

Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática del aceite de soja y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado

Por Nelson Moreno Safra y Aide Perea Villamil*

Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA
Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.
Calle 9 con carrera 27. Bucaramanga - Colombia
Mail de contacto: aperea@uis.edu.co

RESUMEN

Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática del aceite de soja y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado.

Se evaluó la síntesis enzimática de lípidos estructurados por transesterificación de aceite de soja con aceite de palmiste en un reactor de lecho empacado (PBR) con capacidad para 500 gramos de enzima, utilizando como catalizador Lipozyme RM-IM. La mezcla de sustratos se hizo pasar a través del lecho de enzima a 70 °C y diferentes flujos de aceite. A un flujo de 9.36 kg aceite/kg enzima/h se alcanzó un grado transesterificación de 19.6% con una productividad máxima calculada de 2344 kg aceite/kg enzima. Los triacilglicerolos que se formaron en mayor proporción fueron el C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4. El análisis estereoespecífico de la mezcla grasa antes y después de la transesterificación indicó baja migración de grupos acilo. Los productos obtenidos pueden tener aplicación en la formulación de emulsiones lipídicas para nutrición enteral y parenteral y en la industria de alimentos.

PALABRAS CLAVE: Lipasa – Lípidos estructurados – Lipozyme – Reactor lecho empacado – RM-IM.

SUMMARY

Production of structured lipids by enzymatic transesterification of soybean oil and palm kernel oil in a packed-bed reactor.

Enzymatic synthesis of structured lipids by transesterification of soybean oil with palm kernel oil was evaluated in a packed-bed reactor with a capacity for 500g of enzyme loading. Lipozyme RM-IM was used as catalyst. Substrate blends were passed through the enzyme bed at different flow rates. Transesterification reached a level of 19.6%, with a maximum calculated productivity of 2344 kg of transesterified oil/kg of immobilized enzyme, a flow rate of 9.36 kg oil/kg enzyme/h. The triacylglycerols formed in major proportion were C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 and C50:4. Stereospecific analysis of the fat before and after transesterification shows a slight migration of acyl groups. The products obtained by this technology can be applied in the formulation of lipid emulsions for enteral and parenteral nutrition and the food industry.

KEY-WORDS: Lipase – Lipozyme – Packed-bed reactor – RM-IM – Structured lipids.

1. INTRODUCCIÓN

Los lípidos estructurados (SL) son triacilglicerolos (TAG) modificados en la composición de sus ácidos grasos (FA) y su distribución en las moléculas de glicerol, por reacciones de interesterificación química o enzimática. Algunos de estos lípidos se pueden clasificar como alimentos funcionales o nutraceuticos por estar directamente asociados a la prevención o tratamiento de diversas enfermedades (Lai y Chen, 2000; Waitzberg *et al.*, 2006; Wanten y Calder, 2007). La mayoría de ellos combinan FA de cadena media con FA de cadena larga en una misma molécula de glicerol, en tanto que otros combinan FA del mismo tamaño pero diferente grado de insaturación. Estos lípidos presentan propiedades físicas, químicas o fisiológicas que difieren significativamente de las grasas y aceites naturales y es posible sintetizarlos empleando lipasas inmovilizadas que actúan en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 o en la *sn*-2 de los TAG (Carrín y Crapiste, 2008; Chen *et al.*, 2007; Osborn y Akoh, 2002; Iwasaki y Yamane, 2000; Xu *et al.*, 2000).

Las enzimas inmovilizadas permiten trabajar en reactores continuos tipo lecho empacado (PBR), con una caída de presión mínima a altas velocidades de flujo, además de lograr la reutilización eficiente del sistema biocatalítico (Corredor y Caicedo, 2005). En los reactores PBR, al entrar el sustrato en contacto con gran cantidad de enzima, el tiempo de reacción es menor comparado con el de los reactores discontinuos, de forma que al utilizar lipasas inmovilizadas *sn*-1,3 específicas, se limita la migración de grupos acilo que reducen la pureza de triacilglicerolos producidos (Nielsen *et al.*, 2006).

Entre las lipasas *sn*-1,3 específicas empleadas en la producción de lípidos estructurados en reactor PBR se encuentran la lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) evaluada con éxito por Fomuso y Akoh (2002), Kim y Akoh (2002), Camacho *et al.* (2002), Lai *et al.* (2005), Nielsen *et al.* (2006) y la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL-IM) evaluada por Xu *et al.* (2002) y Rønne *et al.* (2005). En estos trabajos se estableció que el gra-

do de reacción esta influenciado por el tipo de catalizador, el tiempo de residencia del aceite, la temperatura de reacción, la naturaleza de los sustratos y el solvente cuando se usa.

Los autores mencionados han utilizado como materias primas diferentes aceites vegetales y ácidos grasos puros, y sus investigaciones se han centrado en el estudio de reacciones de acidólisis generalmente dirigidas hacia la incorporación de ácidos grasos de cadena media y de cadena corta.

En el presente trabajo se evaluó la producción de lípidos estructurados en un reactor de lecho empacado, mediante una reacción de transesterificación enzimática de aceite de soja y aceite de palmiste, utilizando como catalizador la lipasa comercial Lipozyme RM-IM, en ausencia de solvente. Se midió también la especificidad y productividad de la enzima y se caracterizaron los productos obtenidos para establecer sus aplicaciones potenciales.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Materias primas y reactivos

El aceite de palmiste (PKO) y el aceite de soja (SBO) fueron suministrados por la empresa C.I. Sa-ceites S.A (Bucaramanga, Colombia). Los reactivos grado analítico se obtuvieron de Merck.

Catalizadores: La enzima Lipozyme RM-IM, una lipasa 1,3-específica de *Rhizomucor miehei*, lote LUX00115 fue suministrada por Novozymes S.A. (Brasil) y la lipasa 1,3-específica de *Mucor miehei* Lipozyme Fluka 62350 lote LM70783 por Sigma-Aldrich (EE. UU).

2.2. Procedimiento general de la reacción

En todos los ensayos se utilizó un reactor de lecho empacado para 500 g de enzima construido en vidrio, que consistió de un cilindro de doble pared, de 10 cm de diámetro interno por 15 cm de altura con un tabique poroso en la parte inferior para retener la enzima y permitir el flujo de aceite. La mezcla de sustratos 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 compuesta por 60% de aceite de soja y 40% de aceite de palmiste (SBO:PKO 60:40 p/p) a 70 °C a través de la columna de enzima a diferentes flujos. El grado de transesterificación (GT) obtenido, se cuantificó como la sumatoria de la concentración de los TGA C42:2+C44:2+C46:2+C48:2+C48:3+C48, TGA esperados mayoritariamente, de acuerdo a la predicción teórica del intercambio de ácidos grasos del aceite de soja y el aceite de palmiste. Adicionalmente se midió el grado de hidrólisis (GH) de la reacción, por la implicación que tiene la generación de ácidos grasos libres cuya separación posterior repercute en los costos de producción (Moreno, 2008). En todos los casos los productos obtenidos se caracterizaron

en cuanto a composición en acilgliceroles. Al producto obtenido en las condiciones de proceso seleccionadas se le realizó la caracterización estructural de los TGA, el perfil de fusión, el punto de fusión y el contenido de ácidos grasos.

2.3. Determinación de la productividad de la enzima

Para determinar la productividad de la lipasa Lipozyme RM-IM en el reactor PBR, se hizo pasar la mezcla de aceites SBO:PKO 60:40 p/p a través del lecho de la enzima a una temperatura de reacción de 70 °C y un flujo de 9.3 kg aceite/kg enzima/h. Se tomaron muestras del efluente a intervalos apropiados de tiempo durante la operación del reactor y se midieron los contenidos de grasa sólida (SFC) para cuantificar la pérdida de actividad.

2.4. Determinaciones analíticas

Análisis de acilgliceroles. El análisis de acilgliceroles de sustratos y productos de interesterificación se efectuó por cromatografía de gases de alta temperatura HTGC según el procedimiento descrito por Buchgraber *et al.* (2004), utilizando un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Series GC System* (Palo Alto, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización de llama y una columna capilar MXT-65TG (Cat. 17008, Restek Corporation., EE.UU.) (30 m x 0,25 mm, D.I. x 0.1 µm, df). La temperatura del horno se programó desde 240 °C (1 min) hasta 360 °C a 8 °C/min, la del detector se mantuvo en 370 °C. El gas de arrastre empleado fue helio (99,995%), a un flujo de 40 cm/s y el gas *make up* nitrógeno a 30 ml/min. El inyector *Split* se mantuvo en 370 °C y el volumen de inyección fue 1.0 µl de solución de TAG. La identificación de los TAG se realizó por comparación directa de sus tiempos de retención con un patrón de triacilgliceroles (Triglyceride Mix, 17811-1AMP de Sigma Chemical Co. EE.UU.) y los triacilgliceroles componentes de los aceites de referencia para palmiste (Coconut oil Supelco Cat. N° 47112-U) y soja (Soybean oil Supelco Cat. N° 47122). La cuantificación se realizó por el método del estándar interno, utilizando colesterol.

Análisis de ácidos grasos – formación de ésteres metílicos (FAME). La composición en ácidos grasos se determinó por cromatografía de gases, con un equipo *Agilent Technologies 6890 Series GC System* (Palo Alto, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización de llama y una columna capilar DB-WAX (30 m x 0,32mm, D.I. x 0.25µm, df). La temperatura del horno se vario desde 50 °C (2 min) hasta 250 °C (10 min) a 12 °C/min. La temperatura del detector fue 300 °C. El gas de arrastre empleado fue helio (99,995%), a un flujo de 40 cm/s y el gas *make up* nitrógeno a 30 ml/min. El inyector *Split* (10:1) se mantuvo en 250 °C y el volumen de inyección fue 1.0 µl. La identificación de los metilésteres de ácidos grasos se realizó por com-

paración directa de sus tiempos de retención con un patrón de FAME (*Fatty Acid Methyl Ester Mix* SUPELCO Cat. N° 18918-1). La cuantificación se realizó por el método del estándar interno, utilizando tridecano. Con anterioridad al análisis por cromatografía de gases, los ácidos grasos se transformaron en sus correspondientes metilésteres usando el método del KOH en metanol (IUPAC Method 2.301, 1987).

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 y cuantificarlos posteriormente por cromatografía de gases.

Para la preparación de los butilésteres, en un tubo de ensayo se adicionaron 200 mg del analito, 500 µl de n-butanol y 250 mg de la enzima Lipozyme IM20. La mezcla se dejó reaccionar durante 20 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos. Posteriormente, se extrajo con 5 ml de hexano y la fase orgánica se lavó con 2,0 ml de solución saturada de NaCl y luego con 2,0 ml de agua. Finalmente, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se diluyó a 5,0 ml con hexano. De ésta solución se inyectó 1 µl directamente al cromatógrafo de gases y la separación de los butilésteres se efectuó bajo las condiciones utilizadas para la elución de los FAME.

Análisis estereoespecífico. La cuantificación de los ácidos grasos ubicados en la posición *sn*-2 de los TAG, se obtuvo aplicando la ecuación 1:

$$FA(sn-2) = 3*FA(sn-1,2,3)-2*FA(sn-1,3) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde, FA (*sn*-1,3) son los ácidos grasos ubicados en las posiciones *sn*-1,3 de los TAG y corresponden a la composición (% mol) de los butilésteres hallada por cromatografía de gases, en tanto que FA (*sn*-1,2,3) corresponde a los ácidos grasos de las posiciones *sn*-1,2,3 cuantificados como metilésteres (% mol) por GC.

Contenido de grasa sólida (SFC). El contenido de grasa sólida de la mezcla antes y después de la transesterificación se determinó por resonancia magnética nuclear (RMN) de baja resolución según el método AOCS Cd 16b-93 (1996) utilizando el equipo de RMN Minispec mq-20 Mhz, Bruker. (Rheinstetten, Germany). Para este análisis las grasas se atemperaron a 70 °C (7 min) seguido de un enfriamiento a 0 °C (60 min) y 30 minutos a la temperatura a la cual se hace la medición.

Grado de hidrólisis (GH). Se determinó a partir del índice de acidez (método AOCS Ca 5a-40) de la mezcla grasa antes y después de la reacción de transesterificación y del índice de saponificación (método AOCS Cd 3-25) de la mezcla grasa aplicando la siguiente ecuación:

$$GH (\%) = ((IA_{final} - IA_{inicial}) / (IS - IA_{inicial})) * 100 \quad \text{Ec. 2.}$$

Donde: IA_{inicial} = Índice de acidez de la mezcla grasa sin transesterificar

IA_{final} = Índice de acidez de la mezcla grasa transesterificada

IS = Índice de saponificación de la mezcla grasa

3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta la composición en triacilgliceroles del aceite de palmiste, aceite de soja y la mezcla inicial de reacción constituida por 60 % de aceite de soja y 40 % de aceite de palmiste. El aceite de palmiste está conformado por los TAG con número de carbono (CN) y dobles enlaces (DB) que varían entre C26:0 y C50:2 y el aceite de soja por TGA que varían entre C50:1 y C54:7. Los principales TAG componentes del aceite de palmiste son C32:0, C34:0, C36:0, C38:0 y C40:0 que en conjunto suman el 26 % de la mezcla de reacción, en tanto que los principales componentes del aceite de soja son C54:6, C54:5, C54:4 y C52:4 que representan el 47 % de la mezcla SBO:PKO.

Al hacer pasar la mezcla de sustratos (SBO:PKO 60:40 p/p) a través del reactor PBR, ocurrió un intercambio entre los ácidos grasos de los TAG componentes del aceite de palmiste y del aceite de soja que condujeron a la formación de los lípidos estructurados. Este intercambio (tabla 2), el grado de interesterificación y el grado de hidrólisis alcanzados (figura 1) variaron con el flujo del aceite. El mayor valor de GT (22,14 %) se logró con un flujo de 4.36 kg aceite/kg enzima/h. A flujos menores la reacción de transesterificación se acerca al equilibrio en tanto que la reacción de hidrólisis continúa, disminuyendo el rendimiento de TAG, además, el tiempo de proceso se hace mayor conduciendo a mayores costos. A un flujo de 9,36 kg aceite/kg enzima/h el grado de transesterificación fue 2.4 % más bajo, pero el tiempo de proceso se redujo a la mitad, permitiendo duplicar la productividad de la enzima. En el rango de flujos evaluados el grado de hidrólisis fue bajo y sus valores oscilaron entre 0.57-0.89 %.

En cuanto al cambio en la composición de TGA con el flujo del aceite (Tabla 2) en todos los casos se observó una tendencia similar basada en la disminución de la concentración de los TAG saturados C32:0 a C40:0 componentes del aceite de palmiste y los TAG poliinsaturados C52:2 a C54:7 componentes del aceite de soja, y el aumento principalmente en la concentración de los TAG C42:1, C42:2, C44:2, C44:1, C46:1, C46:2, C48:2, C48:3 y C48:4, C50:3 y C50:4, ausentes o presentes en baja concentración en la mezcla inicial de reacción. A este nuevo grupo de TAG se les conoce como lípidos estructurados.

Análisis estereoespecífico de los lípidos estructurados obtenidos.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación de la especificidad de Lipozyme RM IM

Tabla 1
**Triacilgliceroles componentes de las materias primas y la mezcla
 de reacción SBO:PKO 60:40 p/p.**

Flujo*	Aceite de soja	Aceite de palmiste	Mezcla Inicial
TAG ACN:DB	%(p/p)	%(p/p)	%(p/p)
C26:0	nd	0,5	0,2
C28:0	nd	0,2	0,1
C30:0	nd	1,4	0,5
C32:0	nd	7,2	2,8
C34:0	nd	9,2	3,7
C36:0	nd	22,6	9,1
C38:0	nd	16,7	6,7
C40:0	nd	9,8	3,9
C40:1	nd	1,6	0,4
C40:2	nd	0,4	0,1
C42:0	nd	4,0	1,6
C42:1	nd	4,2	1,7
C42:2	nd	0,4	0,2
C42:3	nd	nd	nd
C44:0	nd	1,5	0,6
C44:1	nd	3,4	1,4
C44:2	nd	0,8	0,3
C44:3	nd	0,1	nd
C46:0	nd	0,5	0,2
C46:1	nd	3,4	1,4
C46:2	nd	0,6	0,2
C48:0	nd	0,3	0,1
C48:1	nd	1,6	0,7
C48:2	nd	2,5	1,0
C48:3	nd	0,5	0,2
C50:0	nd	nd	nd
C50:1	0,9	1,3	1,1
C50:2	1,8	1,1	1,5
C50:3	nd	0,2	0,1
C50:4	nd	nd	nd
C52:1	0,5	0,4	0,5
C52:2	4,0	2,0	3,2
C52:3	8,1	0,7	5,2
C52:4	13,2	nd	7,9
C54:1	2,6	nd	1,6
C54:2	1,6	0,6	1,2
C54:3	6,7	nd	4,7
C54:4	13,8	0,7	8,6
C54:5	20,5	nd	12,3
C54:6	22,9	nd	13,8
C54:7	3,3	nd	2,0

nd: no detectable

Tabla 2
**Variación de la concentración de los TAG componentes de la mezcla SBO:
 PKO 60:40 p/p, en reactor PBR a diferentes flujos de aceite.**

Flujo*	Mezcla inicial	2,05	4,36	9,36	15,65	32,48
TAG ACN:DB	%(p/p)	%(p/p)	%(p/p)	%(p/p)	%(p/p)	%(p/p)
C26:0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2
C28:0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2
C30:0	0,5	1,0	0,9	0,5	0,5	0,8
C32:0	2,8	0,8	0,8	0,7	0,7	1,2
C34:0	3,7	0,9	0,3	0,4	0,5	0,8
C36:0	9,1	1,8	1,7	1,9	2,3	3,9
C38:0	6,7	1,2	1,3	1,5	1,7	2,6
C40:0	3,9	2,3	2,3	2,2	2,3	2,6
C40:1	0,4	1,1	0,8	0,8	0,7	0,7
C40:2	0,1	0,8	0,9	0,8	0,7	0,6
C42:0	1,6	2,0	1,6	1,6	1,5	1,6
C42:1	1,7	3,3	3,2	2,8	2,6	2,4
C42:2	0,2	4,3	4,0	3,5	3,2	2,2
C42:3	nd	0,6	0,4	0,4	0,4	0,2
C44:0	0,6	1,6	1,3	1,2	1,2	1,0
C44:1	1,4	1,7	1,6	1,6	1,7	1,4
C44:2	0,3	2,9	2,5	2,3	2,2	1,6
C44:3	nd	1,0	0,9	0,8	0,9	0,5
C46:0	0,2	1,6	1,7	1,5	1,5	0,9
C46:1	1,4	2,9	3,2	2,9	2,8	2,2
C46:2	0,2	4,1	4,2	3,9	3,6	2,4
C46:3	nd	0,6	1,1	0,9	1,0	0,3
C48:0	0,1	0,3	0,5	0,4	0,6	0,3
C48:1	0,7	1,1	1,6	1,5	1,5	1,1
C48:2	1,0	3,6	4,1	3,8	3,5	2,6
C48:3	0,2	5,0	5,3	4,6	4,1	3,0
C48:4	nd	3,8	4,0	3,6	3,2	2,4
C50:1	1,1	1,5	1,5	1,7	1,6	1,4
C50:2	1,5	1,6	1,7	1,8	1,7	1,6
C50:3	0,1	1,3	1,3	1,3	1,2	0,8
C50:4	nd	1,0	1,0	1,1	0,9	0,7
C52:1	0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,8
C52:2	3,2	1,8	1,9	2,4	2,6	3,0
C52:3	5,2	3,7	3,7	4,3	4,3	4,4
C52:4	7,9	3,3	3,3	4,1	4,3	5,1
C54:1	1,6	0,0	0,0	0,8	0,9	1,1
C54:2	1,2	0,6	0,7	1,3	0,9	1,1
C54:3	4,7	2,4	2,5	3,3	3,3	3,8
C54:4	8,6	4,9	5,0	6,1	6,5	7,2
C54:5	12,3	6,2	6,2	7,5	8,4	9,6
C54:6	13,8	3,5	3,4	5,0	6,2	8,3
C54:7	2,0	0,9	1,2	1,3	1,3	1,6

* kg aceite/kg enzima/h

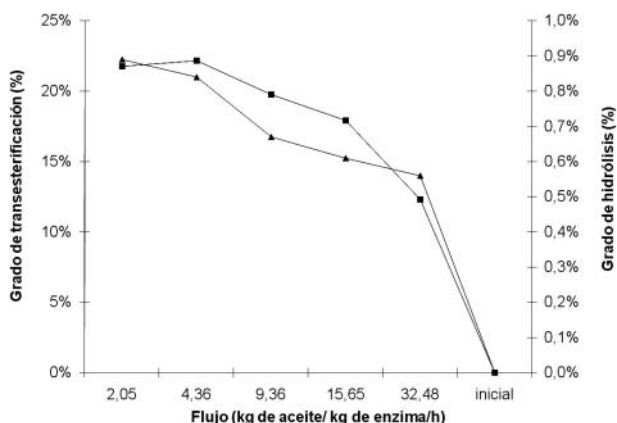


Figura 1

Efecto del flujo de aceite sobre el grado de transesterificación (-■-) y el grado de hidrólisis (-▲-) de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p tratada con Lipozyme RM-IM, en un reactor PBR.

Tabla 3
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

Ácido Graso	Mezcla inicial			Mezcla transesterificada	
	sn-1,2,3	sn-1,3	sn-2**	sn-1,3	sn-2**
CN:DB*					
C6:0	0,4	0,3	0,6	0,3	0,6
C8:0	3,8	5,6	0,3	5,1	1,3
C10:0	2,6	3,0	1,7	2,8	2,1
C12:0	26,7	29,3	21,5	28,6	22,9
C14:0	7,1	8,0	5,3	8,3	4,6
C16:0	10,0	13,4	3,1	14,2	1,5
C18:0	3,0	3,9	1,0	4,3	0,2
C18:1n9c	15,5	12,7	21,0	11,9	22,5
C18:2n6c	27,0	20,1	40,8	20,4	40,2
C18:3n3	3,7	3,2	4,8	3,1	5,0
C20:0	0,3	0,5	0,0	0,7	0,1

*CN:DB: Número de carbono : número de dobles enlaces
** Resultado matemático (Ver ecuación 1).

en un reactor PBR, para lo cual se analizaron 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. Los resultados allí consignados indican que Lipozyme RM-IM exhibió alta especificidad por las posiciones sn-1,3 de los TAG,

al tiempo que la composición de los ácidos grasos ubicados en la posición sn-2 se mantuvo aproximadamente igual, lo que significa que la migración de grupos acilo en este sistema de reacción fue menor a la observada al utilizar un sistema en discontinuo reactor de tanque agitado (datos no mostrados) (Moreno, 2008). Autores como (Nielsen *et al.*, 2006) han encontrado que en el reactor PBR la migración de los grupos acilo disminuye.

La alta especificidad exhibida por Lipozyme RM-IM en el reactor PBR es importante para la síntesis de lípidos con propiedades funcionales definidas, en donde se desee preservar los FA insaturados presentes en la posición central de la molécula, cambiando sólo los FA presentes en las posiciones primarias (sn-1,3) de los acilglicéridos.

Productividad de la enzima. Para calcular la productividad de la enzima en un reactor PBR es necesario conocer previamente la pérdida de actividad residual de la misma. De acuerdo a Novozymes (2004), la pérdida de actividad de la enzima en este tipo de reactores puede determinarse como una función del tiempo de operación, combinando los datos obtenidos en la operación en discontinuo en un reactor de tanque agitado y los obtenidos de la operación del reactor de lecho empacado.

En este caso, la relación utilizada para calcular la actividad residual de la enzima inmovilizada Lipozyme RM IM (α) en el reactor PBR al tiempo t_p fue la mostrada en la ecuación 3:

$$\alpha_{(t_p)} = \frac{F_p}{w_p} * \frac{1}{k} * \ln \left(\frac{\Delta A}{\Delta A + A_0 - sfc} \right) \quad \text{Ec. 3}$$

Donde: $k = 0.7552$, $A_0 = 11.2912$ y $\Delta A = -8.8020$ son las constantes obtenidas de la reacción de transesterificación en reactor de tanque agitado (Moreno, 2007).

- W_p = cantidad de enzima en el reactor PBR (0.5 kg)
- F_p = flujo másico de aceite (0.775 kg.min⁻¹)
- t_p = tiempo desde el inicio del reactor PBR
- sfc = SFC al tiempo t_p

A partir de los datos experimentales se calculó la actividad residual de Lipozyme RM-IM y se relacionó con el tiempo de reacción (durante 32 días) como se muestra en la figura 2, observándose que el modelo que se ajusta a los datos obtenidos, corresponde a una cinética de primer orden (ecuación 4) que es función del tiempo de vida media observado ($t_{1/2}$).

$$\alpha(t_p) = \alpha_0 * \exp \left(\frac{-\ln(2) * t_p}{t_{1/2}} \right) \quad \text{Ec. 4}$$

- Donde: α_0 = actividad residual estimada en el tiempo cero
- $t_{1/2}$ = tiempo de vida medio estimado

Del ajuste de los datos experimentales se obtienen los valores de α_0 y $t_{1/2}$ donde $\alpha_0 = 47,65\%$ y

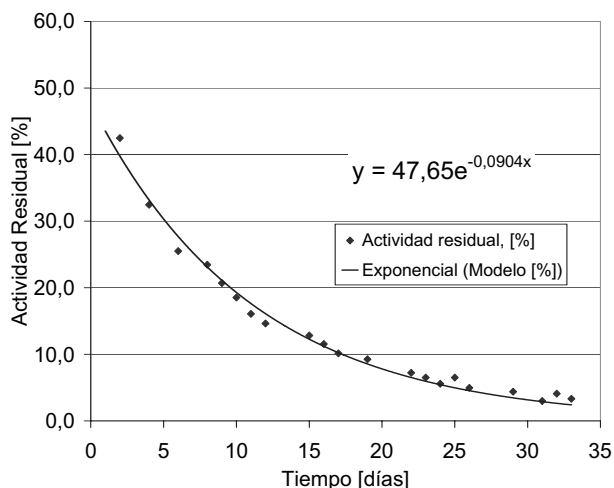


Figura 2

Actividad residual (-u-) calculada y predicha por el modelo exponencial para la transesterificación de la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p en reactor PBR con Lipozyme RM-IM

$t_{1/2} = 7,67$ días. Estos valores se emplean para calcular la productividad (P) de la Lipasa RM IM definida como “la cantidad total de aceite transesterificado hasta cuando la actividad residual de la enzima en el reactor PBR ha alcanzado el 5% del valor inicial”, usando la ecuación 6:

$$P(\alpha = 5\%) = \int_{t_0}^{t_i} F_p \cdot \frac{\alpha(t_p)}{\alpha_0} \cdot dt_p \quad \text{Ec. 6}$$

Reemplazando la ecuación 4 en la ecuación 6 se tiene:

$$P(\alpha = 5\%) = \int_{t_0}^{t_i} F_p \cdot \exp\left(\frac{-\ln(2) \cdot t_p}{t_{1/2}}\right) \cdot dt_p \quad \text{Ec. 7}$$

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).
 $t_{1/2} = 7.67$ días.

Así desarrollando la integral se encuentra un valor para $P(\alpha = 5\%)$ de 2344 kg aceite transesterificado/kg enzima. Este dato indica que con el sistema SBO:PKO (60:40 p/p) y Lipozyme RM-IM en reactor PBR se logró una productividad superior a la alcanzada para el mismo sistema en un reactor de tanque agitado, en el cual el valor de $P(\alpha = 5\%)$ fue de 1200 kg aceite transesterificado/kg enzima (Moreno, 2007).

Caracterización de productos de reacción.

Los productos de reacción fueron caracterizados respecto a contenido de TGA, ácidos grasos, contenido de grasa sólida y punto de fusión (Tabla 4). Se encontró que la mezcla SBO:PKO 60:40 p/p transesterificada por ser líquida a temperatura ambiente y por su composición en TGA se podría utili-

Tabla 4
Contenido de grasa sólida y punto de fusión de la mezcla de reacción SBO:PKO 60:40 p/p, antes y después de la transesterificación (Reactor PBR, flujo 9.3 kg aceite/kg enzima/h)

Mezcla inicial	Mezcla transesterificada
SFC* (%) / temperatura (°C)	SFC (%) / temperatura (°C)
28.8 (5)	20.5 (5)
20.3 (10)	9.8 (10)
12.1 (15)	2.4 (15)
4.0 (20)	0.0 (20)
Punto de fusión: 21.5 °C	14.5-15.0 °C

*SFC: contenido de grasa sólida / temperatura de análisis

zar en la producción de emulsiones lipídicas para nutrición por vía enteral o parenteral. De acuerdo a D’Agostini *et al.* (2001), los lípidos estructurados que contienen en su estructura ácidos grasos de cadena media y ácidos grasos esenciales como son los obtenidos en este estudio, pueden utilizarse para el tratamiento de deficiencias de absorción de grasas y dificultades metabólicas relacionadas con fibrosis cística, cirrosis y anorexia así como en la preparación de formulaciones parenterales para pacientes que van a ser sometidos a cirugías o que padecen desnutrición severa. Estas emulsiones además, no presentan los problemas de toxicidad de las emulsiones fabricadas sólo con triacilglicérols de cadena media (Illis *et al.*, 1998).

Las mezclas de SBO:PKO transesterificadas preservaron asimismo los ácidos grasos esenciales Omega-6 y Omega-3 en la posición central de los TAG, en tanto que los ácidos grasos de cadena media se ubicaron preferentemente en las posiciones primarias, (Tabla 3). Esto permite que una vez hidrolizados de las posiciones primarias los ácidos grasos de cadena media, queden los ácidos grasos esenciales en forma de *sn*-2 monoacilglicérols, forma en que mejor son absorbidos por el organismo para evitar la aparición del síndrome de carencia de ácidos grasos esenciales. De otra parte, la relación Omega-6/Omega-3 en la posición *sn*-2 de los TAG formados 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).

En la industria de alimentos los productos obtenidos pueden ser utilizados 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 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).

El sistema de reacción evaluado en este trabajo no ha sido previamente reportado.

4. CONCLUSIONES

La transesterificación de aceite de soja con aceite de palmiste (60:40 p/p) en un reactor PBR utilizando Lipozyme RM-IM como catalizador permite la obtención de lípidos estructurados con TAG mayoritariamente constituidos por C40:2, C42:2, C42:3, C44:2, C44:3, C50:3 y C50:4, con aplicación potencial en la preparación de emulsiones lipídicas para uso terapéutico y como aceite de cocina saludable.

El biocatalizador utilizado Lipozyme RM-IM permite alcanzar una productividad de 2344 kg aceite transesterificado/kg enzima cuando se opera el reactor PBR a un flujo de 9.3 kg aceite/kg enzima/h, con baja migración de grupos acilo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Comercializadora Internacional Santandereana de Aceites S.A. por el préstamo de sus instalaciones para los ensayos a escala de planta piloto.

BIBLIOGRAFÍA

- Buchgraber M, Ulbert F, Anklam E. 2004. Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography. *J. Chromatog. A*. **1036** (2) 197-203
- Camacho B, Robles M, Camacho F, *et al.* 2002. 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. *Chem. Eng. Sci.* **57**, 1237-1249.
- Carrín ME, Crapiste GH. 2008. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture. *J. Food Eng.* **84** (2) 243-249.
- Chen CW, Chong CL, Ghazali HM, *et al.* 2007. Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. *Food Chem.* **100** (1) 178-191.
- Corredor D, Caicedo LA. 2005. Modelos matemáticos para reactores biológicos de lecho empacado (PBR): Una revisión bibliográfica. *Ing. Investig.* **25** (3) 101-110.
- D'Agostine D, Ferraz RC, Gioielli LA, *et al.*, 2001. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación de las mezclas binarias y ternarias de las grasas de palma, semilla de palma y triglicéridos de cadena media. *Grasas y Aceites* **52** (3-4) 214-221.
- Dourtoglou T, Stefanou E, Lalas S, *et al.* 2001. Regioespecific analysis of fatty acids in triacylglycerols with GC usin 1,3-specific lipase in butanol. *Analyst.* **126**, 1032-1036.
- Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Res. Int.* **35**, 15-21.
- IUPAC. 1987. 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.
- Iwasaki Y, Yamane T. 2000. Enzymatic synthesis of structural lipids. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **10**, 129-140.
- Kim BH, Akoh CC. 2002. Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor. *J. Agric. Food Chem.* **54** (14) 5132-5141.
- Lai H, Chen W. 2000. Effects of medium-chain and long-chain triacylglycerols in pediatric surgical patients. *Nutrition.* **16** (6) 401-406.
- Lai OM, Low CT, Akoh CC. 2005. Lipase Catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor. *Food Chem.* **92** (3) 527-533.
- Matulka RA, Noguchi O, Nosaka N. 2006. Safety evaluation of a médium- and long-chain triacylglycerol oil produced from médium-chain triacylglycerols and edible vegetable oil. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1530-1538.
- Moreno N. 2008. Obtención de lípidos estructurados a escala semiindustrial mediante transesterificación con lipasas estereoespecíficas inmovilizadas. Tesis (Doctor en Química). Bucaramanga, Colombia, Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- NOVOZYMES. 2004. Ficha de información: Método para el cálculo de la actividad residual de Lipasas.
- Osborn HT, Akoh CC. 2002. Structural lipids-Novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Compr. Rev. Food Sci. and Food Saf.* **3**, 93-102.
- Nielsen NS, Yang T, Xu X, Jacobsen C. 2006. Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor. *Food Chem.* **94** (1) 53-60.
- Rønne T, Yang T, Jacobsen C, *et al.* 2005. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. *J. Agric. Food Chem.* **53** (14) 5617-5624.
- Simopoulos AP, Cleland LG. 2003. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio: The scientific evidence. *World Rev. Nutr. Diet.* **92**, 1-22.
- Waitzberg DL, Torrinhas RS, Jacinto TM. 2006. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **30** (4) 351-367.
- Wanten GJ, Calder PC. 2007. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *Amer. J. Clin. Nutr.* **85** (5) 1171-1184.

Willis WM, Lencki RW, Marangoni AG. 1998. Lipid Modification strategies in the production of structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76** 443-450.

Xu X, Porsgaard T, Zhang H, *et al.* 2002. Production of structured lipids in a packed-bed reactor with thermomyces lanuginosa lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79** (6) 561-565.

Xu X, Fomuso L, Akoh C. 2000. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed Acidólisis in a packed bed biorreactor. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3-10.

Recibido: 11//08
Aceptado: 2/4/08