

# Interesterificación enzimática para la producción de grasas especiales usando lipasa de *thermomyces lanuginosus*

## Enzymatic Interesterification for the Production of Special Fats Using Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*

### AUTORES

**Nelson Moreno Safra**

Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aidé Perea Villamil**

Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Sede UIS de Guatiguara, Km 2, Vía al Refugio (Piedecuesta). aperea@uis.edu.co

### Palabras CLAVE

Interesterificación enzimática, Lipozyme TL IM, Superestearina de palma, Aceite de Soya.

Enzymatic interesterification, Lipozyme TL IM, Palm super stearin, Soy Oil.

Recibido: 7 octubre 2008  
Aceptado: 28 enero 2009

### Resumen

La interesterificación enzimática se ha convertido en una alternativa para producir grasas especiales con aplicaciones en la industria de alimentos y en la industria farmacéutica, por su versatilidad para mejorar las propiedades físicas y funcionales de las grasas y los aceites. En este trabajo se estudió la interesterificación enzimática de la superestearina de palma y el aceite de soya, utilizando la lipasa microbiana Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* en forma inmovilizada. Se optimizaron las condiciones de reacción (relación enzima/sustrato, temperatura de reacción, tiempo de reacción) usando la metodología de superficie de respuesta (MSR). Los productos obtenidos fueron caracterizados en cuanto a concentración de acilglicérol, perfil de fusión y contenido de grasa sólida, encontrándose que por sus características finales tienen aplicación en la producción de grasas especiales para la industria de alimentos.

### Summary

Enzymatic interesterification has emerged as an option for producing special fats with applications in the food and pharmaceutical industries, due to its versatile ability to improve the physical and functional properties of fats and oils. This study focused on enzymatic interesterification of palm and soy super-stearin, using immobilized microbial lipase Lipozyme TL IM from *Thermomyces lanuginosus*. The reaction conditions (enzyme-substrate relationship, reaction temperature, reaction time) were optimized, using the response surface methodology (RSM). The products obtained were categorized in terms of their acylglycerol concentration, fusion profile, and solid fat content. It was concluded that, due to their final properties, the products have applications in the production of special fats for the food industry.



## Introducción

Los aceites y las grasas en general pueden someterse a reacciones químicas que modifican sus propiedades físico-químicas para hacerlos funcionales en diferentes áreas. Entre las más usadas se destacan la hidrogenación y la interesterificación. La hidrogenación implica la adición de hidrógeno sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados para cambiar la consistencia de las grasas, mientras que *la interesterificación* es un término frecuentemente usado para describir reacciones en las que se intercambian ácidos grasos por otros ácidos grasos (*acidólisis o transesterificación*), como se muestra en la Figura 1. Estas reacciones cambian las propiedades físicas y químicas de los aceites y las grasas, particularmente el perfil de fusión, la compatibilidad de los diferentes triacilgliceroles (TAG) en el estado sólido, y la plasticidad del sólido resultante como consecuencia de un cambio en las propiedades de cristalización. Así mismo, permiten combinar las propiedades de diferentes mezclas de grasas y aceites (Agyare *et al.*, 2005; Husum *et al.*, 2005), y obtener lípidos estructurados (Akoh, 2002; Beermann *et al.*, 2003; Simoens *et al.*, 2004, Moreno y Perea, 2007).

El proceso de interesterificación puede realizarse con catalizadores químicos o con biocatalizadores como las lipasas, dentro de las cuales las más usadas son las producidas por microorganismos como *Rizhomucor miehei*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus arrhizuz*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica* y *Thermomyces lanuginosa*. La lipasa Lipozyme® RM-IM de *Rhizomucor miehei* inmovilizada

sobre una resina de intercambio iónico y Lipozyme TL IM de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre sílice gel, son las más aplicadas actualmente.

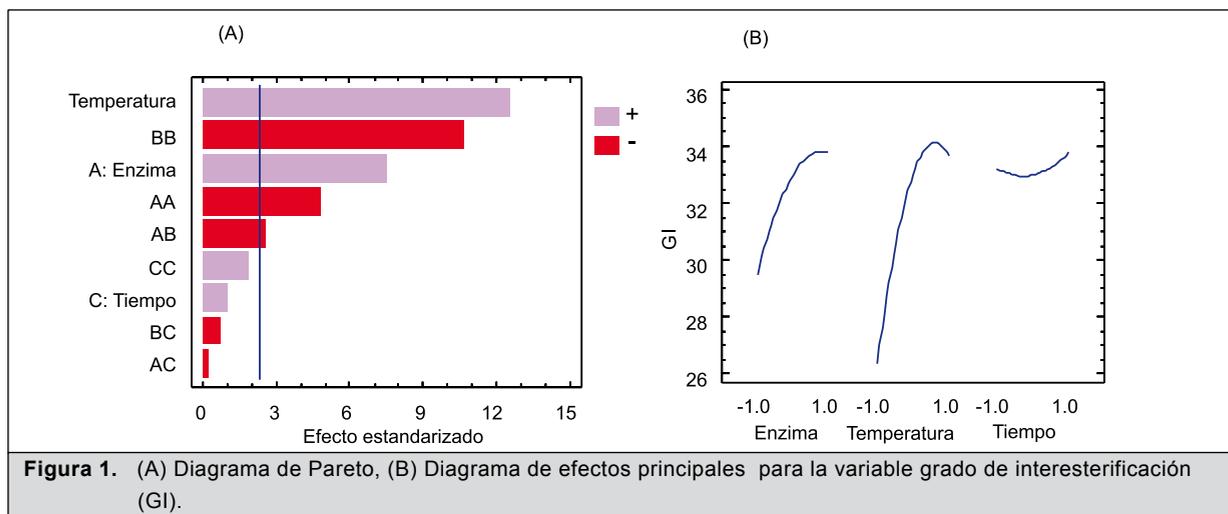
Como sustratos para las reacciones de interesterificación se ha reportado el uso de aceite de pescado con triglicéridos de cadena media (Xu *et al.*, 2002), grasa láctea con aceite de colza (Ronne *et al.*, (2005), aceite de palma y de palmiste (Xu *et al.*, (2005), manteca de cerdo y aceite de soya (Nielsen *et al.*, (2006), y aceite de sésamo con una grasa completamente hidrogenada (Otero *et al.*, 2006). En Colombia se han evaluado el aceite de palma, la oleína de palma, la estearina de palma y el aceite de palmiste (Moreno y Perea, 2007; Arango *et al.*, 2004; Pareja *et al.*, 2004; Moreno y Perea, 2001). En todos los casos los productos obtenidos no presentaron ácidos grasos “trans”.

Teniendo en cuenta las posibilidades de generación de grasas modificadas con alto potencial de utilización en la industria de alimentos y en la industria farmacéutica, en este trabajo se evaluó la utilización de la lipasa Lipozyme TL IM en la producción de grasas especiales a partir de Superestearina de Palma y Aceite de Soya. Los productos obtenidos presentaron aplicación potencial en la industria de alimentos.

## Materiales y métodos

### Materias primas y reactivos

El aceite de soya (SBO) y la superestearina de palma (SEP) fueron suministrados por la empresa C.I. Saceites S.A (Bucaramanga, Colombia). Los reactivos grado





analítico se obtuvieron de Merck. La enzima Lipozyme TL IM, una lipasa 1,3-específica, fue suministrada por Novozymes S.A. (Brasil).

## Procedimiento general de la reacción

En un reactor de 100 ml se adicionaron los sustratos y la lipasa, y se incubó la mezcla de reacción 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 *et al.*, (1999) y adaptado por Moreno (2001). El filtrado exento de ácidos grasos libres se conservó bajo refrigeración para determinar la composición de ácidos grasos, acilgliceroles, punto de fusión y curva de sólidos.

En la selección de las condiciones de la reacción se utilizó un diseño experimental de tres niveles con 19 experimentos individuales. Las variables independientes o factores estudiados fueron la razón enzima/sustrato, el tiempo de reacción y la temperatura (Tabla 1). Como variable respuesta se midió el grado de interesterificación (GI) medido como el incremento en los TAG C50:2, C52:3 y C52:4, TAG que se espera se formen por intercambio entre los ácidos grasos ubicados en los principales TAG componentes del aceite de soya y de la superestearina de palma. El seguimiento de la reacción en el tiempo se efectuó 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.

## 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  $\mu$ m, d). 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 soya (Soybean oil Supelco Cat. N° 47122). La cuantificación se realizó por el método del estándar interno.

*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 Forsell *et al.*, (1992). Para ello, las grasas se atemperan a 70° C por 7 minutos, luego se someten a un enfriamiento a 0° C por 60 minutos, y se llevan 30 minutos a la temperatura deseada inmediatamente antes de realizar la lectura.

*Puntos de fusión.* Los puntos de fusión se determinaron según el método Aocs Cc 3-25.

*Análisis estadístico.* Para el diseño experimental y análisis de los datos se empleó el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows (1998), aplicando las siguientes herramientas: a) Análisis de Efectos Principales; b) Análisis de la varianza (Anova); 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; e) Optimización multivariable.

## Resultados y discusión

La selección de las condiciones de reacción para el sistema Aceite soya– Superestearina de palma

**Tabla 1.** Variables independientes y niveles del diseño experimental para el sistema SBO: SEP 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	1,3	6,3	12,5	18,8	23,8
Temperatura de reacción, (° C)	40	50	60	70	80
Tiempo de reacción, (h)	3	4	5	6	7

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

**Tabla 2.** Arreglos y respuestas del diseño experimental para el sistema SBO: SEP p/p utilizando Lipozyme® TL-IM como catalizador

Ensayo	Razón Enzima/Sustrato	Temperatura	Tiempo	GI
	Nivel	Nivel	Nivel	(%)
1	0	0	0	32,4
2	-1	-1	-1	20,9
3	1	-1	-1	27,4
4	-1	1	-1	31,8
5	1	1	-1	33,2
6	-1	-1	1	22,9
7	1	-1	1	27,9
8	-1	1	1	31,6
9	1	1	1	33,9
10	0	0	0	32,5
11	0	0	0	33,0
12	-1,79	0	0	23,9
13	1,79	0	0	33,7
14	0	-1,79	0	17,9
15	0	1,79	0	29,9
16	0	0	-1,79	34,8
17	0	0	1,79	35,3
18	0	0	0	32,7
19	-1	0	0	32,0

(SBO:SEP)-Lipozyme® TL-IM que conducen al mayor nivel de intercambio de ácidos grasos entre los sustratos (GI) se basó en el análisis de los resultados obtenidos de la aplicación de un diseño experimental de composición central de segundo orden con tres factores y tres niveles, que constó de 19 experimentos individuales, y cuyos rangos, junto con los valores obtenidos para la variable respuesta, se presentan en la Tabla 2.

De acuerdo con estos resultados, al evaluar el efecto de cada una de las variables en forma independiente, se encontró que la temperatura de reacción y la relación enzima/sustrato tienen efectos estadísticamente significativos sobre el grado de interesterificación a un nivel de confianza del 95%, lo cual significa que el grado de interesterificación aumenta en la medida en que estos factores se desplazan del nivel más bajo al nivel más alto, como se observa en los diagramas de Pareto (Figura 1A) y de efectos principales (Figura 1B).

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), y se encontró que la razón enzima/sustrato (A)

y la temperatura (B) 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 ( $p > 0.05$ ).

Con base en estos resultados, el análisis de los datos del diseño experimental por medio de la metodología de superficie de respuesta (MSR) también permitió obtener un modelo matemático tipo polinomio (Ecuación 1) que involucra los factores que más influyen en el grado de interesterificación en orden a la obtención de grasas especiales. En él, los términos  $\beta_0 \beta_i \beta_{ij}$  corresponden a los coeficientes de regresión predichos para el intercepto, los términos lineales, los términos cuadráticos y los términos de interacción que mejor ajustan el modelo matemático a los valores medidos para la variable respuesta GI (Tabla 3).  $X_i$  representa las variables independientes (A: Razón enzima/sustrato, B: Temperatura de reacción y C: tiempo de reacción). El

**Ecuación 1.**

$$GI(\%) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$



**Tabla 3.** Coeficientes de regresión del modelo matemático predicho

Términos		Coeficientes	
Lineal	Constante	$\beta_1$	32,9984
	A: Enzima	$\beta_2$	2,1331
	B: Temperatura	$\beta_3$	3,6713
	C: Tiempo	$\beta_4$	0,2705
Cuadrático	AA	$\beta_5$	-1,3553
	BB	$\beta_6$	-2,9849
	CC	$\beta_7$	0,4995
Interacciones	AB	$\beta_8$	-0,9750
	AC	$\beta_9$	-0,0750
	BC	$\beta_{10}$	-0,2500

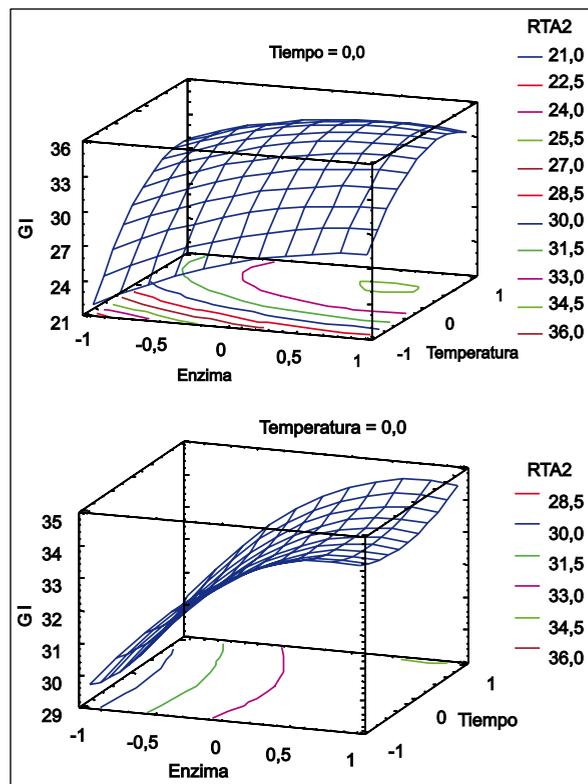
R<sup>2</sup> =97,8%

valor estadístico R<sup>2</sup> cuadrado indica el grado de ajuste del modelo a los datos experimentales, de forma que para este sistema el modelo obtenido explica el 97.8% de la variabilidad en el grado de interesterificación.

A partir del modelo establecido se construyeron los gráficos de superficie de respuesta, en los cuales se representa gráficamente: a) el efecto de variar la razón enzima/sustrato y la temperatura (Figura 2A), y b) el efecto de variar la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción (Figura 2B) sobre el GI. De ellos se deduce que los mayores grados de interesterificación 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 con tiempos de reacción mayores a tres (3) horas.

Finalmente, para ver el efecto simultáneo de las tres variables y sus interacciones, y determinar las condiciones que conducen a alcanzar los valores máximos en el grado de interesterificación, se aplicó la *metodología de optimización multivariable*, encontrándose como niveles óptimos para la reacción los mostrados en la Tabla 4, donde un valor de deseabilidad de 1,0 representa las condiciones más favorables que se podrían alcanzar en este sistema, y, en consecuencia, 0,94 significa que las condiciones seleccionadas están muy próximas al máximo teórico esperado.

*Análisis de triacilglicerol (TGA).* Para determinar los cambios en la composición de TAG y en las propiedades de las mezclas obtenidas en las condiciones seleccionadas como óptimas se realizó el seguimiento de la reacción con el tiempo. Se observó que el punto de fusión disminuyó de 48,0° C (tiempo cero) hasta 40,5°

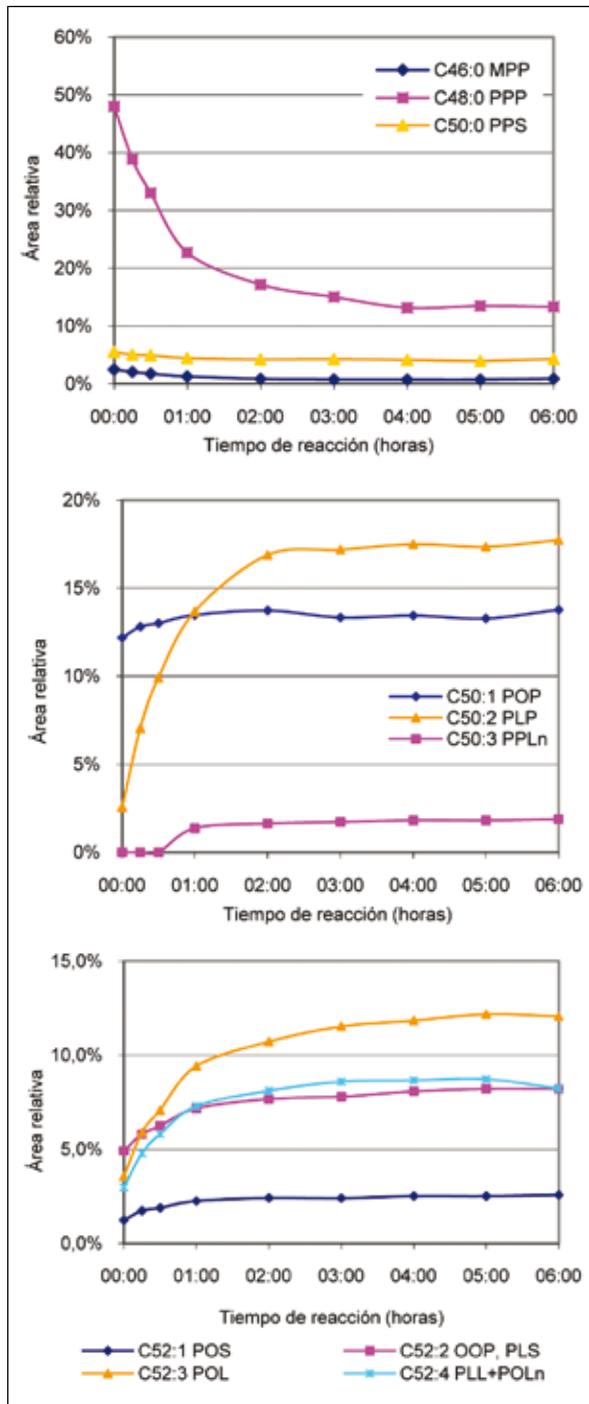


**Figura 2.** Superficie de respuesta mostrando el efecto de variar: (A) la razón enzima/sustrato y la temperatura de reacción; (B) la razón enzima/sustrato y el tiempo de reacción sobre la variable de respuesta grado de interesterificación (GI).

**Tabla 4.** Combinación de factores y niveles que conducen a un valor óptimo de interesterificación

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 h)	1,79 (7 h)	-1,79 (3 h)
Deseabilidad	-----	-----	0,94
GI	-----	-----	34%

C (después de 6 h de reacción), mientras que el contenido de grasa sólida medido a 25° C varió de 25,3% a 12,8%. Estos resultados presentan una tendencia similar a los hallados por Lai, *et al.*, (1999), que utilizando las enzimas lipasas inmovilizadas Lipozyme IM-60 y la lipasa de *Pseudomonas spp.* 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.



**Figura 3.** Evolución de los TAG con el tiempo de reacción en el sistema superestearina de palma-aceite de soya-Lipozyme TL IM.

En cuanto a los TGA, se encontró que los TAG presentes en mayor proporción en la superestearina de palma, C48 y C50, disminuyen con el avance de la reacción 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 Figura 3). De los TAG formados, el que se genera en mayor proporción es el C50:2, seguido del C52:3 y el C52:4. Un análisis adicional de la mezcla SBO: SEP interesterificada mostró que ésta presenta un contenido alto de ácido palmítico, linoleico y linoléico en la posición central del glicerol (*sn-2*), lo que permite predecir un buen desempeño desde el punto de vista nutricional.

El sistema de reacción evaluado en este estudio no ha sido reportado hasta el momento.

## Conclusiones

Se logró la producción de grasas especiales mediante interesterificación enzimática de la Superestearina de Palma con Aceite de Soya, usando como catalizador Lipozyme TL IM, alcanzándose grados de interesterificación de 34% a una temperatura de 65° C, tiempo de reacción 3 h, con una concentración de enzima de 2,5% respecto al peso del sustrato. Los productos obtenidos por su composición en TAG tienen aplicación potencial en la industria de alimentos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa Comercializadora Internacional Santandereana de Aceites S.A. por el préstamo de sus instalaciones para los ensayos, y a la Universidad Industrial de Santander, Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

## Bibliografía

Agyare, K. K.; Xiong, Y. L.; Addo, K.; *et al.* 2005. Effect of Structured Lipid on Alveograph Characteristics, Baking and Sensory Properties of Soft Wheat Flour. *Journal of Cereal Science*. 42 (3): 309-316.

Akoh, C. C. 2002. Structured Lipids. United States Patent No. 6,369,252.

Arango, L. M.; Perea, J. A.; Moreno, N.; Pareja, C. A. y Martínez, F. 2004. Transesterificación enzimática de la oleína de palma para la producción de grasas especiales en un reactor tipo Batch. *Revista Palmas*. 25 (1): 371-375.

Beermann, C.; Jelinek, J.; Reinecker, T.; *et al.* 2003. Short Term Effects of Dietary Medium-chain Fatty Acids and n-3 Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids on the Fat Metabolism of Healthy Volunteers. *Lipids in Health and Disease*. 2-10.

Buchgraber M.; Ulbert, F.; Anklam, E. 2004. Interlaboratory Evaluation of Injection Techniques for Triglyceride Analysis of Cocoa Butter by Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1036 (2), 197-203.



- Chong, C. N.; Hoh, Y. M. and Wang, C. B. 1992. Fractionation Procedures for Obtaining Cocoa Butter-like Fat From Enzymatically Interesterified Palm Olein. *Journal American Oil Chemistry Society Chemists' Society*. 69(2): 137-140.
- Forsell, P.; Kervinen, R.; Lappi, M.; *et al.* 1992. Effect of Enzymatic Interesterification on the Melting Point of Tallow-rapeseed oil (Lear) Mixture. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69 (2): 126-129.
- Husum, T. L.; Pedersen, L. S.; Nielsen, P. M.; *et al.* 2005. Enzymatic Interesterification: Process advantages and Product Benefits. *Palm Oil Developments*. 39: 1-10.
- Lai, O. M.; Ghazali, H. M.; and Chong, C. L. 1998. Physical Properties of *Pseudomonas* and *Rhizomucor miehei* Lipase-catalyzed Transesterified Blends of Palm Stearin: Palm Kernel Olein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75 (6): 953-959.
- Moreno S., N. 2001. 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. Tesis de Maestría en Química, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
- Moreno, N. y Perea, J. A. 2007. Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática de aceite de soya y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado. *Grasas y Aceites*. Aceptado para publicación.
- Nielsen, N. S.; Yang, T.; Xu, X. and 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 Chemistry*. 94 (1): 53-60.
- Otero, C.; López-Hernández, A.; García, H. S.; *et al.* 2006. Continuous Enzymatic Transesterification of Sesame Oil and a Fully Hydrogenated Fat: Effects of Reaction Conditions on Product Characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 94 (5): 877-887.
- Pareja, C.; Arango, L. M.; Moreno, N.; Perea, J. A.; Martínez, F. 2003. La Transesterificación Enzimática de Palme Africane par une Lipase Immobilise. Resumen del Symposium International - Chimie verte. Uses and Applications of Renewable Raw Materials, Poitiers, Francia. 1:83.
- Ronne, 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.
- Senanayake, S. P. J. and Shaidi, F. 1999. Enzyme-ssisted Acidolysis of Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.) Oils: Incorporation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3105-3112.
- Simoens, C. H.; Deckelbaum, R. J. and Carpentier, Y. A. 2004. Metabolism of Defined Structured Triglyceride Particles Compared to Mixtures of Medium and Long Chain Triglycerides Intravenously. *Clin Nutr.* 23 (4):665-72.
- 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.; Yang T.; Rebsdorf, M., *et al.* 2005. Monoacylglycerol Synthesis Via Enzymatic Glycerolysis Using a Simple and Efficient Reaction System. *Journal of Food Lipids*. 12 (4): 299-312.