

## Hidrólisis del aceite de coco (*Cocos nucifera* L.) mediante enzimas estereoespecíficas y sin especificidad posicional

Por R. Rodríguez, J. Sanhueza, A. Valenzuela y S. Nieto\*

Unidad de Bioquímica Farmacológica y Lípidos. INTA, Universidad de Chile,  
Casilla 138-11, Santiago, Chile

### RESUMEN

#### Hidrólisis del aceite de coco (*Cocos nucifera* L.) mediante enzimas estereoespecíficas y sin especificidad posicional.

El aceite de coco, por su composición, aporta a la dieta principalmente ácidos grasos de cadena corta y media, los que desde el punto de vista nutricional tienen ventajas, debido a su rápida utilización metabólica que permite brindar energía, principalmente a nivel hepático. Es importante contar con procedimientos que permitan obtener estos ácidos grasos en forma libre a partir del aceite de coco, ya que de esta manera pueden ser utilizados con diferentes fines, ya sea nutricionales, farmacológicos o tecnológicos. En el presente trabajo se estudió la hidrólisis del aceite de coco producida por dos tipos de lipasas; una lipasa sin especificidad posicional obtenida de *Candida cylindracea*, y otra lipasa sn-1',3' estereoespecífica, obtenida de *Mucor miehei*, en forma libre e inmovilizada (Lipozyme IM-20). La lipasa de *Candida cylindracea* hidroliza un 85%-90% de los triacilglicérols del aceite a las 47-50 horas de acción. La composición del hidrolizado es muy similar a la del aceite, y en los monoacilglicérols remanentes la composición de ácidos grasos es poco definida, aunque predominan los de cadena corta (C6 y C8) y media (C10-C14). La enzima de *Mucor miehei* permite alcanzar sólo un 65% de hidrólisis, que se obtiene a las 30 horas en el caso de la enzima libre y a las 10 horas en el caso de la enzima inmovilizada (Lipozyme IM-20). La composición de ácidos grasos del hidrolizado es muy similar en ambos casos, destacando la presencia de ácidos grasos en el rango C8-C14, aunque con una composición muy diferente a la del aceite original. La composición de ácidos grasos del monoacilglicérol remanente muestra una marcada predominancia de ácido láurico (C12:0) en el producto de ambas formas de la enzima, lo cual indicaría que este ácido graso ocupa mayoritariamente la posición sn-2' de los triacilglicérols del aceite de coco. Se discute la utilidad de las lipasas para obtener fracciones enriquecidas en ciertos ácidos grasos. También se discute la posible utilidad de la enzima de *Mucor miehei* para obtener fracciones enriquecidas en ácido láurico, el que por saponificación posterior puede ser obtenido en forma libre.

**PALABRAS-CLAVE:** Aceite de coco – Enzima estereoespecífica – Enzima sin especificidad posicional – Hidrólisis.

### SUMMARY

#### Hydrolysis of coconut oil (*Cocos nucifera* L.) by specificity and no positional specificity enzymes.

The characteristic fatty acid composition of coconut oil provides mainly short- and medium- chain fatty acids when

incorporated to the diet. These fatty acids have nutritional advantages because their metabolic disposition allows the rapid obtention of energy, mainly at the hepatic level. The obtention of short- and medium- chain fatty acids from coconut oil as substrate, may be of importance because the different nutritional, pharmacological, and technological uses of these fatty acids. In the present work, the effect of two type of lipases on the hydrolysis of coconut oil was studied; a lipase obtained from *Candida cylindracea* showing no positional specificity, and a lipase from *Mucor miehei* with sn-1',3' specificity in its free and immobilized form (Lipozyme IM-20). The lipase from *Candida cylindracea* allows the hydrolysis of 85%-90% of the triacylglycerols after 47–50 hours, the fatty acid composition of the hydrolyzate being similar to the composition of the oil. The remaining monoacylglycerols show a prevalent composition of short- (C6-C8) –and medium- chain (C10-C14) fatty acids. Lipase from *Mucor miehei* allows 65% of hydrolysis, which is obtained after 30 hours of incubation when the free form of the lipase is assayed, and after 10 hours for the immobilized form (Lipozyme IM-20). The fatty acid composition of the hydrolyzate is similar for the two enzymes and different to the composition of the oil, being C8-C14 the most prevalent fatty acids. The remaining monoacylglycerol, as product of the action of both forms of the enzyme, is almost entirely composed by lauric acid (C12:0), implicating that the sn-2' position is the most favoured for this fatty acid in the coconut oil triacylglycerols. The usefulness of lipases for the obtention of specific fractions of some fatty acids is discussed. The utility of the lipase from *Mucor miehei* for the obtention enriched fractions of lauric acid, which can be liberated after saponification, is also discussed.

**KEY-WORDS:** Coconut oil – Hydrolysis – No positional specificity enzyme – Specificity enzyme.

### 1. INTRODUCCIÓN

El coco de la palma (*Cocos nucifera*, L.) es un fruto típico de los climas tropicales. Estos árboles están en condiciones de producir frutos a los 5 ó 6 años de edad, manteniendo su producción por más de 60 años. Una vez que el fruto está maduro, este es descascarado extrayéndose la copra, la que al ser exprimida en frío produce primero un aceite muy fluido (la copraoleína), y después un aceite viscoso (la copraestearina), fracción que es usualmente comercializada y que constituye el llamado «aceite de coco» (Langstraat, 1976). El aceite de coco contiene mayoritariamente ácidos grasos de cadena corta (caproico,

C6:0; y caprílico, C8:0), de cadena media (cáprico, C10:0; láurico, C12:0; y mirístico, C14:0), y en menor cantidad ácidos grasos de cadena larga (palmítico, C16:0; y esteárico, C18:0), e insaturados (oleico, C18:1; y linoleico, C18:2). Debido a su composición, este aceite es considerado como una importante fuente de ácidos grasos de cadena corta y media, los que pueden ser fraccionados y aislados. Desde el punto de vista nutricional, los ácidos grasos de cadena corta y media tienen ventajas sobre los ácidos grasos de cadena larga, debido a su rápida utilización metabólica (Johnson & Cotter, 1986). Estos ácidos grasos brindan energía a través de procesos oxidativos a nivel hepático, principalmente, condición que los convierte en sustratos ideales cuando es un requisito nutricional aportar primordialmente energía, como es el caso de la nutrición que requieren los pacientes quirúrgicos, o aquejados de enfermedades debilitantes y/o incapacitantes (Bach *et al.*, 1988; Méndez *et al.*, 1992).

Uno de los desarrollos actuales más importantes de la industria alimentaria, referido a la tecnología de grasas y aceites, es la obtención de los llamados «lípidos estructurados», provenientes de la modificación controlada de triacilglicerol mediante reacciones catalizadas por lipasas (triacilglicerol acilhidrolasas, E.C 3.1.1.3.) (Yamane, 1987; Valenzuela & Nieto, 1994), principalmente mediante procedimientos de interesterificación (Going, 1981; Haraldsson, 1989). La estructuración de lípidos mediante interesterificación con lipasas estereoespecíficas, requiere disponer de los sustratos adecuados, por ejemplo sn-2' monoacilglicerol de un tamaño determinado de cadena, para ser transesterificados con ácidos grasos (en la forma de metil o etil ésteres), también de un tamaño de cadena determinado. La formación de triacilglicerol conteniendo un ácido graso de cadena larga en la posición sn-2' y ácidos grasos de cadena corta o media en las posiciones sn-1' y sn-3', requiere contar con los sustratos adecuados. Los sn-2' monoacilglicerol de cadena larga se pueden obtener a partir de la hidrólisis de aceites vegetales o de aceites marinos mediante enzimas estereoespecíficas (Goderis, 1987) con lo cual, previo fraccionamiento, se pueden obtener fracciones ricas en sn-2' oleil, linoleil, o linolenil glicerol, si se trata de un aceite vegetal, o de sn-2 eicosapentanoil o docosahexanoil glicerol si se trata del producto de la hidrólisis enzimática de un aceite de origen marino (Valenzuela & Nieto, 1994).

Dada la alta proporción de ácidos grasos de cadena corta y media contenidos en el aceite de coco, este producto aparece como ideal para disponer de ácidos grasos con estas características para transesterificar con diferentes sn-2' monoacilglicerol. La liberación de los ácidos grasos puede ser realizada mediante hidrólisis química o enzimática (Valenzuela & Nieto, 1994). La hidrólisis química es la más utilizada para liberar ácidos grasos a partir de grasas y aceites. Sin embargo, considerando las ventajas de especificidad y de selectividad de las enzimas estas pueden consti-

tuir, también, una buena alternativa. En el presente trabajo se estudió el comportamiento de dos lipasas en la hidrólisis del aceite de coco. Se ensayó una lipasa sin especificidad posicional y una lipasa sn-1',3' estereoespecífica en su forma libre e inmovilizada, con el propósito de caracterizar que ácidos grasos son preferentemente liberados por cada una de las lipasas y, además, obtener información sobre la composición de los monoacilglicerol formados después de la acción de la lipasa sn-1',3' estereoespecífica.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales

El aceite de coco (*Cocos nucifera*, L.), de calidad farmacopea y procedente de Malasia, fue adquirido en el mercado local. Todos los solventes (grado analítico) fueron adquiridos por ROMIL Chemicals (England). El trifluoruro de boro, las sales y las placas cromatográficas de sílica G (Kieselgel 60, 10 cm x 4 cm), fueron adquiridas por Merck (Chile). Los estándares de monoacilglicerol, de diacilglicerol, de ácidos grasos y de metilésteres de ácidos grasos, fueron obtenidos por Sigma Chemicals, St. Louis, USA. La lipasa bacteriana no estereoespecífica extraída de *Candida cylindracea*, con una actividad de 60.000 U/gr. de sólido (300.000 U/gr. proteína), fue adquirida de Sigma Chemicals. La lipasa sn-1',3' estereoespecífica obtenida del hongo *Mucor miehei* en su forma libre e inmovilizada (Lipozyme IM-20), fue obsequiada por Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark. La actividad de la enzima libre fue de 200.000 U/gr, y la de la Lipozyme IM-20 (inmovilizada en una resina aniónica y conteniendo un 8% a 10% p/p de lipasa) fue de 20.000 U/gr.

### 2.2. Métodos

#### 2.2.1. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se realizó en tubos de 15 mL herméticamente cerrados con tapas con sello de Teflón. A cada tubo se agregó 5,0 mL de tampón fosfato 0,1M pH 7,0 y 400 mg de aceite de coco. En el caso de la hidrólisis con la enzima de *Candida cylindracea* y con la enzima de *Mucor miehei* no inmovilizada se agregó 10.000 U de cada enzima. Para la hidrólisis con Lipozyme IM-20, se agregaron 500 mg de resina (aproximadamente 10.000 U). Los tubos fueron incubados en un baño termostático a 37°C con agitación (100 ciclos/min.), y se mantuvieron durante tiempos variables con el propósito de obtener distintos porcentajes de hidrólisis del aceite. Estos porcentajes fueron definidos como etapas de la reacción, e implicaron un 20, 40, 60 y 80% de hidrólisis del aceite.

Para la cuantificación de la hidrólisis, se procedió a extraer y titular los ácidos grasos liberados. Para ello, se agregó a cada tubo al final de la incubación 4 mL de una mezcla de éter etílico:hexano (1:1, v/v), y luego de agitar vigorosamente, se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min. La fase orgánica, una vez separada, se tituló con NaOH 0,02 N en presencia de fenoltaleína al 0,1% de acuerdo a Foglia *et al.*, 1993. Para estimar el 100% de hidrólisis, se procedió a saponificar 400 mg de aceite de acuerdo al procedimiento descrito por AOAC, 1980. El producto de la saponificación se neutralizó con HCL 0,1N, se extrajeron los ácidos grasos libres con éter etílico:hexano (1:1 v/v) y se procedió a titular de acuerdo a Foglia *et al.*, 1993.

### 2.2.2. Obtención e identificación de monoacilglicérols y de ácidos grasos

Una vez determinado el tiempo requerido para alcanzar el máximo de hidrólisis con cada enzima, se procedió a extraer y luego a separar los productos para su identificación y cuantificación por cromatografía gaseosa. Al final de cada incubación se agregó a cada tubo 5mL de éter etílico:hexano (1:1, v/v), se agitó vigorosamente y luego se centrifugó a 2000 x g durante 10 min., la extracción se repitió tres veces y todos los extractos se mezclaron. Posteriormente, se separaron los productos de la hidrólisis mediante cromatografía en capa fina. Para esto, se sembraron 300 uL del extracto orgánico obtenido de cada hidrolizado y la cromatografía se desarrolló con una mezcla de éter de petróleo: éter etílico: ácido acético (80:20:1, v/v) (Zubillaga & Merker, 1988). Como estándar interno para cuantificar el grado de recuperación de los ácidos grasos en los procedimientos de extracción y de separación, se agregó a los hidrolizados ácido heptadecanoico (C17:0) hasta 5% (p/p). Una vez identificadas las manchas correspondientes a los ácidos grasos y a los monoacilglicérols productos de la hidrólisis enzimática, por comparación con los respectivos estándares, estos se recuperaron raspando cuidadosamente cada mancha una vez delimitada. El raspado de cada mancha se extrajo dos veces con 5 mL de éter etílico: hexano (1:1 v/v), y los volúmenes recolectados fueron centrifugados a 2000 x g durante 10 min., y evaporados a sequedad en corriente de nitrógeno. La recuperación de los ácidos grasos y de los monoacilglicérols fue de 90-95%. Finalmente, los extractos se metilaron de acuerdo a Bannon *et al.*, 1985.

La cromatografía gaseosa se realizó en un equipo CARLO ERBA GC 6000, serie 2, utilizando un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílica SUPELCO de 30 mts. Nº 637108A, de 0,53 mm de diámetro interno. La temperatura del inyector fue de 250°C. La temperatura del horno fue inicialmente de 150°C, la que se mantuvo durante 10 minutos y luego aumentando 10°C/min. se llegó a 210°C. Esta tempe-

ratura se mantuvo durante 10 minutos para finalmente, a una velocidad de 10°C/min., se alcanzan los 240°C que se mantuvieron por 10 minutos. La temperatura del detector fue de 270°C. Como gas de arrastre se utilizó nitrógeno. El registro y la integración del cromatograma, como porcentaje de área, se realizó en un integrador Spectra-Physics SPA 420. Cada una de las hidrólisis se realizó en cuadruplicado y los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aceite de coco utilizado en el estudio presentó una composición de ácidos grasos que es característica para este tipo de producto, Tabla I-A, (Bezard *et al.*, 1971; Young, 1983). Los ácidos grasos de cadena corta (C6 y C8) no superan el 10% del total de ácidos grasos del aceite. Los de cadena media (C10, C12 y C14), son los más abundantes correspondiendo en conjunto al 72%. Los ácidos grasos de cadena larga (C16 y C18) corresponden a un 11% del total y los insaturados (C18:1 y C18:2) sólo representan el 8%. De todos los ácidos grasos, el más abundante es el ácido láurico (C12:0), constituyendo un 45,5% del total de ácidos grasos. La suma de los ácidos grasos de cadena corta y de cadena media es superior al 80% del total de ácidos grasos.

El ensayo de la actividad hidrolítica de las enzimas en función del tiempo de incubación se puede observar en la figura 1. El máximo de hidrólisis que es posible obtener con la enzima de *Candida cylindracea* es del 85-90%, al compararse con la hidrólisis química estimada en un 100%. Para lograr esta magnitud de hidrólisis se requiere de 47-50 horas. En las mismas condiciones la enzima de *Mucor miehei* no inmovilizada permite alcanzar un máximo de 65% de hidrólisis, para lo cual requiere de 30 horas de incubación. La Lipozyme IM-20 requiere solamente 10 horas para alcanzar el mismo porcentaje de hidrólisis. La diferencia en los porcentajes de hidrólisis obtenidos con las enzimas de *Candida cylindracea* y de *Mucor miehei* (en sus dos formas), puede ser atribuida a la especificidad de cada una. La enzima de *Candida cylindracea* libera una alta proporción de ácidos grasos debido a que puede actuar en las posiciones sn-1', sn-2', sn-3', aunque con mayor eficiencia en la posición sn-1' y sn-3' (Bistiline *et al.*, 1991). La enzima de *Mucor miehei* es estereoespecífica y sólo hidroliza las posiciones sn-1' y sn-3' (Sonnell & Gazzillo, 1991), por lo cual un porcentaje de ácidos grasos, cercano al 25%-30%, no es tituable ya que permanecen formando sn-2' monoacilglicérols. Destaca la efectividad de la Lipozyme IM-20, ya que en un tiempo equivalente a la tercera parte de lo que requiere la forma libre, alcanza el mismo porcentaje de hidrólisis. La eficiencia de la forma inmovilizada es destacable y obedece a las mejores caracte-

Tabla I

Composición de ácidos grasos del aceite de coco (A), del hidrolizado del aceite de coco (B) y de los monoacilglicérols remanentes de la hidrólisis del aceite (C), con las lipasa de *Candida cylindracea*, de *Mucor miehei* y Lipozyme IM-20

Acido graso	A* Aceite de coco		B* Acidos grasos libres			C* Monoacilglicérols		
	No Tratado		<i>Candida cylindr.</i>	<i>Mucor miehei</i>	Lipozyme IM-20	<i>Candida cylindr.</i>	<i>Mucor miehei</i>	Lipozyme IM-20
C 6:0 Caproico	0,7±0,1		0,8±0,1	3,5±0,6	2,5±0,3	10,0±1,1	0,3±0,01	nd
C 8:0 Caprílico	9,1±0,4		10,0±0,8	17,0±1,2	18,5±1,4	8,5±0,8	3,8±0,5	3,5±0,4
C10:0 Cáprico	7,0±0,6		7,8±0,4	12,0±0,9	11,0±1,5	7,8±0,9	4,7±0,4	4,1±0,6
C 12:0 Láurico	45,5±3,2		45,0±3,2	28,0±2,0	30,0±1,7	35,0±3,5	78,5±5,6	79,0±5,9
C 14:0 Mirístico	19,5±1,3		18,0±2,1	17,0±1,6	18,0±1,4	22,0±2,8	8,5±1,1	8,2±0,7
C 16:0 Palmítico	8,7±0,7		8,2±0,7	8,5±0,7	8,0±1,0	6,5±0,9	0,5±0,1	0,5±0,1
C 18:0 Estearico	1,9±0,4		2,1±0,2	3,5±0,6	3,0±0,3	2,1±0,2	nd	nd
C 18:1 Oleico	5,9±0,6		5,8±0,6	6,0±0,6	5,0±0,9	3,5±0,5	1,5±0,3	1,2±0,3
C 18:2 Linoleico	1,8±0,3		3,7±0,5	2,5±0,3	2,5±0,4	2,2±0,4	0,7±0,1	0,5±0,1

\* Expresados como porcentaje de ésteres metílicos  
nd= No detectado

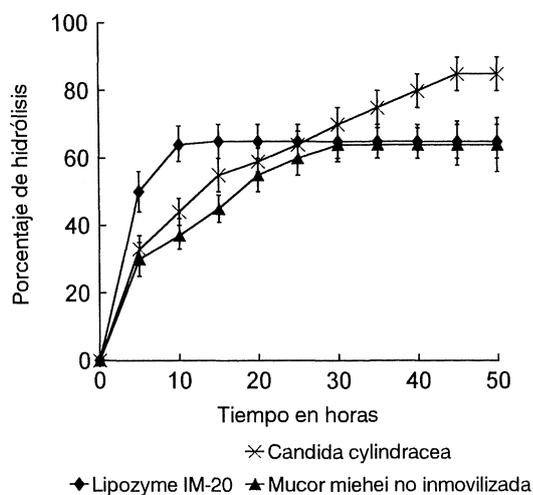


Figura 1

Cinética de hidrólisis del aceite de coco mediante las lipasas de *Candida cylindracea*, *Mucor miehei* no inmovilizada y Lipozyme IM-20. Cada punto representa el promedio de cuatro ensayos  $\pm$  la desviación estándar.

rísticas catalíticas descritas para esta forma de la enzima (Klibanov, 1989; Kim & Rhee, 1991).

La distribución porcentual de ácidos grasos del hidrolizado obtenido con la enzima de *Candida cylindracea* se muestra en la Tabla I-B. La composición de este hidrolizado es muy similar a la distribución de ácidos grasos del aceite de coco obtenida a partir del tratamiento directo del aceite (Tabla I-A). Este resultado es una prueba del carácter inespecífico de la enzima de *Candida cylindracea*. La Tabla I-B muestra, además, la composición de ácidos grasos del hidrolizado obtenido con la enzima de *Mucor miehei* en su forma libre y con la Lipozyme IM-20. En ambos casos, es notoria la disminución de la presencia del ácido láurico (C12:0).

El análisis de la composición de los monoacilglicérols residuales, productos de la hidrólisis con las diferentes enzimas ensayadas, se muestra también en la Tabla I-C. El perfil de ácidos grasos, expresado como porcentaje, obtenido con la enzima de *Candida cylindracea* muestra la presencia de todos los ácidos grasos que componen el aceite de coco, resultado que constituye una nueva evidencia de la inespecificidad de esta enzima al actuar sobre el aceite. Sin embargo,

los porcentajes no reflejan la composición porcentual de ácidos grasos del aceite no tratado con la enzima. Esto se puede deber a que la velocidad de hidrólisis de la enzima no debe ser similar en las diferentes posiciones del enlace acilglicerol, ya que es probable que la posición sn-2' sea la menos favorecida. Es importante considerar, además, que como producto de la hidrólisis se debe producir un cierto nivel de acilmigración que puede modificar aleatoriamente la composición de los monoacilgliceroles residuales de la hidrólisis y cuya participación, considerando el porcentaje de hidrólisis alcanzado, no debe ser superior al 10-15% del total de ácidos grasos. La Tabla I-C muestra, además, la composición porcentual de los ácidos grasos que componen los monoacilgliceroles residuales de la hidrólisis con la enzima de *Mucor miehei* libre y con la Lipozyme IM-20. La composición en ambos casos es prácticamente similar, destacando la presencia casi exclusiva del ácido láurico (C12:0) como ácido graso componente de los monoacilgliceroles producto de la hidrólisis. La alta proporción de este ácido graso indica por un lado, que ocupa preferencialmente la posición sn-2' en los triacilgliceroles que componen el aceite de coco, y por otro lado, la alta especificidad de la enzima de *Mucor miehei* para hidrolizar las posiciones sn-1' y sn-3' de los triacilgliceroles.

El uso de los ácidos grasos de cadena corta y media, obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática del aceite de coco requiere, de cualquier modo, el fraccionamiento de estos mediante destilación, lo cual no significa una ventaja respecto a la hidrólisis química. Sin embargo, debido a que el monoacilglicerol producido a partir de la hidrólisis con la enzima de *Mucor miehei*, tanto libre como inmovilizada, está constituido casi exclusivamente por ácido láurico, la obtención de este monoacilglicerol puede resultar un sustrato adecuado para transesterificar con otros ácidos grasos, o para obtener el ácido graso en forma libre para transesterificarlo con otros monoacilgliceroles. El menor tiempo de hidrólisis requerido por la Lipozyme IM-20 en comparación con la enzima no inmovilizada, es otra ventaja del procedimiento. El uso de lipasas en la modificación estructural de grasas y aceites, es aún incipiente, pero en la medida que las enzimas se han ido convirtiendo en productos más accesibles en términos de costo, estabilidad y eficacia, el futuro de esta tecnología se puede vislumbrar promisorio, en especial en lo que se refiere a la obtención de lípidos estructurados, una nueva faceta de la biotecnología aplicada a la obtención de nuevos tipos de grasas y aceites (Valenzuela & Nieto, 1994).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FONDECYT (Proyecto 1940422) la financiación de la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC Methods (1980). —«Saponification number (Koettstorfer, number 28,025), official final action»—. Methods of Analysis of AOAC, Thirteenth edition.
- Bach, A. C., Storck, D., and Meraihi, Z. (1988). —«Medium-chain triglyceride-based fat emulsions: An alternative energy supply in stress and sepsis».— J. Parent. Ent. Nutr. **12**, 82S-88S.
- Bannon, C. D., Craske, J. D., and Hilliker, A. E. (1985). —«Analysis of fatty acids methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms».— J. Am. Oil Chem. Soc. **62**, 1501-1507.
- Bezar, J., Bugaut, M., and Clement, G. (1971). —«Triglyceride composition of coconut oil».— J. Am. Oil Chem. Soc. **48**, 134-139.
- Bistiline, R., Bilyk, A., and Fearheller, S. (1991). —«Lipase-catalyzed formation of fatty acids».— J. Am. Oil Chem. Soc. **68**, 95-98.
- Foglia, T. A., Petruso, K., and Fearheller, S. (1993). —«Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oils mixtures».— J. Am. Oil Chem. Soc. **70**, 281-285.
- Goderis, H. L. (1987). —«Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity».— Biotechnol. Bioengin. **30**, 258-262.
- Going, L. (1981). —«Interesterification products and processes».— Tetrahed. Lett. **30**, 1221-1226.
- Haraldsson, G. G. (1989). —«The preparation of triglycerides highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids via lipase-catalyzed interesterification».— Tetrahed. Lett. **41**, 1671-1675.
- Johnson, R. C., and Cotter, R. (1986). —«Metabolism of medium-chain triglyceride emulsion».— Nutr. Intl. **2**, 150-155.
- Langstraat, A. (1976). —«Processing vegetable oil-bearing materials».— J. Am. Oil Chem. Soc. **53**, 241-249.
- Méndez, B., Lin, P. R., Istfan, N. W., Babayan, V. K., and Bistran, B. R. (1992). —«Effects of different lipid sources in total parenteral nutrition on whole body protein kinetics and tumor growth».— J. Parent. Ent. Nutr. **16**, 545-551.
- Kim, S. M. and Rhee, J. S. (1991). —«Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system».— J. Am. Oil Chem. Soc. **68**, 499-503.
- Klibanov, A. M. (1989). —«Enzymatic catalysis in anhydrous solvents».— Trends Biochem. Sci. **14**, 141-146.
- Sonnel, P., and Gazzillo, L. (1991). —«Evaluation of lipase selectivity for hydrolysis».— J. Am. Oil Chem. Soc. **68**, 11-15.
- Valenzuela, A., and Nieto, S. (1994). —«Biotechnology of lipids: The use of lipases for the structural modification of fats and oils».— Grasas y Aceites **45**, 337-343.
- Yamane, T. (1987). —«Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview».— J. Am. Oil Chem. Soc. **64**, 1657-1662.
- Young, F. V. K. (1983). —«Palm kernel and coconut oil: Analytical characteristics, process technology and use».— J. Am. Oil Chem. Soc. **60**, 374-379.
- Zubillaga, M. P., and Merker, G. (1988). —«Transesterification of cholesteryl esters».— J. Am. Oil Chem. Soc. **65**, 780-782.

Recibido: Julio 1996  
Aceptado: Enero 1997