structured

- triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998**; 75(9):1187-1193.
132. **NARINE, S.S. and MARANGONI, A.G.** Fractal nature of fat crystal networks. En: *Physical Review E*. **1999**; 59(2): 1908-1920.
133. **NELSON, C.M. and INNIS, M.I.** Plasma lipoprotein fatty acids are altered by the positional distribution of fatty acids in infant formula triacylglycerols and human milk. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1999**; 70:62–9.
134. **NIELSEN, N.S.; YANG, T.; XU, X. and JACOBSEN, C.** Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. En: *Food Chemistry*. **2006**; 94(1):53-60.
135. **NIETO, S., SANHUEZA, J. and VALENZUELA, A.** Synthesis of structured triacylglycerols containing médium-chain and long-chain fatty acids by interesterification with a stereoespecific lipase from *Mucor miehei*. En: *Grasas y Aceites*. **1999**; 50 (3):199-202.
136. **NIETO, S.; GUTIÉRREZ, J.; SANHUEZA, J.; et al.** Preparation of sn-2 long-chain polyunsaturated monoacylglycerols from fish oil by hydrolysis with a stereo-specific lipase from *mucor miehei*. En: *Grasas y Aceites*. **1999**; 50(2):111-113.
137. **NOVOZYMES.** Use de immobilized lipase Lipozyme TL IM for bulk-fat modification. *Novozymes Application Sheet, Oils & Fats*, **2001**-08294-02.
138. **NOVOZYMES.** Enzymatic interesterification using Lipozyme® TL IM in laboratory-scale batch reactors. En: *Novozymes Application Sheet, Oils &*

Fats, 2003-08063-02.

139. **NOVOZYMES**. Ficha de información: Método para el cálculo de la actividad residual de Lipasa en la interesterificación. **2004**.
140. **OMS/FAO**. Fats and oils in human nutrition. Report of a joint expert consultation. En: *Food and Nutrition*. **1994**; 57.
141. **OSBORN, H.T. and AKOH, C.C.** Structural lipids-Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2002**; 3:93-102.
142. **OSÓRIO, N.M.; FERREIRA-DÍAZ, S.; GUSMÃO, J.H.; et al.** Response surface modeling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. En: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2001**; 11:677-686.
143. **OTERO, C.; LÓPEZ-HERNANDEZ, A.; GARCÍA, H.S.; et al.** Continuous enzymatic transesterification of sesame oil and a fully hydrogenated fat: Effects of reaction conditions on product characteristics. En: *Biotechnology and Bioengineering*. **2006**; 94(5):877–887.
144. **OTTOSSON, J.** Enthalpy and entropy in enzyme catalysis -a study of lipase enantioselectivity. Theses (PhD), Swede. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology. **2001**. ISBN 91-7283-157-X
145. **OTTOSSON, J. and HULE, K.** Influence of the acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida Antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of *sec*-alcohols. En: *J. Mol. Catal. B*. **2001**; 11: 1025-1028.
146. **PADLEY, F. and TIMMS, R.** The determination of cocoa butter

- equivalents in chocolate. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1980**; 286-293
147. **PAIVA, A.L.; BALCAO, V.M. and MALCATA, F.X.** Kinetics and mechanisms of reaction catalyzed by immobilized lipases. En: *Enzyme and Microbial Technology*. **2000**; 27:187-204.
148. **PANTZARIS, T. P. and AHMAD, M.J.** Properties and utilization of palm kernel oil. En: *Palm Oil Developments*. **2001**; 35: 11-23.
149. **PAREJA, C.A.; MARTÍNEZ, F. y PEREA, J.A.** Transesterificación enzimática de aceites vegetales para la obtención de grasas base para la producción de margarinas. Tesis (maestría en Química). Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. **2004**
150. **PEREA, J.A.; MORENO, N.; ARANGO, L.M.; et al.** Informe de avance del proyecto de COLCIENCIAS Código 1102-07-11015: Desarrollo de grasas especiales a escala de planta piloto a partir del aceite de palma africana. Bucaramanga, **2004**.
151. **PERSOON, M.; WEHTJE, E. and ADLERCREUTZ, P.** Factors governing the activity of lyophilised and immobilised lipase preparations in organic solvents. En: *ChemBioChem*. **2002**; 3(6): 566 – 571.
152. **PLUMMER, N. and WOOD, C.** The neonatal immune system and risk of allergy a delicate balancing act, positively influenced by probiotics and fatty acids. En: *Townsend Letter for Doctors and Patients* [Online]. **2002**. doi: http://findarticles.com/p/articles/mi_m0ISW/is_2002_Feb-March/ai_82881788
153. **RAMÍREZ, M.; AMATE, L. and GIL A.** Absorption and distribution of

- dietary fatty acids from different sources. En: *Early Hum Dev.* **2001**; 65:S95-S101.
154. **ROBLES, V.J.; GARCÍA, H.S.; MONROY, J.A.; et al.** Lipase-catalized esterification of glycerol with n-3 polyunsaturated fatty acids from winterized fish oil. En: *Food Science and Technology International.* **1998**; 4(6):401-405.
155. **RODRIGUEZ, P.A.** Influencia metabólica e importancia clínica de emulsiones lipídicas MCT/LCT versus LCT en pacientes sépticos y post-quirúrgicos sometidos nutrición parenteral total. Salamanca: Universidad de Lleida, **2000**. 120 p. ISBN 84-89727-64-3.
156. **RØNNE, T.; YANG, T.; JACOBSEN, C.; et al.** Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. En: *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53(14):5617-5624.
157. **ROTTICCI, D.** Understanding and engineering the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B towards sec-alcohols. Theses (PhD). Sweden, Stockholm, **2000**. 53 p. Department of Chemistry, Organic Chemistry, Royal Institute of Technology. ISBN: 91-7170-5 50-3
158. **ROTTICCI, D.; NORIN, T. and HULT, K.** Mass transport limitations reduce the effective stereospecificity in enzyme-catalyzed kinetic resolution. En: *Organic Letters.* **2000**; 2(10):1373-1376.
159. **ROUSSEAU, D. and MARANGONI, A.** Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed enteresterification. 2. Modification of physical properties. En: *J. Agric. Food Chem.* **1998**; 46:2375-2381.
160. **ROUSSEAU, D.; and MARANGONI, A.** Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed

- enteresterification. 1. Compositional modifications. En: *J. Agric. Food Chem.* **1998**; 46:2368-2374.
161. **RU, M.T.; WU, K.C.; LINDSAY, J.P.; et al.** Towards more active biocatalysts in organic media: Increasing the activity of salt-activated enzymes. En: *Biotechnology and Bioengineering.* **2001**; 75(2): 187 – 196.
162. **RUBIN, M.; MOSER, A.; Nir VASERBERG, et al.** Structured triacylglycerol emulsion, containing both medium- and long-chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: a double-blind randomized cross-over study. En: *Nutrition*, **2000**; 16(2) 95-100.
163. **SAHIN, N.; AKOH, C.C. and KARAALI, A.** Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. En: *J. Agric. Food Chem.* **2005**; 53 (14):5779-5783. doi:10.1021/jf050465e S0021-8561(05)00465-6.
164. **SAMMON, A.M.** Dietary linoleic acid, immune inhibition and disease. *Postgraduate Medicine Journal.* **1999**; (75): 129-132.
165. **SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.W.; et al.** Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. En: *Current Science* [Online]. **1999**; 77(1): 101-115. Disponible en internet: <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles18.htm>
166. **SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R. and VARGAS, R.M.** Transesterification of vegetable oils: a review. En: *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**; 9(1):199-210.
167. **SCHWARTZ, S.; FARRIOL, M.; GARCIA, E.; et al.** Influenza of the MCT/LCT ratio in enteral nutrition on liver and jejunal mucosa protein synthesis in post-quirurgical stress. En: *J. Clin. Nutr. Gastroenterol.* **1987**;

2: 31-37.

168. **SEHANPUTRI, P.S. and HILL, C.G.** Biotechnology for the production of nutraceuticals enriched in conjugated linoleic acid: I. Uniresponse kinetics of the hydrolysis of corn oil by a *Pseudomonas sp.* Lipase immobilized in a hollow fiber reactor. En: *Biotechnology and Bioengineering*. **1999**; 64(5):568-579.
169. **SEHANPUTRI, P.S. and HILL, C.G.** Lipase-Mediated acidolysis of butteroil with free conjugated linoleic acid in a packed bed reactor. En: *Biotechnology and Bioengineering*. **2003**; 83(5): 608-617.
170. **SELLAPAN, S. and AKOH, C.C.** Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalized by Lipozyme IM60. En: *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49: 2071-2076.
171. **SENANAYAKE, S.P.J. and SHAIDI, F.** Enzyme-ssisted acidolysis of borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils: incorporation of omega-3 polyunsaturated fatty acids. En: *J. Agric. Food Chem.* **1999**; 47:3105-3112.
172. **SHINOHARA, H.; OGAWA, A.; KASAI, M. et al.** Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. En: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**; 69:1811-1818. doi:10.1271/bbb.69.1811
173. **SILVEIRA, M.B.; MONEREO, S. Y MOLINA B. B.** Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿cerca o lejos?. En: *Rev Esp Salud Pública*. **2003**; 77: 317-331
174. **SIMOENS, C.H.; DECKELBAUM, R.J. and CARPENTIER, Y.A.** Metabolism of defined structured triglyceride particles compared to mixtures

of medium and long chain triglycerides intravenously. En: *Clin Nutr.* **2004**; 23(4):665-72. ISSN: 0261-5614.

175. **SIMOPOULOS, A.P.; CLELAND, L.G.** Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio: The scientific evidence. En: *World Rev Nutr Diet.* **2003**; 92:1-22.

176. **ST-ONGE, M.P.; ROSS, R.; PARSONS, W.D.; et al.** Medium-Chain Triglycerides Increase Energy Expenditure and Decrease Adiposity in Overweight Men. En: *Obesity.* **2003**; 11(3): 395 - 402.

177. **STRAARUP, E.M.; and HOY, C.E.** Structured lipids improve fat absorption in normal and malabsorbing rats. En: *J. Nutri.* **2000**; 130 (11):2802-2808. Citado por: **OSBORN, H.T. and AKOH, C.C.** Structural lipids-Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **2002**; 3:93-102.

178. **THOLSTRUP, T.; EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M.; et al.** Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. En: *American Journal of Clinical Nutrition.* **2004**; 79(4): 564-569.

179. **THONART, N.; CUVELIER, B.; BRACAMONTE, M., et al.** Metabolic utilization of LCT vs MCT/LCT emulsion during IV infusion in man. En: *Clin Nutr.* **1984**; 4 (special suppl):057. p 244; Citado por: **RODRIGUEZ, P.A.** Influencia metabólica e importancia clínica de emulsiones lipídicas MCT/LCT versus LCT en pacientes sépticos y post-quirúrgicos sometidos nutrición parenteral total. Salamanca: Universidad de Lleida, **2000**. 120 p. ISBN 84-89727-64-3.

180. **TORRES, C.F. ; MUNIR, F. ; LESSARD, L.P. ; et al.** Lipase-mediated acidolysis of tristearin with CLA in a packed-bed reactor: A kinetic study. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2002**; 79(7) : 655-661. doi : 10.1007/s11746-002-0539-x
181. **TRIVEDI, R. and SINGH, R.P.** Modification of Oils and Fats to Produce Structured Lipids. En: *Journal of Oleo Science*. **2005**; 54(8):423-430.
182. **TURAN, S.; KARABULUT, I. and VURAL, HALIL.** Influence of sn-1,3-lipase-catalysed interesterification on the oxidative stability of soybean oil-based structured lipids. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2007**; 87(1): 90-97.
183. **TURNER N.A. and VULFSON, E.N.** At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity?. En: *Enzyme and Microbial Technology*. **2000**; 27: 108-113.
184. **VALENZUELA, B.; SANHUEZA, A.; JULIO, C. y NIETO, K.** El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. En: *Rev. chil. nutr.* **2002**; 29(2):106-115. ISSN 0717-7518.
185. **VALENZUELA, B.; SANHUEZA, A.; JULIO, C. y NIETO, K.** ¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles?. En: *Rev. chil. nutr.* **2002**; 29 (1): 174-180. ISSN 0717-7518.
186. **VIKBJERG, A.F.; MU, H. and XU X.** Continuous production of structured phospholipids in a packed bed reactor with lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **2005**. En: *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2005**; 82 (4): 237-242.

187. **VOLPATO, L.A.** Interesterificación enzimática: diferencias con la interesterificación química. En: 10th LATIN AMERICAN CONGRESS ON FATS AND OILS AOCS (2003, Manta-Ecuador). Memoirs of 10th Latin American Congress on fats and Oils. Manta, **2003**.
188. **VOLPATO, L.A.** Interesterificación enzimática: ventajas en el proceso y beneficio para los procesos. En: *Palmas*. **2004**; 25(1):359-364.
189. **WAITZBERG, D.L.; TORRINHAS, R.S. and JACINTHO, T.M.** New parenteral lipid emulsions for clinical use. En: *J. Parenter. Enteral Nutr.* **2006**; 30(4):351-367.
190. **WANKE, C.A.; PLESKOW, D.; DEGIROLAMI, P.C., et al.** A medium chain triglyceride-based diet in patients with HIV and chronic diarrhea reduces diarrhea and malabsorption: a prospective, controlled trial. En: *Nutrition*. **1996**;12:766 – 771.
191. **WANTEN, G.J. and CALDER, P.C.** Immune modulation by parenteral lipid emulsions. En: *American Journal of Clinical Nutrition*. **2007**; 85(5): 1171-1184.
192. **WASELL, P. and YOUNG, N.W.G.** Food applications of trans fatty acid substitutes. En: *International Journal of Food Science & Technology*. **2007**; 42 (5): 503–517. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01571.x.
193. **WATSON, D.G.** Chemical derivatization in gas chromatography. En: BAUGH, P.J. Gas chromatography : a practical approach. Oxford, New York: IRL Press at Oxford University Press. **1993**. p.133-170. ISBN 0199632715.
194. **WILLIS, W.M. and MARANGONI, A.G.** Assessment of lipase and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of

- structured lipids. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1999**; 76 (4):443-450.
195. **WILLIS, W.M. and MARANGONI, A.G.** Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. En: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1998**; 38 (8):639-674.
196. **XIU G.H.; JIANG, L, and LI, P.** Mass transfer limitations for immobilized enzyme-catalyzed kinetic resolution of racemate in a fixed-bed reactor. En: *Biotechnology and Bioengineering*. **2001**; 74(1): 30-39.
197. **XU, X.; BALCHEN, S.; HØY, C.E.; et al.** Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998a**; 75 (2):301-308.
198. **XU, X. ; SKANDS, A.R.H. ; HØY, C.E., et al.** Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998b**, 75 (9):1179-1186.
199. **XU, X.; BALCHEN, S.; HØY, C.E.; et al.** Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1998c**; 75 (11):1573-1579.
200. **XU, X.; MU, H.; HØY, C.E.; et al.** Production of specifically structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot enzyme bed reactor: process optimization by response surface methodology. En: *Fett/Lipid*, **1999**; 101(6): 207-213.
201. **XU, X.; MU, H.; SKANDS, A.; et al.** Parameters affecting diacylglycerol

- formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification. En: *Journal of American Oil Chemists' Society*, **1999**; 76(2): 175-181.
202. **XU X., FOMUSO, L. y AKOH C.** Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed Acidólisis in a packed bed biorreactor. En: *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48: 3-10.
203. **XU, X.; SKANDS, A. and ADLER-NISSEN, J.** Purification of specific structured lipids by distillation: Effects on acyl migration. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2001**; 78(7): 715-718.
204. **XU, X.; PORSGAARD, T.; ZHANG, H.; et al.** Production of structured lipids in a packed-bed reactor with thermomyces lanuginosa lipase. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2002**; 79(6): 561-565.
205. **XU X.; YANG T.; REBSDORF, M.; et al.** Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. En: *Journal of Food Lipids*, **2005**: 12 (4): 299-312.
206. **YAMAGUCHI, I.; AKOH, C.C. and LAI, O.M.** Modification of fish oil by Lipozyme TL IM to produce structured lipid. En: *Journal of Food Lipids*. **2004**; 11(1): 65–73. doi:10.1111/j.1745-4522.2004.tb00261.x.
207. **YANG, T.; FRUEKILDE, M.B. and XU, X.** Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. En: *Food Chem.* **2005**; 92:101–107. doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.007.
208. **YUHAS, R.; PRAMUK, K.; LIEN, EL.** Human milk fatty acid composition from nine countries varies most in DHA. En: *Lipids*. **2006**; 41(9):851-8.
209. **ZHANG, H.; MU, H. AND XU, X.** Monitoring lipase-catalyzed butterfat

interesterification with rapeseed oil by Fourier transform near-infrared spectroscopy. En: *Anal Bioanal Chem.* **2006**; 86 (6):1889–1897.

210. **ZHOU, D., XU, X., MU, H., et al.** Synthesis of structured triacylglycerols containing caproic acid by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization by response surface methodology. En: *J. Agric. Food Chem.* **2001**; 49.

ANEXOS

Anexo 1.1. Preparación de los estándares de triacilgliceroles

Se preparó una solución estándar de TAG (mostrada en la **Tabla A1**) a partir de la cual se prepararon las soluciones patrón de TAG de las concentraciones mostradas en la **Tabla A2**, utilizando la mezcla patrón *Triglyceride Mix, 17811-1Amp lote LA-99204* (compuesta por tricaprina, tricaprilina, trilaurina, trimiristina y tripalmitina), y el estándar de *tristearina R-421545, Lote LA97905*. A todas las soluciones de los estándares de triacilgliceroles se les adicionó *colesterol* Sigma C8667 (pureza >99%) en una concentración de 0.20 mg/ml como estándar interno.

Tabla A1. Solución patrón de TAG.

<i>Triglyceride Mix, 17811-1Amp. LA-99204</i>				
Triacilglicerol	ACN:DB		Pureza (%)	Peso (mg)
Tricaprina	C24:0 [C8:C8:C8]		99.7	19.989
Tricaprilina	C30:0 [C10:C10:C10]		98.2	19.977
Trilaurina	C36:0 [C12:C12:C12]		99.9	19.977
Trimiristina	C42:0 [C14:C14:C14]		99.9	19.972
Tripalmitina	C48:0 [C16:C16:C16]		99.9	20.086
<i>Triestearina R-421545, Lote LA97905</i>				
Triestearina	C54:0 [C18:C18:C18]		99.9	20.052

Tabla A2. Concentración de las soluciones patrón de TAG.

Patrón*	mg/ml C8:C8:C8	mg/ml C10:C10:C10	mg/ml C12:C12:C12	mg/ml C14:C14:C14	mg/ml C16:C16:C16	mg/ml C18:C18:C18
1	0,167	0,166	0,166	0,166	0,167	0,167
2	0,119	0,119	0,119	0,119	0,120	0,119
3	0,083	0,083	0,083	0,083	0,084	0,083
4	0,059	0,059	0,059	0,059	0,060	0,060
5	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042
6	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030
7	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
8	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007
9	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

* A todos las soluciones patrón se les adicionó colesterol en una concentración de 0.20 mg/ml

Anexo 1.2. Determinación de los tiempos de retención (t_R), las áreas de los picos (A_i), los factores de respuesta (R_f) y factores de respuesta relativos (RR_f), de los estándares de triacilgliceroles

Los tiempos de retención relativos (t_{RR}) se establecieron median te la ecuación EcA1, las áreas relativas mediante la ecuación EcA2, los factores de respuesta (R_f) mediante la ecuación EcA3 y los factores de respuesta relativos (RR_f) mediante la ecuación EcA4.

$$t_{RR} = \frac{t_{R(i)}}{t_{R(ISTD)}} \quad \text{Ec.A1}$$

$$\text{Área}_{relativa} = \frac{A_{(i)}}{A_{(ISTD)}} \quad \text{Ec.A2.}$$

$$R_f = \frac{A_{(i)}}{C_{(i)}} \quad \text{EcA3}$$

$$RR_f = \frac{C_{(ISTD)} \times A_{(i)}}{A_{(ISTD)} \times C_{(i)}} \quad \text{EcA4}$$

Donde:

t_{RR} = tiempo de retención relativo

$t_{R(i)}$ = tiempo de retención del pico de interés

$A_{(i)}$ = área del pico de interés

$A_{(ISTD)}$ = área del pico del estándar interno (colesterol)

$C_{(i)}$ = concentración del compuesto de interés.

$C_{(ISTD)}$ =Concentración del estándar

R_f = factor de respuesta

RR_f = factor de respuesta relativo

Anexo 1.3. Reproducibilidad de los tiempos de retención t_R y de las áreas de los pico de los estándares de triacilgliceroles.

Cada una de las soluciones patrón se inyectó por triplicado al cromatógrafo de gases bajo las condiciones descritas en el Numeral 2.2.2.2, para calcular la reproducibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los estándares de TAG. En la Tabla A3 se presentan los valores de los t_R para los estándares de TAG, su desviación estándar (δ) y su coeficiente de variación (CV).

Tabla A3. Reproducibilidad de los tiempos de retención para los estándares de triacilgliceroles con ACN de 24 a 54

Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001			
TAG (ACN:DB)	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	$t_{R, \text{ min}}$	Promedio	Desvest	CV (%)
C24:0	12,641	12,641	12,638	12,636	12,636	12,636	12,637	12,638	2,62E-03	2,07E-02
Colesterol (ISTD)	13,705	13,705	13,704	13,706	13,708	13,709	13,712	13,707	2,78E-03	2,02E-02
C30:0	14,179	14,179	14,176	14,172	14,172	14,171	14,173	14,175	3,45E-03	2,44E-02
C36:0	15,515	15,515	15,512	15,507	15,507	15,507	15,509	15,510	3,89E-03	2,51E-02
C42:0	16,883	16,883	16,878	16,871	16,871	16,869	16,872	16,875	5,75E-03	3,41E-02
C48:0	19,059	19,059	19,050	19,035	19,037	19,034	19,039	19,045	1,13E-02	5,91E-02
C54:0	23,290	23,254	23,252	23,235	23,246	23,242	23,262	23,254	1,81E-02	7,77E-02

Tabla A4. Reproducibilidad de los tiempos de retención relativos (t_{RR}) para los estándares de triacilgliceroles con ACN de 24 a 54

Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001			
TAG (ACN:DB)	t_{RR}	t_{RR}	t_{RR}	t_{RR}	t_{RR}	t_{RR}	t_{RR}	Promedio	Desvest	CV (%)
C24:0	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	0,922	3,31E-04	3,59E-02
Colesterol (ISTD)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,00E+00	0,00E+00
C30:0	1,035	1,035	1,034	1,034	1,034	1,034	1,034	1,034	4,20E-04	4,06E-02
C36:0	1,132	1,132	1,132	1,131	1,131	1,131	1,131	1,132	4,70E-04	4,15E-02
C42:0	1,232	1,232	1,232	1,231	1,231	1,231	1,231	1,231	6,18E-04	5,02E-02
C48:0	1,391	1,391	1,390	1,389	1,389	1,388	1,389	1,389	1,04E-03	7,46E-02
C54:0	1,699	1,697	1,697	1,695	1,696	1,695	1,697	1,697	1,42E-03	8,38E-02

Tabla A5. Áreas de los picos cromatográficos para los estándares de los TAG con ACN 24 a 54

Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001
	Area	Area	Area	Area	Area	Area	Area
C24:0	949,145	606,161	476,693	219,481	111,474	47,126	22,382
Colesterol (ISTD)	91,489	90,691	97,926	94,326	115,530	92,413	96,499
C30:0	1017,839	649,139	510,477	234,528	129,140	50,212	23,861
C36:0	1018,879	647,957	509,851	233,454	131,012	49,784	23,681
C42:0	965,380	612,270	481,688	219,159	120,318	45,934	21,410
C48:0	810,833	512,623	402,038	181,321	100,002	37,456	17,158
C54:0	295,404		143,686	63,625	34,234	12,381	5,558

Tabla A6. Áreas relativas de los picos cromatográficos para los estándares de los TAG con ACN 24 a 54

Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001
Triacilglicerol	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$	$A_{relativa}$
C24:0	10,374	6,684	4,868	2,327	0,965	0,510	0,232
Colesterol (ISTD)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
C30:0	11,125	7,158	5,213	2,486	1,118	0,543	0,247
C36:0	11,137	7,145	5,207	2,475	1,134	0,539	0,245
C42:0	10,552	6,751	4,919	2,323	1,041	0,497	0,222
C48:0	8,863	5,652	4,106	1,922	0,866	0,405	0,178
C54:0	3,229		1,467	0,675	0,296	0,134	0,058

$$A_{Relativa} = A_{(i)}/A_{(ISTD)}$$

Tabla A7. Factores de respuesta (R_f)

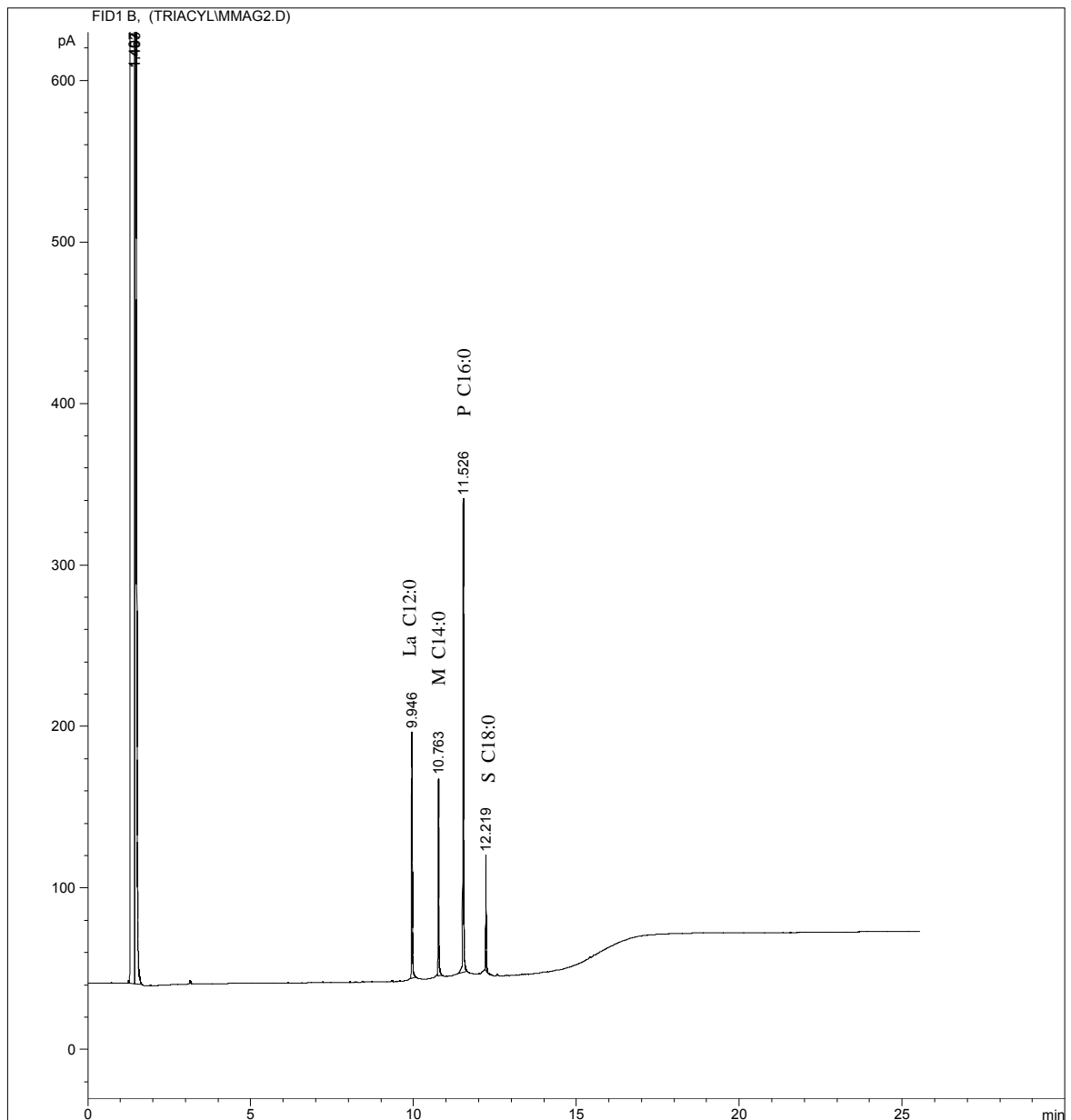
Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001
Triacilglicerol	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f
C24:0	7977,2	7277,9	8012,8	7378,6	7495,2	6337,2	30097,7
C30:0	8554,6	7794,0	8580,7	7884,5	8683,0	6752,3	32087,0
C36:0	8563,3	7779,8	8570,2	7848,4	8808,9	6694,6	31844,2
C42:0	8113,7	7351,3	8096,8	7367,8	8089,8	6176,9	28791,2
C48:0	6814,7	6154,9	6758,0	6095,7	6723,8	5036,8	23073,4
C54:0	2482,8		2415,2	2139,0	2301,8	1664,9	7474,1

Tabla A8. Factores de respuesta relativa (RR_f)

Concentración (mg/ml)	0,119	0,083	0,059	0,030	0,015	0,007	0,001			
	RR_f	RR_f	RR_f	RR_f	RR_f	RR_f	RR_f	Promedio	Desvest	CV (%)
C24:0	0,933	0,934	0,934	0,936	0,863	0,939	0,938	0,925	2,74E-02	2,96E+00
C30:0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,00E+00	0,00E+00
C36:0	1,001	0,998	0,999	0,995	1,014	0,991	0,992	0,999	7,72E-03	7,73E-01
C42:0	0,948	0,943	0,944	0,934	0,932	0,915	0,897	0,930	1,84E-02	1,97E+00
C48:0	0,797	0,790	0,788	0,773	0,774	0,746	0,719	0,769	2,77E-02	3,60E+00
C54:0	0,290		0,281	0,271	0,265	0,247	0,233	0,265	2,15E-02	8,13E+00

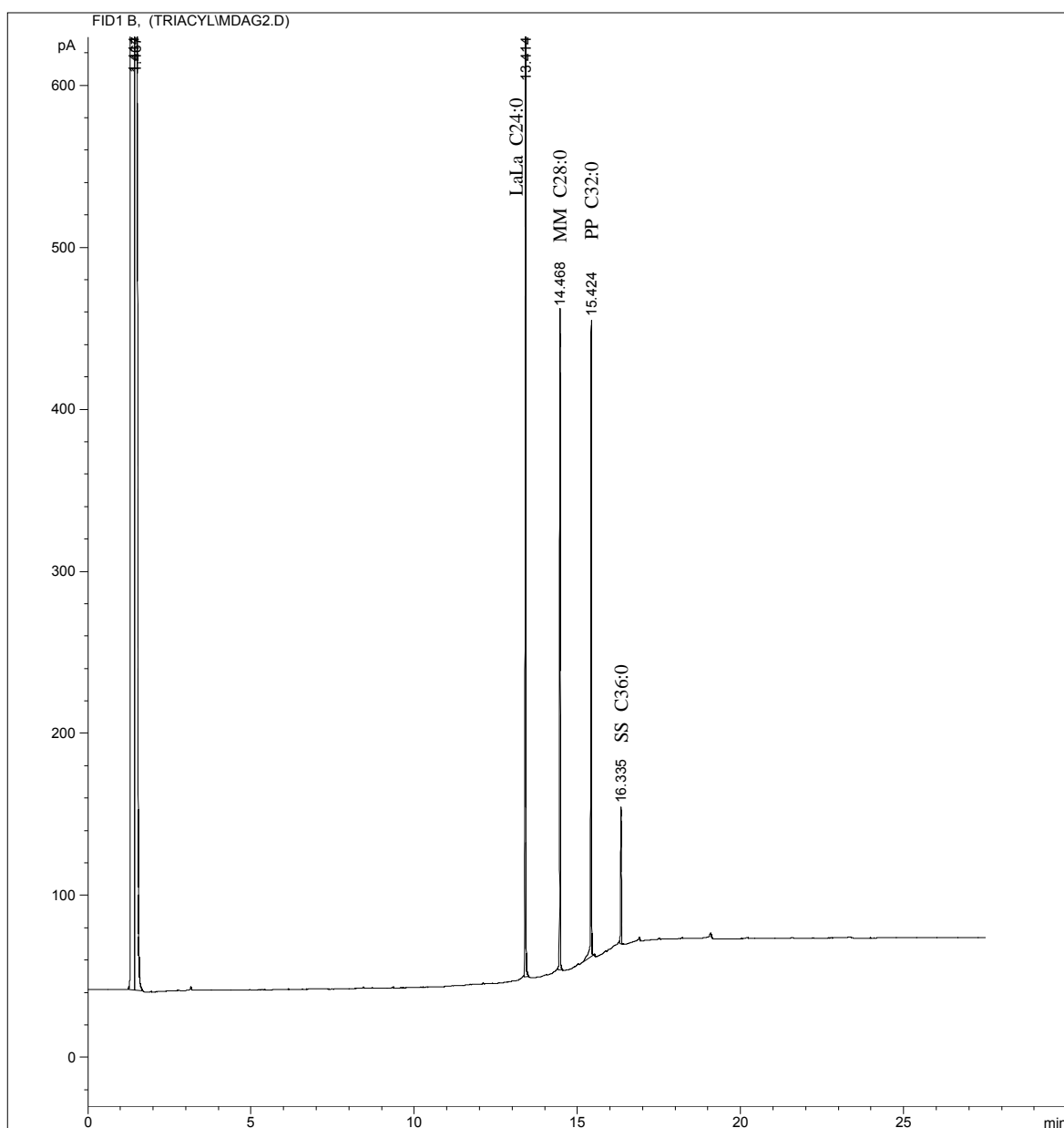
Anexo 1.4

Perfil cromatográfico de la mezcla patrón de monoalilgliceroles de los ácidos láurico La (C12:0), mirístico M (C14:0), palmítico P (C16:0) y esteárico S (C18:0), obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m, de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.



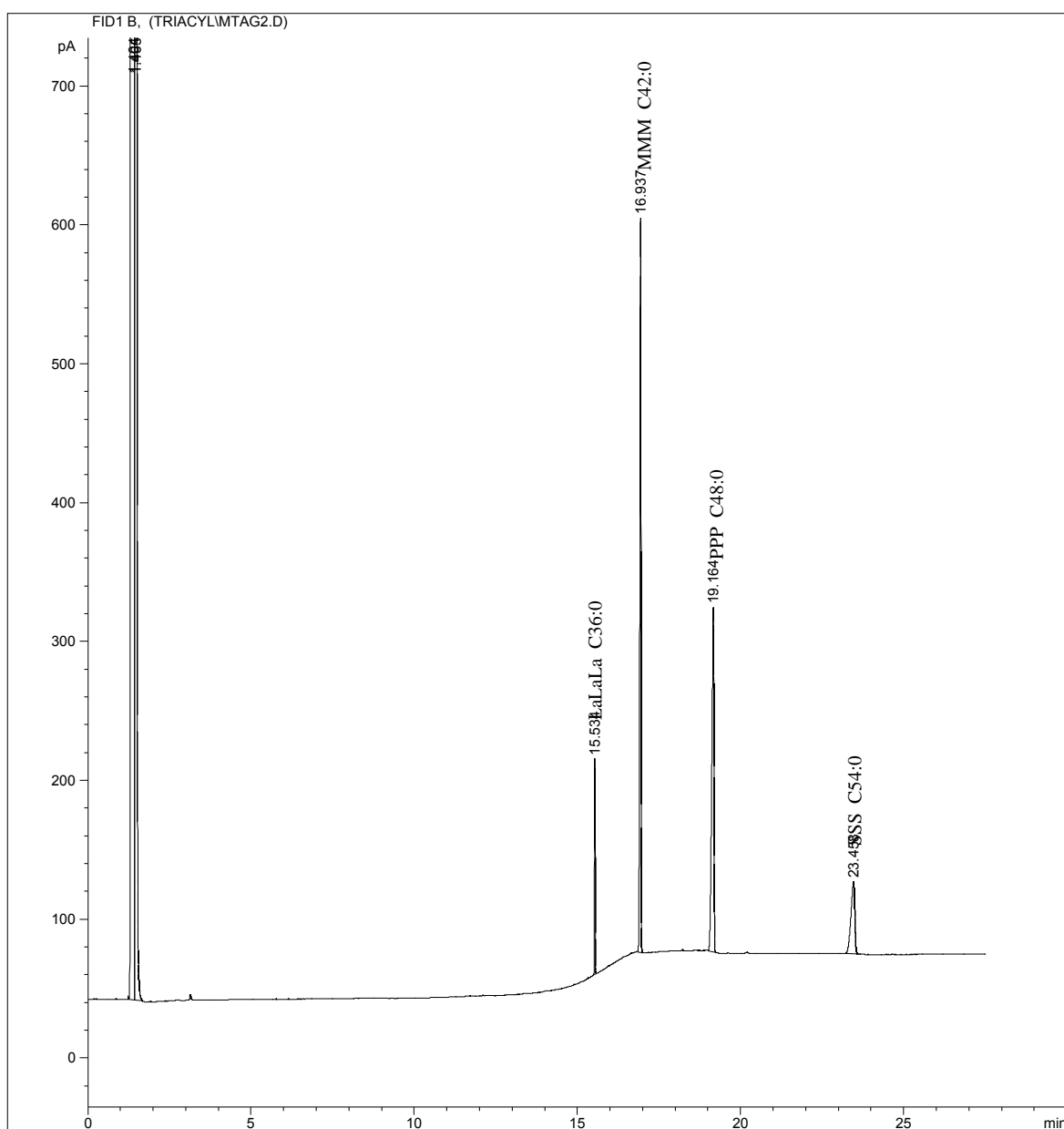
Anexo 1.5

Perfil Cromatográfico de la mezcla de diacilgliceroles del ácido láurico LaLa (C24:0), mirístico MM (C28:0), palmítico PP (C32:0) y esteárico SS (C36:0), obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m, de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.



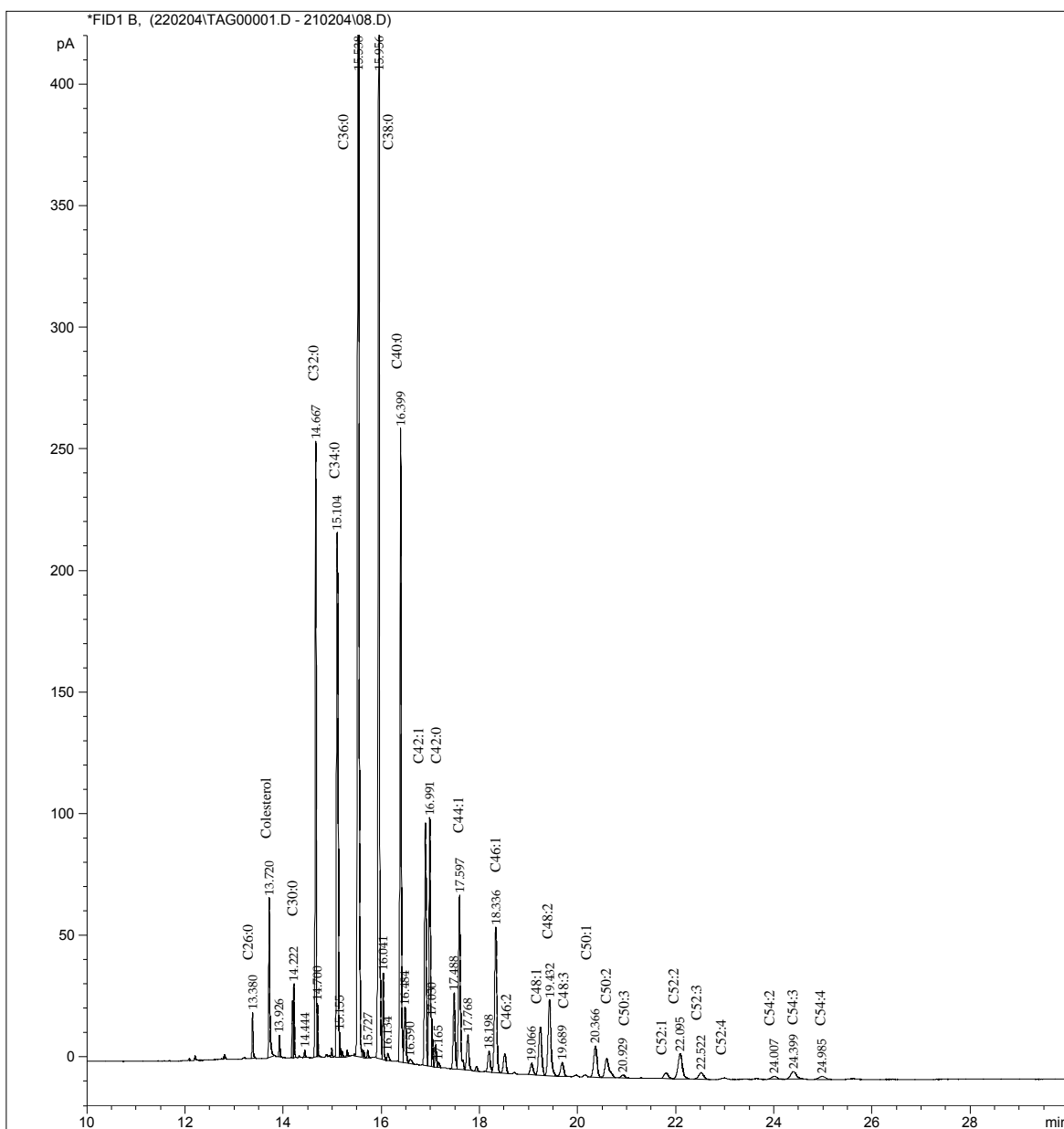
Anexo 1.6

Perfil cromatográfico de la mezcla de triacilgliceroles saturados trilaurila (LaLaLa, C36:0), trimiristina (MMM, C42:0), tripalmitina (PPP, C48:0) y triestearina (SSS, C54:0), obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μm , de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μl de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.



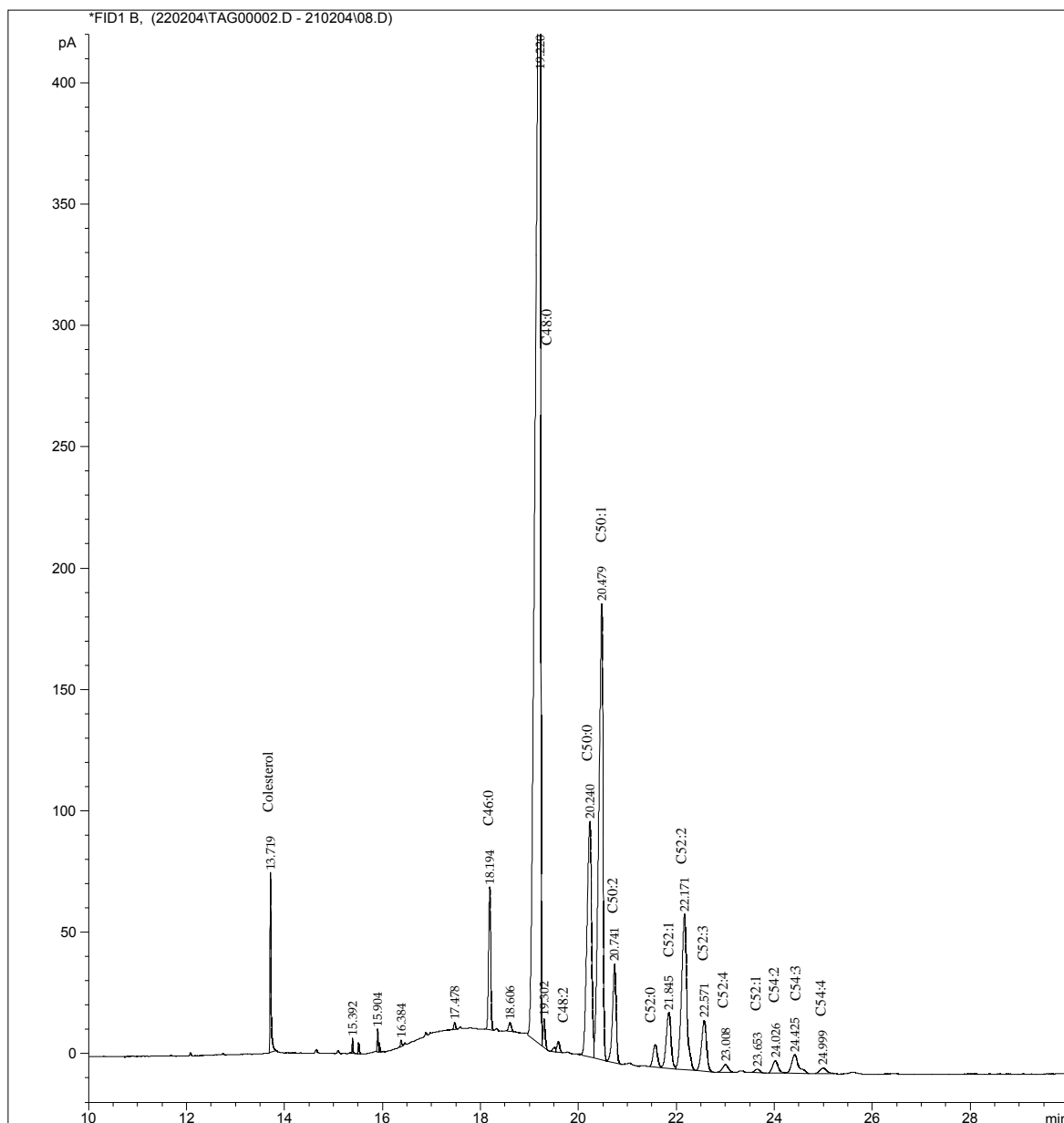
Anexo 1.7

Perfil cromatográfico del aceite de palmiste, obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m, de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.



Anexo 1.8

Perfil cromatográfico de la superestearina de palma, obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m, de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.



Anexo 1.9

Perfil cromatográfico del aceite de soya, obtenido por HTGC. GC/FID. Columna: MXT-65TG (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m, de alta temperatura). Horno: 240°C (1 min) a 360°C a 8°C/min, mantener 17 min. Inyección: 0.5 μ l de solución de analito en n-hexano *On-column*. FID a 370 °C, Nitrógeno como gas *make up* a 30 ml/min.

