

Interesterificación enzimática de mezclas de aceite de soja hidrogenado empleando Novozym 435

Romero, Sandra ^{1*}; Giombi, José Luis ¹; Minari, Roque ^{1,2}; Collins, Sebastián ^{1,2}

¹ Instituto de Desarrollo para la Industria Química (INTEC-CONICET), Güemes 3450, 3000, Santa Fe, Argentina.

² Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, 3000, Santa Fe, Argentina.

scollins@santafe-conicet.gov.ar

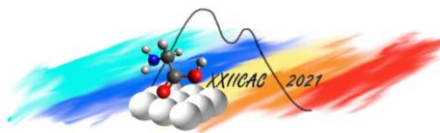
Palabras Claves: Aceite de Soja, Hidrogenación, Interesterificación, Lipasa

Resumen

En este trabajo se investiga la interesterificación enzimática de mezclas binarias de aceite de soja con diferentes grados de hidrogenación, donde predominan los ácidos grasos saturados, empleando una lipasa comercial no específica (Novozym 435®). La reacción se realizó en batch a 90 °C con una estabilidad de hasta 8 ciclos sin pérdida de actividad enzimática. Los materiales se caracterizaron por cromatografía gaseosa para analizar la composición química, por calorimetría diferencial de barrido para examinar los perfiles térmicos, por difracción de rayos X y microscopía de luz polarizada se analizó la estructura cristalina y mediante ensayos de penetración la textura. Luego de la interesterificación se observó una disminución del contenido de triglicéridos trisaturados y triinsaturados, y el aumento de mono-insaturados di-saturados (se detectaron también mono- y diglicéridos en bajas concentraciones). Los materiales interesterificados presentaron cambios en los perfiles de cristalización y menor punto de fusión, lo cual tiene un impacto positivo en su plasticidad. Estas características los hacen potenciales candidatos para sustituir en aplicaciones comerciales a parafinas de origen mineral.

Abstract

In this work, the enzymatic interesterification of binary mixtures of soybean oil with different hydrogenation degrees, where saturated fatty acids predominate, is investigated using a non-specific commercial lipase (Novozym 435®). The reaction was carried out in batch at 90 °C, showing stability of up to 8 cycles without loss of enzymatic activity. The obtained materials were characterized by gas chromatography to analyze their chemical composition, by differential scanning calorimetry to examine their thermal profiles, by X-ray diffraction and polarized light microscopy to analyze their crystalline structure and through a penetration test to infer their texture. After interesterification, a decrease in the concentration of trisaturated and triunsaturated glycerides was observed, as well as an increase in di-saturated monounsaturated (mono and diglycerides were also detected as minor components). The interesterified materials showed changes in the crystallization and melting profiles, lowering the melting points, which improves their plasticity behavior. These characteristics become them potential candidates to replace paraffins of mineral origin in commercial applications.



Introducción

Las parafinas o ceras minerales son hidrocarburos derivados del petróleo que presentan consistencia sólida a temperatura ambiente y se clasifican por grados según sus puntos de fusión (PF), comúnmente entre 40 y 90 °C [1]. Son productos con alta demanda, ya que son utilizados en muchas aplicaciones tales como ceras, fabricación de fósforos, velas, papeles, adhesivos, pinturas, productos farmacéuticos y cosméticos, etc. En los últimos años se han dedicado considerables esfuerzos al desarrollo de nuevos materiales que permitan la sustitución de productos de origen mineral por alternativas que provengan de fuentes renovables, que sean sostenibles y biodegradables.

En este sentido, los aceites vegetales, compuestos por triglicéridos (TAG), adecuadamente transformados, aparecen como una buena alternativa para satisfacer estos requisitos [2]. Es así que pueden sintetizarse bioparafinas basadas en aceites vegetales a partir de la hidrogenación de los mismos, con el objetivo de aumentar su PF y dureza. No obstante, la mera hidrogenación produce materiales duros y frágiles que no son adecuados, lo cual requiere realizar algunas modificaciones químicas adicionales para alcanzar las propiedades deseadas, por ejemplo el rango de fusión y la plasticidad [3].

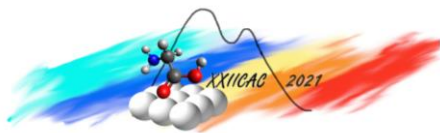
La reacción de interesterificación de mezclas de TAG es comúnmente utilizada para la obtención de margarinas libre de ácidos grasos trans o equivalentes de manteca de cacao [4–6]. Consiste en el intercambio posicional de los ácidos grasos (AG) en mezclas TAG. Durante este proceso, el perfil de AG del material no se altera, pero el reordenamiento molecular del TAG altera las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los materiales. La misma se puede llevar a cabo mediante diferentes enfoques: i) interesterificación química (IQ), para la cual el catalizador más utilizado es el metóxido de sodio; e ii) interesterificación enzimática (IE) que utiliza principalmente lipasas soportadas. Debido a los diferentes mecanismos de reacción la composición química de los productos obtenidos por la IQ e IE son diferentes y, por lo tanto, se alcanzan propiedades físicas/texturales distintas [3].

Sin embargo, en nuestro conocimiento, no se han reportado estudios en la literatura que utilicen la interesterificación de aceites vegetales con alto grado de saturación para obtener sustitutos de ceras minerales con puntos de fusión entre 40 y 68 °C. En este trabajo se presenta el efecto de la reacción de interesterificación empleando lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) soportada (Novozym 435) sobre mezclas binarias formadas por aceite de soja totalmente hidrogenado con aceite de soja o aceite de soja parcialmente hidrogenado. Las bioparafinas obtenidas se caracterizaron exhaustivamente empleado técnicas de cromatografía de gases, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, microscopía de luz polarizada y ensayos de penetración.

Experimental

Síntesis de las bioparafinas.

La hidrogenación del aceite de soja (SO), índice de yodo (IV)=129 g I₂/100g de aceite, se realizó empleando un reactor discontinuo marca Parr (tipo 'dead-end') de acero inoxidable con 2000 ml de capacidad. Se utilizó un catalizador comercial de níquel (Pricat 9910). Las condiciones operativas fueron: 1400 ml de aceite, 0,15 %p/p de catalizador, 60 psig de presión de H₂, 140 °C y 1500 rpm. El consumo de hidrógeno se registró en forma continua empleando un controlador de flujo másico (conectado a un sistema de adquisición de datos por Arduino) para controlar de forma precisa el grado de hidrogenación. El SO se hidrogenó totalmente hasta un IV de 0,5 (denominado de aquí en más FH) o parcialmente hasta IV ~30 (denominado PH). Se generaron mezclas binarias entre: FH/SO 80:20 %p/p, FH/PH 50:50 y 80:20 %p/p. Las mezclas obtenidas se sometieron al proceso IE utilizando el biocatalizador comercial Novozym 435® (CALB, Novozymes, Dinamarca). La reacción se realizó a 90 °C, en el extremo superior de funcionamiento de la enzima con el fin de disminuir el tiempo de reacción, durante 8 h usando el biocatalizador al 5 %p/p en un reactor de vidrio Pyrex esférico de tres bocas, bajo agitación magnéticamente y calefaccionado con una camisa eléctrica conectada a un controlador de temperatura. Se evaluó la reutilización del catalizador enzimático. Para esta prueba, la



enzima se filtró después de la reacción y se introdujo una nueva mezcla precalentada para comenzar el siguiente lote.

Caracterizaciones.

El análisis del perfil de AG se obtuvo empleando un cromatógrafo de gases (GC) Clarus 500 (Perkin Elmer) luego de la formación de los respectivos esteres metílicos (FAME) según el Método Oficial AOCS Ce 2-66 [7]. La identificación y la cuantificación de FAME se realizó usando una columna capilar Chrompack CP Sil 88 (50 m x 0.25 mm x 0.1 μm), según el Método Oficial AOCS Ce 1f-96 [7].

La composición de TAG se determinó mediante GC adaptando el método AOCS Ce 5-86 [7] y empleando una columna WCOT UltiMetal CP-TAP CB de Agilent (25 m x 0.25 mm x 0.1 μm). Complementariamente se determinó la concentración de diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos (MAG) y ácidos grasos libres (AGL) mediante GC, empleando el procedimiento de sililación de la muestra utilizando N-metil-N(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) en piridina. La columna utilizada fue ZB-5HT (30 m x 0.25 mm x 0.1 μm).

El comportamiento térmico se analizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) empleando un equipo Q2000 (TA Instruments) siguiendo el Método Oficial AOCS Cj 1-94 [7]. La estructura cristalina de las muestras se determinó por difracción de rayos X (DRX) según el Método Oficial AOCS Cj 2-95 [7] utilizando un difractómetro XD-D1 (Shimadzu), con radiación Cu-K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, a 40 KV y 30 mA). La microestructura se investigó por microscopía de luz polarizada (PLM) utilizando un microscopio Zeiss Universal M con una lente objetivo de 40x. Para la observación se colocó una gota de muestra fundida en un portaobjetos caliente, que luego fue cubierto con el cubreobjetos para eliminar el aire y esparcirlo. Los portaobjetos se mantuvieron a la temperatura de análisis (25 °C) durante 24 h previa a la observación.

La textura de los materiales se determinó mediante un ensayo de penetración utilizando una máquina universal de ensayos (Instron 3344) con un penetrador cilíndrico de punta plana de 2 mm. Las muestras se prepararon fundiéndolas a 80 °C durante 10 min y cristalizadas a 25 °C en moldes (2.5 x 2.5 x 2 cm). Las pruebas se realizaron a una velocidad de penetración de 10 mm/min con una celda de carga de 1000 N.

Resultados y discusión

En la Tabla 1 se presenta la composición de AG de los materiales de partida y de las mezclas. SO posee gran contenido de AG insaturados, e.g. ácido linoleico (L) y ácido oleico (O), además posee ácido linoléico (Ln), sus valores coinciden con los reportados en la literatura [3]. La muestra PH (IV ~30) posee 39.5% de O y un alto contenido de S (49.5 %), mientras que la muestra FH posee principalmente S (88.2%) y ácido palmítico (P) 10.3%. La composición de AG de las mezclas es una combinación lineal de sus constituyentes. Como se puede observar todas las mezclas poseen principalmente S, con el objetivo de obtener PF en el rango de 50-65 °C. La mezcla FH/SO posee ~17% de AG insaturados donde predomina L y O. Mientras que FH/PH 50:50 y 80:20 poseen 20.5 y 9.1% de O respectivamente.

Tabla 1: Composición de AG de los materiales de partida y mezclas

AG	SO	PH	FH	FH/SO 80:20	FH/PH 50:50	FH/PH 80:20
P	10.5	11	10.3	10.3	10.7	10.4
S	4.5	49.5	88.2	71.5	68.9	80.5
O	24	39.5	1.5	6.0	20.5	9.1
L	55.8	n.d.	n.d.	11.2	n.d.	n.d.
Ln	5.2	n.d.	n.d.	1.0	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado

En adelante se presentan las distribuciones de TAG agrupados en término de trisaturados (S_3), disaturados-monoin saturado (S_2U), monosaturado-diinsaturados (SU_2) y U_3 (triinsaturados), a fin de facilitar la discusión. Como se menciona en la sección experimental, se empleó una temperatura de reacción de 90°C, en el límite superior de uso de la enzima a fin de disminuir los tiempos de reacción. Con el objetivo de verificar la

Tabla 2: Composición de TAG de mezclas FH/SO IE reutilizadas.

TAG	FH/SO IE 1	FH/SO IE 8	FH/SO IE 9
S ₃	62.7	64.1	67.5
S ₂ U	27.1	28.0	25.1
SU ₂	6.8	4.7	5.9
U ₃	3.4	3.2	1.6

(11.1%) y las mezclas FH/PH presentan mayor contenido de TAG de puntos de fusión intermedios (SU₂ y S₂U). La reacción de interesterificación modifica la distribución de TAG. El contenido de S₃ y U₃ disminuye, a la vez que aumenta S₂U. SU₂ aumenta para FH/SO y disminuye para ambas mezclas

estabilidad del biocatalizador, se realizaron sucesivos reusos. En la Tabla 2 se observa, a modo de ejemplo, la distribución de TAG de la mezcla FH/SO IE, la cual se mantiene inalterada hasta el reuso 9, cuando se observó un cambio, principalmente en la concentración de U₃.

En la Tabla 3 se observa la composición de TAG y subproductos de las mezclas antes y después de la reacción de IE. Las mezclas iniciales poseen un alto contenido de S₃. FH/SO posee el mayor contenido de U₃

Tabla 3: Composición de TAG y subproductos de las mezclas iniciales y después de la IE

TAG	FH/SO	FH/PH	FH/PH	FH/SO IE	FH/PH IE	FH/PH IE
	80:20	50:50	80:20	80:20	50:50	80:20
S ₃	78.0	62.8	82.1	58.3	48.5	71.1
S ₂ U	5.2	18.6	10.7	25.2	31.9	20.4
SU ₂	5.7	12.9	5.0	6.3	7.7	2.8
U ₃	11.1	5.7	2.2	3.2	1.7	0.8
DAG	n.d.	n.d.	n.d.	4.5	4.6	3.1
MAG	n.d.	n.d.	n.d.	0.5	0.7	0.4
AGL	n.d.	n.d.	n.d.	2.1	4.9	1.5

n.d. no detectado

FH/PH IE.

Además, el proceso de interesterificación puede generar diferentes subproductos, cuya concentración final está relacionado, entre otros parámetros, con el tipo de catalizador, y parámetros de proceso, e.g. tiempo de reacción, temperatura y contenido de agua, etc. [8]. El porcentaje de MAG en grasas interesterificadas es generalmente bajo, en el orden del ~1% debido a que este componente se esterifica rápidamente [9]. Criado et al. [10] interesterificaron enzimáticamente, utilizando Novozym 435®, mezclas de aceite de oliva extra virgen y aceite de palma totalmente hidrogenado en diferentes proporciones, con una carga del biocatalizador de 10 %p/p y un tiempo de reacción de 4 horas. Observaron que el contenido de subproductos, diglicéridos y ácidos grasos libres, fue menor a 5%. En

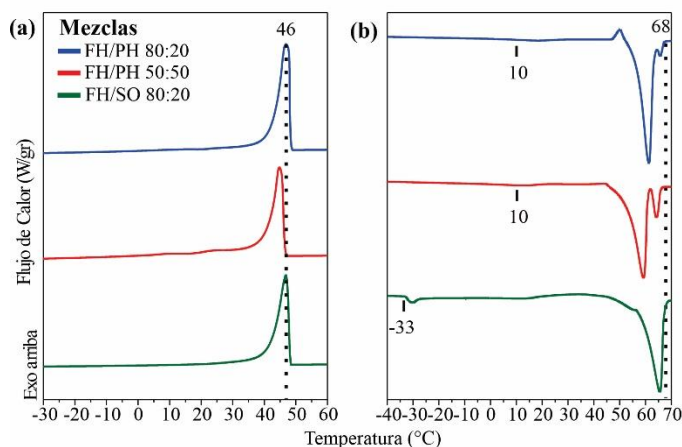


Figura 1: Termogramas de (a) cristalización y (b) fusión de las mezclas.

nuestros experimentos, luego de la IE, se observan contenidos de DAG y AGL también en valores inferiores al 5%.

La caracterización de las bioparafinas sintetizadas se estudió en cuanto a perfiles de fusión y textura, y se comparan con dos parafinas comerciales ampliamente utilizadas en la industria. En la Figura 1 se muestran los termogramas obtenidos por DSC de las mezclas (antes de la IE). Debido al alto contenido de S₃ las mismas presentan en la curva de cristalización (a) un pico a ~46 °C y en la curva de fusión (b) un PF final de 68 °C. Se puede observar que FH/SO presenta TAG que funden a baja temperatura, esto implica que estos

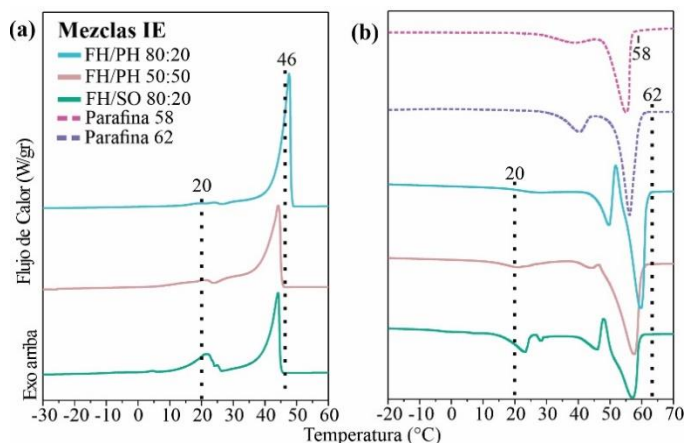


Figura 2: Termogramas de (a) cristalización y (b) fusión de las mezclas IE y parafinas comerciales.

componentes están en forma líquida a temperatura ambiente. El efecto de estos componentes sobre la textura se discutirá posteriormente.

Luego de la reacción de IE con Novozym, podemos observar cambios en los termogramas (Figura 2). La disminución del contenido de S_3 no produce cambios notorios en la curva de enfriamiento (a), mientras que en las curvas de fusión se observa una disminución el PF hasta 60-62 °C. Por otro lado, la disminución de U_3 modifica la temperatura de fusión inicial, mientras que el aumento de S_2U genera la aparición de picos a temperaturas intermedias (cercasas a 20 °C) en ambas

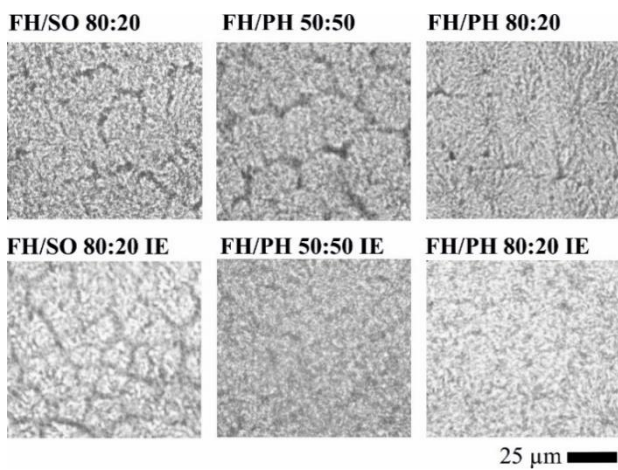


Figura 3: Imágenes de microscopia polarizada (PLM).

curvas.

Respecto a las propiedades macroscópicas, hay que considerar que el polimorfismo, la distribución del tamaño y la forma de los cristales, así como la red formada entre los cristales, juegan un papel clave en la determinación de la característica de textura de los materiales a base de lípidos [3]. En la Figura 3 podemos observar las imágenes de PLM. Según Shi [11], la morfología de los cristales en una mezcla está dominada por los TAG con el punto de fusión más alto. Todas las muestras presentan gran contenido de cristales, esferulitas irregulares o agregados de esferulitas, que se corresponden con el polimorfo β' tal como se evidenció en los análisis de DRX (datos no mostrados). La mezcla FH/PH 50:50 presenta los cristales con contornos más definidos, posiblemente debido a que es la muestra con menor contenido de S_3 . Luego de la reacción de IE, puede observarse una disminución del tamaño de los agregados en las mezclas FH/SO IE mientras que las mezclas FH/PH IE muestran partículas dispersas. La fuerza de unión entre las partículas juega un papel clave en la determinación de las propiedades texturales [11], que se discuten a continuación.

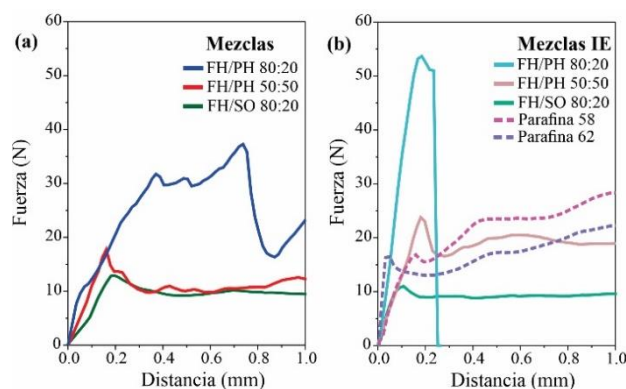
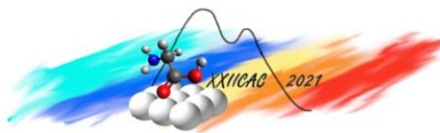


Figura 4: Test de penetración (a) de las mezclas y (b) de las mezclas IE.

La textura se evaluó mediante el test de penetración. Las curvas obtenidas se presentan en la Figura 4. Los valores de dureza de los materiales son medidos como el esfuerzo

máximo obtenido de la prueba de penetración. Luego, la forma de la curva es consecuencia de las características de cohesión y fragilidad de la muestra.

La mezcla FH/SO 80:20 posee una dureza de 13 N a 0.23 mm seguida de una carga suave y casi constante durante el ensayo, pero presenta una superficie grasosa atribuida al alto contenido de poliinsaturados (U_3). FH/PH 50:50 tiene un dureza máxima de 18 N a 0.18 mm luego se mantiene a



alrededor de los 10 N esto puede ser debido a la separación entre los agregados de esferulitas. FH/PH 80:20 presenta mayor resistencia a la penetración (30 N a 0.4 mm) y se observan oscilaciones en la curva, debido al desprendimiento de material al costado del indentador y/o a la formación de microagrietamiento.

Por otro lado, a pesar de que en las muestras IE disminuye el contenido de S₃, estas presentan mayor o similar dureza que las mezclas iniciales. Ambas mezclas FH/PH IE presentan partículas dispersas que generan una red cristalina continua, la cual produce una red altamente compacta que restringe la capacidad del material a la deformación. En el caso de la muestra 80:20, que posee un alto contenido de S₃, el material es duro (54 N a 0.15 mm) y frágil, mostrando un quiebre al superar 0,2 mm de penetración. La muestra FH/PH 50:50 IE aumenta la dureza a un valor promedio de 20 N, conservando una buena plasticidad. Mientras que FH/SO IE posee una dureza similar a la mezcla inicial, en promedio 10 N, una textura suave sin exteriorizar en la superficie grasitud debido a la disminución de U₃.

A modo de comparación se analizaron dos parafinas minerales comerciales con puntos de fusión de 58 y 62 °C (ver Figura 2). Estas parafinas presentan durezas entre 15 y 30 N (Figura 4), con alta plasticidad (curvas suaves sin rupturas). La comparación con las bioparafinas, muestra que FH/PH 50:50 IE presenta la mayor similitud con las parafinas minerales.

Conclusiones

Se investigó la reacción de interesterificación enzimática de mezclas de aceite de soja totalmente hidrogenado con aceite de soja (80:20 % p/p) y con aceite de soja parcialmente hidrogenado a un índice de iodo cercano a 30 en dos proporciones (50:50 y 80:20 % p/p). Estas mezclas se sometieron a reacción de interesterificación enzimática, empleando la enzima comercial CALB soportada: Novozym 435. La reacción de interesterificación se llevó a cabo a 90 °C por 8 h y se demostró la posibilidad de hasta 8 reusos sin pérdida de desempeño. La reacción de IE modificó significativamente la distribución de triglicéridos, disminuyendo los trisaturados y triinsaturados, y aumentando los disaturados. Además, se generaron subproductos en concentraciones totales menores al 10 %. Esta reacción altera el comportamiento térmico, mostrando una disminución general del perfil de cristalización y fusión, y la microestructura. A su vez, se modifica la dureza y plasticidad respecto a las mezclas sin interesterificar. Al comparar con muestras de parafinas minerales comerciales, se observa que la bioparina FH/PH 50:50 IE presenta la mejor similitud, mostrando que es un sustituto adecuado para las parafinas minerales.

Referencias

- [1] E. Krendlinger. Waxes en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Ed.). Weinheim, Germany. (2015).Capítulo 15.
- [2] S. Miao, P. Wang, Z. Su, S. Zhang; Acta Biomater., 10 (2014) 1692–1704.
- [3] A. E. Bailey, S. Fereidoon en Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6th ed. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ. (2005).
- [4] H. Zhang, X. Xu, J. Nilsson, H. Mu, J. Adler-Nissen, C. E. Høy; J. Am. Oil Chem. Soc., 78 (2001) 57–64.
- [5] P. Ornlá-ied, S. Sonwai, S. Lertthirasuntorn; Food Sci. Biotechnol., 25 (2016) 673–680.
- [6] R. Costales-Rodríguez, V. Gibon, R. Verhé, W. De Greyt; J. Am. Oil Chem. Soc., 86 (2009) 681–697.
- [7] D. Firestone en Official Methods and Recommended Practices, 6th ed. AOCS Press, Urbana, IL. (2009).
- [8] B. Kowalski, K. Tarnowska, E. Gruczynska, W. Bekas; Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106, (2004) 655–664.
- [9] E. Ledóchowska, E. Wileczyńska; Lipid - Fett, 10 (1998) 343–348.
- [10] M. Criado, E. Hernández-Martín, A. López-Hernández, C. Otero; J. Am. Oil Chem. Soc., 84 (2007) 717–726.
- [11] Y. Shi, B. Liang, R. W. Hartel; J. Am. Oil Chem. Soc., 82 (2005) 399–408.