



MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /12-13

Máster en Química
Agrícola y Nuevos
Alimentos



**Etanolisis de Aceite de
Oliva Catalizada por
una Lipasa de Alcali-
genes sp Inmoviliza-
da en Reactor de
Flujo Continuo**

Sara Castelló Andrés



Agradecimientos

En primer lugar agradecer a los Dres. Carlos Torres y Luís Vázquez por haberme aceptado en su grupo de investigación para llevar a cabo el trabajo de fin de máster, y por supuesto, agradecerles su dirección a lo largo del tiempo del estudio y su apoyo en la realización del mismo.

Gracias a la Dra. Diana Martín por su dirección en los ensayos de actividad oxidativa, en el análisis de los resultados así como por su interés constante en el trabajo.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de lípidos bioactivos: Inés, Víctor, Alba y Noemí por su ayuda y por el buen ambiente de trabajo; y en especial gracias a Óscar por su constante atención en el trabajo del día a día.

Por último gracias a mi marido, Jorge, por haberme apoyado a lo largo de todo este año.

Tabla de contenidos

I.	Resumen ejecutivo	6
II.	Introducción, estado del arte y objetivos.....	8
1.	Introducción	8
2.	Estado del arte	9
2.1.	<i>Etanolisis catalizada por lipasas.....</i>	<i>9</i>
2.2.	<i>Etanolisis enzimática de aceites en reactores en continuo</i>	<i>12</i>
2.3.	<i>Inactivación o pérdida de actividad de la enzima</i>	<i>13</i>
3.	Objetivos	17
III.	Materiales y métodos	18
1.	Materiales	18
2.	Equipos y métodos	18
IV.	Resultados y discusión	24
1.	Estudio de la cinética de la reacción	24
2.	Inactivación o pérdida de la actividad enzimática	27
2.1.	<i>Estimación cuantitativa de la inactivación o pérdida de la actividad enzimática.....</i>	<i>27</i>
2.2.	<i>Análisis de la eficiencia de la lipasa PLG de Alcaligenes sp.</i>	<i>28</i>
2.3.	<i>Causas de la inactivación o pérdida de actividad enzimática</i>	<i>28</i>
2.4.	<i>Efecto de la variación de los principales parámetros del proceso.....</i>	<i>36</i>
3.	Evolución del estado oxidativo del producto	39
V.	Conclusiones	41
VI.	Anexos	42
VII.	Referencias	43

Nomenclatura

AGCC	Ácido graso de cadena corta
AGCL	Ácido graso de cadena larga
AGCM	Ácido graso de cadena media
AGL	Ácido graso libre
DAG	Diglicérido
DHA	Ácido docosahexanoico
EPA	Ácido eicosapentanoico
FAEE	Ácidos grasos etil éster
FAME	Ácido graso metil éster
IP	Índice de peróxidos (meq O ₂ /Kg)
K _d	Constante de inactivación
MAG	Monoglicérido
PBR	Reactor de lecho empaquetado (packed-bed reactor)
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
STR	Reactor de tanque agitado
TAG	Triglicérido
T _F	Tiempo total de funcionamiento del reactor (horas)
TOC	Concentración de polifenoles como α-tocoferol (mg/Kg)
T _R	Tiempo de residencia (horas)

I. Resumen ejecutivo

El aceite de oliva refinado es el aceite de oliva obtenido a partir de aceites de oliva virgen lampantes, aquellos que por sus características organolépticas y una acidez superior a 2° no son aptos para consumo directo, mediante métodos de refinado o rectificación que no afectan a su estructura de glicerol. Si bien parte de este aceite puede ser mezclado con aceites comestibles para su comercialización, los excedentes requieren de otras vías de rentabilización, además de una apropiada gestión medioambiental. España es el primer productor de aceite de oliva a escala mundial, hecho que refuerza la importancia de encontrar nuevas salidas a los aceites de baja calidad (1, 2).

Al igual que ocurre con otros aceites vegetales las tendencias actuales en investigación van dirigidas a desarrollar nuevos productos de uso en diferentes sectores, tales como el biodiesel en el sector energético, lípidos estructurados para el sector alimentario o texturizantes para el sector cosmético, entre otros (3, 4). La biotecnología se ofrece como un canal de alto potencial para conseguir estos nuevos productos de alto valor añadido. En este caso el uso de lipasas regio-específicas abre una puerta a esos desarrollos.

El objetivo del presente estudio ha sido investigar la cinética de la reacción de etanolisis enzimática de un aceite de oliva refinado catalizada por la lipasa comercial PLG de *Alcaligenes sp.* en un reactor en continuo. La finalidad del estudio es conocer el perfil de los productos resultantes de dicha reacción y establecer los parámetros y condiciones óptimos que definen la máxima eficiencia de catálisis de la enzima. Los principales parámetros del estudio han sido: el tiempo de residencia, T_R (determinado por caudales entre 1.29 - 193.01 mL h⁻¹), el tiempo de funcionamiento total del reactor, T_F (0 - 281.25 h), la temperatura del sistema (constante a 45 °C), la composición del medio de reacción (aceite de oliva refinado, con un 6% etanol 96° p/p y 300 ppm de α -tocoferol), y la aleatoriedad de la secuencia de muestras.

La reacción de etanolisis se llevó a cabo en un reactor de lecho empaquetado con 7.7 g de lipasa y con un volumen efectivo de 15.44 mL. Las muestras recogidas se analizaron por cromatografía de gases para la determinación de lípidos neutros así como para el análisis de etil ésteres. Asimismo se determinó el contenido de polifenoles totales en base a α -tocoferol (TOC), el índice de peróxidos (IP), el valor de p-anisidina y el glicerol presente en el soporte enzimático por espectrofotometría.

Los resultados obtenidos muestran una alta eficiencia de conversión en condiciones óptimas, cuando la inactivación puede ser un hecho despreciable, llegando a alcanzar niveles de conversión superiores al 30% en tiempos 8 veces inferiores al proceso en reactores de tipo tanque agitado. La cinética de la reacción según modelo de Michaelis-Menten modificada para reacciones de etanolisis combinada con una cinética de inactivación de tipo exponencial simple obtenida según el modelo desarrollado por Torres & Hill (5), ha permitido estimar la obtención de un 35% ácidos grasos etil éster (FAEE) con un pseudo-tiempo de reacción de 4 h.

Esta alta capacidad catalítica hace pensar en un potencial uso a nivel industrial. No obstante el estudio ha permitido evaluar la evidente inactivación de la enzima a lo largo del tiempo. La inactivación ha supuesto una reducción de la actividad enzimática del 50% a las 210 h de reacción ($k_d = 0.00315249 \pm 0.0030714 \text{ h}^{-1}$). El principal mecanismo de pérdida de actividad del enzima es la acumulación de diferentes compuestos en el soporte enzimático y la reacción de algunos de estos compuestos con la lipasa, además de la posible inactivación térmica (6). Entre los principales compuestos causantes de la inactivación o pérdida de actividad enzimática se encuentran los compuestos de oxidación lipídica, el glicerol, el agua y el etanol.

La evaluación de las diferentes variables resultado de este estudio aporta datos consistentes con publicaciones previas. Los estudios de Ohta (7), Wang (8), Xu (9) y Pirozzi (10) describen los mecanismos de inactivación de lipasas debidos a hidroperóxidos y compuestos de oxidación secundaria. La disminución del índice de peróxidos en las muestras con el aumento del T_R iría asociada principalmente a la retención de hidroperóxidos en la columna, compuestos con radicales libres que tendrían un efecto polimerizante en la lipasa. El incremento de TOC y del IP detectado en T_F avanzados indicarían una posible saturación de la columna debido a dicha acumulación a lo largo del tiempo. En concordancia con estos resultados se constató una reducción de la actividad catalítica de la lipasa, lo que se tradujo en un menor índice de conversión en FAEE.

El mecanismo de inactivación del glicerol, el agua y el etanol tiene un fundamento similar, cuya base es la polaridad de los tres compuestos. En el caso del glicerol (11, 12) y del etanol (13, 14) pueden actuar reduciendo la actividad de agua óptima para la actividad de la enzima, inhibiendo o dificultando el acceso del sustrato al centro activo de la enzima. Un incremento de agua (15, 16), aumenta la capa de agua que rodea la enzima y la desestabiliza. El presente estudio reveló una cierta acumulación de glicerol en el soporte enzimático (1.61%). Este glicerol unido a la posible existencia de etanol no solubilizado en el aceite y a una acumulación de agua procedente de los reactivos empleados podría haber contribuido a la inactivación de la lipasa. Por último, se observó una disminución relevante de α -tocoferol en las muestras que estaría asociada a fenómenos de adsorción en el soporte enzimático compuesto por tierra de diatomeas.

Los parámetros del proceso más influyentes fueron el T_R , el T_F y la secuencia de muestras. T_R largos favorecieron mayores grados de conversión, así como una disminución del IP y de TOC. Estas relaciones fueron opuestas para el T_F . La secuencia de muestras fue determinante ya que en función del T_R de cada muestra el efecto de inactivación pudo acentuarse en mayor o menor grado, influyendo en las muestras posteriores y por lo tanto en la cinética y termodinámica de la reacción.

II. Introducción, estado del arte y objetivos

1. Introducción

El aceite de oliva refinado es el aceite de oliva obtenido a partir de aceites de oliva virgen lampantes (aquellos que por sus características organolépticas y una acidez superior a 2° no son aptos para consumo directo) mediante métodos de refinado o rectificación que no afectan a su estructura de glicerol. La acidez libre de los aceites de oliva refinados no supera los 0.3°, expresado como ácido oleico. El aceite de oliva refinado como tal no es comercial, no obstante actualmente puede agregarse en un 10-20% a aceites de oliva virgen dando lugar al aceite de oliva comercial (1, 17).

En cualquier caso es necesario encontrar alternativas al uso de aceites que no pueden ser consumidos directamente, ya no sólo con la finalidad de rentabilizarlos sino también para reducir excedentes que en muchos casos suponen un problema medioambiental y económico para la industria (2).

En el caso de los aceites vegetales una de las líneas de investigación que ha despertado más interés y que quizá es también más conocida es la producción de biodiesel. El biodiesel es una mezcla de alquil-ésteres de alcoholes de cadena alifática corta y ácidos grasos de cadena larga obtenidos mediante el proceso de alcoholisis de materia biológica rica en triglicéridos (TAG). Se trata de un combustible biodegradable, menos tóxico y que genera menores emisiones de humo y CO₂ en comparación con los combustibles diesel de origen fósil (18-20). Actualmente la producción industrial de biodiesel se lleva a cabo mediante reacciones químicas empleando distintos catalizadores. No obstante, el proceso podría mejorarse sustancialmente llevando a cabo reacciones enzimáticas de transesterificación con lipasas (21).

Aunque obviamente la investigación en biodiesel tiene un gran interés por su repercusión medioambiental y económica, existen otros trabajos que pretenden valorizar estos aceites y que abarcan otros ámbitos y sectores, tales como el agroalimentario, el nutracéutico, el cosmético y el farmacéutico. El presente trabajo se enmarca precisamente en este segundo grupo de aplicaciones (4).

La etanolisis enzimática de aceites mediante lipasas es un proceso controlado que permite llevar a cabo una reacción de forma dirigida y conocida para generar distintos productos a partir de ese aceite. Las aplicaciones más destacadas en este tipo de reacciones son la producción de lípidos estructurados, la producción de aceites de diglicéridos (DAG), la obtención de concentrados de alta pureza de monoglicéridos (MAG), la obtención de

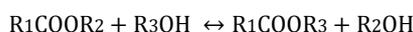
concentrados ricos en EPA y DHA y la recuperación de compuestos minoritarios existentes en el aceite (22).

2. Estado del arte

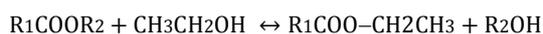
2.1. Etanolisis catalizada por lipasas

2.1.1. Aplicaciones de procesos de etanolisis de aceites mediante lipasas

Las lipasas se han empleado ampliamente en reacciones no sólo de hidrólisis (en medio acuoso) sino también de alcoholisis, esterificación y transesterificación de ésteres carboxílicos (en medio no acuoso). La propiedad de muchas lipasas de ser regio- y/o estéreo-específicas las convierte en una interesante herramienta biocatalítica para determinados campos de la química orgánica (13, 21, 23, 24). Una reacción de alcoholisis catalizada por una lipasa es una reacción entre un éster y un alcohol que tiene como resultado la sustitución de un grupo éster-alquilo por un grupo alcohol-alquilo(24):



La alcoholisis es la que el alcohol que cede la cadena alquílica-alcohólica es el metanol recibe el nombre de metanolisis, mientras que si se trata de etanol, la reacción se conoce como etanolisis. La expresión de la reacción de etanolisis sería la siguiente:



Tal como se ha introducido previamente, las lipasas se emplean en la actualidad en la producción de lípidos estructurados (25, 26), aceites de diglicérido, o concentrados de monoglicérido, entre otros.

1.1.1. Síntesis de lípidos estructurados con lipasas

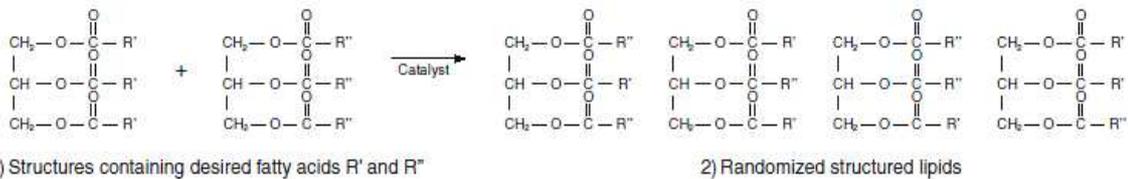
Los lípidos estructurados se definen como acilglicéridos o glicerofosfolípidos cuya estructura inicial y natural ha sido modificada intencionadamente mediante métodos químicos o enzimáticos. Dichas modificaciones incluyen la incorporación de un nuevo ácido graso o la reestructuración del lípido con el fin de variar la posición de los ácidos grasos que lo constituyen dando lugar a un nuevo lípido. En el caso de glicerofosfolípidos también se incluiría el cambio de los grupos que forman la cabeza polar de los mismos (26, 27).

En la obtención de lípidos estructurados la etanolisis va seguida de una esterificación generalmente de la posición sn-1 y sn-3 del glicerol. La finalidad de esta esterificación es

producir TAG con una estructura específica de interés fisiológico y/o nutricional. Este tipo de TAG estructurados son desarrollados especialmente en nutrición infantil, enteral y parenteral (24). Un ejemplo bien conocido de este tipo de lípidos estructurados son aquellos que tratan de mimetizar la grasa de la leche materna, cuyos TAG tienen ácido palmítico en posición sn-2 (28).

Otros desarrollos de lípidos estructurados tienen una finalidad tecnológica, mejorar las propiedades tecnológicas de una grasa, ya sea para obtener una grasa “mimética” o un sustitutivo o para crear una nueva grasa con unas propiedades determinadas adecuadas para un proceso específico en el desarrollo de alimentos o nutraceuticos. Este es el ejemplo de las grasas que mimetizan la manteca de cacao para conseguir unas características similares (27).

(A) Chemical Interesterification



(B) Enzymatic Interesterification

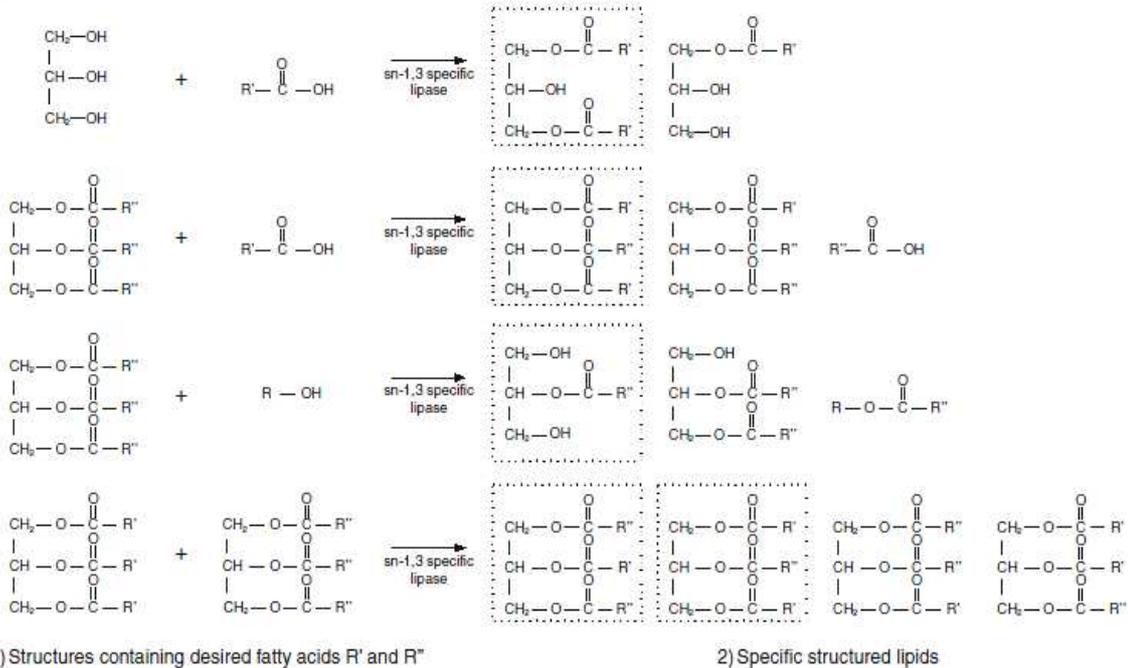


Figura 1. Obtención de lípidos estructurados mediante interesterificación enzimática y química (27)

El tercer grupo de lípidos estructurados va dirigido a la obtención de grasas hipocalóricas. Este tipo de grasas no pretende un aporte nutricional sino una reducción sustancial del aporte calórico. Generalmente se trata de TAG que combinan AGCC y AGCM con AGCL, en los cuales los AGCC y AGCM que se absorben aportan poca energía y los AGCL tienen una absorción muy reducida (27).

1.1.1.1. Obtención de aceite de diglicéridos

Los DAG son ésteres de glicerol con dos ácidos grasos, existentes en dos formas isoméricas 1,2-DAG y 1,3-DAG, que se encuentran como componentes minoritarios de grasas y aceites comestibles de diferentes fuentes. Estudios en profundidad sobre el metabolismo de estos DAG han mostrado efectos positivos sobre la salud, concretamente en lo que refiere a prevención de la obesidad, ya que especialmente la forma 1,3-DAG contribuye a la reducción de TAG en sangre (3, 29).

Los aceites ricos en DAG llegan a contener hasta un 80% de DAG. Enova Oil, único aceite de diglicérido comercializado en EEUU y Japón fue retirado del mercado en 2009 debido al alto contenido en glicidil ésteres de ácidos grasos generados en el procesado, no obstante el DAG, sigue siendo reconocido como seguro (GRAS) en ambos países. Su producción se puede llevar a cabo por una hidrólisis parcial mediante un proceso térmico o enzimático de los TAG para obtener AGL o MAG que posteriormente se esterifican mediante una lipasa sn-1,3 específica. Tras la esterificación se requiere una etapa de purificación que permite llegar a aceites de 80% de riqueza en DAG con ambos isómeros en proporciones similares (3).

1.1.1.2. Obtención de concentrados de monoglicérido de alta pureza

Otra de las posibles aplicaciones de la etanolisis de aceites es la obtención por fraccionamiento y purificación, de concentrados de MAG y DAG, productos extensamente empleados en la industria alimentaria como saborizantes, aromatizantes y emulgentes, especialmente por su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja o nula toxicidad (24, 30, 31). Los MAG se emplean usualmente como emulgentes en productos de panadería, margarinas, productos lácteos, salsas y pastelería, entre otros. En la industria farmacéutica los MAG se emplean como aglutinante de pastillas y como humectante de medicamentos de liberación transdérmica lenta. En la industria cosmética los MAG se utilizan como texturizantes para mejorar la consistencia de cremas y lociones (6).

En otros casos la obtención de MAG puede ir asociada a la producción de mezclas de alta riqueza en PUFA, no obstante en estos casos se parte de aceites de origen animal (25, 32).

1.1.1.3. Producción de biodiesel

La producción de biodiesel es una de las aplicaciones que ha dado lugar a más investigaciones en el campo de la biocatálisis. Aunque actualmente la producción de biodiesel a nivel industrial mayoritariamente se lleve a cabo mediante métodos químicos, es previsible que en algunos años esta tendencia cambie hacia el uso de enzimas.

Itabaiana et al. (33) revisan brevemente el estado del arte de la investigación en producción de biodiesel en la última década empleando reactores de lecho empaquetado (PBR), tecnología que podría permitir ese salto a la biocatálisis sin perder eficiencia en la reacción y con mayor rentabilidad. Las principales barreras para su producción a escala industrial en este tipo de

reactores son la acumulación de un porcentaje elevado de glicerol, la actividad del agua, el tipo de alcohol a emplear y la reutilización de la enzima. Aunque gran parte de la investigación se ha centrado en reacciones de metanolisis para la producción de biodiesel, debido a que el coste del metanol es significativamente menor al del etanol absoluto, la etanolisis ha ido ganando peso en los últimos años, especialmente gracias a la posibilidad de producir etanol a partir de fuentes biorenovables y a la menor toxicidad del etanol respecto al metanol (13, 20, 21, 34).

2.2. Etanolisis enzimática de aceites en reactores en continuo

Los reactores de lecho empacado (PBR) permiten llevar a cabo reacciones en continuo a diferencia de los reactores en batch. Un PBR consiste en una columna empacada que contiene el catalizador deseado a través de la cual se bombea el medio de reacción a un flujo concreto que determinará el tiempo de residencia de acuerdo al volumen efectivo de la columna(33). Existe un amplio abanico de enzimas capaces de catalizar reacciones de etanolisis, no obstante la mayor parte de los estudios realizados emplean lipasas de microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Candida*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Alcaligenes* o *Thermomyces*. Las enzimas comerciales más estudiadas son Novozyme 435, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM, especialmente debido a su disponibilidad, eficiencia, estabilidad y su regioselectividad.

Este tipo de reactores ofrecen ciertas ventajas sobre los reactores en batch, ya que permiten separar fácilmente el producto del biocatalizador, la enzima tiene mayor estabilidad, lo cual permite prolongar su utilización, y se consigue un ratio mayor de enzima-sustrato, es decir, es necesaria una menor cantidad de enzima por unidad de sustrato (11). Si bien las reacciones en reactores en batch han sido descritas más extensamente en la literatura, a continuación se ofrece una breve visión del uso de reactores en continuo con lipasas para reacciones de alcoholisis. Itabaiana et al. (33) recogen ampliamente el estado del arte de los reactores en continuo aplicados a diferentes campos en su revisión.

En 2001, Watanabe et al. (2, 13) investigaron la conversión enzimática de aceites comestibles desechados en biodiesel. Emplearon un reactor de lecho fijo con lipasa de *C.antártica* durante 100 días en el que se alcanzó una conversión de FAME del 90% sin pérdida significativa de actividad. Esto fue posible al llevar a cabo la reacción en diferentes etapas, ya que un exceso de metanol no disuelto en el aceite causaba la inactivación irreversible de la lipasa. El agua residual procedente del aceite no tuvo efectos negativos sobre la reacción ya que se observó que el agua se movía hacia la capa de glicerol producido en la reacción reduciendo su contenido entre la fase oleosa y el metanol. Este efecto mejoraba incluso la velocidad de la reacción.

Marty et al. (16) y posteriormente Dossat et al. (35) llevaron a cabo reacciones en continuo reactores de lecho empacado. Ambos estudios tuvieron como objetivo la determinación de la influencia del agua, en el primer caso, y del glicerol, en el segundo caso, en las reacciones catalizadas por lipasas empleando disolventes no acuosos. En ambos estudios se detectó una disminución acusada de la actividad enzimática debida en gran parte a la presencia de compuestos polares.

Camacho et al. (24) llevaron a cabo un estudio sobre la etanolisis enzimática de trioleína y un aceite rico en PUFA para la obtención de 2-MAG. Para ello utilizaron 2 lipasas: Lipozyme IM (*Mucor miehei*) y Lipasa D (*Rhizopus oryzae*). Los resultados del estudio determinaron que los procesos para cada una de las lipasas eran diferentes. En el caso de Lipozyme IM el efecto de acilmigración era dominante lo que daba lugar a 1,3-DAG y finalmente a glicerol, mientras que el proceso con Lipasa D generaba 2-MAG hasta un 80%. El proceso trasladado a condiciones de flujo en continuo mantuvo resultados similares.

En 2009 Esteban et al. (32) estudiaron la síntesis de 2-MAG a partir de aceites de pescado en un reactor de tanque agitado (STR) y en un PBR. A diferencia de Camacho et al. emplearon las lipasas DF, Palatase 20000L y Novozyme 435 de *R. oryzae*, *M. miehei* y *C. antarctica* respectivamente. La lipasa Novozyme 435 fue seleccionada para la producción en los reactores por su estabilidad a pesar de no ser la que mayor rendimiento ofrecía. Los resultados obtenidos mostraron hasta un 65% de rendimiento en STR frente a un máximo de 54% en el PBR.

Kaewthong et al. (6) publicaron en 2005 un estudio sobre producción en continuo de MAG mediante glicerolisis de oleína de palma con una lipasa inmovilizada. Para ello emplearon lipasa PS de *Pseudomonas sp.* inmovilizada en Accurel EP100. Las pruebas en reactor en batch alcanzaron un 20.74% de MAG mientras que los resultados para la reacción en continuo fueron algo menores: 14.34% y 14.01% para STR y PBR respectivamente.

2.3. Inactivación o pérdida de actividad de la enzima

La inactivación enzimática es un proceso por el cual un enzima reduce su actividad sustancialmente debido a causas generalmente externas. Esta pérdida de actividad se ha detallado extensamente en la bibliografía, especialmente en aquellos procesos en continuo y de mayor duración donde puede apreciarse más este hecho. Si bien existen algunas causas bien conocidas y referenciadas, muchas otras requieren de estudios mucho más amplios.

El hecho de que en muchos casos se desconozcan las causas de la inactivación ha provocado por otra parte, que muchos autores no la consideren como parte de sus estudios, de modo que muchas de las cinéticas enzimáticas que se encuentran en la bibliografía no incluyen la inactivación en el proceso, hecho que dificulta trasladar los resultados a escalas mayores o tiempos más largos de reacción.

En el presente trabajo se aborda la cinética enzimática considerando el fenómeno de la inactivación, por lo que es relevante reseñar algunos estudios en los que se plasma la pérdida de actividad enzimática para posteriormente poder interpretar los resultados.

Así pues, Dossat (35) y Marty (16) ya aludieron a la pérdida de actividad enzimática en reactores en continuo debido a la existencia de compuestos polares, como el agua, el glicerol o alcoholes no solubilizados. El glicerol ha sido una de las causas de inactivación más estudiadas y reseñadas en estudios de Xu (12) o Ciftci (11) recientemente. Finalmente hay que citar también la inactivación debida a la acumulación de otras sustancias, especialmente, compuestos de oxidación, tal como se amplía más adelante.

2.3.1. Inactivación por acumulación de glicerol

El glicerol se produce por la hidrólisis total de los TAG. En reacciones de etanolisis enzimática donde la lipasa tiene actividad regioespecífica en sn-1,3 no se forma glicerol. No obstante es posible su aparición, debido al fenómeno de acilmigración en el que el ácido graso esterificado en posición sn-2 se transloca a la posición sn-3, en la que la lipasa sí tiene actividad catalítica. Generalmente en procesos de producción de biodiesel donde se persigue una alta conversión de FAEE (o FAME) se puede llegar a generar un volumen de glicerol muy significativo durante el proceso, alcanzando porcentajes cercanos al 10% sobre la composición final (11). Considerando sus efectos sobre la actividad enzimática no es de extrañar la cantidad de estudios que abordan este tema, especialmente en el campo de producción de biodiesel.

Si bien se conoce que la pérdida de actividad enzimática está causada por un recubrimiento de la enzima, Xu et al. (12) propusieron tres mecanismos que explicarían la caída en la actividad enzimática. Una primera hipótesis plantearía la formación de una capa de glicerol que limitaría la difusión de los sustratos hacia la lipasa. El segundo mecanismo se centraría en una disminución de la actividad del agua causada por la naturaleza higroscópica del glicerol. Por último, el tercer mecanismo establecería una competencia por la unión al enzima entre el glicerol y el etanol necesario para la etanolisis.

Algunos estudios han propuesto procedimientos para la eliminación del glicerol de la enzima, no obstante no se ha encontrado ninguno realmente eficiente para reactores de flujo continuo. Yesiloglu (21) propuso la utilización de gel de sílice como sistema colector de glicerol en reacciones en batch. El gel de sílice tiene la capacidad de captar glicerol, por lo que es interesante en reactores donde la enzima no esté inmovilizada. En el caso de reactores en continuo con lipasas inmovilizadas el hecho de emplear soporte de sílice implica que podría atrapar y retener el glicerol en el mismo lugar donde se da la reacción enzimática, por lo que su efecto negativo a nivel enzimático podría ser incluso más acusado.

Dossat et al. (35) llevaron a cabo diferentes ensayos para la eliminación del glicerol. Los resultados empleando gel de sílice, así como la utilización de un co-solvente más polar (acetona) no dieron lugar a mejoras en la eficiencia del reactor. Como solución plantearon un

reactor en semi-continuo en el que la transesterificación se llevaba a cabo en ciclos, entre los cuales se hacía pasar un alcohol terciario con la actividad del agua ajustada a 0.54 para limpiar la columna y eliminar el glicerol

2.3.2. Procesos oxidativos en reacciones de etanolisis

Los aceites y grasas, y en especial, aquellas que presentan un alto contenido en ácidos grasos insaturados son muy susceptibles a los procesos de auto-oxidación y fotooxidación, dando lugar inicialmente a hidroperóxidos y posteriormente a compuestos de oxidación secundaria (9).

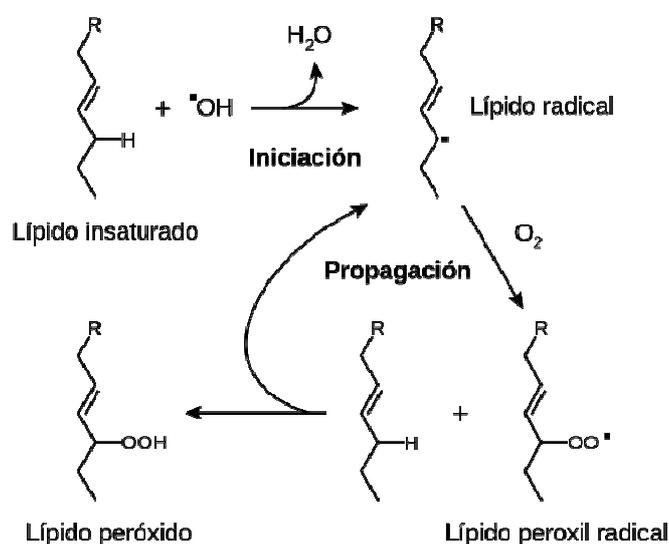


Figura 2. Proceso de peroxidación lipídica

Los aceites contienen un cierto nivel de antioxidantes (propios o exógenos) que los protegen frente a estos procesos oxidativos y los estabilizan. Sin embargo se ha visto que los antioxidantes pueden tener efectos tanto positivos como negativos. Entre los efectos positivos, reducen la formación de radicales y peróxidos y, tienen la capacidad de generar microambientes que mimetizan y/o mantienen la actividad del agua ya que son más polares que los lípidos. Entre los efectos negativos se les atribuye la posibilidad de inhibir la catálisis, de actuar como competidor del sustrato a catalizar bloqueando su acceso al centro activo y de acumularse en el soporte enzimático, entre otros (36).

Algunos autores como Ohta (7), Wang (8) o Pirozzi (10) han llevado a cabo estudios sobre el efecto de los compuestos de oxidación en reacciones en continuo con lipasas. A partir de estos estudios se plantearon diferentes teorías sobre el mecanismo de acción de estos compuestos y su relación con la inactivación enzimática. Una de estas teorías, contrastada en las investigaciones de Ohta, defiende un efecto “polimerizante” sobre la lipasa hasta tamaños en los que pierde completamente su actividad. Wang, estudió en profundidad las diferencias en

los índices de peróxidos del aceite y la actividad de la lipasa y determinó el rol esencial de compuestos de oxidación secundaria como portadores de radicales libres que promoverían en última instancia la polimerización de la lipasa. Por último Pirozzi, propuso un mecanismo basado principalmente en la acción de los compuestos de oxidación secundaria por el cual, una serie de reacciones darían lugar a la generación de radicales libres que actuarían directamente sobre la enzima. Realmente los tres mecanismos propuestos están alineados, si bien, algunos dan más peso a la acción de los hidroperóxidos mientras que otros se centran en compuestos de oxidación más avanzada.

2.3.3. Inactivación asociada a la actividad del agua

Las enzimas requieren de una cierta cantidad de agua para poder llevar a cabo su actividad catalítica. Por esta razón, es fundamental conseguir un equilibrio en la actividad del agua que favorezca al máximo la actividad de la enzima, sin perjudicar al proceso (15). En condiciones reducidas de actividad de agua como es el caso de la etanolisis, el agua existente no desplaza de forma significativa la reacción hacia la hidrólisis. Sin embargo un exceso de agua, puede tener este efecto dificultando la formación de FAEE.

La adición de agua puede tener dos efectos en el sistema de reacción. Por una parte, favorecer la reacción de hidrólisis, y por otra parte, afectar al microambiente de la enzima y por lo tanto a su actividad catalítica, hecho que en casos extremos puede llegar a causar su desnaturalización (37). No obstante la adición de agua en niveles que favorezcan una actividad de agua óptima, conseguirá un efecto positivo sobre el proceso. En este sentido, Salum et al. (37) observaron una mejor tasa de conversión de FAEE con la adición de un 1% (peso/peso) de agua.

En el caso particular la de la etanolisis no se produce agua durante la reacción. El punto crítico puede surgir cuando los reactivos o el propio sustrato de la reacción contienen agua en un determinado porcentaje. El etanol que se emplea a nivel industrial no suele ser etanol absoluto sino que puede contener un cierto porcentaje de agua, lo que debe ser tenido en cuenta al diseñar un proceso con vistas a su posterior escalado industrial, puesto que esta cantidad de agua podría ser significativa para la reacción enzimática.

El etanol, si bien es necesario para la reacción de etanolisis porque desplaza la reacción hacia la formación de etil ésteres, también puede afectar a la actividad de la lipasa incrementando su tasa de desnaturalización o generando una inhibición competitiva con el sustrato (37). El exceso de etanol generalmente causa inactivación enzimática por lo que muchos autores se decantan por la adición de etanol en ciclos ajustándose a una relación estequiométrica (13, 14, 38, 39).

Los estudios que contemplan la adición de etanol en exceso, van dirigidos a la producción de lípidos estructurados y generalmente trabajan con lipasas altamente sn-1,3 regioespecíficas

para la producción de 2-MAG, ya que en estas reacciones la aparición de glicerol es mucho menor generándose por reacciones de hidrólisis total de los TAG o por fenómenos de acilmigración.

3. Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es investigar la cinética de la reacción de etanolisis enzimática de un aceite de oliva refinado catalizada por la lipasa comercial PLG de *Alcaligenes sp.* en un reactor en continuo. La finalidad del estudio es conocer el perfil de los productos resultantes de dicha reacción y establecer los parámetros y condiciones óptimos que definan la máxima eficiencia de catálisis de la enzima.

Objetivos técnico-específicos

- Llevar a cabo una reacción de etanolisis en continuo empleando como biocatalizador la enzima comercial PLG de *Alcaligenes sp.*
- Comprobar la viabilidad de la reacción a una temperatura constante y monitorizada de 45 °C y una concentración inicial del 6% (peso/peso) de etanol en el aceite.
- Minimizar los procesos oxidativos en el aceite de partida mediante la adición de α -tocoferol y monitorizar el estado de oxidación en el producto de la reacción a lo largo del tiempo de funcionamiento del bioproceso.
- Mejorar la eficiencia de la conversión respecto a la reacción llevada a cabo en un sistema en batch (tipo STR):
 - Aumentando la cantidad de etanol hasta un 6% (peso/peso) en el aceite de partida.
 - Incrementando la temperatura del sistema de 40 °C a 45 °C para conseguir un sistema monofásico.
- Comprobar la viabilidad temporal del proceso en relación a la posible inactivación de la enzima;
 - Estudiando el grado de conversión a diferentes tiempos de residencia;
 - Alimentando el sistema al menos durante 200 h de forma continuada (en un mismo ciclo).
- Proponer un modelo que describa adecuadamente la cinética de la reacción y de la inactivación enzimática de la lipasa empleada en este sistema y bajo las condiciones utilizadas.

III. Materiales y métodos

1. Materiales

1.1. Lipasa PLG de *Alcaligenes sp.* (Meito Sangyo Co. Ltd.)

La lipasa PLG es una enzima obtenida a partir de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas granulada. Está diseñada tanto para reacciones con disolventes orgánicos como sin disolventes. Puede ser empleada en la síntesis de sustancias con actividad óptica en disolventes orgánicos y en la transesterificación de grasas y aceites sin disolventes.

Especificaciones y características:

Punto isoeléctrico: 4.5

pH óptimo: 8 - 9.5

Estabilidad de pH: 7 - 10

Temperatura óptima: 50 °C

Estabilidad térmica: por debajo de 40 °C

Inhibidores: detergentes catiónicos

Especificidad: Posicional, preferentemente hidrolizando las posiciones sn-1 y sn-3 de triglicéridos.

Actividad sobre ésteres, aproximadamente 75 U/g (p-Nitrofenil acetato como sustrato)

Actividad: aprox. 100.000U/g*1

Pérdida por secado: 1% o menor

1.2. Reactivos

El aceite de oliva refinado 0:0 fue suministrado por un proveedor local); el (+/-)- α -tocoferol, NaIO₄ y la acetil acetona fueron suministrados por Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos); el etanol 96° y el acetato de amonio fueron suministrados por Panreac (Castellar del Vallés, España); el cloroformo, el hexano, el isopropanol 99% y el ácido acético fueron suministrados por Lab Scan (Gliwice, Polonia); el hexadecano fue suministrado por Merck (New Jersey, Estados Unidos) y los reactivos del equipo FoodLabFat fueron suministrados por CDR s.r.l. (Ginestra, Italia).

2. Equipos y métodos

2.1. Reactor enzimático en continuo

La reacción enzimática se llevó a cabo en un reactor provisto de los siguientes elementos: (a) un reactor cilíndrico encamisado con llave de descarga de 5 L (Trallero & Schlee)

termostatzado con aceite térmico a 45 °C, con un sistema de agitación de hélice simple (200 rpm), protegido de la luz y con sistema de reflujo mediante un serpentín refrigerado en la parte superior que evita las fugas de etanol existente en fase gaseosa en el tanque agitado; (b) Bomba de jeringa termostatzada de alta presión con doble pistón ISCO 260D (Teledyne ISCO); (c) Columna de acero inoxidable de 250 mm de longitud x 10.5 mm d.i. en la que se han empaquetado 7.7 g de lipasa PLG de *Alcaligenes sp.* La columna empaquetada está termostatzada a 45 °C mediante un cable térmico controlado por un sistema de control de temperatura externo.

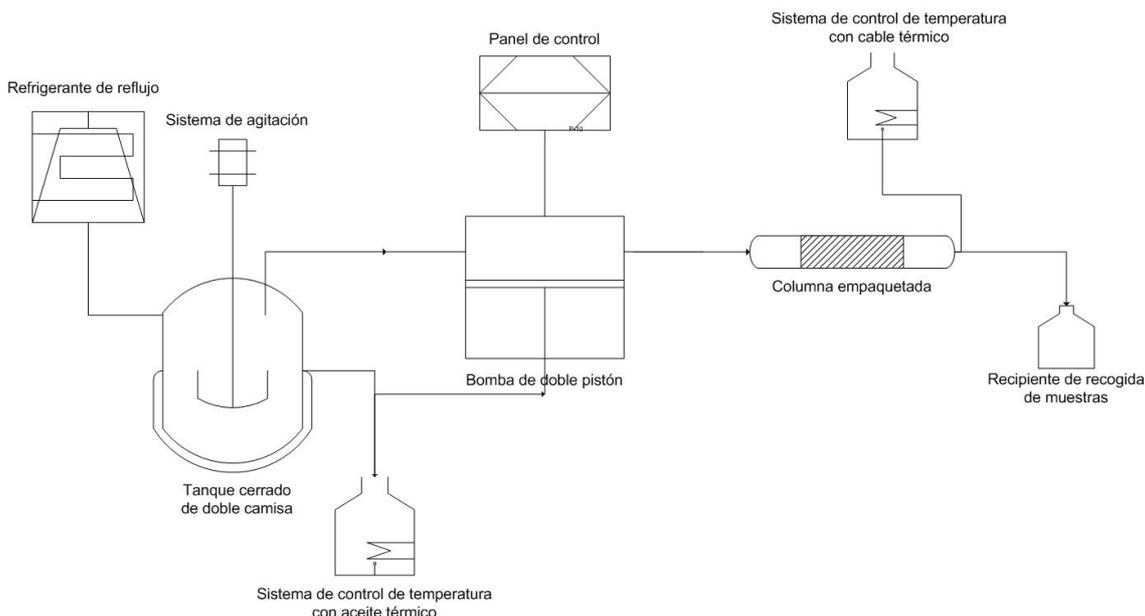


Figura 3. Representación gráfica del reactor de flujo continuo empleado

2.2. Determinación del volumen efectivo de la columna empaquetada

Se rellenó la columna previamente pesada con 7.7 g de lipasa PLG y sin ejercer compresión se realizó su montaje en el en el sistema de reacción. Se hizo pasar el aceite refinado, cuya densidad había sido determinada previamente, por la columna a un caudal de 600 mL h⁻¹ hasta que se obtuvo aceite por el extremo final de la columna. En ese momento, se detuvo la bomba, se extrajo la columna y se pesó nuevamente. De este modo, se calculó un volumen efectivo de 15.44 mL.

2.3. Reacción de etanolisis

Se preparó una mezcla de 2,100 g de aceite de oliva refinado al que se le añadió un 6% (peso/peso) de etanol 96% y 300ppm de α -tocoferol. La mezcla se mantuvo durante una hora en agitación a 45 °C y en condiciones de oscuridad hasta conseguir un aceite totalmente

transparente. La mezcla homogénea se trasvasó al reactor cilíndrico ya termostatzado, que actuaba a modo de reservorio de la mezcla de reacción, y se conectó el sistema de agitación a 200 rpm. Se desplazó el aire del reactor cilíndrico mediante una corriente de N₂. La reacción de etanolisis se llevó a cabo sin interrupción durante 281.25 h con caudales aleatorios entre 1.29 mL h⁻¹ y 193.01 mL h⁻¹. Se tomaron muestras de cada uno de los caudales empleados tras dejar al menos dos tiempos de residencia de cada caudal para permitir la estabilización del flujo y alcanzar un estado estacionario. El reactor cilíndrico fue alimentado con una mezcla de aceite idéntica y en las mismas condiciones a la inicial tras el consumo de 0.5 L de mezcla para mantener un volumen constante en dicho reactor. Se tomaron muestras del reservorio tras cada recarga para comprobar el estado oxidativo de la mezcla contenida y se empleó una corriente de N₂ para eliminar el aire tras cada apertura del reservorio.

2.4. Análisis de lípidos neutros por cromatografía de gases on-column

El análisis de lípidos neutros se basó en el método desarrollado por Torres et al. (40). La separación de las diferentes clases de glicéridos y ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II con inyección on-column utilizando una columna capilar de 7 m 5% fenil-metil-silicona de longitud (Quadrex Corporation, New Haven, CT) (0.25_m i.d.) y detector FID. La temperatura del inyector y del detector fue de 43 °C y 360 °C respectivamente. El programa de temperatura establecido fue el siguiente: inicio a 40 °C con una subida de 42 °C min⁻¹ hasta los 250 °C. Mantenimiento de 250 °C durante 10 min, seguida de una subida hasta 325 °C con una pendiente de 7.5 °C min⁻¹, manteniendo la temperatura durante 30 min. Se empleó helio como gas portador a una presión de 5.2 psi. Para realizar la adquisición de datos se empleó un software GC Chemstation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

2.5. Análisis de FAEE por cromatografía de gases

El análisis de FAEE se realizó siguiendo el método descrito por Tenllado et al. (41). La cuantificación de FAEE se llevó a cabo en un CG Agilent (Avondale, PA) (6890N Network GC System) acoplado a un inyector automático (Agilent 7683B) con columna capilar 30 m HP-88 (Avondale, Pennsylvania) (0.25 mm i.d.) y detector FID. Se utilizó split con ratio 20:1. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 °C and 250 °C respectivamente. El programa de temperaturas empleado fue el siguiente: inicio a 100 °C con una subida hasta 180 °C a 20 °C min⁻¹, seguido de una subida desde 180 °C a 220 °C a 15 °C min⁻¹. La temperatura final, 220 °C, se mantuvo durante 10 min. En la cuantificación se empleó un estándar externo de hexadecano.

2.6. Determinación de índices de oxidación y compuestos fenólicos totales

Se determinaron los índices de oxidación primaria (índice de peróxidos) y secundaria (valor de p-anisidina) así como la concentración de compuestos fenólicos totales de las distintas muestras lipídicas mediante el equipo de medida rápida FoodLab Fat. Se trata de un método espectrofotométrico recientemente desarrollado para el control de calidad de aceites y grasas(42).



2.6.1. Índice de peróxidos (conforme al método oficial AOCS Cd 8-53)

Se adicionaron 5 μL de muestra a las cubetas de medida previamente preparadas con los reactivos comerciales distribuidos específicamente para este equipo (CDR S.r.L., Ginestra Fiorentina). Al cabo de 3 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, se procedió a la medida de la absorbancia a 505 nm. Los resultados se indicaron en meq O_2/kg muestra a partir de rectas de calibración específicas del equipo de medida.

$$IP \left(\text{meq} \frac{\text{O}_2}{\text{kg}} \right) = 9.49x + 0.37$$

2.6.2. Test de p-anisidina (conforme al método oficial AOCS Cd 18-90)

Se adicionaron 20 μL de muestra a las cubetas de medida previamente preparadas con el reactivo comercial distribuido específicamente para este equipo (CDR S.r.L., Ginestra Fiorentina). Al cabo de 1 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$, se procedió a la medida de la absorbancia a 366 nm. Los resultados se indicaron en unidades de p-anisidina a partir de rectas de calibración específicas del equipo de medida.

$$TA = 100x + 0.5$$

2.6.3. Compuestos fenólicos totales (α -tocoferol)

Se adicionaron 10 μL de muestra a las cubetas de medida previamente preparadas con el reactivo comercial distribuido específicamente para este equipo, (CDR S.r.L., Ginestra Fiorentina). Al cabo de 5 min de incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ se procedió a la medida de la absorbancia a 505 nm. Los resultados se expresaron en mg α -tocoferol/kg a partir de rectas de calibración realizadas mediante un patrón de tocoferol adicionado al propio aceite de oliva refinado en el rango de 0 – 1241 ppm.

$$\text{Polifenoles} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \alpha\text{-tocoferol} \right) = -1993.40x + 16.19$$

2.7. Determinación de la cantidad de aceite retenida en el soporte enzimático tras la recuperación de la enzima

Una vez detenido el reactor se desconectó la columna, se dejó escurrir el aceite sobrante, y se extrajo la enzima mediante métodos mecánicos para evitar cualquier efecto de disolventes orgánicos sobre la enzima y sustrato remanente. Posteriormente se colocó la enzima sobre papel absorbente para eliminar el aceite libre. Una vez eliminado el aceite en exceso se recogió la enzima y se guardó en un frasco oscuro.

Se tomó una muestra de 1 g de enzima y se extrajo el aceite y el glicerol con isopropanol 99% (25 mg/ml). Para ello la mezcla se mantuvo en agitación suave (600-800 rpm) durante 5 min. Después se filtró a vacío a través de una placa filtrante. La enzima seca se pesó y se volvió a extraer con 25 mg/ml de isopropanol 99%. El filtrado se evaporó en rotavapor hasta peso constante para determinar la cantidad de aceite y glicerol totales. Tras la segunda extracción con isopropanol se llevó a cabo el mismo procedimiento de filtración y evaporación con el fin de asegurar una extracción total.

2.8. Cuantificación de glicerol retenido en el soporte enzimático recuperado del reactor

La cuantificación de glicerol que quedó adsorbida en el soporte enzimático se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Bondioli et al. (22, 41, 43). Mediante este método se prepararon los dos reactivos de la reacción: el reactivo A (65 mg NaIO₄ en 90 mL de agua, 10 mL de ácido acético y 7.7 g de acetato de amonio) y el reactivo B (1 mL de acetyl acetona en 99 mL de isopropanol).

La mezcla de aceite con glicerol obtenida de acuerdo al apartado 2.7 se homogenizó a 50 °C. Cuando la mezcla fue homogénea y transparente se preparó una disolución madre de 10 mg/ml con isopropanol 99%, de la cual se prepararon tres alícuotas de 50, 100, 250 µL respectivamente. A cada una de las alícuotas se añadió 1 mL de reactivo A y se dejó reaccionar durante 5 min. A continuación se añadieron 2.5 mL del reactivo B y se dejó reaccionar durante 20 min a 50 °C. Se midió la absorbancia a 410 nm.

Para la cuantificación se preparó una recta patrón con glicerol (10 mg) diluido en isopropanol (76 mL). Se tomaron diferentes alícuotas a las que se les añadieron los dos reactivos preparados realizando el mismo protocolo descrito.

2.9. Análisis estadístico

Para determinar la relación entre los parámetros del proceso (Tiempo de residencia, T_R y Tiempo de funcionamiento del reactor, T_F) y las variables resultado (Índice de peróxidos, concentración de polifenoles y clases lipídicas) se ha calculado el coeficiente de correlación de Pearson. Este índice permite establecer la existencia de una correlación positiva o negativa entre dos variables de una serie de datos así como la relevancia de la relación entre las mismas. Así, el coeficiente puede tomar valores entre -1 y 1. Las variables fuertemente relacionadas obtendrán un valor cercano a 1 (relación directa) o -1 (relación inversa), mientras que las variables con una relación débil o nula tomarán valores próximos a cero.

El parámetro Ω_2 describe la reacción directa de etanolisis; Ψ_2 describe la reacción inversa. En el modelo propuesto la constante de inhibición, k_1 , se ha considerado con valor cero, por lo que el término divisor de la ecuación 1 queda anulado. La expresión de la cinética de la reacción queda reducida a la derivada del producto formado menos el producto eliminado en la reacción inversa, a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos para los parámetros Ω_2 y Ψ_2 se indican en la tabla 2:

Tabla 2. Valores obtenidos para los parámetros de la cinética de la reacción (Ec. 1)

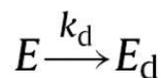
Ω_2	$0,0011934 \pm 0,0001717$
Ψ_2	$0,0005040 \pm 0,0005356$
$\Omega_2, \Psi_2, \text{ en } mM^{-1} \cdot h^{-1}; k_1 \text{ en } mM^{-1}$	

Otro fenómeno que ocurre simultáneamente a la cinética de la reacción es la inactivación del biocatalizador. Con el fin de poder representar ambos procesos que ocurren simultáneamente en un gráfico bidimensional XY, se recurre a la utilización del concepto de pseudo-tiempo de reacción. El pseudo-tiempo de reacción se define como el tiempo que habría necesitado la enzima para obtener un producto si no hubiese habido inactivación enzimática. Según Torres et al.(22) su expresión sería la siguiente:

$$t^* = \frac{\int_{t_1}^t a\{\hat{t}\} d\hat{t}}{a_0}$$

Ecuación 2. Expresión del pseudo-tiempo de reacción. a es la actividad del enzima a un tiempo determinado; a_0 es la actividad de la enzima a t_0 ; t^* es el pseudo-tiempo de reacción; \hat{t} es una variable agrupada

En el caso de no haber pérdida de actividad enzimática el pseudo-tiempo de reacción es igual al tiempo de reacción. Sin embargo, en el caso de existir inactivación sí se da una diferencia más o menos sustancial entre ambos parámetros. La inactivación enzimática responde a una cinética exponencial de primer orden, y viene representada por una constante de inactivación, k_d . La k_d obtenida para la reacción llevada a cabo es de $0,00315249 \pm 0,0030714 h^{-1}$.



La expresión de cómo la actividad enzimática varía con el tiempo viene dada por la ecuación 3(22):

$$a\{t\} = a_0 \exp[-k_d(t - t_0)]$$

Ecuación 3. Representación de la variación de la actividad enzimática con el tiempo. t es el tiempo; t_0 es el tiempo en el cual se empezó el primer experimento con la enzima; $a(33)$ es la actividad de la enzima en un tiempo concreto t ; a_0 es la actividad de la enzima a t_0 ; k_d es la constante de inactivación de primer orden

Combinando las ecuaciones 2 y 3, se obtiene la expresión que describe el pseudo-tiempo para la reacción dada(22).

$$t_A^* = \frac{a_0}{k_d} \{ \exp[-k_d(t_1 - t_0)] - \exp[-k_d(t - t_0)] \}$$

Ecuación 4. Representación del pseudo-tiempo. T_0 es el tiempo al cual el batch de interés se inició; y $(t-t_1)$ es el espacio de tiempo durante el cual un batch de aceite está en contacto con la lipasa (el tiempo de residencia)

La figura 5, representa la conversión de TAG en FAEE en función del tiempo de pseudo-reacción

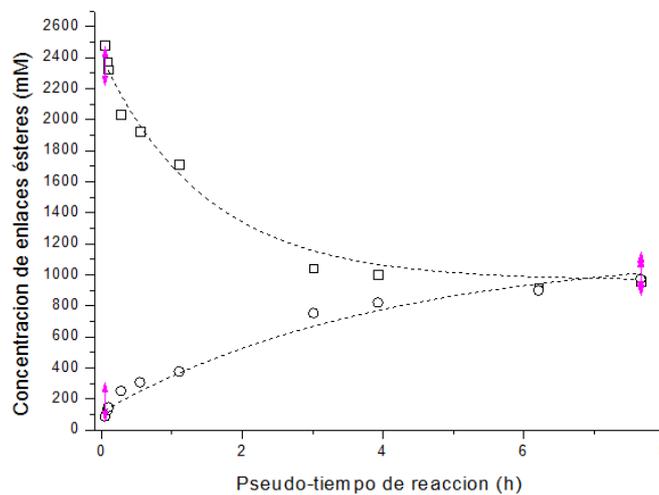


Figura 5. Conversión de TAG en FAEE en base al pseudo-tiempo de reacción.
(TAG: cuadrados, FAEE: círculos)

Con el fin de entender mejor el concepto de pseudo-tiempo de reacción y de acuerdo a la figura 5, un pseudo-tiempo de reacción de 4 horas daría lugar a una concentración de FAEE aproximada de 821mM. En la reacción real, debido a la progresiva inactivación enzimática, este grado de conversión se alcanza a un T_R de 6 horas. A partir de la figura 5 es posible también observar que cerca del 60 % de los enlaces esterés iniciales se han convertido para un pseudo-tiempo de reacción de aproximadamente 8 horas lo que da lugar a una conversión de ácidos grasos etil esterés cercana al 38%. Esto supone para este pseudo-tiempo de reacción que más del 90% del etanol de la mezcla de reacción ha sido convertido en el bioproceso. Este dato indica una alta eficiencia del reactor ya que prácticamente agota el sustrato que se encuentra en defecto en un pseudo-tiempo de residencia de 8 horas.

2. Inactivación o pérdida de la actividad enzimática

2.1. Estimación cuantitativa de la inactivación o pérdida de la actividad enzimática

La inactivación o pérdida de la actividad de una enzima a lo largo del tiempo es un fenómeno constatado en numerosos estudios sobre lipasas (7, 9, 11-13, 16, 20, 21, 35, 44-46). Esta pérdida de actividad pueden tener su origen en diferentes causas: acumulación de glicerol, agua, compuestos de oxidación, temperatura, recubrimiento, etc. Esta pérdida de actividad no se observa generalmente en reacciones en batch (reactores tipo STR) ya que en estos estudios la enzima trabaja durante periodos de tiempo más cortos. Por ello, los efectos a largo plazo no se reflejan frecuentemente en el ensayo a menos que el mismo lote de enzima no sea recuperado del medio de reacción y reutilizado en un siguiente ciclo de reacción.

En el presente estudio la pérdida de la actividad comenzó a apreciarse especialmente a partir del quinto día de la reacción tras la muestra recogida al tiempo de residencia de 12 h, es decir, la muestra que empleó un flujo de aceite más lento. A partir del sexto día (144 h) se observó una disminución significativa de la actividad. Esta disminución tan acusada de la actividad se plasma en la figura 6 que representa la actividad remanente de la enzima (x100) a lo largo de la reacción. En ella se muestra la progresiva pérdida de actividad de la lipasa, según la K_d obtenida, desde el inicio de la reacción hasta 210 h de funcionamiento del reactor, un proceso de inactivación que se tradujo en una pérdida del 50% de actividad catalítica.

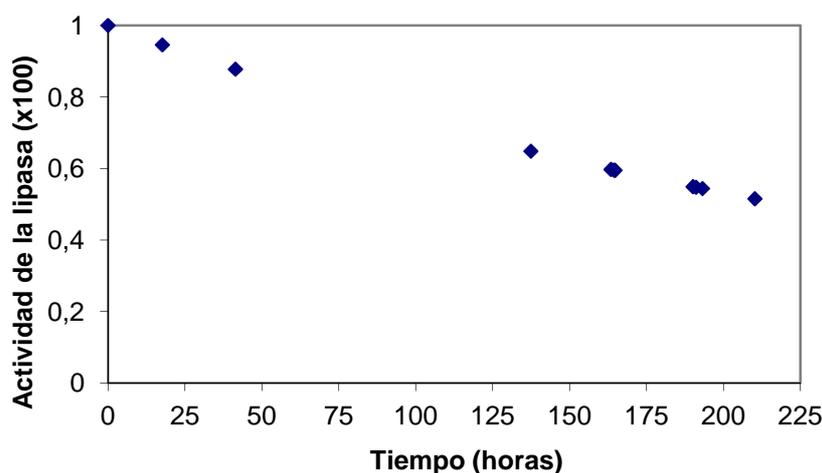


Figura 6. Pérdida de la actividad de la lipasa con el tiempo de funcionamiento del reactor

Tal como se aprecia en la figura 6, en las primeras 40 horas de funcionamiento la actividad de la lipasa se redujo un 10% y tras 210 horas, la reducción llegó al 49%, lo que correspondería

con la vida media de la lipasa. A partir de la K_d obtenida se estima que la actividad enzimática sería prácticamente nula tras 427 horas (alrededor de 17.8 días) de reacción en continuo.

2.2. Análisis de la eficiencia de la lipasa PLG de *Alcaligenes sp.*

La conversión alcanzada por la lipasa PLG previamente a que la inactivación se hiciera más evidente, revelan una alta capacidad de conversión. Aunque el máximo de conversión alcanzado fue del 36% de FAEE en un T_R de 8 h, niveles superiores al 25% FAEE se alcanzan con T_R a partir de los 5 min. Los resultados correspondientes a otros estudios realizados por el grupo de investigación en reactores tipo tanque agitado con la misma lipasa mostraron un máximo de conversión del 28% con un T_R de 8 h (datos no publicados). Si se comparan ambos estudios, el proceso en continuo demuestra ser mucho más eficiente e interesante para un posterior escalado.

A la vista de los resultados de la cinética de la reacción, se deduce que la lipasa ha sufrido una inactivación irreversible ya que no llega al grado de conversión máxima a pesar del incremento del T_R . No obstante, un análisis de los posibles factores que han afectado su actividad, podría permitir una mejora sustancial del proceso y convertirla como una opción factible y atractiva a nivel industrial, teniendo en cuenta que su vida media, tal como se ha estimado es de 210 h aproximadamente.

2.3. Causas de la inactivación o pérdida de actividad enzimática

Tal como se aprecia en la figura 6, la inactivación es un fenómeno significativo en la reacción llevada a cabo, ya que supone un 50% de la pérdida de la actividad enzimática tras 10 días de funcionamiento del reactor. Hipotéticamente las causas de la pérdida de actividad de la lipasa vienen dadas por la acumulación de diferentes compuestos en el soporte enzimático así como por posibles reacciones entre compuestos existentes en el aceite y la lipasa, además de la propia inactivación térmica de la enzima. La figura 7 recoge la diferencia en la composición del aceite inicial respecto a los aceites extraídos de la columna tras la reacción.

En sí la composición final de la clase de acilglicéridos no es relevante puesto que está sujeta al flujo empleado en la última parte de la reacción, no obstante lo que es destacable es la diferencia entre el total de clases de acilglicéridos analizadas. En el aceite inicial se ha cuantificado por GC un total de clases de lípidos del $103,15 \pm 3.75\%$ mientras que en el aceite extraído del soporte enzimático el total cuantificado es del 83.87 ± 1.46 . La infravaloración del aceite extraído del soporte enzimático indica que alrededor de un 15% correspondería a otros compuestos no identificados mediante el GC.

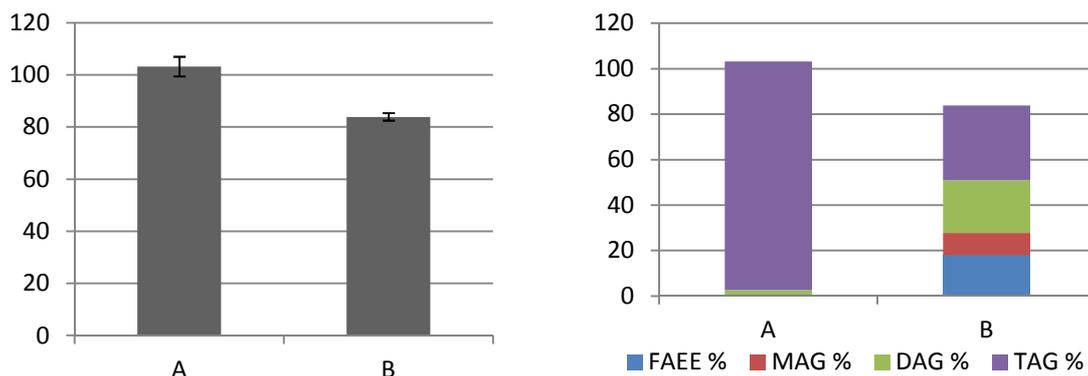


Figura 7. Porcentaje total de compuestos identificados (izq) y composición porcentual (drcha) de los aceites de partida (A) y del aceite recogido del soporte enzimático tras la reacción (B).

Los principales compuestos a los que se les atribuye este efecto de acumulación y la consiguiente inactivación enzimática son el glicerol, los compuestos de oxidación, los polifenoles (α -tocoferol), el agua y los alcoholes de cadena corta (etanol).

2.3.1. Efecto de peróxidos y compuestos de oxidación en la actividad enzimática

Los peróxidos y compuestos de oxidación son una posible causa de la inactivación enzimática de la lipasa. Aunque no ha podido medirse directamente la cantidad de peróxidos en la mezcla extraída de la columna, indirectamente se ha constatado que sí existe un efecto de retención en la misma, ya que la concentración de peróxidos en las muestras recogidas tenía en muchos casos valores muy inferiores al del aceite inicial. Más adelante, en la figura 11 (apartado 3), se observa como la concentración de peróxidos en las muestras disminuye con el aumento del T_R empleado, o lo que es lo mismo, con la reducción del caudal. Además, es destacable que la primera muestra recogida correspondiente a un T_R de 8 horas tuviera una reducción en el IP del 87% respecto al aceite inicial. Si bien las muestras recogidas no ofrecen una caída tan relevante del IP, esta cifra es significativa y correlaciona adecuadamente con los datos experimentales obtenidos. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que la lipasa estaba completamente limpia y tenía una mayor capacidad de reacción y adsorción a los compuestos de la mezcla de reacción. Considerando que se empleó un caudal de 1.93 mL h^{-1} ($T_R = 8\text{h}$), la capacidad de retención de este tipo de compuestos de oxidación sería suficientemente elevada para capturar casi el 100% de los mismos. El hecho de que sucesivas muestras nos llegasen a este valor, vendría dado por un nivel de saturación de la columna que permitiría “retener” un determinado nivel de compuestos en función de la velocidad de paso del aceite. Así pues sería esperable que las dos muestras recogidas con $T_R=8\text{h}$ cuyos parámetros del proceso son similares, principalmente el flujo, hubiesen tenido un efecto

similar en el IP. No obstante la muestra de $T_R=8h$ que se recogió tras 185h de reacción en continuo tuvo una reducción del IP sólo del 45%. En la figura siguiente se aprecia esta diferencia entre las muestras con el mismo T_R .

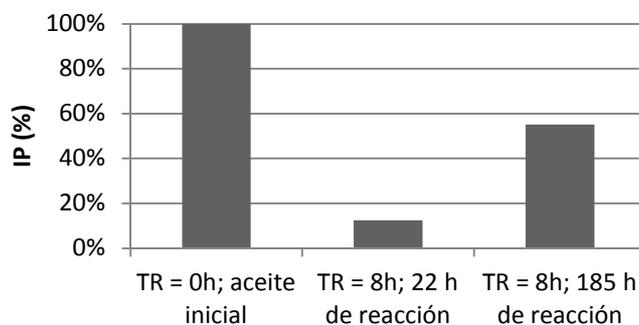


Figura 8. Reducción del IP en diferentes muestras respecto al aceite inicial. TR, tiempo de residencia

Existen referencias previas sobre la inactivación causada por acumulación y/o reacción con peróxidos. En 1989 Ohta et al. (7) describieron el fenómeno de inactivación de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en reacciones de glicerolisis en batch y en continuo causada por los peróxidos presentes en aceite de cártamo. En su estudio comprobaron que la K_d aumentaba linealmente con el aumento del IP del aceite. Según este estudio el mecanismo de inactivación principal era causado por la polimerización de la lipasa hasta un nivel en el que ya no mostraba actividad lipolítica. Más tarde, en 1991, Wang y Gordon (8) estudiaron el efecto de los productos de oxidación lipídica sobre la actividad de transesterificación de la lipasa Lipozyme IM20. A diferencia del estudio de Ohta, los hidroperóxidos no causaron reducción alguna en la tasa inicial de transesterificación. No obstante, los aceites con un IP > 5 meq O_2/Kg sí que tenían un efecto claro sobre lipasa, disminuyendo su actividad en reacciones en batch sucesivas. IP por encima de 50 meq O_2/Kg redujeron al 50% la actividad de la lipasa en 8 reacciones en batch consecutivas. Se observó igualmente que el IP se reducía con cada batch mientras que el índice de lípidos conjugados se mantenía. A raíz de estos resultados concluyó que aunque el nivel de peróxidos bajaba, los compuestos secundarios de oxidación producidos de la descomposición de los hidroperóxidos, posiblemente radicales libres, estaban causando la inactivación de la lipasa. Esta conclusión sería consistente con la teoría de la polimerización de la lipasa de Ohta, causada probablemente por estos radicales libres.

Xu et al. (9) estudiaron en 1998 el efecto de compuestos generados a partir de lípidos sobre la estabilidad de las lipasas en sistemas microacuosos en reacciones de interesterificación. Para ello llevaron a cabo una reacción de interesterificación entre aceite de girasol y ácido cáprico para la producción de lípidos estructurados, empleando Lipozyme IM como biocatalizador. En su estudio observaron que los hidroperóxidos estaban siendo absorbidos por el soporte enzimático ya que los efluentes tenían un IP de cero.

En 2012, Teixeira et al. (46) publicaron un estudio sobre reacciones en STR consecutivas catalizadas por lipasas para la producción de ésteres de esteroles a partir de destilados de deodorización de aceite de girasol. El objetivo del estudio fue el desarrollo de un método de reutilización de la enzima en reacciones en STR consecutivas identificando y tratando de resolver posibles procesos de inactivación de la lipasa relacionados principalmente con la

actividad del agua, el glicerol y los productos de oxidación. En su estudio achacaron que estos últimos eran los principales causantes de la pérdida de actividad enzimática, ya que incluso en ensayos en los que durante la esterificación no existía inicialmente ni se producía glicerol, la inactivación tenía igualmente lugar.

Pirozzi (10) fue uno de los primeros en investigar la actividad inhibitoria de los compuestos de oxidación sobre las lipasas. Su estudio sobre la mejora de la estabilidad de las lipasas en presencia de triglicéridos comerciales, elucidó que los compuestos de oxidación eran responsables de la inactivación enzimática. Concretamente trabajando con la lipasa Novozyme 435 determinó que, para este enzima, los compuestos de oxidación secundaria que contenían grupos oxo- (aldehídos y cetonas) tenían un efecto inhibitor mucho más destacado que los hidroperóxidos. La razón se debía a la interacción de los productos de oxidación secundaria con los grupos sulfhidrilo de las cisteína de la lipasa, dando lugar a productos de adición de Michael que reaccionaban posteriormente con los grupos e-amino de la lisina generando el entrecruzamiento proteico y polimerización de la lipasa, teoría alineada con los resultados de Ohta (7) y Wang (8).

Si bien los compuestos de oxidación pueden afectar de diferente manera a cada lipasa, en el presente trabajo, se podría concluir que dichos compuestos de oxidación serían uno de los agentes de inactivación más relevantes. Aunque no se puede afirmar con alta seguridad en este caso si correspondería a compuestos de oxidación primaria o secundaria, posiblemente los hidroperóxidos podrían estar más implicados en los procesos de inactivación. El análisis del valor de p-anisidina que determina la cantidad de compuestos de oxidación secundaria fue realizado a aquellas muestras con mayor T_R ya que también eran las que presentaban un menor IP.

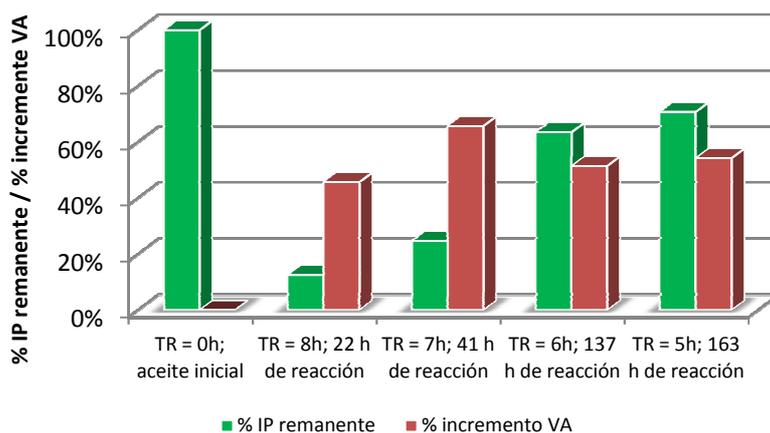


Figura 9. Valores porcentuales del IP remanente y del incremento del valor de p-anisidina en muestras de aceite inicial y para los tiempos de residencia de 5, 6, 7 y 8h.

Se midió el valor de p-anisidina para comprobar si la reducción del IP podía deberse a la transformación de compuestos de oxidación primaria en compuesto de oxidación secundaria, o si por lo contrario, no se estaba dando esta transformación y la reducción del IP era debida a la retención de hidroperóxidos en la columna. El valor del test de p-anisidina para la muestra

inicial fue de 3.4. Tras la reacción el valor de p-anisidina se mantuvo en un rango entre 5.1-5.8, excepto para la muestra de $T_R=8h$ tomada a las 185h de reacción, cuyo valor se mantuvo más cerca del valor del aceite de partida, en 3.9.

A la vista de los resultados representados en la figura 9, aparentemente la reducción del IP no estaría relacionada con un incremento significativo del valor de p-anisidina, ya que tanto reducciones del 80% como del 30% en el IP, estarían dando lugar a un valor similar de p-anisidina. Así el mecanismo de inactivación hipotético estaría más relacionado con la inhibición de la lipasa por reacción con radicales libres y polimerización de la lipasa causada por compuestos de oxidación primaria retenidos durante la reacción.

2.3.2. Efecto del glicerol

Una de las causas de la pérdida de actividad de la lipasa PLG es el posible recubrimiento del soporte enzimático por el glicerol liberado durante en proceso de catálisis. Muchos autores han descrito previamente este proceso como el principal motivo de pérdida de actividad enzimática. Recientemente Ciftci & Temelli (11) publicaron un estudio sobre producción en continuo de FAMES a partir de destilado de aceite de maíz en el que corroboraban la acumulación de glicerol en el soporte enzimático, al cual le atribuían un efecto negativo a la transferencia de materia entre la enzima y el sustrato. En su trabajo calcularon que una completa reacción de TAG con el metanol podía dar lugar a un 10% de glicerol aproximadamente. En su caso, tras 5 días de funcionamiento en continuo el producto contenía un 1.9% de glicerol, lo que indicaría que el glicerol estaría reteniéndose en el soporte, hecho que se confirmó tras el análisis de la enzima tras la reacción, en la que se determinaron valores entre el 30-40% de glicerol sobre la masa de los subproductos existentes en la enzima extraída.

En 2011, Xu et al. (12) llevaron a cabo un estudio sobre el efecto del glicerol en una reacción de etanolisis enzimática en aceite de colza. Para ello analizaron la acumulación de glicerol sobre diferentes soportes enzimáticos así como el efecto del glicerol sobre el propio catalizador (Lipozyme TL HC) y comprobaron que efectivamente una concentración de glicerol del 2% llegaba a causar una disminución de la conversión de TAG en FAEE en un 21%. Demostraron además que el efecto del glicerol sobre el catalizador variaba en función del mismo. Llevaron a cabo un ensayo con Novozyme 435, Lipozyme TL IM y Lipozyme TL HC y determinaron que el glicerol tenía mayor efecto sobre Lipozyme TL IM, posiblemente debido a que la actividad inicial del enzima era mayor, lo que provocaba una aparición más rápida de glicerol en el medio. En el mismo estudio analizaron la afinidad del glicerol por diferentes soportes enzimáticos, tanto de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica. Estos ensayos elucidaron que en soportes de naturaleza más hidrofílicos el glicerol quedaba altamente adsorbido en el material mientras que los soportes de naturaleza más hidrofóbica repelían el glicerol, el cual quedaba disperso formando gotas en el aceite.

Ambos estudios, así como publicaciones previas en las que el glicerol se presenta como la posible causa de la pérdida de actividad, están basados en los resultados de Dossat (35) y Marty (16) en los años 90. Marty et al. estudió la influencia de la producción de compuestos

hidrofílicos en reacciones catalizadas por lipasas en continuo empleando n-hexano. Los resultados de sus estudios implicaban una reducción drástica de la actividad de la enzima, hecho que se atribuyó a la adsorción de compuestos polares, principalmente agua y glicerol alrededor del catalizador, formando una capa que dificultaba la difusión de sustratos del medio al enzima. Posteriormente Dossat et al. refrendaron los resultados obtenidos por Marty et al. constatando el efecto del glicerol sobre la actividad catalítica. De hecho Dossat et al. encontraron que esta pérdida de actividad era incluso más evidente cuando existía agua en el medio además de glicerol, ya que el efecto de hidratación hidrofílica era aún mayor. Otra de las conclusiones del trabajo fue la asociación de la polaridad del medio respecto al efecto de adsorción del glicerol. En este caso, se advirtió que cuanto menos hidrofóbico era el sustrato, menor era la adsorción del glicerol en el soporte, debido a una disminución de la afinidad del glicerol por el soporte.

Tabla 3. Porcentajes de aceite y glicerol en la enzima recuperada del reactor

	% en peso
% de aceite en enzima recuperado	56.7
Concentración de glicerol (%) en enzima recuperado impregnado de aceite	0.69
Concentración de glicerol (%) en enzima recuperado libre de aceite	1.61

La tabla 3 muestra la cantidad de glicerol en la mezcla recuperada del interior del reactor, tras la reacción. El porcentaje de glicerol sobre la enzima libre de aceite alcanzaría un valor promedio de 1.61% en el total de la enzima recuperado. Este porcentaje, comparado con los resultados obtenidos por Temelli (11) (40%), parece insignificante, no obstante otros trabajos publicados, como el de Xu et al. (9) (2%), avalarían un resultado similar. En cualquier caso ensayos previos del grupo de investigación (no publicados) determinaron que porcentajes por encima del 1% de glicerol sí tenían un efecto negativo sobre la lipasa PLG.

2.3.3. Efecto de la temperatura del reactor

La temperatura es un parámetro crítico en las reacciones enzimáticas ya que pequeñas variaciones pueden reducir o aumentar la actividad del catalizador, de igual modo, que un exceso de temperatura prolongado puede afectar a su funcionalidad y llegar a inactivar un enzima de forma irreversible.

La temperatura de trabajo del reactor durante toda la reacción se mantuvo constante a 45 °C. En estudios previos del grupo de investigación (no publicados) se investigó la reacción de etanolisis de aceite de oliva refinado con la lipasa PLG en STR, a 40 °C y con una concentración del 5% de etanol (peso/peso). Se consiguió llegar a un 28% de conversión de FAEE llevando a cabo 10 ciclos consecutivos sin pérdida de actividad significativa de la lipasa. Entre ciclo y ciclo se realizó un lavado de la lipasa con etanol y se comprobó que la lipasa recuperaba la actividad íntegramente. A partir de estos resultados y para el presente estudio, con el fin de aumentar el grado de conversión del proceso, por encima del 30%, se aumentó la concentración de etanol en el medio hasta un 6%. Este hecho obligó a aumentar la temperatura de la reacción ya que esta concentración de etanol a 40 °C no permitía conseguir una mezcla totalmente

homogénea, observándose un medio bifásico. Con el fin de obtener la monofase se decidió aumentar la temperatura del sistema a 45 °C.

Las especificaciones del proveedor (Meito Sangyo) establecen una temperatura óptima de trabajo para la enzima de 50 °C, no obstante la mayor estabilidad térmica se sitúa en los 40 °C. Aunque no se han encontrado trabajos específicos sobre la estabilidad térmica de la lipasa PLG, Kaewthong et al. (6) desarrollaron un estudio sobre producción en continuo de MAG por glicerolisis en el que comparaban la estabilidad de diferentes lipasas a diferentes temperaturas, entre las que hay mención a la lipasa PL de *Alcaligenes sp.* En este estudio se observó que la lipasa PL había perdido un 80% de su actividad enzimática a las dos horas de comenzar la reacción de glicerolisis a 45 °C.

Dado que no se han encontrado más estudios al respecto es complejo determinar si la temperatura ha sido clave en la pérdida de actividad enzimática, o más bien, ha sido un parámetro más que ha podido influir en la inactivación global.

2.3.4. Efecto del agua y el etanol

La reacción de etanolisis no produce agua, sino que la consume, por lo tanto es necesaria la existencia de una cierta cantidad de agua en el medio de reacción para mantener la lipasa catalíticamente activa. Debe existir un equilibrio en la actividad del agua que permita la reacción catalítica, no obstante, un exceso de agua puede favorecer reacciones de hidrólisis no deseadas e incluso provocar una disminución de la actividad de la enzima, tal como ocurre en el caso del glicerol. Muchos autores han reportado el efecto de la actividad del agua en lipasas (2, 13, 16, 21, 35, 37, 44). El hecho de considerar una posible contribución del agua a la pérdida de actividad de la lipasa PLG, proviene fundamentalmente del uso de etanol 96° en la mezcla de reacción. Si bien se trata de una cantidad de agua muy baja (23.28 ppm) en el total del medio de reacción, no se puede descartar completamente su posible influencia en el proceso, ya que a esta cantidad de agua posiblemente se le sumaría la existente en el aceite así como la de la enzima inmovilizada.

Marty et al.(16) reportaron sobre la influencia de los compuestos hidrofílicos en reacciones de esterificación y transesterificación, y comprobaron que en reacciones con disolventes no polares, el agua causaba una reducción en la actividad enzimática.

Watanabe et al.(2), en un estudio con Novozyme 435 en el que valoraron el efecto del agua en la metanolisis de aceite para la producción de biodiesel, reportaron un efecto negativo del agua, en una concentración superior a 500 ppm sobre la actividad de la lipasa durante el primer ciclo de reacción. No obstante la conversión se recuperaba y llegaba a valores cercanos al 35% de FAME tras cinco ciclos de conversión. La explicación a este fenómeno se debía a que el agua existente en el medio de reacción pasaba a la capa de glicerol por lo que ofrecía menor interferencia a la reacción entre los reactivos y la lipasa. Shimada et al.(13) obtuvieron estos mismos resultados en un estudio sobre alcoholisis enzimática para la producción de biodiesel. Las conclusiones en ambos estudios indicaron que el agua no interfería en la reacción de

metanolisis. Sin embargo, Yesiloglu (21) estudiando la etanolisis enzimática de aceite de girasol determinó que el agua contenida en la enzima era suficiente para llevar a cabo la etanolisis, la adición de agua al medio en porcentajes por encima de 0.125% (v/v) afectaba negativamente a la misma.

Kaieda et al. (15), investigando el efecto del metanol y el agua en la producción de biodiesel, concluyeron que diferentes lipasas requieren concentraciones de agua diferentes para catalizar adecuadamente las reacciones de alcoholisis, siendo en algunos casos contrapuestas, es decir, algunas lipasas trabajan mejor a altas concentraciones de agua, mientras que otras lipasas ven menguada su capacidad catalítica a dichas concentraciones. En aquellos casos en los que las lipasas eran más estables a altas concentraciones de agua, se le atribuyó a la misma un papel protector frente a la inhibición por metanol. Salum et al. (37) refrendaron esta teoría en un estudio con lipasa de *B. cepacia*. Chattopadhyay et al. (38) estudiaron los parámetros que afectaban a la producción de biodiesel a partir de semillas de algodón con lipasa pancreática e igualmente convinieron en que la concentración de agua es crucial en función del tipo de lipasa, ya que la enzima conseguía su mayor nivel de eficiencia en la interfase acuoleosa, y un aumento de la fracción hídrica causaba limitaciones difusionales del sustrato o dirigía la reacción hacia la hidrólisis.

En cuanto a la concentración de etanol, también existen múltiples referencias aludiendo a la capacidad inhibitoria del mismo en reacciones de etanolisis. En el presente estudio, se empleó una concentración de etanol del 6% (peso/peso) con la finalidad de incrementar el grado de conversión a FAEE, puesto que estudios previos del grupo de investigación habían alcanzado únicamente un 28% de FAEE. Aunque el reactor se mantuvo en agitación continua y no se observó en ningún momento que se estableciera un sistema bifásico, es posible que una fracción de etanol no estuviera solubilizada por completo en el aceite. Este etanol insoluble sería una causa de inactivación enzimática. En el presente estudio se empleó una relación molar aproximada 1/1 (etanol/aceite). De acuerdo a las cantidades de aceite y etanol, se estimó llegar a una conversión máxima del 35% FAEE, por lo que el etanol no estaría en exceso en ningún momento.

En 1999 y 2002, Watanabe (14) y Shimada (13) determinaron que ratios superiores a 1/3 (en equivalentes molares metanol/ácido graso) conducían a una inactivación irreversible de lipasa de *C. antártica* en reacciones de etanolisis y metanolisis respectivamente, debido a la existencia de gotas de alcohol no disueltas en el aceite. Esta inactivación podía ser resuelta con alcoholisis en varias etapas, añadiendo en cada una de ellas una cantidad de alcohol en relación molar 1/3.

Yesiloglu(21) también describió una caída de la actividad enzimática debido a un exceso de etanol en el reactor, que provocaba un desequilibrio de la capa de agua que rodeaba la enzima, resultados acordes a lo propuesto por Kaieda (15) y Chattopadhyay (38). Salum et al.(37) confirmaron una conversión por encima del 90% empleando ratio 3/1 (etanol/aceite) y determinaron que ratios mayores etanol/aceite reducían significativamente la conversión, sin embargo, su conclusión no estuvo basada en una posible desnaturalización enzimática como

sugería en estudio de Shimada, sino más bien debido a una mayor inhibición competitiva del etanol.

En 2009, trabajando con la lipasa de *Alcaligenes spp.* Lorena et al. (39), llevaron a cabo la transesterificación de ácidos grasos para la producción de biodiesel. Para ello desarrollaron una metanolisis empleando diferentes ratios de aceite/metanol. Los resultados demostraron una inhibición significativa de la lipasa por metanol empleando relaciones molares 1/3 y 1/4 (aceite/metanol). Esta inhibición pudo ser reducida, desarrollando el proceso en seis etapas.

Considerando los estudios publicados en relación a la inhibición de la lipasa por el etanol, podemos plantear que el etanol ha podido tener cierta determinación en la reducción de actividad de la lipasa, no obstante, no debería ser el factor más significativo, teniendo en cuenta que el ratio (aceite/etanol) está muy por debajo de los ratios inhibitorios contrastados en investigaciones previas.

2.4. Efecto de la variación de los principales parámetros del proceso

Hasta este punto la discusión se ha centrado en las causas de la inactivación enzimática identificada en el proceso de reacción. En cualquier caso es importante determinar la importancia de las principales variables del proceso en los resultados obtenidos, con el fin de conocer su influencia. Los parámetros variables considerados en este estudio fueron:

- el orden o secuencia en que se recogieron las muestras
- el tiempo de residencia empleado (T_R)
- el tiempo total de reacción (tiempo de funcionamiento total, T_F).

A continuación se analiza la relación de cada uno de estos parámetros con los resultados obtenidos para la concentración de polifenoles, el índice de peróxidos (IP), y la composición en acilglicéridos en las diferentes muestras recogidas.

2.4.1. Tiempo de residencia

El T_R ha mostrado una correlación inversa con la concentración de polifenoles ($r = -0.8672$) y el IP ($r = -0.9453$), así como con la concentración de TAG ($r = -0.9614$) y directa o positiva con la concentración de FAEE ($r = 0.9916$) y MAG ($r = 0.9794$). El T_R asociado al flujo empleado es importante en la conversión de FAEE, ya que el hecho de emplear caudales más bajos permite un mayor tiempo de contacto entre la enzima y el medio de reacción y por lo tanto aumentar el rendimiento. Ciftci y Temelli (11) estudiaron el efecto del flujo en una reacción de metanolisis en un reactor de fluidos supercrítico y observaron una caída mayor al 40% en la conversión a FAMEs al triplicar el caudal. Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En relación al índice de peróxidos, los resultados corroboran la discusión descrita en el apartado 2, sobre la posible acumulación de compuestos de oxidación en la columna como causa de la inactivación enzimática. La base de la explicación sería similar a la dada para la conversión de FAEE, es decir, un menor caudal permitiría que se dieran un mayor número de reacciones de oxidación y polimerización en la columna, reteniéndose un mayor número de compuestos de oxidación lipídica.

La relación con respecto a la concentración de polifenoles ha resultado algo controvertida. Si bien sería esperable un descenso de tocoferol causado por su interacción con los peróxidos, hecho que además contribuiría a la reducción del IP del medio, no cabría esperar que ello estuviese condicionado a un T_R . El hecho de existir esta relación hace pensar sobre una posible acumulación de tocoferol en la columna. X.Xu et al. (36), en un estudio sobre el efecto de antioxidantes en la producción de lípidos estructurados empleando lipasas advirtieron sobre el este posible efecto acumulativo de tocoferol en el soporte enzimático.

2.4.2. Tiempo de funcionamiento del reactor

A tiempos largos de funcionamiento, el sistema enzimático pueda haber variado sustancialmente debido a acumulación de compuestos, inactivación, etc. Así pues esta variable nos ofrece una idea de lo que puede haber sucedido en el reactor a lo largo de un ensayo y la tendencia de los datos a más largo plazo.

A partir del análisis estadístico basado en el coeficiente de Pearson, se observa que el T_F no presenta una correlación fuerte con la conversión de los acilglicéridos del aceite. De acuerdo a los resultados existe correlación entre una reducción de MAG ($r = -0.8819$) y el aumento del T_F . En el caso de los TAG ($r = 0.7067$) y FAEE ($r = -0.7976$) los resultados constatan que con el aumento de T_F aumenta el contenido el TAG debido a la pérdida de actividad enzimática y se da, por lo tanto, una reducción en el contenido en FAEE.

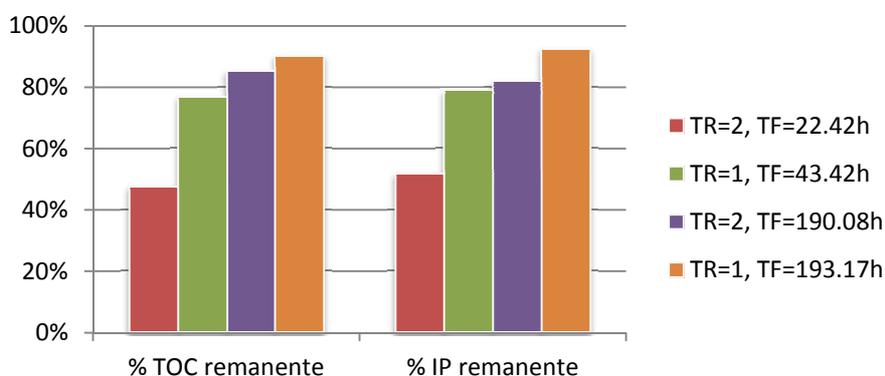


Figura 10. Incremento del IP y del porcentaje de polifenoles en las muestras a diferentes T_F .

Las relaciones más fuertes destacan para la concentración de polifenoles ($r = 0.9309$) y para el IP ($r = 0.9801$). En ambos casos se observa una relación directa que indica que a medida que el

reactor está en funcionamiento las muestras van reteniendo mayor cantidad de polifenoles y de peróxidos en cada uno de los T_R . La figura 10 muestra un ejemplo para los T_R de 1 y 2 horas a diferentes tiempos de funcionamientos del reactor. Gráficamente se observa un incremento tanto de polifenoles como de IP con el incremento de T_F . Del mismo modo considerando muestras con el mismo T_R , también se observa esta misma tendencia incremental. En el caso de las muestras con un T_R de 2 h al inicio del ensayo, se determinó un 48% de tocoferol remanente y un 52% de peróxidos remanentes en la muestra. A las 190 h de funcionamiento del reactor, una muestra con ese mismo T_R había incrementado hasta un 85% y 82% respectivamente los niveles para las variables mencionadas.

Estos datos refuerzan la hipótesis de la retención o acumulación de compuestos en la columna, ya sea por interacción con la enzima o retenidos en el soporte enzimático. A medida que va avanzando la reacción la acumulación de compuestos se hace más significativa. Si bien no se puede saber si existe un arrastre interno por el que se van acumulando compuestos a la entrada de la columna y van saliendo por el extremo opuesto, o sencillamente la saturación alcanzada evita que tocoferoles y compuestos de oxidación se retengan mucho más y prácticamente todo aquello que entra en la columna acabe saliendo, excepto por lo poco que ya pueda quedar retenido en T_F avanzados.

2.4.3. Orden (secuencia) aleatorio de los tiempos de residencia

Aunque a nivel global el tiempo de funcionamiento del reactor sea el mismo, hay que considerar la posibilidad de que el hecho de emplear los T_R en un orden secuencial o aleatorio pueda haber influido en los resultados obtenidos para las diferentes variables estudiadas. En el caso que no hubiese habido pérdida de actividad enzimática posiblemente no se encontrarían diferencias entre el uso de un orden secuencial y un orden aleatorio. En este caso, tal como se ha discutido en apartados anteriores, el hecho de haber empleado un T_R mayor al inicio puede haber influido en la mayor acumulación de compuestos en la columna, lo que habría condicionado en mayor o menor medida los T_R siguientes.

El análisis estadístico revela que existe una correlación entre la secuencia y las concentraciones de polifenoles y el IP, siendo positiva en ambos casos. Estos resultados son lógicos teniendo en cuenta los razonamientos discutidos hasta este punto, ya que cuanto más avanzada esté una muestra en la secuencia, mayor va a ser su T_F y debido a la inactivación enzimática, el tiempo en el que se recoge la muestra va a ser relevante.

3. Evolución del estado oxidativo del producto

A lo largo de los anteriores apartados se ha discutido ampliamente sobre las causas de la inactivación de la lipasa, entre las que destaca la acumulación de compuestos de oxidación y otros compuestos en el reactor. Aunque también se ha mencionado brevemente la posible acumulación de tocoferol, a continuación se analiza este punto en mayor profundidad.

Estudiando la reducción de tocoferol y del IP en los diferentes T_R , se advirtió que la reducción en ambas variables era similar para cada uno de los T_R . Esta reducción se aprecia claramente en la figura 11. La reducción del IP está fundamentada en la acumulación e interacción de compuestos de oxidación con la enzima, además de por la propia acción del tocoferol sobre los radicales libres. La disminución de tocoferol, sin embargo, debería estar únicamente sujeta a la pérdida de tocoferol por inactivación de compuestos de oxidación. El hecho de que ambas variables disminuyan al mismo nivel, sólo es explicable por un efecto adicional sobre el tocoferol.

Si bien, no se han encontrado referencias relativas a la posibilidad de interacciones entre la enzima y el tocoferol, la acumulación podría ser debida a interacciones con el material del soporte enzimático. La lipasa PLG empleada en este estudio está inmovilizada sobre tierra de diatomeas, un material compuesto por sílice amorfo empleado extensamente en la industria por su capacidad de adsorción, con la finalidad de recuperar o purificar determinados compuestos. Otra posible explicación a esta reducción de tocoferol vendría dada por la formación de ésteres de tocoferol por interacción entre el tocoferol y los ácidos carboxílicos de ácidos grasos libres. Hamam y Shahidi(47) ya observaron este mecanismo durante la producción de lípidos estructurados y ha sido reseñado por varios autores(27, 48, 49).

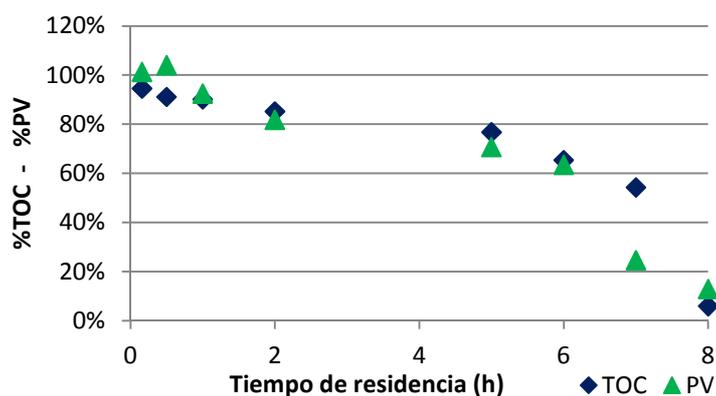


Figura 11. Efecto del tiempo de residencia sobre la presencia de polifenoles y peróxidos en el aceite resultante. PV, índice de peróxidos; TOC, polifenoles remanentes en el producto

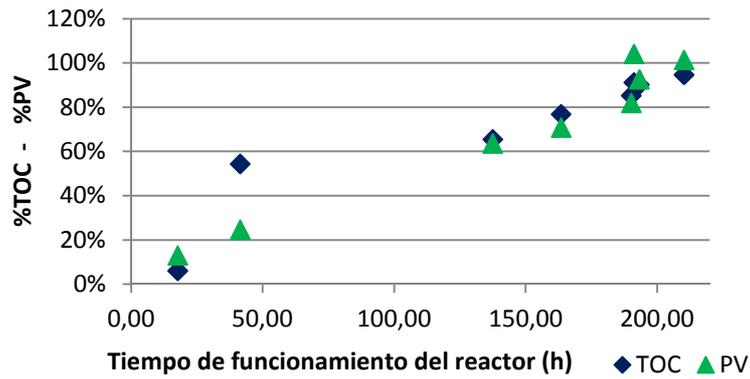


Figura 12. Efecto del tiempo de funcionamiento del reactor sobre la presencia de polifenoles y peróxidos en el producto. PV, índice de peróxidos; TOC, polifenoles remanentes en el producto

Entre las hipótesis planteadas para la reducción del nivel de tocoferol, la figura 12 refuerza la teoría de la acumulación en el soporte enzimático. De nuevo se observa la misma tendencia en los puntos para el IP y para la concentración de polifenoles. Tal como se la comentado previamente el efecto de saturación de la columna no permitiría una acumulación mayor de compuestos, por lo que los existentes en el medio de reacción entrante se mantendrían en la muestra o habría un efecto de captura-liberación simultanea, de modo que seguiría existiendo una acumulación en la parte inicial de la columna, y un desprendimiento en la fracción de la salida.

V. Conclusiones

El presente estudio ha permitido elucidar algunas de las propiedades de la lipasa PLG de *Alcaligenes sp.* para su uso en reacciones de etanolisis en reactores en continuo. El principal aspecto a destacar es su alta eficiencia de conversión en condiciones óptimas, en las que la inactivación puede ser un hecho despreciable, llegando a alcanzar niveles de conversión superiores al 30% en tiempos 8 veces inferiores al proceso en reactores en batch. De acuerdo a la cinética de la reacción, con un pseudo-tiempo aproximado de 4h se alcanzarían niveles de conversión cercanos al máximo posible. Esta alta capacidad catalítica hace pensar en un potencial uso a nivel industrial.

Las variables de proceso más influyentes son el tiempo de residencia, el tiempo de funcionamiento del reactor y la aleatoriedad en la secuencia de muestras. Tanto el T_R como el T_F muestran fuerte correlación con el IP y la concentración de polifenoles, siendo dicha relación inversa para el T_R , y directa para el T_F . El T_R es además un factor clave en el grado de conversión, favoreciendo un incremento de la misma a caudales más bajos hasta alcanzar el nivel máximo de conversión posible.

El proceso no obstante, muestra una evidente inactivación enzimática reduciendo la actividad catalítica progresivamente hasta el 50% a las 210h de reacción. Esta pérdida de actividad puede ser atribuida a diferentes factores de acuerdo a estudios previos relacionados, principalmente por la acumulación de compuestos en el soporte enzimático que actúan dificultando o inhibiendo la actividad de la lipasa. Los compuestos de oxidación, especialmente los hidroperóxidos, pueden causar la polimerización de la enzima hasta un nivel en el que no tiene actividad catalítica. El glicerol, el agua y el etanol son compuestos polares que han demostrado un potencial inhibidor de la enzima en medios hidrófobos. El glicerol producido en la reacción actúa creando una barrera física que dificulta el paso de los sustratos hacia el centro activo. El agua y el etanol, si bien favorecen reacciones diferentes, de hidrólisis y de etanolisis respectivamente, actúan variando la actividad del agua en el sistema de reacción, hecho que puede llegar a cambiar la actividad enzimática tanto a nivel cinético como termodinámico. Adicionalmente el etanol puede actuar como inhibidor competitivo del sustrato de la reacción, impidiendo su unión al centro activo.

Otro factor relevante ha sido el soporte en el que está inmovilizada la lipasa. La tierra de diatomeas es un fuerte adsorbente que podría actuar secuestrando no sólo el glicerol sino también el tocoferol presente en el aceite. La temperatura empleada en el proceso, si bien no se conoce su efecto real, podría haber contribuido a la inactivación enzimática.

Este análisis de los resultados alude indirectamente a posibles líneas de investigación futuras para mejorar el proceso en continuo y reducir la inactivación, como podría ser posible el estudio de la lipasa PL inmovilizada en soportes enzimáticos con menor capacidad adsorbente.

VI. Anexos

Índice de tablas

Nº	Descripción	Página
1	Relación entre los parámetros del modelo y las constantes representadas en la Figura 4	24
2	Valores obtenidos para los parámetros de la cinética de la reacción	25
3	Porcentajes de aceite y glicerol en la enzima recuperada del reactor	33

Índice de figuras

Nº	Descripción	Página
1	Obtención de lípidos estructurados mediante interesterificación enzimática y química	10
2	Proceso de peroxidación lipídica	15
3	Representación gráfica del reactor de flujo continuo empleado	19
4	Representación esquemática de la reacción de etanolisis	24
5	Conversión de TAG en FAEE en base al pseudo-tiempo de reacción	26
6	Pérdida de la actividad de la lipasa con el tiempo de funcionamiento del reactor	27
7	Porcentaje total de compuestos identificados y composición porcentual de los aceites de partida y del aceite recogido del soporte enzimático tras la reacción	29
8	Reducción del IP en diferentes muestras respecto al aceite inicial	30
9	Valores porcentuales del IP remanente y del incremento del valor de p-anisidina en muestras de aceite inicial y para los tiempos de residencia de 5, 6, 7 y 8 h	31
10	Incremento del IP y del porcentaje de polifenoles en las muestras a diferentes T_F	37
11	Efecto del tiempo de residencia sobre la presencia de polifenoles y peróxidos en el aceite resultante	39
12	Efecto del tiempo de funcionamiento del reactor sobre la presencia de polifenoles y peróxidos en el producto	40

Índice de ecuaciones

Nº	Descripción	Página
1	Descripción de la cinética de la reacción de etanolisis según Modelo de Torres & Hill	24
2	Expresión del pseudo-tiempo de reacción	25
3	Representación de la variación de la actividad enzimática con el tiempo	25
4	Representación del pseudo-tiempo para el presente estudio	26

VII. Referencias

- (1) *International Olive Oil. International Olive Council 2013* Available from: URL: <http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-spanish/oliveWorld/aceite1.html>
- (2) Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *J Amer Oil Chem Soc* 2001;78(7):703-7.
- (3) Lubary M, Hofland GW, ter Horst JH. A process for the production of a diacylglycerol-based milk fat analogue. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011 Apr 1;113(4):459-68.
- (4) Schorken U, Kempers P. Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009 Jul 1;111(7):627-45.
- (5) Torres CF, Hill Jr CG, Otero C. Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Borage Oil: A Kinetic Study. *Biotechnol Progr* 2008 Sep 5;20(3):756-63.
- (6) Kaewthong W, Sirisansaneeyakul S, Prasertsan P, Kittikun A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem* 2005 Apr;40(5):1525-30.
- (7) Ohta Y., Yamane T., Shimizu S. Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolyses of fat by lipase. *Agr Biol Chem Tokio* 1989;53(7):1885-90.
- (8) Wang Y, Gordon MH. Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase. *J Agr Food Chem* 1991 Sep 1;39(9):1693-5.
- (9) Xu X, Hoy CE, Adler-Nissen J. Effects of lipid-borne compounds on the activity and stability of lipases in microaqueous systems for the lipase-catalyzed interesterification. In: Ballesteros A, editor. *Progress in Biotechnology. Volume 15* ed. Elsevier, 1998. p. 441-6.
- (10) Pirozzi D. Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides. *Eur J Lipid Sci Technol* 2003 Oct;105(10):608-13.
- (11) Ciftci ON, Temelli F. Continuous biocatalytic conversion of the oil of corn distiller's dried grains with solubles to fatty acid methyl esters in supercritical carbon dioxide. *Biomass Bioenerg* 2013 Jul;54(0):140-6.
- (12) Xu Y, Nordblad M, Nielsen PM, Brask J, Woodley JM. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. *J Mol Catal B-Enzym* 2011 Nov;72(3-4):213-9.
- (13) Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal B-Enzym* 2002 Jun 7;17(3-5):133-42.
- (14) Watanabe Y, Shimada Y, Sugihara A, Tominaga Y. Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Biosci Bioeng* 1999;88(6):622-6.
- (15) Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H. Effect of Methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *J Biosci Bioeng* 2001;91(1):12-5.
- (16) Marty A, Dossat V, Condoret JS. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol Bioeng* 1997 Oct 20;56(2):232-7.
- (17) *Aceite de Oliva. 2013. Agencia para el Aceite de Oliva.* URL: <http://www.aao.es>
- (18) Lubary M, ter Horst JH, Hofland GW, Jansens PJ. Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Milk Fat with a Focus on Short-Chain Fatty Acid Selectivity. *J Agr Food Chem* 2008 Dec 12;57(1):116-21.
- (19) Meher LC, Vidya Sagar D, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renew Sust Energ Rev* 2006 Jun;10(3):248-68.

- (20) Stamenkovic OS, Velickovic AV, Veljkovic VB. *The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives.* *Fuel* 2011 Nov;90(11):3141-55.
- (21) Yesiloglu Y. *Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil.* *J Amer Oil Chem Soc* 2004;81(2):157-60.
- (22) Torres CF, Fornari T, Tenllado D, Señoráns FJ, Reglero G. *A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst.* *Biochem Eng J* 2008 Nov 1;42(2):105-10.
- (23) Piyatheerawong W, Iwasaki Y, Xu X, Yamane T. *Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases.* *J Mol Catal B-Enzym* 2004 Apr 2;28(1):19-24.
- (24) Camacho F, Robles A, González PA, Camacho B, Esteban L, Molina E. *Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols.* *Appl Catal A-Gen* 2006 Feb 24;301(2):158-68.
- (25) Muñoz MdM, Robles A, Esteban L, González PA, Molina E. *Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols.* *Process Biochem* 2009 Jul;44(7):723-30.
- (26) Iwasaki Y, Yamane T. *Enzymatic synthesis of structured lipids.* *J Mol Catal B-Enzym* 2000 Oct 4;10:129-40.
- (27) Martin D, Reglero G, Señoráns FJ. *Oxidative stability of structured lipids.* *Eur Food Res Technol* 2010 Jul 21;231(5):635-53.
- (28) Sorensen AD, Xu X, Zhang L, Kristensen J, Jacobsen C. *Human Milk Fat Substitute from Butterfat: Production by Enzymatic Interesterification and Evaluation of Oxidative Stability.* *J Am Oil Chem Soc* 2010;87(2):185-94.
- (29) Wang L, Wang Y, Hu C, Cao Q, Yang X, Zhao M. *Preparation of Diacylglycerol-Enriched Oil from Free Fatty Acids Using Lecitase Ultra-Catalyzed Esterification.* *J Am Oil Chem Soc* 2011;88(10):1557-65.
- (30) Yang Y, Vali S, Ju Y. *A Process for Synthesizing High Purity Monoglyceride.* *J Chin Inst Chem Eng* 2013 Nov 1;34(6):617-23.
- (31) Lee GC, Wang DL, Ho YF, Shaw JF. *Lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides for short-chain monoglyceride production.* *J Amer Oil Chem Soc* 2004;81(6):533-6.
- (32) Esteban L, Muñoz MdM, Robles A, Hita E, Jimenez MJ, González PA, et al. *Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types.* *Biochem Eng J* 2009 May 15;44(2):271-9.
- (33) Itabaiana J, de Mariz e Miranda LS, de Souza ROMA. *Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions.* *J Mol Catal B-Enzym* 2013 Jan;85-86(0):1-9.
- (34) Chesterfield DM, Rogers PL, Al-Zaini EO, Adesina AA. *Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase.* *Chem Eng J* 2012 Oct 1;207-208(0):701-10.
- (35) Dossat V, Combes D, Marty A. *Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production.* *Enzyme Microb Tech* 1999 Aug;25(3-5):194-200.
- (36) Xu X, Timm-Heinrich M, Nielsen NS, Porsgaard T, Jacobsen C. *Effects of antioxidants on the lipase-catalyzed acidolysis during production of structured lipids.* *Eur J Lipid Sci Technol* 2005 Aug 1;107(7-8):464-8.
- (37) Salum TFC, Villeneuve P, Barea B, Yamamoto CI, Cocco LIC, Mitchell DA, et al. *Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by Burkholderia cepacia LTEB11.* *Process Biochem* 2010 Aug;45(8):1348-54.
- (38) Chattopadhyay S, Karemore A, Das S, Deysarkar A, Sen R. *Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics.* *Appl Energ* 2011 Apr;88(4):1251-6.

- (39) Lorena S, Wilson L, Andrés I. Immobilization of the *Alcaligenes* spp. lipase to catalyze the transesterification of fatty acids to produce biodiesel. *New Biotechnol* 2009 Sep;25, Supplement(0):S125.
- (40) Torres CF, Tenllado D, Señorans F, Reglero G. A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes. *Chromatographia* 2009;69(7-8):729-34.
- (41) Tenllado D, Reglero G, Torres CF. A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil. *Sep Purif Technol* 2011 Nov 15;83(0):74-81.
- (42) Kamvissis V, Barbounis E, Megoulas N, Koupparis M. A novel photometric method for evaluation of the oxidative stability of virgin oils. *J Aoac Int* 2008;91:794-801.
- (43) Bondioli P, Della Bella L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol* 2005 Mar 1;107(3):153-7.
- (44) Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnol Bioeng* 2009 Apr 1;102(5):1298-315.
- (45) Pilarek M, Szewczyk KW. Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *J Biotechnol* 2007 Jan 20;127(4):736-44.
- (46) Teixeira ARS, Santos JLC, Crespo JG. Lipase-Catalyzed Consecutive Batch Reaction for Production of Steryl Esters from Vegetable Oil Deodorizer Distillates. *Ind Eng Chem Res* 2012 Mar 19;51(15):5443-55.
- (47) Hamam F, Shahidi F. Acidolysis Reactions Lead to Esterification of Endogenous Tocopherols and Compromised Oxidative Stability of Modified Oils. *J Agr Food Chem* 2006 Aug 29;54(19):7319-23.
- (48) Basturk AYHA, Javidipour ISSA, Boyaci IH. Oxidative stability of natural and chemically interesterified cottonseed, palm and soybean oils. *J Food Lip* 2007 Jun 1;14(2):170-88.
- (49) Zou L, Akoh CC. Identification of Tocopherols, Tocotrienols, and Their Fatty Acid Esters in Residues and Distillates of Structured Lipids Purified by Short-Path Distillation. *J Agr Food Chem* 2012 Dec 16;61(1):238-46.