

Silvia Liliana Bucio López

Valorización de subproductos de la industria
pesquera: obtención de derivados lipídicos
ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de
concentrados de harina de pescado con bajo
contenido en grasa



Universidad de Burgos, España

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos Burgos 2015

**Valorización de subproductos de la industria
pesquera: obtención de derivados lipídicos
ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de
concentrados de harina de pescado con
bajo contenido en grasa**

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Burgos en el
programa Avances en Ciencia y Biotecnología
Alimentarias

SILVIA LILIANA BUCIO LÓPEZ

Burgos, 2015



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Dña. MARÍA TERESA SANZ DÍEZ y Dña. SAGRARIO BELTRÁN CALVO, Profesoras del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos

CERTIFICAN:

Que la licenciada Dña. Silvia Liliana Bucio López ha realizado bajo su dirección, el trabajo titulado:

“Valorización de subproductos de la industria pesquera: obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de concentrados de harina de pescado con bajo contenido en grasa”

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos para ser presentado como Tesis Doctoral, expresan su conformidad con dicha presentación.

Y para que conste, firman el presente certificado, en Burgos, a 15 de mayo 2015

Fdo. M. Teresa Sanz

Fdo. Sagrario Beltrán



PILAR MUÑIZ RODRÍGUEZ, coordinadora del programa de doctorado Avances en Ciencia y Biotecnología Alimentarias de la Universidad de Burgos,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "Valorización de subproductos de la industria pesquera: obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de concentrados de harina de pescado con bajo contenido en grasa", presentada por Dña. Silvia Liliana Bucio López, Licenciada en Ingeniería Química y Máster en Metalurgia y Ciencia de los Materiales, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos bajo la dirección de las Dras. María Teresa Sanz Díez y Sagrario Beltrán Calvo, y en representación de la Comisión Académica del Programa de Doctorado, autoriza su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Y para que conste y a efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Burgos,
a 15 de Mayo de 2015



Fdo. Pilar Muñiz **Rodriguez**

Coordinadora del Programa de Doctorado

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España, por la financiación del proyecto “PROCESOS CON FLUIDOS SUPERCRITICOS APLICADOS A LA PRODUCCION Y SEPARACION DE ACILGLICERIDOS ENRIQUECIDOS EN OMEGA-3” (ref.: CTQ2012-39131-C02-01) en cuyo marco se ha realizado la presente Tesis Doctoral

A la Secretaria de Educación Pública por su programa PROMEP quien asigno la Beca Convencional al Extranjero para estudios de Doctorado, dentro del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP/103.5/12/4891).

A la Universidad Tecnológica de Morelia por la gestión y apoyo para mi capacitación.

A mis directoras de tesis, Teresa y Sagrario, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por su constante apoyo, dedicación, confianza y amistad.

A Bety, Orlando, Ángela, Rodrigo, Sara y a todos los compañeros del Área de Ingeniería Química, por su colaboración en este trabajo, por los buenos momentos y su amistad.

A Mila, Teresa Martin, Teresa, Marga, Marian, José Manuel, Toñy, Daniela, Chus, Olga, Alberto, Isabel, Miguel, Martina, Nerea, Miloud, a la familia Blanco y a la familia Sanz, a todos con los que compartí momentos de tertulia y risas en este periodo de crecimiento, gracias por su amistad, pero sobre todo por su cariño.

A mi familia y amigos de México por apoyarme siempre.

A ese ser especial que siempre está a mi lado y que me guía en este camino.

La vida no es fácil para nadie.

¿Y qué importa?

Debemos tener perseverancia y confianza en nosotros mismos;

Crear que tenemos un don para algo

Y que ese algo debe ser realizado.

Marie Curie

Índice General

Índice general

Resumen	17
Introducción	21
Objetivos.....	61
Capítulo 1/Chapter 1	
Liquid-Liquid Equilibrium for Ethanolysis Systems of Fish Oil	67
Capítulo 2/Chapter 2	
Kinetic Study for the Ethanolysis of Fish Oil Catalyzed by Lipozyme® 435 in Different Reaction Media	93
Capítulo 3/ Chapter 3	
Comparación de lipasas en la etanolisis de aceite de pescado. Fraccionamiento de los productos de reacción mediante CO ₂ supercrítico	125
Capítulo 4/Chapter 4	
Study of the influence of process parameters on liquid and supercritical CO ₂ extraction of oil from rendered materials: fish meal and oil characterization	151
Conclusiones	177
Apéndice A	
Equipo de extracción con CO ₂	181
Apéndice B	
Métodos analíticos.....	189

Resumen

RESUMEN

Los subproductos de la industria pesquera generados en tierra han aumentado de forma considerable en los últimos años. La mayor parte de dichos subproductos se emplean para la producción de harinas y aceites de pescado, si bien, debido al desarrollo tecnológico de las últimas décadas, en la actualidad, se considera que este tipo de utilización es ineficiente, por ende se puede hacer un uso más sostenible y eficiente de los recursos pesqueros.

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en la revalorización de los subproductos de la industria pesquera. Para ello, se propone el uso de la tecnología enzimática para la obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados, así como de la tecnología del CO₂ presurizado tanto para el fraccionamiento de los distintos compuestos lipídicos obtenidos en las reacciones enzimáticas como para la obtención de concentrados de proteína de harina de pescado con bajo contenido en grasa.

El trabajo de investigación realizado en esta Tesis Doctoral se engloba dentro del proyecto "Procesos con Fluidos Supercríticos Aplicados a la Producción y Separación de Acilglicéridos Enriquecidos en Omega-3" (MINECO CTQ2012-39131-C02-01) desarrollado en el Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Área de Ingeniería Química, de la Universidad de Burgos.

Los beneficios para la salud de los ácidos grasos omega-3 están bien establecidos en bibliografía, de ahí su amplia utilización como suplementos nutricionales, en farmacia, o como ingredientes de alimentos funcionales. Los aceites de pescado, ricos en dichos ácidos grasos, constituyen uno de los principales sustratos de las reacciones enzimáticas con el fin de obtener concentrados lipídicos ricos en ácidos grasos poli-insaturados.

La primera etapa de este trabajo de investigación ha sido la obtención de derivados lipídicos a partir de aceite de pescado, mezcla de aceite de atún y sardina, rico en omega-3 mediante la etanolisis enzimática del aceite de pescado con dos lipasas comerciales inmovilizadas en distintos soportes que actúan como biocatalizadores.

Este estudio se inició con la determinación del equilibrio entre fases de mezclas de reacción en dos disolventes orgánicos (tert-pentanol y hexano), que permitieron predecir zonas de miscibilidad, obteniendo diagramas de equilibrio de los sistemas estudiados.

Posteriormente se estudió la cinética de etanolisis de aceite de pescado catalizada por las lipasas Lipozyme® 435 y Lipozyme® RM IM en diferentes medios de reacción. Para ello, se analizó el efecto de los parámetros que afectan a la cinética de reacción, comparando así mismo ambas lipasas. En la parte final de esta primera parte de la Tesis, se estudió la capacidad de fraccionamiento con CO₂ presurizado para separar los productos de etanolisis, estudiando el efecto de los parámetros de presión y temperatura que influyen en el proceso, obteniendo un extracto rico en ésteres de etilo y un refinado concentrado en 2-monoglicéridos.

El objetivo de la segunda etapa de este trabajo ha sido el estudio de la extracción del contenido de aceite de la harina de pescado utilizando CO₂ líquido y supercrítico. Los métodos más utilizados para la extracción de grasas implica el empleo de disolventes orgánicos, lo que conlleva el uso de grandes cantidades de los mismos, altas temperaturas y largos tiempos de operación, además de requerir etapas posteriores de refinado. El proceso con fluidos supercríticos supera estas desventajas e incrementa los rendimientos de extracción de compuestos bioactivos.

Mediante el empleo de CO₂ presurizado se pueden obtener concentrados de proteína de pescado con porcentajes inferiores al 1% en masa de aceite. En la última parte de la Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la evaluación del efecto de los parámetros de presión y temperatura que influyen en el proceso. Además, también se han determinado las cinéticas de extracción, evaluando las características de composición y calidad de la harina, así como del aceite extraído.

Introducción

Índice

1	LA INDUSTRIA PESQUERA	25
2	SUBPRODUCTOS EN TIERRA DE LA INDUSTRIA PESQUERA: HARINA Y ACEITE DE PESCADO.....	26
2.1	Harina de pescado	29
2.1.1	Concentrados de proteína de pescado	33
2.2	Aceite de pescado	34
2.2.1	Ácidos grasos insaturados	37
3	REACCIONES PARA LA MODIFICACIÓN DE LIPIDOS.....	38
3.1	Etanolisis	39
3.2	Catálisis enzimática.....	40
3.2.1	Lipasas.....	42
3.2.2	Parámetros que afectan el proceso de Etanolisis	49
4	PROCESOS CON FLUIDOS SUPERCRITICOS.....	51
4.1	Extracción con FSC.....	52
4.2	Fraccionamiento con FSC	54
5	REFERENCIAS	55

1 LA INDUSTRIA PESQUERA

El informe de la FAO del 2014 indica que la producción mundial de la pesca ha aumentado progresivamente desde 133.6 millones de toneladas en el 2002 hasta 158 millones de toneladas en 2012. ¹(ver Figura 1).

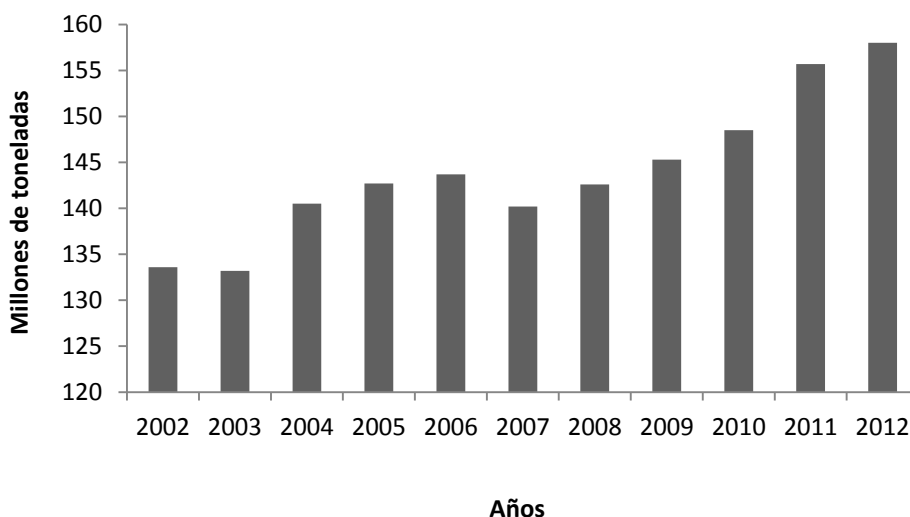


Figura 1. Producción mundial de la pesca^{1,2}

En este mismo informe también se muestra que la proporción de la producción pesquera utilizada para consumo humano directo aumentó de un 75.37% a más del 86.2% del 2002 al 2012. El resto de la producción pesquera (21.8 millones de toneladas en 2012) se destinó a fines no alimentarios (Figura 2). El 75 % de esta cantidad (16.35 millones de toneladas) se redujo a harina y aceite de pescado. Los 5.45 millones de toneladas restantes se utilizaron en su mayoría para el cultivo (peces pequeños, alevines, etc.), como cebo y como materia prima para la alimentación directa en la acuicultura y la ganadería.¹

La producción de harina se destina principalmente a piensos ricos en proteínas, mientras que el aceite de pescado, se emplea como aditivo para piensos en acuicultura, así como para consumo humano por motivos de salud. Tanto la harina como el aceite, se elaboran a partir del pescado entero, o de alguno de sus subproductos. En torno al 35% de la producción mundial de harina de pescado se obtuvo a partir de residuos de pescado en 2012.¹

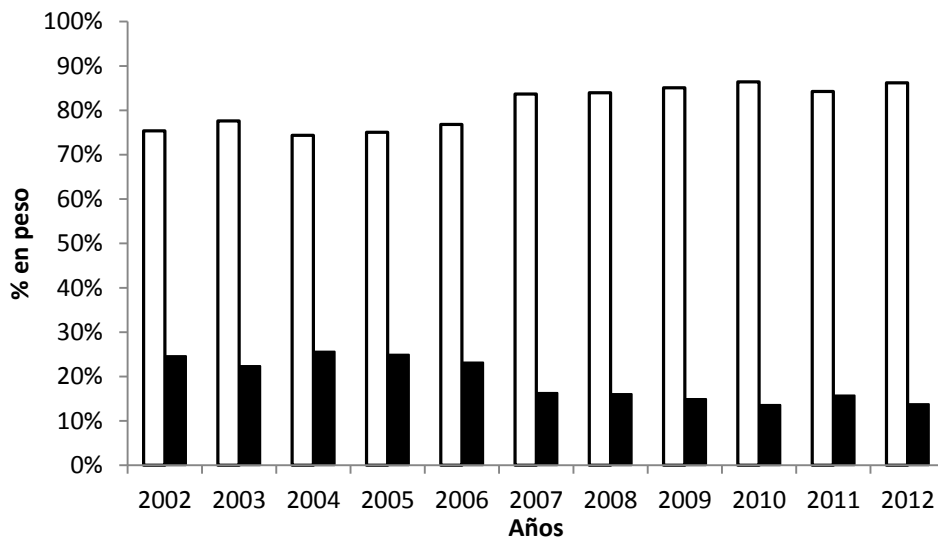


Figura 2. Utilidad de la producción pesquera mundial desde el 2002 al 2012. El rectángulo □ representa el consumo humano y ■ el uso no alimentario.^{1,2}

2 SUBPRODUCTOS EN TIERRA DE LA INDUSTRIA PESQUERA: HARINA Y ACEITE DE PESCADO

No todo lo que se obtiene del mar se utiliza adecuadamente y podemos mencionar tres aspectos claramente: los subproductos y/o desperdicios en tierra, los descartes, el desperdicio de a bordo de las flotas pesqueras.³

- Subproductos y/o desperdicios generados en tierra al procesar especies de peces para obtener el músculo en diferentes presentaciones.
- Descartes de especies por diversas flotas pesqueras, que se da por la captura no intencional de algunas especies de peces, también se llama captura incidental o secundaria.
- El desperdicio a bordo, se obtiene al procesar las capturas a bordo de la flota pesquera, obteniendo la generación de sub-productos como cabezas, vísceras, piel, etc., que son arrojados de nuevo al mar.

Tipos de subproductos generados en tierra

Blanco y col. 2007, reportaron que los residuos de pesca en tierra estaban aumentando. Este aumento se debe a tres factores: (1) mayor elaboración y transformación de productos de pesca, (2) la implementación de nuevas industrias y (3) la subasta de pescados más grandes, generando grandes cantidades de residuos.³

En la industria pesquera el producto principal es la parte comestible constituida por el músculo, pero existen diversos usos potenciales para los subproductos generados, es decir, los distintos componentes que constituyen el pescado que no pertenecen a las partes comestibles empleadas en los circuitos comerciales más habituales. Los productos y subproductos generados en tierra se muestran en la Figura 3. El producto principal en la industria pesquera es el músculo de pescado el cual tiene tres presentaciones como filetes, bloques de pescado y surimi. Los sub-productos principales generados son la harina y el aceite de pescado.

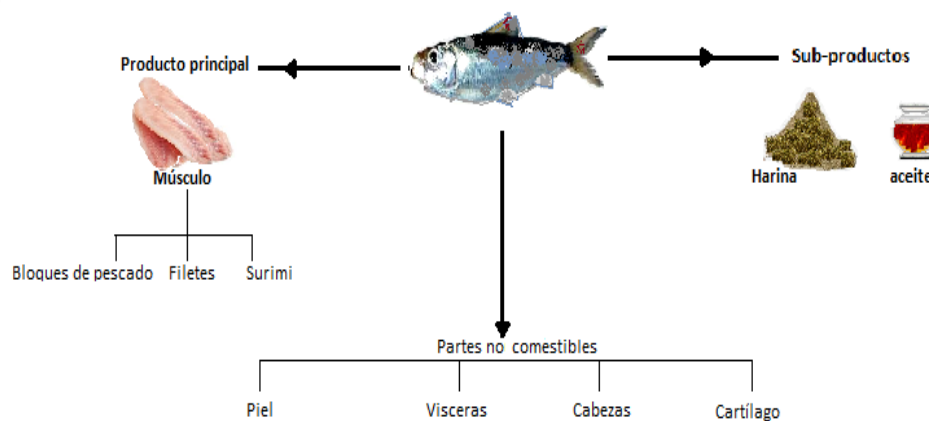


Figura 3. Esquema de los productos y subproductos en la industria pesquera.

El esquema de la Figura 3 también muestra las partes no comestibles de los pescados, de las cuales se pueden obtener nuevos productos y realizar la utilización integral. En la Tabla 1, se observan los usos de las partes no comestibles del pescado. Aunque en general la fabricación de harinas y aceites de pescado para alimentación animal es la principal vía de aprovechamiento, también hay otros usos potenciales de estas partes no comestibles como lo son las enzimas, colágeno, pigmentos.^{3,4}

Tabla 1. Usos de las diferentes partes no comestibles del pescado. ³⁻⁷

Partes no comestibles	% en peso del pescado	Usos y tendencias
Cabeza	9-12	Harinas, aceite y pigmentos
Resto de músculo	15-20	Harina, aceite, enzimas
Piel	1-3	Harinas, colágeno, gelatina, pigmentos, cuero
Vísceras	12-18	Harina, aceites, enzimas, lecitinas, hidrolizados, compuestos bio-activos (proteasas, péptidos, polipéptidos)
Espinas	9-15	Harinas, gelatina, colágeno hidroxapatita

Blanco y col. 2007³, reportaron que aunque gran parte de estos residuos de la pesca en tierra son usados para la producción de harina de pescado y de aceites, se considera que este tipo de utilización es ineficiente ya que con el presente desarrollo tecnológico es posible un uso más inteligente y rentable de ellos. Es por este enfoque que el desarrollo de esta tesis doctoral está dirigido a la revaloración de estos dos sub-productos principales (la harina de pescado y el aceite), por una parte se obtendrán concentrados de proteína de pescado tipo A, a partir de la harina de pescado utilizando CO₂ y por otra parte se estudiará la revaloración del aceite de pescado para obtener derivados lipídicos ricos en omega-3 mediante catálisis enzimática.

Antecedentes del proceso de producción de harina y aceite de pescado

La industria de harina y aceite de pescado comenzó en el norte de Europa y en América del Norte a principios del siglo XIX y se basó principalmente en las capturas excedentarias de arenque de las pesquerías costeras de temporada⁸.

En la Tabla 2, se exponen algunas de las patentes que se han publicado para describir nuevos equipos o procesos de producción de harina y aceite de pescado, especialmente por el uso de subproductos de peces como materia prima, con la finalidad de mejorar la rentabilidad del proceso industrial. ⁹⁻¹⁵

Tabla 2. Principales patentes sobre la extracción de aceite de pescado y producción de harinas.

Año	Título	Inventor	Número patente
1932	Extracción de aceite de pescado	Stanley Hiller ¹⁵	US1840715
1933	Método del proceso de extracción de aceite del pescado y de la torta de prensa húmeda.	W.T. Conn ⁹	US1903503
1966	Producción de aceite farmacéutico a partir de aceite de pescado	E. Potter ¹³	GB1026359
1976	Proceso para producir harina de pescado y aceite de pescado (bio-productos)	D.B. Vincent ¹⁶	US3959518
1989	Proceso para producir harina de pescado y/o aceite de pescado.	Shirakawa, Yoichi y col. ¹²	ES2039625
2001	Método y planta extractora de aceite de pescado y productos derivados	P.Barrera y J.Y. Rousseau ¹⁴	US6214396
2007	Un proceso para la producción de aceite y proteína a partir de los desechos de pescado.	J.B. Cloughley ¹¹	GB2428682
2010	Método de extracción de aceite de pescado crudo de tilapia	Bai Yang, Lian Shi Jun y col. ¹⁰	CN101768507

2.1 Harina de pescado

Como ya se ha explicado, la harina de pescado es un subproducto del procesado de pescado asociado a la producción de aceite de pescado. Se produce directamente por la cocción o secado del pescado crudo y posterior extracción del aceite. Se utiliza en las dietas para peces y crustáceos de criadero o como suplemento en periodos exigentes nutricionalmente en el ciclo de vida de cerdos y aves de corral, así como en alimentos para mascotas.

Los principales beneficios nutricionales de la harina de pescado son su alta concentración en proteínas con un excelente perfil de aminoácidos, además de ser altamente digerible sin factores anti-nutricionales.¹⁷ La harina de pescado posee un contenido proteico del 60-75%, con un contenido elevado y equilibrado de aminoácidos esenciales.⁴

En la Tabla 3 se muestra la composición de la harina de pescado de diferentes fuentes.

Tabla 3 Composición aproximada de la harina de pescado

Composición/ variedad	Humedad (%)	Grasa bruta (%)	Ceniza (%)	Proteína cruda (%)	Referencias
Harina de Capelán	6.6 - 9	8.4 - 11.9	8.8 - 10.3	69.6 - 71.7	Bragadottir y col. (2004) ¹⁸
Harina de arenque americano	6 - 10	8 - 12	16 - 21	62 - 66	IFFO (2008) ¹⁹
Harina de pescado del Perú	6-10	12	12-18	64-68	IFFO (2007) ²⁰

Proceso de producción de harina

IFFO (The Marine Ingredients Organization), la organización no gubernamental que representa y promueve la industria de harina y aceite de pescado y otros ingredientes de origen marino a nivel mundial, describe el proceso de producción de harina y aceite de pescado bajo estándares de calidad usando buenas prácticas de manufactura y trazabilidad desde la captura en alta mar a través de técnicas modernas de procesamiento, supervisando el tipo y tamaño de los peces capturados. Generalmente, se utiliza agua de mar refrigerada para enfriar y mantener fresco al pescado. El procesado consiste en varias etapas y el esquema del mismo se muestra en la Figura 4.

El proceso se inicia con la descarga en fábrica, donde se pesa y se muestrea para verificar la frescura. Una vez seleccionado el uso, el pescado pasa a la segunda etapa que consiste en el cocinado en una estufa para coagular la proteína y permitir la liberación del aceite, a una temperatura entre 358-363 K. Esta temperatura permite la eliminación de microorganismos. Ya cocido pasa a una prensa de tornillo donde el licor es extraído y los sólidos (torta de prensa) van a la secadora.

Este licor pasa a un decantador para eliminar otros sólidos. A continuación se centrifuga para separar el aceite de la fase acuosa (agua de cola). El aceite de pescado crudo puede ser purificado por una serie de filtros especiales para su refinado. El agua de cola pasa a unos evaporadores para concentrarse.

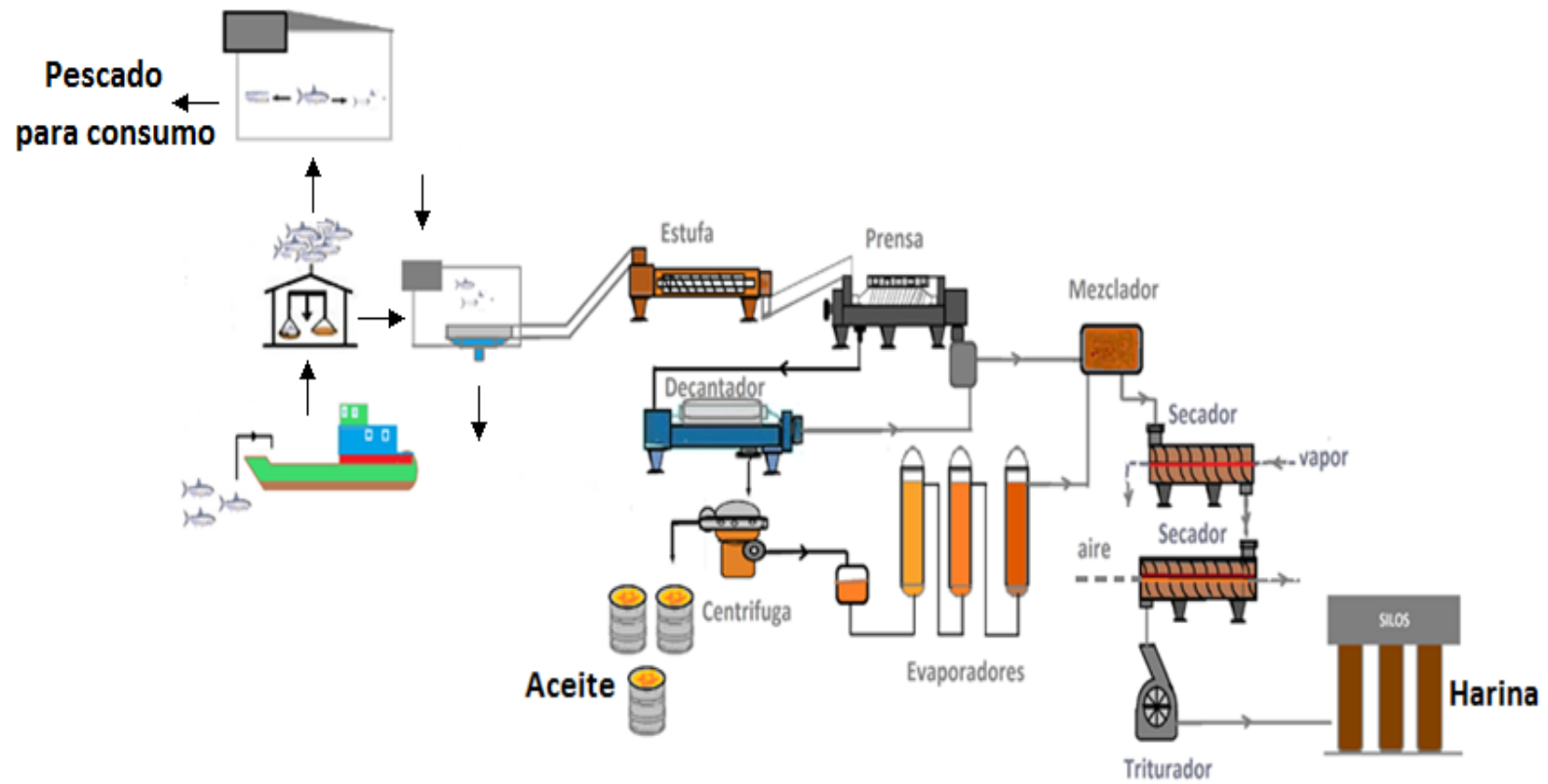


Figure 4 Esquema del proceso de producción de harina y aceite de pescado (IFFO).

El licor concentrado se mezcla con la torta que sale de la prensa. Una vez mezclados, pasan a un secador con vapor sobrecalentado a una temperatura de 363 K y a una velocidad de flujo controlada. Posteriormente pasa a otro secador con aire caliente indirecto a temperaturas más bajas. Por último se tritura y se almacena en sacos de 25 kg, o a granel en silos de una tonelada (un 90% de contenido de materia seca no sostiene el crecimiento microbiano), esperando el transporte.²¹

En la bibliografía se han encontrado diversas investigaciones sobre métodos de extracción de aceite y harinas de pescado así como de otros sub-productos pesqueros. En la Tabla 4 se muestran métodos convencionales con otros solventes orgánicos obteniendo aceites crudos con requerimientos de refinado, así como otros métodos enzimáticos (hidrólisis) y fisicoquímicos.

Tabla 4 Métodos de extracción de aceite de harinas y otros sub-productos.

Substrato	Solvente	Método	Observaciones	Ref.
Cabezas de atún	-	Pre-cocidos y no pre-cocidos	Condiciones óptimas de separación de 360 K, durante 30 min.	Chantachum y col.(2000) ²²
Salmón fresco	-	Hidrólisis enzimática	Protamex™	Liaset y col.(2003) ²³
Cabezas de salmón fresco	-	Hidrólisis enzimática	Alcalase®, Neutrase® y Protamex™	Gbogouri y col.(2006) ²⁴
Músculo de sardina	-	Ajuste del pH (punto isoelectrico)	(pH 5,5) usando HCl o ácidos orgánicos	Okada y col.(2007) ²⁵
Vísceras de pescado y harina de pescado	Isopropanol	Método Sikorski y Naczki	Tres extracciones hasta proteína con <1% de lípidos	Kristinsson y col.(2007) y Oterhals y col.(2008) ^{26,27}

Según estadísticas de la FAO (2014), la demanda global de harina de pescado continua creciendo, empujando los precios a máximos históricos hasta enero de 2013, con un incremento del 206% entre enero de 2005 y enero de 2013. Perú y Chile son los principales

exportadores.¹

Hay dos tipos básicos de harina de pescado, (1) los que se producen a partir de residuos del procesamiento de diversos productos de pesca humana comestible (salmón, atún, etc.) y (2) los que se producen a partir de peces específicamente para producir harina de pescado como arenque, lacha, abadejo, etc.²⁸

2.1.1 Concentrados de proteína de pescado

El concentrado de proteína de pescado (FPC) por lo general se refiere a la harina de pescado destinado al consumo humano. El término puede aplicarse a una variedad de productos que en términos generales, se dividen en dos categorías, tipo A y tipo B.

Bajo el término de FPC tipo A se encuentran las harinas de pescado que, a través de técnicas de procesamiento especiales, se han hecho prácticamente libre de olor y sabor. El método más común usado comercialmente hasta ahora se basa en la extracción con isopropanol o etanol. A pesar de su alto valor nutricional, FPC tipo A ha fracasado en encontrar un mercado de interés comercial, en gran parte debido a sus propiedades funcionales pobres, y a los relativamente altos costos de producción. Todavía se están haciendo esfuerzos para mejorar las propiedades funcionales del producto, especialmente mediante la reducción de las temperaturas de procesamiento.

La categoría FPC tipo B básicamente se produce mediante el uso de los mismos principios de procesamiento que se utilizan para la harina de pescado ordinaria, es decir la extracción mecánica del aceite y eliminación de agua por evaporación y el secado. Aunque FPC tipo B está siendo utilizado, ningún producto ha alcanzado hasta ahora el estado de un producto alimenticio comercial reconocido internacionalmente.^{29,30}

La Figura 5 muestra un ejemplo del proceso de producción de FPC tipo A, adaptado de Sikorski y Naczki, 1981.³⁰ La materia prima se muele y se extrae con isopropanol a 293-303 K durante 50 minutos. El sobrenadante se recoge a continuación y se extrae dos veces, primero a 348 K durante 90 min con isopropanol y luego a 348 K durante 70 min con isopropanol azeotrópico.³¹ Esto proporciona una fracción sobrenadante final que se seca, muele y tamiza para separar piezas óseas. El producto final debe ser en gran medida incoloro e inodoro y se compone principalmente de proteínas (<1% de lípidos) con alto valor biológico.⁵

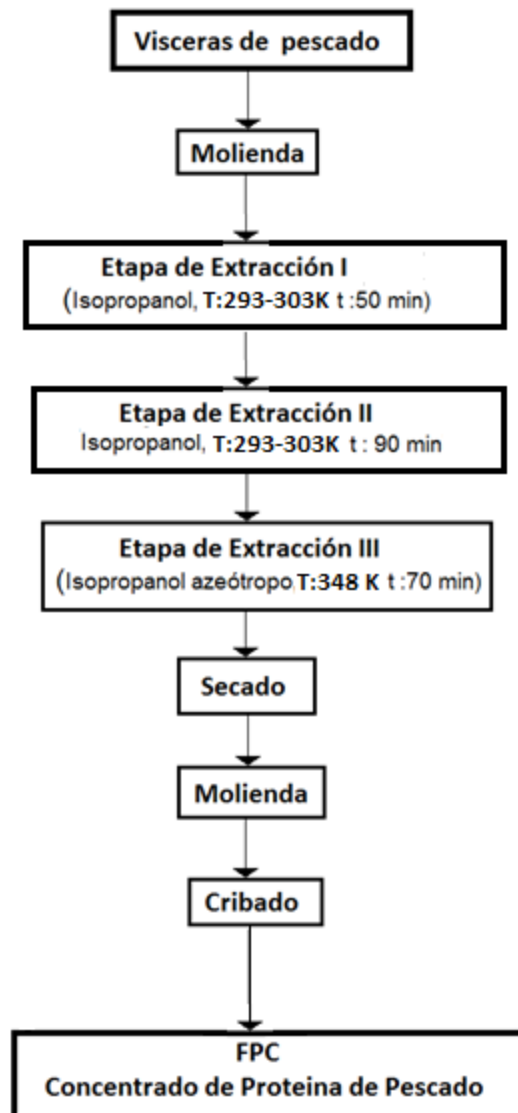
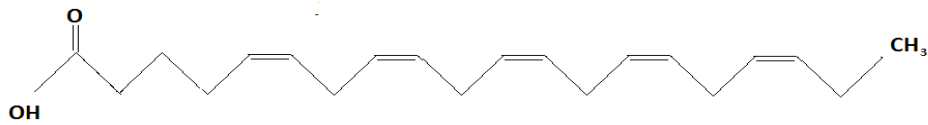


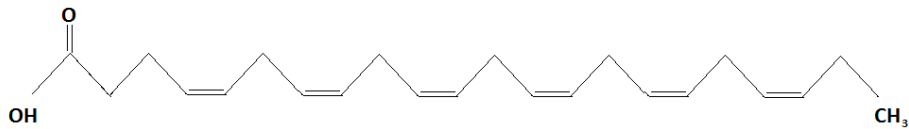
Figura 5 Ejemplo de proceso de producción de concentrados de proteína de pescado

2.2 Aceite de pescado

El aceite de pescado o lípidos de pescado es otro de los subproductos principales en la industria pesquera. Este aceite es una de las principales fuentes de n-3 ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), como el ácido eicosapentaenoico (C20: 5 n-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (C22: 6 n-3, DHA) que se presentan en la Figura 6. Estos compuestos se han notificado a tener efectos beneficiosos en la salud humana.³²



Ácido eicosapentaenoico EPA (C 20: 5n-3)



Ácido docosahexaenoico DHA (C 22:6n-3)

Figura 6. Estructura de los ácidos grasos polinsaturados EPA y DHA,

El informe del mercado mundial de aceite de pescado publicado por Transparency Market Research denota que el mercado mundial de aceite de pescado, incluyendo la fabricación y venta de aceite de pescado obtenido a partir la pesca y la acuicultura, tiene perspectivas de crecimiento modestas para los próximos años. Países como Dinamarca, Chile, y Perú son los principales productores de aceite de pescado, representando en conjunto una cuota de más del 50% del mercado. Según este informe se señala que el mercado mundial de aceite de pescado crecerá de US \$ 1.1 mil millones en 2011 a US \$ 1.7 mil millones para el 2018.³³

Uno de los principales aceites comerciales de pescado es el aceite de Anchoveta que se comercializa principalmente al mercado de los alimentos para la acuicultura en Europa y Chile. Su riqueza en los ácidos grasos omega-3 de cadena larga EPA y DHA también lo hace atractivo para el consumo humano directo en los rápidamente crecientes mercados de suplementos y alimentos funcionales.²⁰ El aceite de pescado de arenque americano se comercializa en los EE.UU, Europa, Chile, Canadá y Japón. Los requerimientos del aceite de pescado para su comercialización se observan en la Tabla 5.

En la Tabla 6 se muestra la composición en los ácidos grasos de diferentes aceites de pescados como el de sardina, que es uno de los más comercializados, el de atún y una mezcla de ambos. Se puede observar que el porcentaje en peso del DHA es mayor en los aceites de atún y en el de la mezcla de aceites de atún-sardina, comparado con el aceite de sardina.

Tabla 5. Requerimientos de comercialización de composición del aceite de pescado^{19,20}

Composición	Ácidos grasos libres (%)	EPA (%)	DHA (%)	Humedad e impurezas (%)
Aceite de pescado de Anchoqueta	<4	15-17	7-9	<0.8
Aceite de arenque americano	<4	12.8-15.4	6-9	<0.8

Tabla 6 Ácidos grasos de aceites de pescado

Ácidos grasos	Formula	Tipo ácido	Aceite de Sardina (%) ³⁴	Aceite atún-sardina (%) ³⁴	Aceite de atún % ³⁵
Mirístico	C14:0	SFA	7.6	3.3	4.6
Palmitico	C16:0	SFA	18.1	19.5	19.5
Palmitoleico	C16:1n-7	MUFA	8.8	5.3	6.8
Estearico	C18:0	SFA	3.6	6	5.6
Oleico	C18:1n-9	MUFA	10	18	14.6
Vaccenico	C18:1n-7	MUFA	3.8	3	2.8
Linoleico	C18:2n-6	PUFA	2.5	2.4	1.8
Linolenico	C18:3n-3	PUFA	1.1	0.7	0.9
Estearidínico	C18:4n-3	PUFA	3.6	0.8	3.1
Eicosenoico	C20:1n-9	PUFA	-	2.1	2.1
Eicosatrienoico	C20:3n-3	PUFA	1.7	2.1	7.5
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n-3	PUFA	25.9	7.6	1.9
Docosapentaenoico (DPA)	C22:5n-3	PUFA	2.7	2	1.4
Docosahexaenoico (DHA)	C22:6n-3	PUFA	10.6	27.2	22.1

Existen diversos métodos para la extracción de aceites de pescado, una de ellos es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), que es un método alternativo a la extracción convencional de ácidos grasos, en respuesta al deseo de reducir el uso de disolventes

orgánicos en el entorno. El dióxido de carbono en condiciones supercríticas es un disolvente que presenta unas buenas características como: no tóxico, no inflamable y no contaminante, recuperable y su capacidad para solubilizar sustancias lipofílicas.³⁶ Este proceso de extracción con fluidos supercríticos se explicará detalladamente más adelante en la sección 4.

2.2.1 Ácidos grasos insaturados

Los ácidos insaturados, pueden subdividirse en:

1. Ácidos monoinsaturados (MUFA's), contienen un doble enlace.
2. Ácidos poliinsaturados (PUFA's), contienen dos o más dobles enlaces.

Los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los seres humanos, pero hay un grupo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), los ácidos grasos esenciales, que el cuerpo humano no puede producir estos son los omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6). El ácido graso parental omega-6 es el ácido linoleico (C18: 2 n-6, LA) y el ácido graso omega-3 es el ácido α -linolénico (C18: 3n-3, ALA). Los ácidos grasos omega-6 como el ácido araquidónico (C20: 4n-6; AA) se puede sintetizar por los seres humanos y los ácidos grasos omega-3, como el ácido eicosapentaenoico (C20: 5 n-3; EPA), ácido docosapentaenoico (C22: 5 n-3, DPA) y ácido docosahexaenoico (C22: 6 n-3, DHA), a partir de ALA, pero la conversión de ALA en EPA, DPA y DHA es baja. Sin embargo, estos ácidos grasos omega-3 se consideran ácidos grasos esenciales, por ello, los omega-3 y los omega-6 deben ser consumidos en la dieta ya que son necesarios para la salud humana. Se desea una relación en gramos de 5g o menos de n-6 por 1g de n-3, según lo sugerido por los expertos en nutrición.³⁷

Omega-3

Los ácidos grasos omega-3 son esenciales para la salud humana y sus efectos beneficiosos han sido ampliamente reconocidos. Una revisión Ruxton y col. en 2005,³⁸ reporta el impacto de n-3 PUFA en el beneficio clínico en enfermedades cardiovasculares. Innis publicó en 2007³⁹ sobre el impacto de los (n-3) ácidos grasos como nutrientes esenciales de la dieta, llegando a la conclusión de que el ácido docosahexaenoico [C22:6(n-3)] (DHA) juega un papel importante en el crecimiento y función del tejido

nervioso. Una reducción de DHA se asocia con deficiencias en el rendimiento cognitivo y conductual, efectos que son particularmente importantes durante el desarrollo cerebral. Estudios recientes sugieren las funciones de DHA en la neurogénesis, la neurotransmisión, y la protección contra el estrés oxidativo. Estas funciones se relacionan con los roles de DHA en el núcleo hidrofóbico de las membranas y los efectos neuronales. El uso de aceite de pescado como fuente natural de ácidos grasos omega-3, supone una vía interesante para la revalorización de este subproducto de la industria pesquera en tierra, asimismo es innovadora la propuesta de obtención de omega-3 en forma de 2-monoglicéridos, la forma natural en que asimila el cuerpo humano los omega-3, ya que en la actualidad se obtienen mayoritariamente en forma de ésteres, que no constituyen una etapa en el proceso de asimilación natural.

3 REACCIONES PARA LA MODIFICACIÓN DE LIPIDOS

Los ácidos grasos pueden sufrir reacciones de esterificación (reacción inversa de la hidrólisis), con alcoholes (alcoholisis), ácidos grasos (acidólisis) o con otros esteres (interesterificación)⁴⁰.

A continuación se muestran las principales reacciones en la modificación de lípidos:

Hidrólisis



Esterificación



Transesterificación

Acidólisis



Alcoholisis



Interesterificación



Aminólisis



Una parte de esta tesis doctoral está dirigida a la valoración del aceite de pescado mediante reacción enzimática para obtener derivados lipídicos ricos en omega-3. En concreto nos enfocamos a la reacción de etanolisis enzimática, que se puede llevar a cabo para obtener 2-monoglicéridos y ésteres de etilo, a bajas temperaturas y bajos costos.

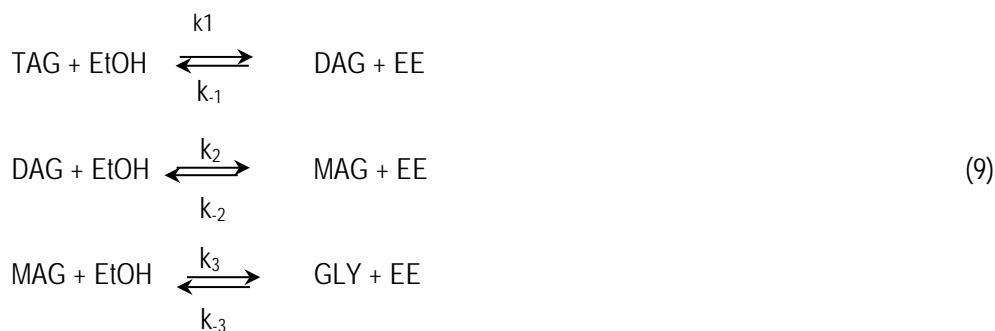
3.1 Etanolisis

En esta reacción enzimática intervienen un mol de triglicérido y tres moles de alcohol para producir uno de glicerol y tres de alquil-éster como se ve en la ecuación (8)



donde TAG indica triglicéridos, ETOH etanol, Gly glicerol y EAAG o EE éster etílico de ácidos grasos.

El alcohol debe ser preferiblemente de cadena corta para evitar la formación de emulsiones al finalizar la reacción.⁴¹ La ecuación (9) indica los tres pasos de conversión de la reacción.



Los Monoglicéridos (MAG), son mono-ésteres de ácidos grasos de glicerol y existen en dos formas isoméricas 1 y 2. Estas moléculas, muestran excelentes propiedades emulsionantes, siendo aplicadas ampliamente en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, y las industrias químicas.⁴²

Los Diglicéridos (DAG) son diésteres de ácidos grasos de glicerol y ocurren en dos formas isoméricas, los encontramos como 1,2 Diglicerido y 1,3 Diglicéridos. Los DAG son eficaces para evitar la acumulación de grasa corporal y los trastornos relacionados con la obesidad, y por lo tanto se consideran ingredientes funcionales.⁴³

3.2 Catálisis enzimática

Las reacciones de transesterificación de lípidos, como etanolisis, pueden estar catalizadas por catalizadores químicos y por enzimas. En la catálisis química, los catalizadores químicos empleados en las reacciones de transesterificación (etanolisis y metanolisis) son: NaOH, KOH, NaOBu, NaOCH₃.⁴⁴ Para procesos alcalinos se requieren temperaturas mayores de 333 a 353 K y para procesos en medio ácido se requieren temperaturas superiores a 373 K,⁴⁵ lo que genera altos costos de energía y requiere altas cantidades de catalizador. La catálisis enzimática utiliza enzimas, que son capaces de catalizar reacciones como esterificación, hidrolisis y transesterificación de los triglicéridos.

Cuando se comparan con los catalizadores químicos, las enzimas tienen un gran número de ventajas, entre ellas las condiciones suaves empleadas, así como las mínimas cantidades de energía requeridas.⁴⁶

Enzimas

Las enzimas son proteínas que se obtienen de células animales, vegetales o de microorganismos. Son catalizadores biológicos estereoespecíficos sujetos a las mismas leyes termodinámicas y cinéticas que los catalizadores químicos, alteran la velocidad de reacción pero no la posición final del equilibrio entre el sustrato y el producto.⁴⁶

Las enzimas son catalizadores muy potentes con cuatro rasgos característicos:

- a) son muy eficaces, catalizan reacciones 10^8 - 10^{11} veces más rápido que los catalizadores no enzimáticos. Estas velocidades pueden alcanzarse incluso aunque las enzimas requieran condiciones menos extremas de presión, temperatura, pH y los medios (solventes) más económicos.
- b) el rango de reacciones catalizadas muy amplio, catalizan más tipos de reacciones que los catalizadores químicos.
- c) son específicas en cuanto al tipo de reacción catalizada, existen pocos casos donde se ha demostrado que una enzima actúa con un sustrato en dos formas diferentes.
- d) están sujetas naturalmente a un número de controles, como el de la velocidad de síntesis y degradación.

Enzimas inmovilizadas

Las enzimas inmovilizadas son enzimas unidas, insolubilizadas, soportadas o ligadas a una matriz. La inmovilización de catalizadores no es exclusiva de las enzimas, sino que también se emplean con catalizadores químicos metálicos caros. Industrialmente se usan enzimas inmovilizadas ya que se pueden reusar o usar en procesos continuos, las células o enzimas libres son muy difíciles de volver a utilizar o de emplearse en continuo, puesto que ambos son demasiado pequeños para ser filtrados, y su recuperación mediante centrifugación es muy costosa.⁴⁶

Características de las enzimas inmovilizadas⁴⁶:

- Actividad enzimática, pierden poca actividad durante la inmovilización, durante la inmovilización de las células se conserva la actividad enzimática máxima minimizando los cambios bruscos de pH, presión osmótica, temperatura.
- El proceso de inmovilización es irreversible y está controlado por la difusión lenta de la enzima en los poros del material de soporte.
- Los soportes se diseñan para ser apropiados al uso, se emplean una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, de diferentes tamaños, forma, densidades y porosidad, pueden ser membranas milipore empaquetadas o cerámicas desarrolladas en forma de láminas, tubos, fibras, cilindros o esferas.
- Los soportes no deben estar cargados y deben ser hidrófilos

3.2.1 Lipasas

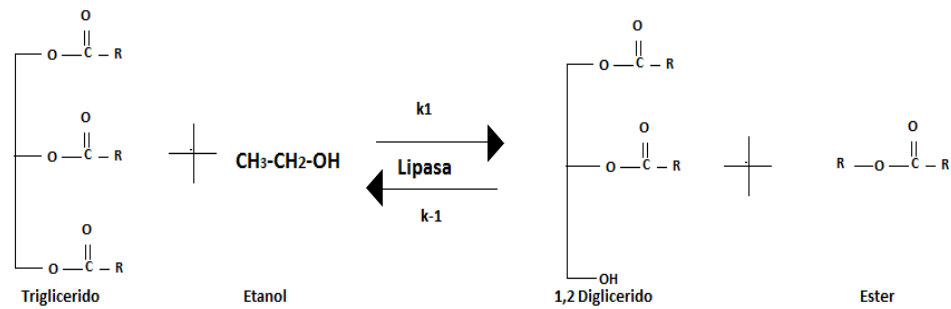
Son enzimas que tienen una utilización en el tratamiento o modificación de grasas y aceites. La mayoría son de origen animal, presentan una actividad óptima entre 303 y 318K.^{47,48} Lipasas de bacterias y hongos son las más comúnmente utilizadas para la transesterificación. Los parámetros óptimos para el uso de una lipasa específica dependen del origen, así como la formulación de la lipasa.⁴⁹ Los procesos enzimáticos para obtener concentrados de omega-3 se basan en el uso de enzimas específicas, normalmente lipasas, que son capaces de catalizar reacciones tales como hidrólisis, etanolisis o transesterificación de los triglicéridos, a bajas temperaturas.⁵⁰ El aspecto de la selectividad o especificidad de la lipasa es importante ya que cambia con las condiciones de reacción empleadas, pero puede hacer algunas generalizaciones, algunas de las lipasas más utilizadas como la lipasa *R. mucor miehei* tiene una especificidad posicional de 1>3>>2, *Rhizopus oryzae* con una especificidad posicional de 1,3>>>2, *Rhizopus delemar* tiene una especificidad de 1,3>>2, para la *Cándida antártica* es de 1,3,2, como se muestra en la Tabla 7.^{51,52}

Tabla 7. Lipasas inmovilizadas para catálisis enzimática para producir acilgliceroles

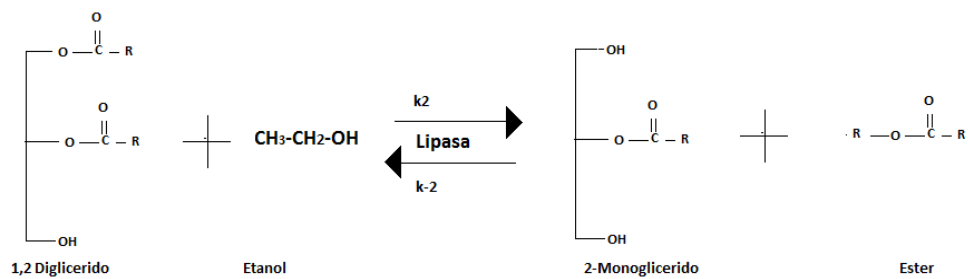
Lipasa	Soporte	Especificidad
Novozym® 435 (<i>Cándida antártica</i>)	Resina acrílica hidrófoba macroporosa	1,3,2 (posiblemente no específica)
Lipozyme® RM IM (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Resina macroporosa de intercambio aniónico	sn-1,3 (1>3>>2)
Lipozyme® TL IM (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Gránulos de sílice porosa	sn-1,3 (1>3>>2)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Inmunoesferas 150 (copolimero de metacrilato)	sn-1,3 (1>3>>2)
QLC® (<i>Alcaligenes sp.</i>)	Tierra de diatomeas	1,3,2 (posiblemente no específica)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Inmunoesferas 150	sn-1,3 (1,3>>>2)
DF (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Polipropileno microporosa	sn-1,3 (1,3>>>2)

El esquema que se muestra en la Figura 7 indica paso a paso las conversiones que se llevan a cabo en el proceso de etanolisis con lipasa o enzima específica.

Conversión de triglicérido a di-glicérido.



Conversión de di-glicérido a mono-glicérido



Conversión de mono-glicérido a glicerol

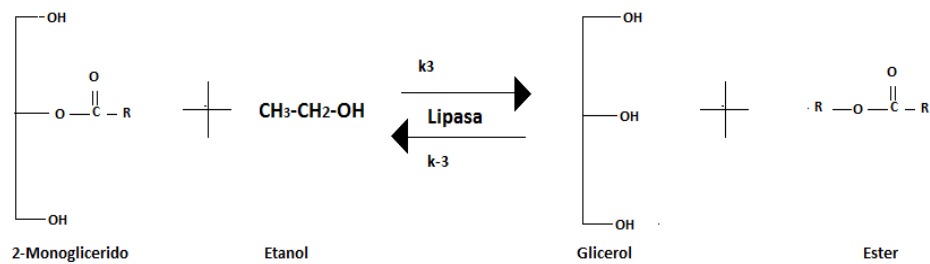


Figura 7. Esquema de los pasos de la reacción enzimática etanolisis con lipasa sn-1,3.

En la última década, varios estudios acerca de la transesterificación o etanolisis de aceite de pescado y otros aceites con lipasas microbianas han sido también revisado en la bibliografía ver Tabla 8.

Tabla 8. Antecedentes de etanolisis catalizada con lipasas

Aceite	Alcohol	Lipasas	Medio (disolvente)	Temperatura K	Relación molar Aceite:alcohol	Lipasa %en peso	Referencia
Trioleoylglicerol; Trilinoleoylglicerol; Tri- α -linolenoylglicerol; Triarachidonoylglicerol; Trieicosapentaenoylglicerol Tridocosahexaenoylglicero	Etanol	Novozym 435	-	288 a 333 (15-60°C)	1:19 a 1:192	10%	Imirescu y col en 2002 ⁵³
Trioleoylglicerol (TO)	Etanol	(RML); (TLL); Novozym 435; Novozym CALB L Amano PS-C-I(BCL)	-	308 (35°C)	1:76		Piyatheerawong y col en 2004 ⁵⁴
Triacetin, tributyrin, tricaproin, tricaprylin, trilaurin, tripalmitin	Etanol, Isopropanol, n-Butanol, Amyl alcohol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	hexane > acetone > toluene > acetonitrile > ethyl acetate > pyridine > chloroform	301 (28°C)	1:1		Lee y col en 2004 ⁵⁵
Tricaprylin, triacetin	iso-propanol, propanol	Novozym 435®	-	323 (50°C)	1:2 a 1:10	7%	Pilarek ySzewczyk en 2007 ⁵⁶
Palma	Metanol	R. Rhizopodiformis	hexano, enceno, tolueno y heptano	313 y 343 (40 y 70°C)	1:1 a 1:10	10%	Basri M y col en 1997 ⁵⁷

Aceite	Alcohol	Lipasas	Medio (disolvente)	Temperatura K	Relación molar Aceite:alcohol	Lipasa %en peso	Referencia
Palmaste	Etanol	Lipozyme IM y Novozym® 435	n-hexano	313-343 (40-70°C)	1:3 y 1:10	5-20%	De Oliveira y col. en 2000 ⁵⁸
Ricino	Etanol	Lipozyme IM y Novozym®435	n-hexano	308-338 (35-60°C)	1:3 -1:10	5-20%	De Oliveira y col. en 2004 ⁵⁹
Girasol	Ethanol	<i>Pancreática porcina</i>	-	318 (45°C)	1:3	(0.5g)	Yesiloglu en 2004 ⁶⁰ ,
	etanol 96% etanol absoluto, 1 - propanol, 2- propanol, iso-butanol, metanol	TLL-1 y TLL-2, RML,; CAL, PCL; PFL	-	313 (40°C)	1:3	10%	Deng y col. en 2005 ⁶¹
Oliva	Etanol	<i>Candida antarctica, Rhizo-mucor miehei y Thermomyces lanugino</i>	-	308 (35°C)	(10 g aceite /0.85 g etanol)		Torres y col. en 2007 ⁶²
Soja	Etanol	Novozym®435 Lipozyme IM.	n-hexano	308-338 (35-60°C)	1:3 y 1:10	5-20%	De Oliveira y col. en 2005 ⁶³
	Etanol	Novozym®435	tert-butanol y iso-propanol	303 a 323 (30-50°C)	1:03 a 1:06	4 a 15%	Sangaletti y col. en 2013 ⁶⁴
	Etanol	Novozym® 435	-	298(25°C)	1:70	10%	Compton y col en 2014 ⁶⁵

Aceite	Alcohol	Lipasas	Medio (disolvente)	Temperatura K	Relación molar Aceite:alcohol	Lipasa %en peso	Referencia
Vegetal (girasol, borraja, oliva y soja)	Etanol	Novozym®435 y Lipozym TL IM	-	298 a 333 (25-60°C)	1:0.5 a 1:6	5 hasta 50%	Hernández-Martin y Otero en 2008 ⁶⁶
Comestible de residuos	Metanol	Novozym® 435	tert-butanol	323 (50°C)		1.7%	Shimada y col. en 2002 ⁶⁷
Cocina	Etanol	Novozym® 435	-	298- 338 (25-65°C)	1:6	(6.25gL ⁻¹)	Chesterfield y col en 2012 ⁶⁸
Grasa de cacao, aceite de borraja y aceite de atún	Etanol	Novozym 435	-	303(30°C)	1:2 a 1:6	1 a 7%	Shimada y col. en 2003 ⁶⁹
Hígado de bacalao	Etanol, metanol, isopropano, propanol 1 Y 2, butanol, pentanol, hexanol.	<i>Candida cylindracea</i> <i>Porcine pancreas.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Geotrichum candidum.</i> <i>Pseudomonas sp. Mucor miehe</i>	Iso-propanol	273, 283, 303 a 328 (0,10,30 a 55°C)	1:30		Zuyi y Ward (1993) ⁷⁰
Atún	Etanol	<i>Candida antarctica</i>		313 (40°C)	1:3,1:6,2:3,3:3 y 5:3	4%	Watanabe y col. en 1999 ⁷¹
Bonito	Etanol	Novozym 435 y Lipozyme IM	sin disolvente	308 (35°C)	1:77 ratio	10%	Irimescu y col. en 2001 ⁶
Pescado mezcla de Menhaden y tuna	Etanol	<i>Pseudomonas cepacia</i> (PS) (not immobilized)	-	298 (25°C)	(1:10 en peso)	10%	Torres y col. en 2003 ⁷²

Aceite	Alcohol	Lipasas	Medio (disolvente)	Temperatura K	Relación molar Aceite:alcohol	Lipasa %en peso	Referencia
Atún y aceite de hígado de bacalao	Etanol; etanol (96%, v/v),	Immobilized Candida antarctica ;	sin solvente;	303 (30°C)	1:10 a 1:50	4%	Shen y Wijesundera en 2006 ⁷³
	Etanol (99.5%v/v); etanol (99.8%v/v)	DF, Palatase 20000L y Novozym 435	Acetona	308 (35°C)	1:79	24-10%	Esteban y col. en 2009 ⁷⁴
Pescado	Etanol(96% (v/v); absolute con 0.5% agua, y absolute	Novozym 435; lipase D y lipase EU O93	acetona	308 K (35°C)	1:19 y 1:76	6% (Lipasa D on MP-1000); 10% (Novozyme 434)	Muño y col. en 2008 ⁷⁵
	Etanol	D (MP1000) y Novozyme 435	acetona	308 K (35°C)	1:76	10%	Muño y col. en 2009 ³⁵
	Sitosterol (B),	Lipozyme TLIM	-	313-338 K (40-65°C)	3:1, 3:2, 3:3, 3:4, 3:5, y 3:6	2-12%	Sengupta y Ghosh en 2011 ⁷⁶
Sardina	Etanol	CALB, TLL y RML	Ciclohexano y tert-amyl alcohol	298 (25°C)	1:10		Moreno-Pérez y col en 2014 ⁷⁷

Lipozyme RM IM (lipasa inmovilizada de Rhizomucor miehei (RML)); Lipozyme TL IM (lipasa inmovilizada de Thermomyces lanuginosus (TLL)); Novozym 435 (lipasa inmovilizada de C. antarctica); Amano PS-C-I (lipasa inmovilizada de Burkholderia cepacia (BCL)); Lipasa de Pseudomonas cepacia (PS); Palatase® 20.000L (lipasa no inmovilizada Rhizomucor miehei); D (MP1000) lipasa D de Rhizopus oryzae, inmovilizado sobre Accurel MP 1000; Lipasa Rd o lipasa de la UE 093 de R. delemar; Lipasa DF (lipasa no inmovilizada de Rhizopus oryzae).

3.2.2 Parámetros que afectan el proceso de Etanolisis

Temperatura de reacción

Es un factor que influye directamente en la velocidad de los procesos bio-catalíticos. Esta temperatura es más baja que la utilizada en catálisis química, debido a que las altas temperaturas desnaturalizan las enzimas. El rango de temperatura más utilizado en la catálisis enzimática está entre 308-323 K, sin embargo, M. Basriet y col. en 1997⁵⁷, encontraron que la metanolisis del aceite de palma con *R. Rhizopodiformis* mostró excepcionalmente alta estabilidad térmica en el estudio a 343 K. Sin embargo, en la reacción de etanolisis de aceite de cocina con la lipasa Novozym 435 (Lipasa de *Candida antarctica*), la desnaturalización térmica se produjo a 320 K.⁶⁸ En la investigación de Soumanou y Bornscheuere en (2003)⁷⁸, encontraron que el rendimiento en la transesterificación del aceite de girasol con *R. Miehei*, aumenta con la temperatura de reacción, dentro del rango limitado por la enzima. Zuyi y Ward en 1993⁷⁰, encontraron en su estudio del efecto de la temperatura sobre alcoholisis, que a una baja temperatura de reacción de 283 K se produce una alta concentración de monoglicéridos que contiene en porcentaje molar de n-3 ácidos grasos poliinsaturados de un 40%. Irimescu y col. en 2002⁵³, sugieren que al utilizar la lipasa Novozym 435 la temperatura del proceso enzimático debe ser de 298 K, para un alto rendimiento de 2-monoglicerido.

Relación molar

La relación estequiométrica de la reacción de alcoholisis es 1:3 (aceite:etanol) en relación molar; sin embargo, se necesita alimentar un exceso de alcohol para favorecer la reacción directa. Se ha reportado por Watanabe y col. en 1999⁷⁹, que la lipasa inmovilizada *Candida antarctica* se inactiva en presencia de una relación molar 3:2 (aceite:etanol) en etanolisis de aceite de atún, para evitar tal inactividad es recomendable realizar la etanolisis por etapas respetando la relación estequiométrica de la reacción o con exceso de etanol. Pero no todas las lipasas se comportan igual. Soumanou y Bornscheuer en 2003⁷⁸, encontraron en su estudio de metanolisis de aceite de girasol, que al aumentar la relación molar de aceite:metanol con las lipasas inmovilizadas *R. mieher* (RM), *T. lanuginosa* (TL) se inactivan a una relación molar de 1:4.5. Imirescu y col. en 2001⁶ así como Muñio y col. en

2008⁷⁵, mencionan que se obtiene un alto rendimiento de 2-monoglicéridos, utilizando la lipasa Novozym 435 con una relación molar de 1:77 (aceite:etanol).

Disolvente

Zaks y Klibanov (1985)⁴⁷, estudiaron diversos procesos catalizados con enzimas en disolventes orgánicos, debido a que se presentan bajas solubilidades entre los reactantes. En la transesterificación, la mezcla de alcohol con el aceite genera dos fases debido a la dificultad por la baja solubilidad entre los componentes de la reacción. M. Basri y col. en 1997⁵⁷, evaluaron la reacción de alcoholisis de aceite de palma con la lipasa *Rhizopus rhizopodiformis* en diferentes disolventes, la lipasa mostro una alta actividad en disolventes no polares ($\log P > 2$), tal como hexano, benceno, tolueno y heptano. Soumanou y Bornscheuer en 2003⁷⁸ valoraron el rendimiento de conversión al transesterificar aceite de girasol con la lipasa *R. miehei* utilizando diferentes disolventes, encontrando que existe un efecto del disolvente orgánico en la velocidad de alcoholisis, con éter de petróleo obtuvieron una conversión del 84%mol, un 75%mol con el disolvente n-hexano, pero en acetona obtuvieron una conversión menor al 10%. Lee y col. en 2004⁵⁵ estudiaron la alcoholisis de triglicéridos para la producción de monoglicéridos con *Pseudomonas fluorescens* en presencia de co-disolvente orgánico, encontraron que este co-disolvente afectó la velocidad de reacción de la alcoholisis catalizada, alcanzando unos rendimientos máximos de monoglicéridos (MAG) del 85%mol en n-butanol para monoacetina, 50%mol para monocaprilina en n-butanol, 48%mol para monolaurina en isopropanol, y 45%mol para monopalmitina en isopropano. Al utilizar un disolvente como medio de reacción se mejora la miscibilidad de la mezcla de reacción, por ende el rendimiento aumenta al utilizar disolventes, pero también aumentan los costos de producción al separar y purificar los productos de la misma.

Concentración de biocatalizador.

La concentración de la lipasa en la reacción, depende del tipo de reacción y de las condiciones del proceso. Hernández-Martin y Otero en 2008⁶⁶, encontraron que a mayor concentración en peso de encima se obtiene mayor rendimiento de la reacción de alcoholisis de aceites vegetales (girasol, borraja, oliva y soja) con Lipozyme® TL IM y

Novozym® 435. Vicente y col. en 2006⁸⁰, mencionan que las constantes de velocidad aumentan linealmente con la concentración de catalizador, de acuerdo con su modelo cinético para metanolisis propuesto.

Tipo de alcohol.

Los rendimientos de la reacción enzimática dependen también del tipo de alcohol y de la lipasa.^{61,70} Nelson y col. en 1996⁸¹, encontraron en su estudio de alcoholisis que la lipasa de *C. antarctica* es más eficiente con alcoholes secundarios y que con la lipasa *M. mieher* se obtiene mayor rendimiento con alcoholes primarios. Li Deng y col. en 2005⁶¹, señalan en su estudio de evaluación de lipasas comerciales para obtener esteres por alcoholisis enzimática de aceite de girasol, que los rendimientos más altos en porcentaje molar de esteres los obtienen con la lipasa CAL (Lipasa de *Candida antarctica*-B) en 1-propanol obteniendo un 93%mol de esteres después de 24h de alcoholisis. Con Lipozyme TL IM (lipasa *Thermomyces lanuginosa*, TLL-1), el mejor sustrato alcohólico es metanol, logrando una conversión de un 90%mol de esteres.

La separación de los productos de reacción de etanolisis se pueden realizar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), extracción con acetona a baja temperatura, cristalización fraccionaria a baja temperatura, extracción o separación con fluidos supercríticos y destilación molecular. En este trabajo el uso de una tecnología limpia como lo es el proceso de Fluidos Supercríticos (FSC) en la separación o fraccionamiento de los productos de reacción de etanolisis y en el sistema de extracción de aceite de harinas de pescado para obtener concentrados de proteína, es la innovación prevista ya que la aplicación de FSC se extiende ahora a nuevas áreas.

4 PROCESOS CON FLUIDOS SUPERCRTICOS

Un FSC es aquel fluido que se encuentra bajo condiciones de presión (p) y temperatura (T) superiores a las críticas (p_c y T_c).

Los FSC's presentan propiedades intermedias entre líquido y gas. Al encontrarse por encima de su temperatura crítica, la elevada energía cinética molecular vence las fuerzas

de atracción intermolecular propias del estado líquido. En este sentido, los FSC's se comportan como un gas ocupando todo el volumen del recipiente que los contiene, poseen una alta difusividad molecular y su tensión superficial es casi nula, lo que permite una fácil penetración en matrices sólidas y micro porosas. La baja viscosidad permite el flujo por el interior de conducciones con un mínimo requerimiento energético. Al estar sometidos a una presión superior a la crítica, poseen una elevada densidad, cercana a la de los líquidos, por lo que presentan un poder disolvente similar a éstos.

Para diferenciar FSC's de gases comprimidos que no presentan poder disolvente debido a su baja densidad, Darr y Poliakov ⁸² acotan la definición anterior como sigue:

"estado de un compuesto, mezcla o elemento por encima de su presión y temperatura críticas y con una densidad cercana o superior a la densidad crítica."

Varios compuestos de extracción pueden ser utilizados en la extracción de fluido supercrítico, pero CO₂ es de lejos el más utilizado. Muestra condiciones críticas suaves (T_c = 304.15 K y P_c = 7.38 MPa), no es inflamable, no tóxico, el gas a temperatura ambiente, su riqueza natural y por lo tanto de bajo costo.⁸³

4.1 Extracción con FSC

Extracción de gas (disolvente supercrítico) a partir de sólidos (substrato o lecho fijo), consta de dos pasos de proceso: (1) la extracción y (2) la separación del extracto del disolvente. En la extracción, el disolvente supercrítico fluye a través de un lecho fijo de partículas sólidas y disuelve los componentes extraíbles del sólido. El disolvente cargado se retira del extractor y se alimenta al separador para que el extracto sea precipitado, logrando así separar el extracto del disolvente.

La extracción de los compuestos solubles a partir de material sólidos procede en varios pasos paralelos y consecutivos: (Brunner, 1994)^{84,85}

- a) La matriz planta absorbe el disolvente supercrítico
- b) Los compuestos del extracto se disuelven por el disolvente
- c) Los compuestos disueltos son transportados a la superficie exterior del sólido.
- d) La difusión es el mecanismo de transporte más importante.
- e) Los compuestos disueltos pasan a través de la superficie exterior. Un cambio de fase puede ocurrir en ese lugar.

La presión y la temperatura, son los principales parámetros que influyen en el proceso de

extracción. La densidad, difusividad, viscosidad y constante dieléctrica del SCF puede ser controlada mediante la variación de las condiciones operativas de presión y temperatura, o ambos en combinación. Por lo tanto, el proceso de separación puede verse afectada por un simple cambio de la presión de funcionamiento y la temperatura para alterar el poder de solvatación del disolvente.⁸⁶ En general, se produce un aumento en el rendimiento de extracción con la presión debido a un aumento de la solubilidad en lípidos en SC-CO₂ basado en un aumento de la densidad de CO₂. El impacto de la temperatura depende de los parámetros de la competencia; la densidad de CO₂ disminuye con la temperatura, mientras que la presión de vapor de solutos aumenta, dando lugar a los fenómenos de cruce bien conocidos para las isotermas de solubilidad. Por lo tanto, el impacto resultante de la temperatura sobre la solubilidad es dictada por lo que el parámetro es mayor a una presión dada. Además, la difusividad aumenta con la temperatura mejora la cinética de transferencia de masa durante la extracción.⁸⁷

Extracción con fluidos supercríticos (SFE) ofrece un método alternativo para la extracción convencional de ácidos grasos. SFE fue desarrollado para aplicaciones de análisis a mediados de la década de 1980 en respuesta al deseo de reducir el uso de disolventes orgánicos en el entorno de laboratorio, y ahora se está convirtiendo en un método estándar para la extracción, fraccionamiento, el refinamiento y la desodorización de los lípidos o aceites esenciales que contiene matrices de muestras a la escala industrial.³⁶ El FSC más ampliamente utilizado es el dióxido de carbono que se considera un disolvente verde; CO₂ es económico, no inflamable, tiene condiciones críticas leves que permiten procesar compuestos como ácidos grasos omega-3 PUFA's, es gaseoso en condiciones ambientales y por lo tanto fácil de separar de los productos elaborados después del procesamiento y hace que los costos de operación no es demasiado caro. Una amplia variedad de procesos se aprovechan de las características interesantes de FSC se han desarrollado en las últimas décadas.³⁷ Las fuentes de grasas y aceites son materiales de plantas y animales, el procesamiento convencional para extraer estos implica una serie de procesos de separación para lograr extraer los lípidos de la matriz de planta o tejido animal complejo y refinarlos para producir diversos ingredientes para su uso en una amplia gama de productos, así como los procesos de conversión para convertir los lípidos a otras formas para diferentes aplicaciones. Disolventes orgánicos tales como hexano se utilizan ampliamente y el uso de hexano se enfrenta a mayor restricción gubernamental debido a la

seguridad ambiental. Por lo tanto, el uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) se presenta como una alternativa más favorable que los disolventes orgánicos utilizados en las grasas y aceites de procesamiento. Esto es especialmente cierto para el mercado de los alimentos funcionales y nutraceuticos ya que los consumidores están exigiendo productos "naturales", sin el uso de disolventes orgánicos, el uso de SC-CO₂ puede satisfacer esta demanda.⁸⁷ Davarnejad y col. en 2008⁸⁸, estudiaron la solubilidad del aceite de pescado en dióxido de carbono supercrítico en un rango de temperatura de 313 a 343 K y presiones de (13.6, 20.4, y 27.2) MPa. Los resultados experimentales mostraron que la mayor solubilidad del aceite de pescado es de 0.921g de aceite / 100 g de CO₂ en condiciones óptimas de 313 K y 27.2MPa.

4.2 Fraccionamiento con FSC

La extracción fraccionada se refiere a la recogida de fracciones a lo largo de un período de extracción como una función de tiempo donde la temperatura de extracción y / o presión pueden ser cambiados a ciertos intervalos en el tiempo. Esto permite que las fracciones de diferentes composiciones para ser recogidos selectivamente.⁸⁷ Así se puede fraccionar extracto de lípidos en bruto con el fin de refinar o bien obtener una fracción enriquecida en bio-activos específicos o productos de reacciones, en este último sentido existen varios estudios en bibliografía en la que se analizan el empleo de CO₂ para fraccionar derivados lípidos. Nilsson y col. en 1991⁸⁹, estudiaron las isotermas de solubilidad para el ácido oleico y oleato de metilo, así como mono-, di-, y trioleilglicérol (MO, DO, y TO) en CO₂ como fluido supercrítico a 323 y 333 K entre 110 a 309 bar. El CO₂ fluido supercrítico parece ser un buen medio para la eliminación de glicerol y mono- diacil- subproductos de mezclas de reacción de triglicéridos sintéticos a temperaturas moderadas. Compton y col. en (2012)⁹⁰, investigaron el uso de CO₂ líquido en una columna de fraccionamiento para eliminar los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) de una mezcla de sintetizados de alcoholisis enzimática de trioleína. Encontraron que el CO₂ líquido puede ser un disolvente viable para la eliminación de ésteres de ácidos grasos a las condiciones de CO₂ líquido (8.6MPa, 298 K) obteniendo un purificado de 2-MAG (80%), junto con glicerol (18%) y cantidades muy pequeñas de DAG (2%). Soto y col. en 2014⁹¹, estudiaron la producción de esteres de biodiesel y el fraccionamiento de ésteres de ácidos grasos y acilgliceroles con CO₂ supercrítico, obteniendo los diagramas de equilibrio de fases del sistema CO₂ + FAEE+

MAG-DAG a las condiciones de 75bar y 298.2 K ,así como a las condiciones 90bar y 313.2K.

5 REFERENCIAS

1. FAO *El estado mundial de la pesca y la acuicultura; oportunidades y desafíos*. 253 (Roma, 2014).doi:978-92-5-308275-9 ISSN1020-5500
2. FAO *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. 218 (Roma, Italia, 2008).doi:978-92-5-306029-0 ISSN:1020-5500
3. Blanco, M., Sotelo, C. G., Chapela, M. J. & Pérez-Martín, R. I. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends in Food Science & Technology* **18**, 29–36 (2007).
4. CECOPESCA *Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos*. ANFACO -CECOPESCA 44 (Madrid, 2012).doi:280-12-232-4
5. Guerard, F. Enzymatic methods for marine by-products recovery. *Maximising the value of marine by-products* 107–109 (2007).
6. Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y. & Yamane, T. Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* **78**, 743–748 (2001).
7. Vincenza Ferraro, Ana P. Carvalho, Clara Piccirillo, Manuela M. Santos, Paula M. L. Castro, M. E. P. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues. *Materials Science and Engineering* **33**, 3111–3120 (2013).
8. FAO Produccion de harina y aceite de pescado. *Fisheries and Aquaculture Departmen* (1986).doi:92-5-102464-2
9. Conn, W. T. Patent US 1903 503 Method and process of extracting oil and moisture from "FISH PRESS CAKE". 2 (1933).
10. Bai Yang Patent:CN101768507B Método de extracción de aceite de pescado crudo de tilapia. 7 (2010).
11. J.B. Cloughley Patent GB 2428 682 A A process for the production of oil and protein from fish waste. 22 (2007).
12. Shirakawa, Y., Mlnowa, Y., Azumi, T. & Hisano, J. Proceso para producir harina de pescado y/o aceite de pescado. (1989).
13. Potter, E. Patent GB 1026359 Production of pharmaceutical oil from fish oil. 2 (1966).
14. Pascale Barrier, J.-Y. R. Patent US 6 214 396 B1 Method and plant for extracting fish oil and resulting productis. 4 (2001).

15. Stanley Hiller Patent US 1 840 715 Fish Oil Extraction. 5 (1932).
16. Daniel B Vincent Patent US 3959518 Process For Producing Improved Fish Meal, And Fish Oil By Product. 45–65 (1976).
17. Tacon, A. G. J. & Metian, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146–158 (2008).
18. Bragadottir, M., Pálmadóttir, H. & Kristbergsson, K. Composition and Chemical Changes during Storage of Fish Meal from Capelin (*Mallotus villosus*). *J. Agric Food Chem.* **52**, 1572–1580 (2004).
19. IFFO *La producción de harina y aceite de pescado del menhaden del golfo.* 6 (2008).
20. IFFO *La producción de harina y aceite de pescado de la anchoveta peruana.* 8 (2007).
21. IFFO Production of fish meal and oil. 20 marzo 2015 at <<http://www.iffonet.es/produccion>>
22. Chantachum, S., Benjakul, S. & Sriwirat, N. Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. *Food Chemistry* **69**, 289–294 (2000).
23. Liaset, B., Julshamn, K. & Espe, M. Chemical composition and theoretical nutrition evaluation of the produced fractions from enzyme hydrolysis of salmon with Protamex™. *Process Biochemistry* **38**, 1747–1759. (2003).
24. Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J. & Parmentier, M. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European J. of Lipid Science and Technology* **108**, 766–775 (2006).
25. Okada, T. & Morrissey, M. T. Recovery and characterisation of sardine oil extracted by pH adjustment. *J. of Agricultural and Food Chem.* **55**, 1808– 1813. (2007).
26. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E. & Ingadottir, B. Chemical processing methods for protein recovery from marine by-products and underutilized fish species. *Maximising the value of marine by-products* 144–168 (2007).
27. Oterhals, Å. & Nygard, E. Reduction of Persistent Organic Pollutants in Fishmeal : A Feasibility Study. *J. Agric Food Chem.* **56**, 2012–2020 (2008).
28. Cho, J. H. & Kim, I. H. Fish meal – nutritive value. *J of Animal Physiology and Animal Nutrition* **95**, 685–692 (2011).
29. FAO Concentrados de proteína. at <<http://www.fao.org/docrep/003/x6899e/x6899e04.htm#3.4> Fish Protein Concentrates (FPC)>
30. Sikorski, ZE , Naczka, M. Modifying the technological properties of fish protein concentrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **14**, 201–230 (1981).
31. Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutri.* **40**, 43–81 (2000).

32. Ustün, G., Güner, S., Arer, G., Türkay, S. & Erciyas, a T. Enzymatic hydrolysis of anchovy oil: production of glycerides enriched in polyunsaturated fatty acids. *Applied biochemistry and biotechnology* **68**, 171–86 (1997).
33. IFFO El Mercado Global De Aceite De Pescado Verá Un Fuerte Crecimiento. *December 4, 2014 (2015)*.at <<http://www.iffonet.es/node/702>>
34. Solaesa, Á. G., Bucio, S. L., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Rebolleda, S. Characterization of triacylglycerol composition of fish oils by using chromatographic techniques. *J. Oleo. Sci.* **63**, 449–460 (2014).
35. Muñío, M. D. M., Robles, A., Esteban, L., González, P. a. & Molina, E. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochemistry* **44**, 723–730 (2009).
36. Sahena, F. *et al.* Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. *J. of Food Engineering* **95**, 240–253 (2009).
37. Rubio-Rodríguez, N. *et al.* Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**, 1–12 (2010).
38. Ruxton, C. H. S., Calder, P.C., Reed, P. C., & Simpson, M. J. A. The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutrition Research Reviews* **18**, 113–129 (2005).
39. Innis, S. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J. of Nutrition* **137**, 855–859 (2007).
40. Mara, J. & Barrera-arellano, D. Introducción a la Química de Lípidos. *Temas Selectos En Aceites Y Grasas* 1–36 (2012).
41. Schuchardt, U.L.F., R. S. and R. M. V. Transesterification of vegetable Oils: A review. *J. B. Chem. Soc.* **9**, 199–210. (1998).
42. Gunstone, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Review. *Journal of the Science of Food and Agri- culture* **79**, 1535–1549. (1999).
43. Oscar, P., Gamboa, D. & Gioielli, A. Lípidos estructurados obtenidos por interesterificación química y enzimática a partir de aceite de pescado y grasa de palmiste. **54**, 161–168 (2003).
44. Marjanović, A. V., Stamenković, O. S., Todorović, Z. B., Lazić, M. L. & Veljković, V. B. Kinetics of the base-catalyzed sunflower oil ethanolysis. *Fuel* **89**, 665–671 (2010).
45. Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C. & Irimie, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renew. Energy* **39**, 10–16 (2012).
46. Cheetham, P. S. J. Principios de la enzimología industrial: bases de la utilización de enzimas solubles e inmovilizados en los procesos industriales. *Handbook of Enzyme Biotechnology* 45–134 (1991).

47. Zaks, a & Klibanov, a M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 3192–6 (1985).
48. Mukherjee, K. D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis and Biotransformation* **3**, 277–293 (1990).
49. Fjerbaek, L., Christensen, K. V & Norddahl, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and bioengineering* **102**, 1298–315 (2009).
50. Rubio-Rodríguez, N. *et al.* Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**, 1–12 (2010).
51. Fajardo, A. R. Purificación de Omega-3 mediante reacciones enzimáticas. 118–120 (2005).
52. Martín Valverde, L. *et al.* Concentration of Docosahexaenoic Acid (DHA) by Selective Alcoholysis Catalyzed by Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **89**, 1633–1645 (2012).
53. Irimescu, R., Iwasaki, Y. & Hou, C. T. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **79**, 879–883 (2002).
54. Piyatheerawong, W., Iwasaki, Y., Xu, X. & Yamane, T. Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases. *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **28**, 19–24 (2004).
55. Lee, G.-C., Wang, D., Ho, Y. & Shaw, J. Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Triglycerides for Short-Chain Monoglyceride Production. *J Am Oil Chem Soc* **81**, 533–536 (2004).
56. Pilarek, M. & Szewczyk, K. W. Kinetic model of 1, 3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *J. Biotechnol.* **127**, 736–744 (2007).
57. Basri M *et al.* Alcoholysis of palm oil mid-fraction by lipase from *Rhizopus rhizopodiformis*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 113–116 (1997).
58. De Oliveira, D. & Livio, M. A. T. A Kinetic Study of Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Palm Kernel Oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 59–68 (2000).
59. De Oliveira, D. *et al.* Optimization of Enzymatic Production of Biodiesel from Castor Oil in Organic Solvent Medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **113-116**, 771–780 (2004).
60. Yesiloglu, Y. Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil. *J Am Oil Chem Soc* **81**, 157–160 (2004).
61. Deng, L., Xu, X., Haraldsson, G. G., Tan, T. & Wang, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**, 341–347 (2005).

62. Torres, C. F., Toré, A. M., Fornari, T., Señoráns, F. J. & Reglero, G. Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic study. *Biochem Eng J.* **34**, 165–171 (2007).
63. De Oliveira, D. *et al.* Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121-124**, 231–241 (2005).
64. Sangaletti, N., Cea, M., Bismara, A. & Arce, R. Enzymatic transesterification of soybean ethanolic miscella for biodiesel production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**, 2098–2106 (2013).
65. Compton, D. L., Laszlo, J. A., Appell, M., Vermillion, K. E. & Evans., K. O. Synthesis, Purification, and Acyl Migration Kinetic of 2-Monoricoleoylglycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 271–279 (2014).
66. Hernández-Martín, E. & Otero, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Bioresource technology* **99**, 277–86 (2008).
67. Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J. of Molecular Catalysis - B Enzymatic* **17**, 133–142 (2002).
68. Chesterfield, D. M., Rogers, P. L., Al-Zaini, E. O. & Adesina, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chem. Eng. J.* **207-208**, 701–710 (2012).
69. Shimada, Y. *et al.* Regiospecific Analysis by Ethanolysis of Oil with Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Lipids* **38**, 1281–1286 (2003).
70. Zuyi, L. & Ward, O. P. Lipase-catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 601–606 (1993).
71. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. Stepwise Ethanolysis of Tuna Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *J. of Bioscience and Bioengineering* **88**, 622–626 (1999).
72. Torres, C. F., Moeljadi, M. & Hill, C. G. Lipase-catalyzed ethanolysis of fish oils: multi-response kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 274–81 (2003).
73. Shen, Z. & Wijesundera, C. Evaluation of Ethanolysis with Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Regiospecific Analysis of Triacylglycerols Containing Highly Unsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83**, 923–927 (2006).
74. Esteban, L. *et al.* Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. *Biochemical Engineering Journal* **44**, 271–279 (2009).
75. Muño, M. d. M. *et al.* Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases. *Process Biochem.* **43**, 1033–1039 (2008).
76. Sengupta, A. & Ghosh, M. The kinetics of enzyme catalyzed synthesis of sterol ester. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* **113**, 763–767 (2011).

77. Moreno-Pérez, S., Guisan, J. M. & Fernandez-Lorente, G. Selective Ethanolysis of Fish Oil Catalyzed by Immobilized Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 63–69 (2013).
78. Soumanou, M. M. & Bornscheuer, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 97–103 (2003).
79. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. Stepwise Ethanolysis of Tuna Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *J. Biocience and Bioengineering* **88**, 622–626 (1999).
80. Vicente, G., Martínez, M. & Aracil, J. Kinetics of Brassica carinata Oil Methanolysis. *Energy Fuels* **20**, 1722–1726 (2006).
81. Nelson, L. A., Foglia, T. A. & Marmer, W. N. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* **73**, 1191–1195 (1996).
82. Darr, J. A. & Poliakoff, M. New Directions in Inorganic and Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids. *Chem. Rev.* **99**, 495–541 (1999).
83. Beckman, E. J. Supercritical and near-critical CO₂ processing. *Green Technologies in Food Production and Processing* 239–271 (2012).
84. Johannsen, M. & Brunner, G. Solubilities of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria* **95**, 215–226 (1994).
85. Riha, V. & Brunner, G. Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* **17**, 55–64 (2000).
86. Shi, J. *et al.* Green separation technologies in food processing: supercritical-CO₂ fluid and subcritical water extraction. *Green Technologies in Food Production and Processin* 273–294 (2012).
87. Temelli, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J. of Supercritical Fluids* **47**, 583–590 (2009).
88. Davarnejad, R., Kassim, K. M., Zainal, A. & Sata, S. A. Extraction of Fish Oil by Fractionation through Supercritical Carbon Dioxide. *J. Chem. Eng. Data* **53**, 2128–2132 (2008).
89. Nilsson, W. B., Gauglitz, E. J. & Hudson, J. K. Solubilities of Methyl Oleate , Oleic Acid , Oleyl Glycerols , and Oleyl Glycerol Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide. *J Am Oil Chem Soc* **68**, 87–91 (1991).
90. Compton, D. L., Eller, F. J., Laszlo, J. a. & Evans, K. O. Purification of 2-Monoacylglycerols Using Liquid CO₂ Extraction. *J Am Oil Chem Soc* **89**, 1529–1536 (2012).
91. Soto, G., Hegel, P. & Pereda, S. Supercritical production and fractionation of fatty acid esters and acylglycerols. *J. of Supercritical Fluids* **93**, 74–81 (2014).

Objetivos



OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado en la introducción, la mayor parte de los subproductos generados en el procesado en tierra de los productos pesqueros se destinan a la producción de harina y/o aceite. Estos dos productos son interesantes debido por una parte a la calidad de la proteína de las harinas y por otra, a la elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega-3 que se encuentran en general en los aceites de pescado. De esta forma, el objetivo general de este trabajo es estudiar la valorización de los dos subproductos principales generados en el procesado de pescado en la industria pesquera, la harina y el aceite.

La estrategia propuesta para el logro de este objetivo general se llevó a cabo en dos etapas:

Como primera etapa de este trabajo tuvo por objetivo "La obtención de derivados lipídicos ricos en omega 3 a partir de aceite de pescado, mediante reacciones enzimáticas, como etanolisis, utilizando lipasas inmovilizadas como biocatalizadores" puesto que, como se ha expuesto previamente, este tipo de reacciones se llevan a cabo en condiciones suaves evitando la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en el aceite de pescado. En esta etapa se han llevado a cabo reacciones de etanolisis utilizando lipasas inmovilizadas Lipozyme® 435 y Lipozyme® RMIM, así como el fraccionamiento de sus productos. En este objetivo se utilizó un aceite proporcionado por la empresa AFAMSA (mezcla de atún y sardina).

En la segunda etapa de este trabajo, se consideró la harina como un subproducto de la industria pesquera. Para ello, se trabajó con una harina suministrada por la empresa SARVAL. S.A., realizando en primer lugar una caracterización de la misma. Como ya se ha indicado, uno de los usos que se propone en la actualidad para la valorización de la harina de pescado es la obtención de concentrados de proteína de pescado (FPC) para producir hidrolizados de proteína. Para ello se requiere que el contenido de aceite en la harina sea inferior al 1%. Por esta razón, en esta etapa se planteó como objetivo "La reducción del contenido en aceite de las harinas de pescado mediante CO₂ presurizado como alternativa al actual procesado con disolventes orgánicos".

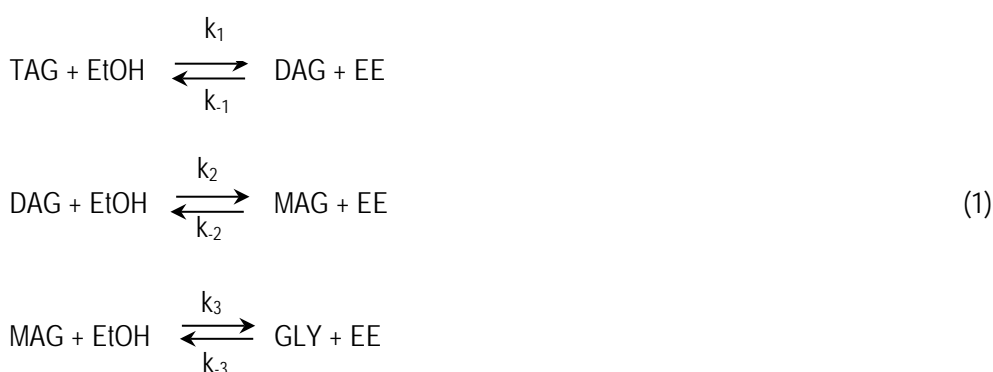
Para la consecución del objetivo general de este trabajo en sus dos etapas, se proponen

los siguientes objetivos específicos del trabajo:

Determinación del equilibrio líquido-líquido para el sistema formado por las mezclas implicadas en la etanolisis de aceite de pescado en dos medios de reacción. Para conseguir un buen contacto entre los reactantes etanol y aceite, las reacciones enzimáticas se van a llevar a cabo en disolventes orgánicos, tert-pentanol o hexano, en la cantidad adecuada que proporcione homogeneidad de las mezclas. Por ello, con el fin de detectar las zonas de miscibilidad completa se determinó experimentalmente el equilibrio líquido-líquido de los sistemas etanol + aceite + tert-pentanol y etanol + aceite + hexano a dos temperaturas diferentes 303.15 K y 323.15 K.

Estudio cinético de la etanolisis de aceite de pescado catalizada por Lipozyme® 435 y Lipozyme® RM IM en diferente medios de reacción. Una vez conocido el equilibrio entre fases se realizó el estudio cinético de las reacciones catalizadas por dos lipasas inmovilizadas comerciales Lipozyme® 435 y Lipozyme® RM IM.

Las reacciones propuestas para los modelos cinéticos de etanolisis, son las que se muestra en la ecuación (1). Las reacciones se llevaron a cabo a distintas condiciones de temperatura (293.2 a 323.2 K), cantidad de catalizador g enzima/g reactantes (2.5 a 10 %), relación molar inicial de reactantes etanol: aceite (4:1 a 76:1), así como en diferentes medios de reacción. Además, se realizó un modelado cinético para estudiar de forma más detallada la influencia de los distintos parámetros cinéticos en cada una de las etapas de etanolisis.



Valoración del fraccionamiento de los productos de etanolisis utilizando CO₂ en condiciones supercrítico como agente material de separación. Una vez estudiada la

cinética de etanolisis del aceite de pescado se llevó a cabo el fraccionamiento de los productos de reacción utilizando CO₂ en condiciones supercríticas como agente auxiliar de separación. Este fraccionamiento de los productos de etanolisis se realizó a distintas condiciones de temperatura (313.2, 328.2 y 343.2 K) y presión (10.5 a 18 MPa), para obtener dos fracciones, una rica en EE's (extracto) y otra en 2-MAG (concentrado).

Estudio de la extracción con CO₂ líquido y como fluido supercrítico para reducir el contenido de aceite de harinas de pescado a porcentajes inferiores al 1%. En este estudio se evaluaron distintas condiciones de extracción con el fin de encontrar las más adecuadas para alcanzar el porcentaje de reducción de aceite en harina deseado siendo deseables temperaturas suaves. También, se llevó a cabo una comparación de la calidad del aceite obtenido mediante CO₂ presurizado y con disolventes orgánicos convencionales

Los objetivos específicos y las principales tareas junto con su relación con los diferentes capítulos se muestran con más detalle en la Tabla 1.

Tabla 1. Objetivos específicos y tareas principales del presente trabajo

Objetivos principales	Objetivos específicos	Capítulo	Principales tareas
Obtención de derivados lipídicos a partir de aceite de pescado ricos en omega-3 mediante reacción enzimática etanolisis utilizando lipasas inmovilizadas como biocatalizadores."	Determinación del equilibrio líquido-líquido para el sistema formado por las mezclas implicadas en la etanolisis de aceite de pescado en dos medios de reacción	<u>1</u>	Determinación del equilibrio líquido-líquido del sistema etanol + aceite de pescado + tert-pentanol, a 303.2 y 323.2 K. Determinación del equilibrio líquido-líquido del sistema etanol + aceite de pescado + hexanol, a 303.2 y 323.2 K.
	Estudio cinético de la etanolisis de aceite de pescado catalizada por Lipozyme® 435 y por Lipozyme® RM IM en diferentes medios de reacción	<u>2</u>	Estudio del efecto de los parámetros del proceso (% en peso de enzimas, temperatura, relación molar de etanol / aceite de pescado, medio de reacción) en el rendimiento de 2-MAG y ésteres etílicos. Modelado de etanolisis de aceite de pescado por Lipozyme® 435
		<u>3</u>	Estudio de los diferentes requisitos de la enzima Lipozyme® RM IM, el efecto de los parámetros de proceso (relación molar de etanol / aceite de pescado, la temperatura, medio de reacción) en el rendimiento de 2-MAG y sus ésteres etílicos. Comparación de lipasas en la etanolisis de aceite de pescado
	Valoración del fraccionamiento con CO ₂ supercrítico como método de separación de los productos etanolisis	<u>3</u>	Estudio del fraccionamiento de productos de etanolisis por CO ₂ supercrítico a distintas condiciones de temperatura (313.2-343.2 K) y presiones (10-18 MPa).
Reducción del contenido en aceite de las harinas de pescado mediante CO ₂ presurizado como alternativa al actual procesado con disolventes orgánicos	Estudio de la extracción con CO ₂ líquido y como fluido supercrítico para reducir el contenido de aceite de harinas de pescado a porcentajes inferiores al 1%.	<u>4</u>	Estudio de la influencia de los parámetros del proceso de extracción de aceite con CO ₂ líquido y supercrítico. Caracterización de la harina de pescado y aceite obtenido.

Capítulo 1

Chapter 1

Liquid-Liquid Equilibrium for
Ethanolysis Systems of Fish Oil

*Bucio, S.L., Solaesa, A.G., Sanz, M.T., Beltrán, S., Melgosa, R.
Liquid-liquid equilibrium for ethanolysis systems of fish oil. (2013)
Journal of Chemical and Engineering Data, 58 (11), pp. 3118-3124.*

ABSTRACT

Enzymatic alcoholysis of fish oil can produce monoacylglycerols (MAG) rich in polyunsaturated fatty acids at atmospheric pressure and low temperature. Biocatalysis in organic solvents helps to create a homogeneous reaction system for the reactants, ethanol and fish oil. This work presents liquid-liquid equilibrium at two different temperatures (303.15 and 323.15 K) and at atmospheric pressure for two solvent-systems in the ethanolysis of fish oil: Ethanol + oil + tert-pentanol and ethanol + oil + hexane. Experimental solubility (binodal) curves were obtained by the cloud point method and tie-line composition was obtained by density and high temperature gas chromatography (HT-GC). The consistency of experimental tie line data was checked by using the Othmer-Tobias equation. The experimental liquid-liquid data were correlated satisfactorily by the nonrandom two liquid (NRTL) model for activity coefficient calculation.

RESUMEN

La alcoholisis enzimática de aceite de pescado puede producir monoacilglicérols (MAG) ricos en ácidos grasos poliinsaturados a presión atmosférica y temperatura baja. Llevar a cabo este tipo de reacciones de biocatalizadas en disolventes orgánicos ayuda a crear un sistema de reacción homogéneo formado por los reactivos, etanol y aceite de pescado. En este trabajo se presenta el equilibrio líquido-líquido a dos temperaturas diferentes (303.15 y 323.15 K) y a presión atmosférica para dos sistemas formados por los reactantes de la reacción de etanolisis de aceite de pescado y un disolvente: Etanol + Aceite + Tert-pentanol y Etanol + Aceite + Hexano. Las curvas de solubilidad experimental (binodales) se obtuvieron por el método del punto de enturbiamiento y la composición de las rectas de reparto se obtuvo por densidad y cromatografía de gases de alta temperatura (HT-GC). La consistencia de los datos experimentales se comprobó mediante el uso de la ecuación Othmer-Tobías. Los datos de equilibrio líquido-líquido experimentales se correlacionaron satisfactoriamente mediante el modelo NRTL (Non Random Two Liquids) para el cálculo del coeficiente de actividad.

Índex

1	INTRODUCTION	73
2	MATERIALS AND METHODS	74
2.1	Materials	74
2.2	Apparatus and procedure	74
2.3	Analytical methods	76
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	78
3.1	Experimental data.....	78
3.2	Data correlation	87
4	CONCLUSIONS.....	90
5	REFERENCES	90

1. INTRODUCTION

Fish oil is one of the main sources of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as eicosapentaenoic acid (20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6 n-3, DHA). These compounds have been reported to have beneficial effects in human health (Ustun, 1997).¹ They are also widely used as ingredients in functional foods, mostly as their ethylester derivatives. However, their acylglyceride derivatives are preferred to achieve a better assimilation by the human body. From the different acylglycerides, MAGs are non-ionic surfactants and emulsifiers used in the food industry. Enzymatic alcoholysis of fish oil by using 1,3-specific lipases is a simple method to obtain 2-MAGs significantly enriched in EPA and DHA,^{2,3} providing a practical alternative to the conventional chemical methods in the production of MAGs. Many factors affect the lipase-catalyzed synthesis of MAG, including reaction conditions, type of enzyme ^{4,5} and reaction media. To obtain the highest yield, all these factors should be optimized.^{6,7} By using organic solvents as reaction media, the mutual solubility of reactants, ethanol and fish oil could be improved. Therefore, knowledge of the phase behavior for ethanolysis systems of fish oil in organic solvent as reaction media is necessary to optimize the amount of solvent and guarantee the full miscibility of the reaction mixture. As pointed out by Lanza et al. ^{8,9} this type of studies are important for a correct design of the process since this can influence the reaction pathway as well as the further purification steps.

Despite the industrial interest, no equilibrium data were found in the literature for ethanolysis systems of fish oil in different organic solvents. This work presents liquid-liquid equilibrium data for two organic solvents with different log P: ethanol + fish oil + hexane and ethanol + fish oil + tert-pentanol, at 303.2 K and 323.2 K ($\log P_{\text{hexane}} = 3.5$, $\log P_{\text{tert-pentanol}} = 0.96$). Binodal curves were obtained by the cloud-point method. Compositions of tie-lines have been directly determined by using a high temperature gas chromatograph (HT-GC) and evaporation of the solvents. The results were compared with indirect measurements of tie lines composition through density measurement of the two phases. The consistency of experimentally measured tie line data was verified by using the Othmer-Tobias equation.

The experimental data were correlated by the nonrandom two-liquid (NRTL) activity coefficient equation, using the Simplex Nelder Mead minimization method with a weight composition-based objective function.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Ethanol was purchased from Merck KGaA with a purity of 99.9 % and a water content of 0.05 %. Tert-pentanol was obtained from Merck with a purity of $\geq 99\%$ and a water content of 0.065 %, Hexane was purchased from Lab-Scan Analytical Sciences with a purity of $\geq 99\%$ and a water content of 0.01%. Refined fish oil was kindly provided by AFAMSA and it is a mixture of tuna and sardine oil.

Densities measurements were carried out by using an Anton Paar DMA 5000. Results for reactants and solvents are presented in Table 1.1 with some values found in the literature.¹⁰⁻¹²

Table 1. 1 Density of the pure components.^a

Component	ρ exp.(kg·m ⁻³)		ρ literature(kg·m ⁻³)		
	303.15 K	323.15 K	298.15 K	303.15 K	323.15 K
Ethanol	783.92	768.73	785.06 10	781.7510	765.2011
Hexane	652.20	632.80	654.8012	650.18 12	631.2212
Tert-pentanol	801.33	783.30	805.00 10	--	--
Fish oil	917.50	906.53	--	--	--

^a Standard uncertainty u is $u(p) = 0.05$.

2.2 Apparatus and procedure

Binodal curves determination

Solubility (binodal) curves of the two ternary systems studied in this work have been determined at 303.2 ± 0.5 K and 323.2 ± 0.5 K and atmospheric pressure by the cloud point method using the titration method. Temperatures investigated in this work were chosen since enzyme catalyzed reactions are carried out under mild conditions. For the fish oil rich phase, different binary mixtures of fish oil + hexane (or tert-pentanol) have been prepared at various concentrations. However, for the ethanol rich phase, different binary mixtures of ethanol + hexane (or tert-pentanol) have been prepared. Binary mixtures were weighed by

using an analytical balance (Sartorius Basic, accurate ± 0.0001 g). These binary mixtures were titrated with the third component (ethanol or fish oil) by using a syringe needle until a change from transparent to turbid was observed by using a turbidimeter (Eutech Instruments TN-100). The temperature was controlled by a thermostatic bath with a precision of ± 0.5 K. To determine the mass added of the third component, the mixture was weighed again. The amount of the third component was also determined from the mass change of the syringe before and after the titration. The same results were obtained by these two measurements.

The cloud point was considered to be a binodal curve point (see Figure 1.1). Samples were collected for density analysis. This way, an expression for density as a function of weight ratio for the three components could be obtained. Each experimental point was replicated at least twice.

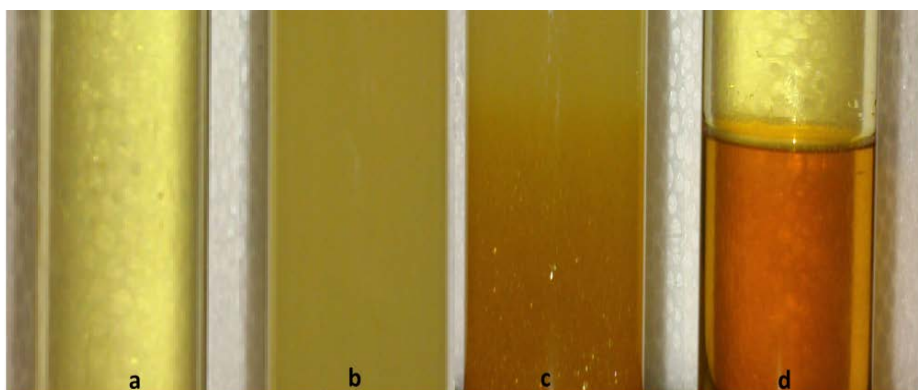


Figure 1. 1 Solubility of mixture fish oil-ethanol-tert-pentanol and the binodal curve point: a=homogeneous system of an phase ; b=cloud point , c=point heterogenic system; d= two-phase system.

Tie lines determination

Experiments have been carried out in equilibrium cells of 20 cm^3 . The overall mixture was prepared directly inside the equilibrium cell by weighing known amounts of fish oil, ethanol and the respective solvent, hexane or tert-pentanol, on an analytical balance (Sartorius Basic, accurate ± 0.0001 g). The cell temperature was controlled by a thermostatic bath (± 0.5 K). The ternary mixture was then vigorously stirred for at least 3 h to allow contact between the two liquid phases and to ensure equilibrium. After that, the mixture was allowed

to stand for at least 24 h at constant temperature until two transparent liquid phases, with a defined interface, could be clearly observed. The upper phase was the ethanol-rich phase and the lower phase was the oil-rich phase. Samples of both phases were collected and composition was determined. The tie line experiments were replicated twice.

2.3 Analytical methods

Fatty acid profile of fish oil used in this work has been determined by gas chromatography by following the AOAC method.¹³ The fatty acid methyl esters were firstly prepared and then analyzed by gas chromatography (GC) in a Hewlett Packard gas chromatograph (6890N Network GC System) equipped with an auto-sampler (7683B series) and a flame ionization detector (FID). A fused silica capillary column (OmegawaxTM-320, 30m×0.32mm i.d.) was used. Most of the fatty acid methyl esters were identified by comparison of their retention times with those of chromatographic standards (Sigma Chemical Co.). Further details of the gas chromatograph method can be found elsewhere.¹⁴ Table 1.2 shows the fatty acid composition of the fish oil.

The free fatty acid (FFA) content of the fish oil has been determined according to AOCS Official Method Ca 5a-40 using an automatic titrator Methrom (Titrand 605).¹⁵ The FFA content was found to be 0.23 ± 0.015 % expressed as percentage of oleic acid. Due to the low free fatty acid content, FFA was not taken into account in the studied systems.

High-Temperature Gas Chromatography (HT-GC) has been used to determine the composition of the tie lines. A Hewlett Packard (HP 6890 Series GC System) gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), a fused silica capillary column of 30m×0.25mm i.d., coated with a 0.25 mm film thickness of 65% Phenyl Methylpolysiloxane (65HT) as a stationary phase, and an Agilent Technologies 7683B Series automatic injector was used. Helium (1 mLmin^{-1}) was used as carrier gas. The initial oven temperature, 80°C , was kept for 2 min and raised to 340°C at a rate of $15.0^\circ\text{Cmin}^{-1}$. Then, it was raised to 365°C at a rate of $1.5^\circ\text{Cmin}^{-1}$ and held isothermally for 4 min. Split injection mode was used with a ratio of 1:40. The injector temperature was kept at 380°C , while the detector temperature was at 400°C .

Table 1. 2 Fatty acid composition of the fish oil and for the two phases (oil and ethanol rich phases) of a tie line at 303.15K for the system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3).^a

Fatty acid		fish oil, %	Tie line	
			OP, %	EP, %
Myristic	C14:0	3.3	3.4	3.8
Palmitic	C16:0	19.5	20.2	20.4
Palmitoleic	C16:1	5.4	5.5	5.9
Stearic	C18:0	6.0	6.2	5.8
Oleic	C18:1n-9	18.0	18.5	18.3
Vaccenic	C18:1n-7	3.0	2.9	2.9
Linoleic cis (LA)	C18:2n-6	2.4	2.4	2.5
α -Linolenic (ALA)	C18:3n-3	0.7	0.7	nd
Steriadonic	C18:4n-3	0.9	0.9	nd
Eicosenoic	C20:1n-9	2.1	2.1	2.0
Eicosatrienoic	C20:3n-3	2.1	2.1	2.2
Eicosapentaenoic (EPA)	C20:5n-3	7.6	7.4	8.0
Docosapentaenoic (DPA)	C22:5n-3	2.0	1.9	1.9
Docosahexaenoic (DHA)	C22:6n-3	27.0	25.8	26.3

EP: ethanol phase; OP: oil phase; a Standard uncertainties u are u(percentage) = 0.5.

For the ethanolysis system of fish oil in tert-pentanol, all components could be satisfactorily quantified by HT-GC. In the literature it has been reported that HT-GC could thermally degrade species that contain PUFAs such as fish oils.¹⁶ To check the reliability of HT-GC to quantify the fish oil used in this work, composition of the tie line was also determined by density measurements. A density calibration curve was obtained from the previous cloud point determination as a function of composition of the three components of the mixture.¹⁷ This way, for tie line measurements, density and only one composition (tert-pentanol) must be known to determine the composition of the other two components since the third component can be written in terms of the other two to satisfy the material balance. For the

ethanolysis system of fish oil in hexane, the HT column was not able to separate ethanol and hexane and only fish oil composition could be determined by HT-GC. For this system, fish oil composition was also measured by evaporation at 323K. The time necessary to remove completely the other two components was determined by weighing samples every hour until constant mass was reached. The oil composition was obtained by difference. Similar procedure was followed by Lanza et al. ⁸ in the LLE study of systems of interest in biodiesel production. The composition of the other two components could be determined by density measurements, as it has been reported for the ethanolysis system in tert-pentanol.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Experimental data

Tables 1.3 and 1.4 present the binodal curve and the density data at 303.2 K and 323.2 K for the systems ethanol + fish oil + tert-pentanol and for ethanol + fish oil + hexane, respectively.

A direct fit of the density data, similar to the approach used in the correlation of the boiling points of ternary mixtures without using binary data, suggested by Tamir ¹⁸ has been used in this work:

$$\rho = \sum_{i=1}^N w_i \rho_i + \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N w_i w_j [A_{ij} + B_{ij}(w_i - w_j) + C_{ij}(w_i - w_j)^2 + \dots] \quad [1.1]$$

The coefficients of the empirical Eq. 1.1 were determined by using the Marquardt algorithm and are listed in Table 1.5.

Table 1. 3 Binodal curves for ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) at 303.2 K and 323.2 K. ^a

w_1	w_2	w_3	$\rho, \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
303.2 K			
0.9711	0.0289	0.0000	784.55
0.8850	0.0260	0.0890	791.74
0.7410	0.0570	0.2020	797.29
0.6860	0.0700	0.2440	798.12
0.5990	0.1420	0.2590	805.20
0.5040	0.2410	0.2550	820.17
0.4190	0.3420	0.2390	827.52
0.3700	0.4200	0.2100	838.72
0.3380	0.4770	0.1850	847.90
0.2830	0.5820	0.1350	860.14
0.2410	0.6760	0.0830	873.72
0.2200	0.7230	0.0570	880.51
0.1765	0.8080	0.0155	891.17
0.1753	0.8247	0.0000	895.48
323.2 K			
0.9350	0.0650	0.0000	774.08
0.8390	0.0870	0.0740	776.61
0.7600	0.1100	0.1300	780.78
0.6900	0.1550	0.1550	787.70
0.6420	0.2026	0.1554	794.05
0.6100	0.2353	0.1547	798.65
0.5600	0.2890	0.1510	804.31
0.5150	0.3380	0.1470	810.68
0.4700	0.3948	0.1352	815.05
0.4000	0.4900	0.1100	827.92
0.3650	0.5402	0.0948	832.27
0.3320	0.5930	0.0750	843.07
0.3100	0.6340	0.0560	849.13
0.2650	0.7350	0.0000	886.49

^a Standard uncertainties u are $u(T) = 0.5 \text{ K}$, $u(x) = 0.0005$, $u(\rho) = 0.05$.

Table 1. 4 Binodal curves for ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) at 303.2 K and 323.2 K. ^a

w_1	w_2	w_3	$\rho, \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
303K			
0.9711	0.0289	0.0000	784.55
0.8800	0.0536	0.0664	778.50
0.8000	0.0800	0.1200	774.23
0.7116	0.1280	0.1604	774.56
0.6090	0.2132	0.1778	780.00
0.5129	0.2934	0.1936	787.70
0.4037	0.4043	0.1920	800.05
0.3395	0.4829	0.1776	815.43
0.2660	0.6057	0.1283	839.40
0.2181	0.7019	0.0800	864.38
0.1940	0.7705	0.0355	878.10
0.1753	0.8247	0.0000	895.48
323K			
0.9350	0.0650	0.0000	774.08
0.9080	0.0720	0.0200	774.45
0.7978	0.1342	0.0680	769.32
0.6770	0.2230	0.1000	767.17
0.5905	0.3052	0.1043	773.91
0.5540	0.3420	0.1040	775.18
0.5300	0.3660	0.1040	778.23
0.4943	0.4057	0.1000	787.76
0.4020	0.5100	0.0880	816.03
0.3564	0.5782	0.0654	837.32
0.3300	0.6100	0.0600	847.51
0.3072	0.6531	0.0397	864.38
0.2650	0.7350	0.0000	886.49

^a Standard uncertainties u are $u(T) = 0.5 \text{ K}$, $u(x) = 0.0005$, $u(\rho) = 0.05$.

Table 1. 5 Parameters of Equation 1

T /K	Parameters		r ²
Ethanol (1) + Fish oil (2) + Tert-pentanol (3)			
303.15	A ₁₂ = -29.9336	B ₁₂ = -55.7633	0.9990
	A ₁₃ = -15.5716	B ₁₃ = 87.2705	
	A ₂₃ = 17.6950	B ₂₃ = -72.7033	
323.15	A ₁₂ = 32.5906	B ₁₂ = -107.4340	0.9994
	A ₁₃ = -26.5671	B ₁₃ = -1.8442	
	A ₂₃ = 38.4506	B ₂₃ = -984.75	
Ethanol (1) + Fish oil (2) + Hexane (3)			
303.15	A ₁₂ = -46.0208	B ₁₂ = -74.8922	0.9994
	A ₁₃ = 88.6053	B ₁₃ = -74.3176	
	A ₂₃ = -140.763	B ₂₃ = 99.1214	
323.15	A ₁₂ = 35.4547	B ₁₂ = -103.842	0.9991
	A ₁₃ = 164.299	B ₁₃ = 3.4146	
	A ₂₃ = -1571.93	B ₂₃ = 2207.08	

Figures 1.2 and 1.3 show the binodal curves for the systems studied in this work. The information provided by the binodal curve is important to optimize the amount of solvent used to create a homogeneous system between reactants. From Figures 1.2 and 1.3 can be observed that the two-phase region is slightly bigger when using tert-pentanol as solvent than when using hexane. As expected, an increase in temperature, in the range covered in this work, decreases the biphasic region for both solvents.

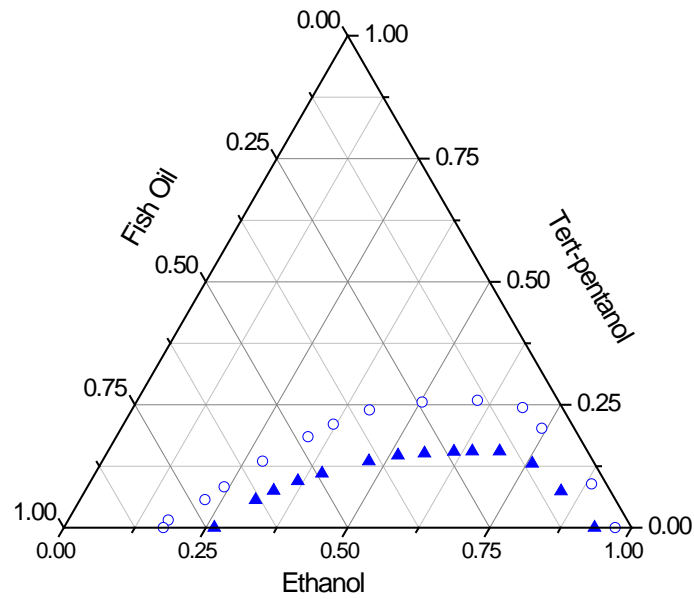


Figure 1.2 Phase diagram of ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) (○ 303.2 K; ▲ 323.2 K).

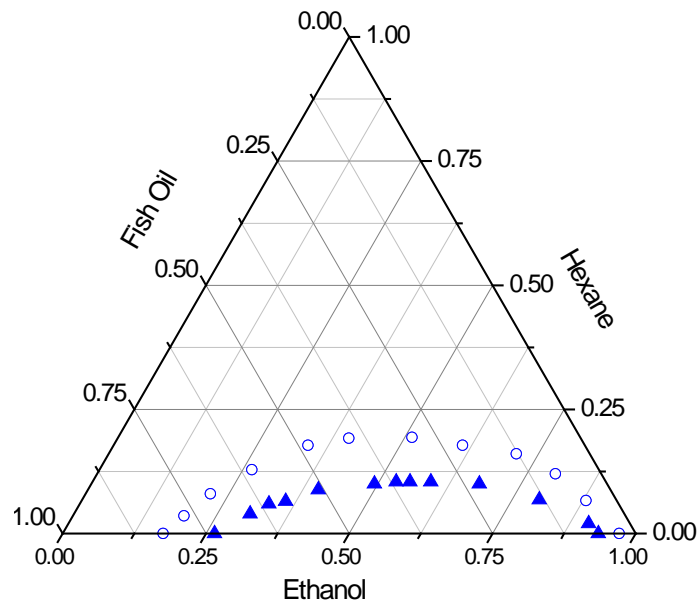


Figure 1.3. Phase diagram of ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) (○ 303.2 K; ▲ 323.2 K)

Tie line data for the system ethanol + fish oil + tert-pentanol or hexane are presented in Tables 1.6 and 1.7 respectively and Figure 1.4 to 1.7. For the system ethanol + fish oil +

tert-pentanol, as it has been explained in section 2.2, composition of tie lines has been determined by HT-GC. Additionally, mass fraction of two of the components of the mixture was determined by density calibration using tert-pentanol as the key component. This way, by using parameters from Table 1.5, composition of fish oil and ethanol could be also determined. Composition of fish oil and ethanol calculated by density calibration and by HT-GC were similar. For ethanol + fish oil + hexane, oil composition was determined by HT-GC and evaporation. The composition of the other two components was determined from density measurements with parameters from Table 1. 5.

Table 1. 6. Ternary LLE Data for the system ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) at 303.2 K and 323.2 K.^a

Overall composition			Ethanol-rich phase			Oil-rich phase		
W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
303.2 K								
0.5024	0.4773	0.0203	0.9189	0.0320	0.0491	0.1669	0.8243	0.0088
0.4966	0.4530	0.0504	0.8700	0.0374	0.0926	0.1779	0.8060	0.0161
0.5037	0.4344	0.0619	0.8400	0.0433	0.1167	0.1909	0.7820	0.0271
0.5032	0.4014	0.0954	0.7900	0.0519	0.1581	0.2074	0.7528	0.0398
0.4988	0.3803	0.1209	0.7590	0.0586	0.1824	0.2181	0.7340	0.0479
0.5025	0.3446	0.1529	0.6898	0.0811	0.2291	0.2622	0.6579	0.0799
323.2 K								
0.5979	0.3764	0.0257	0.8780	0.0790	0.0310	0.2554	0.7281	0.0165
0.5995	0.3652	0.0353	0.8743	0.0857	0.0400	0.2680	0.7110	0.0210
0.5990	0.3558	0.0452	0.8485	0.0955	0.0560	0.2860	0.6842	0.0298
0.6002	0.3399	0.0599	0.8271	0.0999	0.0730	0.2937	0.6680	0.0383
0.6003	0.3152	0.0845	0.7723	0.1200	0.1077	0.3403	0.5947	0.0650

^a Standard uncertainties u are $u(T) = 0.5$ K, $u(x) = 0.0005$.

Table 1. 7 Ternary LLE Data for system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) at 303.2 K and 323.2 K. ^a

Overall composition			Ethanol-rich phase			Oil-rich phase		
W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃	W ₁	W ₂	W ₃
303.15 K								
0.5510	0.4176	0.0314	0.9061	0.0540	0.0399	0.2178	0.7400	0.0422
0.5379	0.4095	0.0526	0.8710	0.0714	0.0576	0.2171	0.7190	0.0639
0.5296	0.4005	0.0699	0.8460	0.0850	0.0690	0.2219	0.6925	0.0856
0.5195	0.3905	0.0900	0.8171	0.0914	0.0915	0.2561	0.6390	0.1049
0.4988	0.3711	0.1301	0.7830	0.0895	0.1275	0.2924	0.5695	0.1381
323.15 K								
0.5700	0.4200	0.0100	0.9201	0.0684	0.0115	0.2660	0.7217	0.0123
0.5596	0.4090	0.0314	0.8732	0.0943	0.0325	0.3025	0.6604	0.0371
0.5470	0.3970	0.0560	0.8067	0.1310	0.0623	0.3263	0.6150	0.0587
0.5326	0.3916	0.0758	0.7291	0.1910	0.0799	0.3528	0.5700	0.0772
0.5299	0.3741	0.0960	0.6526	0.2510	0.0964	0.4230	0.4820	0.0950

^a Standard uncertainties u are $u(T) = 0.5$ K, $u(x) = 0.0005$.

Tie lines show that, for the tert-pentanol system, the ethanol phase is richer in tert-pentanol than the oil phase. For the ethanol + fish oil + hexane system, the content of hexane in both phases is very similar.

The reliability of the tie-line data were tested by the Othmer–Tobias equation: ¹⁹

$$\ln\left(\frac{1-w_2^{OP}}{w_2^{OP}}\right) = A + B \ln\left(\frac{1-w_1^{EP}}{w_1^{EP}}\right) \quad [1.2]$$

where w_2^{OP} is the mass fraction of fish oil in the oil rich phase and w_1^{EP} is the mass fraction of ethanol in the ethanol-rich phase.

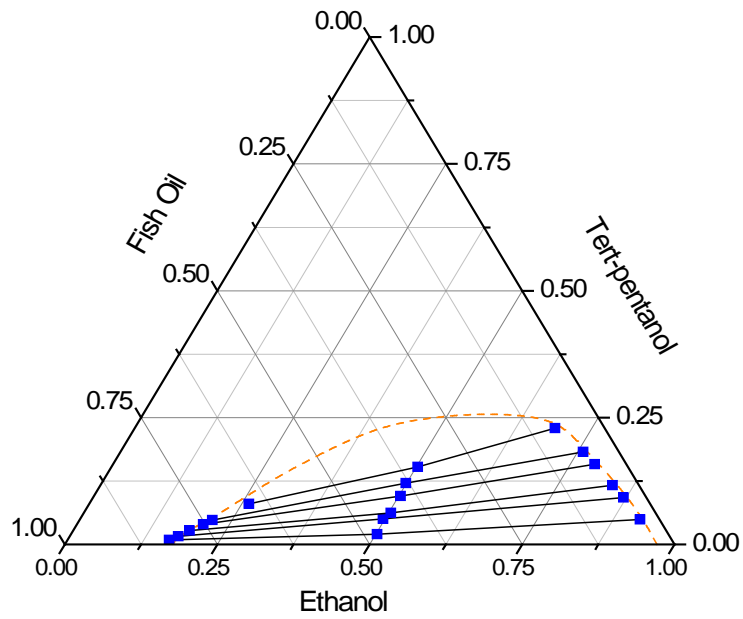


Figure 1. 4. Liquid-liquid equilibrium for the system ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) at 303.2 K: --- binodal curve; ■ tie lines; — NRTL ($\alpha=0.4$).

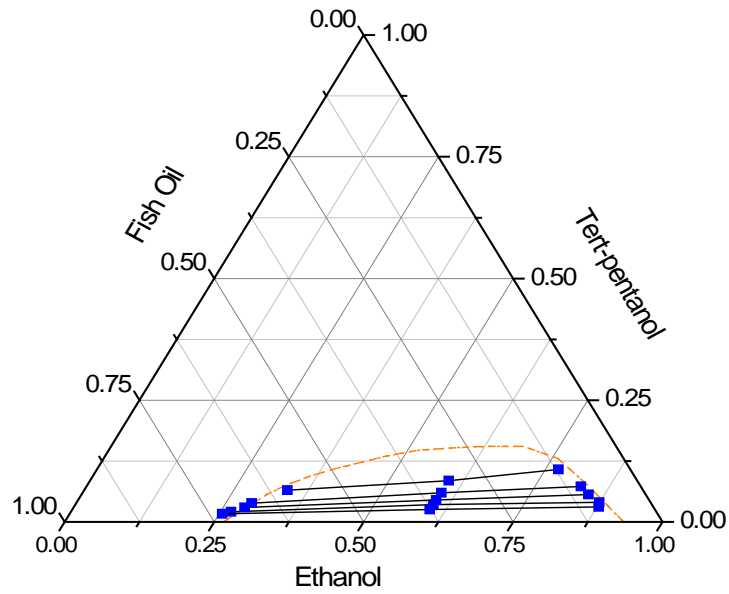


Figure 1. 5. Liquid-liquid equilibrium for the system ethanol (1)+ fish oil (2) + tert-pentanol (3) at 323.2 K: --- binodal curve; ■ tie lines; — NRTL ($\alpha=0.4$).

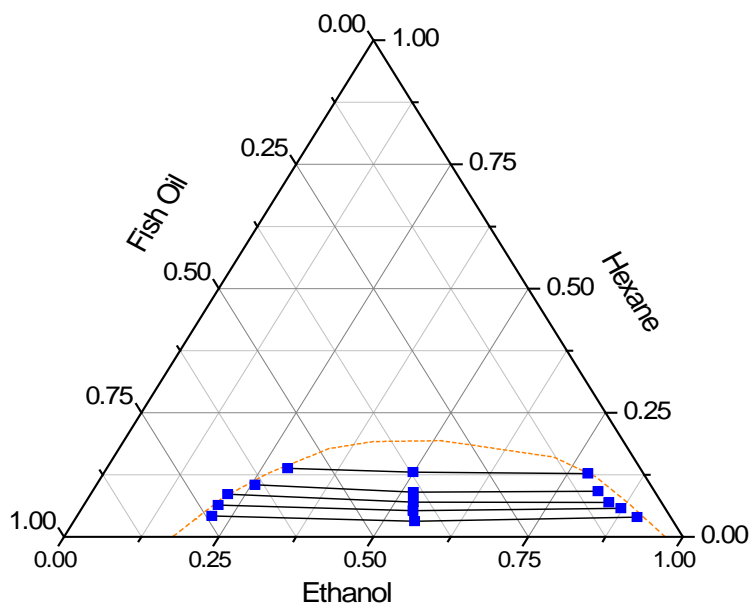


Figure 1. 6. Liquid-liquid equilibrium for the system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) at 303.2 K: --- binodal curve; ■ tie lines; — NRTL ($\alpha=0.2$).

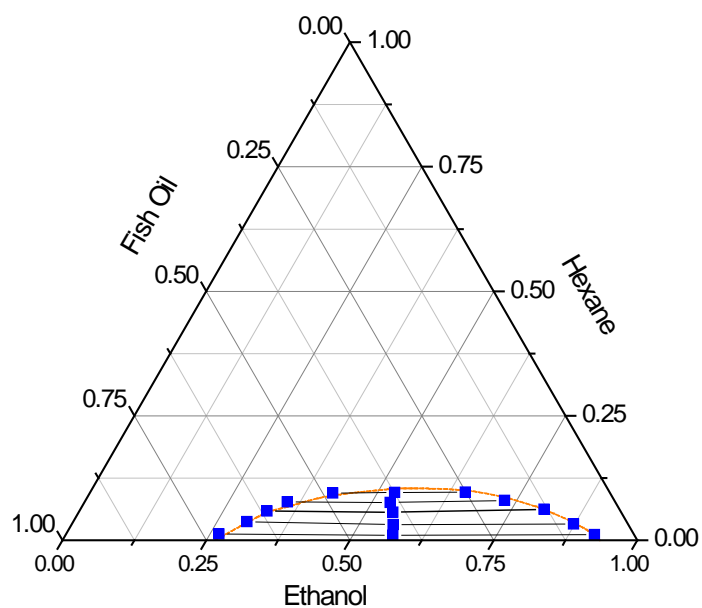


Figure 1. 7. Liquid-liquid equilibrium for the system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) at 323.2 K: --- binodal curve; ■ tie lines; — NRTL ($\alpha=0.2$).

The Othmer-Tobias plot for the studied systems is shown in Figure 1.8. The linearity of the plot indicates a good degree of consistency of the experimental data. The correlations are given in Table 1.8 at 303.2 K and 323.2 K.

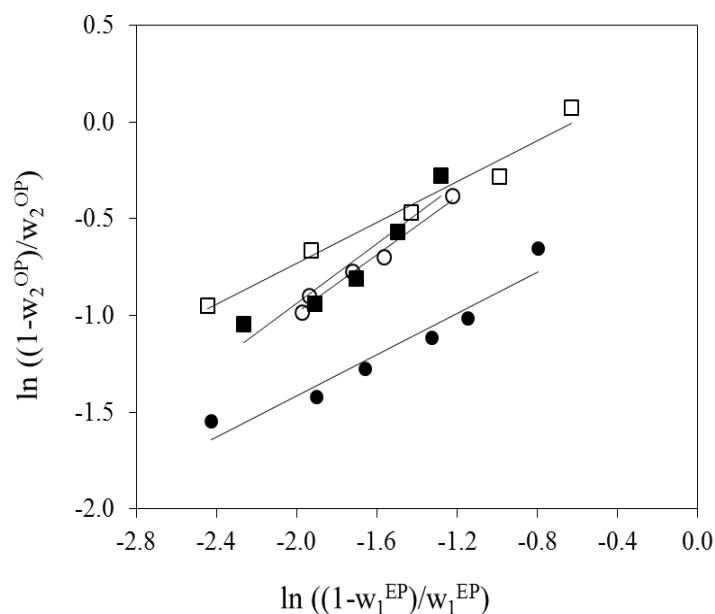


Figure 1. 8. Othmer-Tobias plot for the system ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) at 303.2 K (●, $r^2 = 0.9290$) and 323.2 K (○, $r^2 = 0.9816$) and for the system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3) at 303.2 K (■, $r^2 = 0.9033$) and 323.2 K (□, $r^2 = 0.9734$).

3.2 Data correlation

In this work, it has been assumed that the different triacylglycerols present in the fish oil behave in a similar way in the liquid-liquid system. Therefore, the fish oil has been treated as a single compound. This approach has been suggested in the literature when dealing with different types of oil.¹⁹ To verify this assumption, fatty acid composition has been determined for the oil and ethanol rich phase. Table 1.2 shows the fatty acid composition of the fish oil used in this work, together with the fatty acid composition of the corresponding oil rich phase and ethanol rich phase for a tie line obtained at 303 K in the system ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3). A similar distribution of the fatty acids in both phases can be observed. This result supports the previous assumption of considering the fish oil as a single compound. Similar results were obtained for the other tie lines and systems studied in

this work. Minority fatty acids in the fish oil (see Table 1.2), such as α -linolenic and stericadonic, could not be properly detected in the ethanol phase due to the low oil concentration of fish oil in this phase (see Tables 1.6 and 1.7).

NRTL model has been used to correlate the experimental tie line data. In this work, mass fraction was used as composition unit instead of mole fraction due to the large difference in molar mass of the components of the system. This fact has been suggested in the literature dealing with liquid-liquid equilibrium systems including different kinds of vegetable oils.⁸

The isoactivity criterion of phase equilibrium can be expressed as a function of mass fraction units as follows:

$$(\gamma_i^w w_i)^{EP} = (\gamma_i^w w_i)^{OP} \quad [1.3]$$

The mass fraction-scale activity coefficient γ_i^w must be related to the NRTL activity coefficient γ_i by the following equation:^{8,20}

$$\gamma_i^w = \frac{\gamma_i}{M_i \sum_j^n \left(\frac{w_j}{M_j} \right)} \quad [1.4]$$

where M_i and M_j are the molecular weight of component i and j respectively and w_j is the mass fraction of component j respectively.

Rodriguez et al.²⁰ present an expression for the activity coefficient, γ_i , for the NRTL model using mass fractions as unity of concentration:

$$\ln \gamma_i = \frac{\sum_{j=1}^K \tau_{ji} G_{ji} w_j / M_j}{\sum_{j=1}^K G_{ji} w_j / M_j} + \sum_{j=1}^K \left[\frac{w_j G_{ji}}{M_j \sum_{l=1}^n G_{lj} w_l / M_l} \times \left(\tau_{ij} - \frac{\sum_{l=1}^K \tau_{lj} G_{lj} w_l / M_l}{\sum_{l=1}^K G_{lj} w_l / M_l} \right) \right] \quad [1.5]$$

where

$$G_{ij} = \exp(-\alpha_{ij} \tau_{ij}) \quad [1.6]$$

$$\tau_{ij} = \frac{A_{ij}}{T} + B_{ij} \quad [1.7]$$

$$\alpha_{ij} = \alpha_{ji} \quad [1.8]$$

A_{ij} , B_{ij} and α_{ij} are parameters of the NRTL model, w is the mass fraction, M is the molecular weight and T is the equilibrium temperature. A_{ij} and B_{ij} represent the interaction energy

between compounds i and j and α_{ij} is a nonrandomness parameter that derives from the local composition assumption. The parameter estimation was based on the minimization of the following objective function by using the Simplex Nelder Mead method:

$$OF = \sum_k^D \sum_j^M \sum_i^{N-1} \left[\left(w_{ijk}^{EP,exp} - w_{ijk}^{EP,calc} \right)^2 + \left(w_{ijk}^{OP,exp} - w_{ijk}^{OP,calc} \right)^2 \right] \quad [1.9]$$

where D is the number of data sets (number of studied temperatures for each system), M is the number of tie-lines in each data set, N is the number of components, the superscripts EP and OP refer to ethanol rich phase and oil rich phase respectively, and the superscripts exp and calc refer to the experimental and calculated values of the liquid-phase concentration. A similar procedure as proposed by Reyes-Labarta et al.²¹ has been followed in the minimization procedure to calculate the equilibrium concentrations.

The concentrations that satisfy the isoactivity criterion and the mass balances in each phase are calculated by the Newton-Raphson method by fixing pressure, temperature and composition of one of the components in one phase. In the fitting procedure, the non-randomness parameter of the NRTL model has been fixed to different values ranging from 0.1 to 0.5. The best results were obtained for $\alpha_{ij} = 0.4$ in the system ethanol + fish oil + tert-pentanol and $\alpha_{ij} = 0.2$ in the system ethanol + fish oil + hexane. Table 1.8 shows the NRTL binary interaction parameters (A_{ij} , B_{ij}) for these results.

Tie lines calculated by using parameters from Table 1.8 have been plotted in Figures 1.3-1.6. Comparison between experimental and calculated compositions of each component in each of the two phases were made through the root mean-square (RMS) deviation, given by the following expression²² and it is also shown in Table 1.8:

$$\delta w = 100 \sqrt{\frac{\sum_i^M \sum_j^N \left(w_{ijk}^{EP,exp} - w_{ijk}^{EP,calc} \right)^2 + \left(w_{ijk}^{OP,exp} - w_{ijk}^{OP,calc} \right)^2}{2MN}} \quad [1.10]$$

From Figures 1.3-1.6 can be observed that the NRTL model was able to describe the phase behavior for the ethanol + fish oil system with the two organic solvents, tert-pentanol and

hexane, with an average deviation of 0.73 % and 0.51 %, respectively.

Table 1.8 NRTL parameters for the ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3) and for the ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3)

Pair	A_{ij}/K	A_{ji}/K	B_{ij}	B_{ji}	α_{ij}	RMS
System: Ethanol (1) + fish oil (2) + tert-pentanol (3)						
12	-271.5	3314.3	8.3	-7.5	0.4	
13	7041.2	1930.3	-7.8	-4.4	0.4	
23	1594.6	149.7	2.1	-5.7	0.4	0.73
System: Ethanol (1) + fish oil (2) + hexane (3)						
12	134.8	1605.6	9.0	-8.5	0.2	
13	5537.7	20525.8	-16.0	832.7	0.2	0.51
23	650.5	3162.0	-0.3	-0.8	0.2	

4 CONCLUSIONS

Experimental liquid-liquid equilibrium data, binodal curve and tie lines, for systems containing fish oil (mixture of tuna and sardine oil), ethanol and tert-pentanol or hexane have been determined. Equilibrium data have been obtained at two different temperatures 303.2 and 323.2 K. As expected, by increasing temperature the biphasic region decreases in the temperature range covered in this work (303.15 to 323.15 K). The miscibility region is slightly larger when using hexane as solvent in the ethanolysis system. The reliability of the tie-lines was checked by applying the Othmer-Tobias correlation. NRTL activity coefficient model was able to describe the liquid-liquid equilibrium for the two studied systems showing a root mean square deviation lower than 1 %.

5 REFERENCES

1. Ustün, G., Güner, S., Arer, G., Türkay, S. & Erciyes, a T. Enzymatic hydrolysis of anchovy oil: production of glycerides enriched in polyunsaturated fatty acids. *Applied biochemistry and biotechnology* , 171–86 (1997).
2. Zuyi, L. & Ward, O. P. Lipase-catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil. *Enzyme Microb. Technol.* , 601–606 (1993).
3. Zaks, A. Production of Monoglycerides by Enzymatic Transesterification. *Opta Food Ingredients; Inc., Bedford, Mass.* 60–65 (1992).
4. Shen, Z. & Wijesundera, C. Evaluation of Ethanolysis with Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Regiospecific Analysis of Triacylglycerols Containing Highly Unsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* , 923–927 (2006).
5. Shaw, J. F., Chang, R. C., Wang, F. F. & Wang, Y. J. Lipolytic Activities of a Lipase Immobilized on Six Selected Supporting Materials. *Biotechnol. Bioeng.* , 132–137 (1990).
6. Lee, G.-C., Wang, D., Ho, Y. & Shaw, J. *Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Triglycerides for Short-Chain Monoglyceride Production. J Am Oil Chem Soc* **81**, 533–536 (2004).
7. Zaks, a & Klivanov, a M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 3192–6 (1985).
8. Lanza, M., Neto, W. B., Batista, E., Poppi, R. J. & Meirelles, A. J. A. Liquid – Liquid Equilibrium Data for Reactional Systems of Ethanolysis at 298 . 3 K. *J. Chem. Eng. Data* , 5–15 (2008).
9. Lanza, M., Sanaiotti, G., Batista, E. A. C., Poppi, R. J. & Meirelles, A. J. A. Liquid - Liquid Equilibrium Data for Systems Containing Vegetable Oils , Anhydrous Ethanol , and Hexane at (313.15, 318.15 and 328.15) K. *J. Chem. Eng. Data* 1850–1859 (2009).
10. Riddick J. A, K., Bu. W. B. & Sakano, T. *Organic Solvents Physical Properties And Methods Of Purification.* (New York, 1986).
11. Deenadayalu, N., I., B. & T., H. Ternary Excess Molar Volumes of Methyltrioctylammonium Bis Trifluoromethylsulfonyl Imide + Ethanol + Methyl Acetate, or Ethyl Acetate Systems at T = (298.15, 303.15, and 313.15) K. *J. Chem. Thermodyn* , 726– 733. (2010).
12. Gonçalves, F. A. M. M. et al. PVT, viscosity, and surface tension of ethanol: New measurements and literature data evaluation. *J. Chem. Thermodynamics*, 1039–1049 (2010).
13. AOAC Official Method 991.39: Fatty Acids in Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Methyl and Ethyl Ester. Gas Chromatographic Method. Association of Official Analytical Chemists (1995).

14. Rebolleda, S., Rubio, N., Beltrán, S., Sanz, M. T. & González-Sanjosé, M. L. Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *J. Supercrit. Fluids.* , 270–277 (2012).
15. AOAC Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Champaign, IL. Association of Official Analytical Chemists (1990).
16. Lee, T. W. & Hastilow, C. I. Quantitative determination of triacylglycerol profile of structured lipid by capillary supercritical fluid chromatography and high-temperature gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* , 1405–1413 (1999).
17. Maduro, R. M. & Aznar, M. Liquid–liquid equilibrium of ternary systems 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate+aromatic+aliphatic. *Fluid Phase Equilibria* , 129–138 (2008).
18. Tamir, A. Correlation of Vapor-Liquid Equilibria in Systems Showing Homoeotropy or Heteroazeotropy Using Expressions for the Total Pressure and Temperature as Direct Functions of Vapor Composition. *Chem. Eng. Sci.* , 1467–1473. (1981).
19. Othmer, D.F.; Tobias, P. E. The line correlation. *Ind. Eng. Chem.*, 693–696. (1942).
20. Rodriguez, C. E. C., Filho, P. A. P. & Meirelles, A. J. A. Phase Equilibrium for the System Rice Bran Oil + Fatty Acids + Etanol + Wáter + γ -Oryzanol + Tocols. *Fluid Phase Equilib.* , 271–283. (2004).
21. Reyes-Labarta, J. a., Olaya, M. M., Velasco, R., Serrano, M. D. & Marcilla, a. Correlation of the liquid–liquid equilibrium data for specific ternary systems with one or two partially miscible binary subsystems. *Fluid Phase Equilibria*, 9–14 (2009).
22. Gonzales, C.B; Batista, E.;A.J.A. Meirelles, A. J. A. Liquid-Liquid Equilibrium Data for the System Corn Oil+OleicAcid+Ethanol+Water at 298.15 K. *J. Chem. Eng. Data* , 416–420. (2002).

Capítulo 2

Chapter 2

Kinetic Study for the Ethanolysis
of Fish Oil Catalyzed by
Lipozyme®435 in Different
Reaction Media

Bucio, S.L., Solaesa, Á.G., Sanz, M.T., Melgosa, R., Beltrán, S., Sovová, H.
Kinetic study for the ethanolysis of fish oil catalyzed by Lipozyme® 435 in different
reaction media. (2015) Journal of Oleo Science, 64 (4), pp. 431-441.

ABSTRACT

The ethanolysis of fish oil in various reaction medium (tert-pentanol, n-hexane and solvent free system) catalyzed by the immobilized commercial lipase Lipozyme® 435 (*Candida Antarctica*) at atmospheric pressure has been studied in this work. The effect of some kinetic parameters, such as the amount of lipase, temperature and the initial reactant molar ratio ethanol:oil on monoacylglyceride and ethyl ester yield has been analyzed. Experimental data were successfully correlated by a simple kinetic model based on the elementary reactions proposed in this work. At high initial reactant molar ratio the three elementary steps can be considered as irreversible. However the reaction rate constants ratio for the deacylation of monoglyceride to glycerol decreased by decreasing the molar ratio ethanol:oil. The reaction rates are slower in n-hexane as reaction medium compared to tert-pentanol and a solvent-free system, at the experimental conditions essayed in this work. In this last case, ethanol acts as solvent for reaction and as reactant.

RESUMEN

En este apartado se ha estudiado la etanólisis de aceite de pescado en diversos medio de reacción (tert-pentanol, n-hexano y el sistema libre de solvente) catalizada por la lipasa comercial inmovilizada Lipozyme® 435 (*Candida antarctica*) a presión atmosférica. Se ha analizado el efecto de algunos parámetros cinéticos, tales como la cantidad de lipasa, la temperatura y la relación molar inicial de los reactantes (etanol: aceite) en el rendimiento de monoacilgliceroles y ésteres etílicos. Los datos experimentales se correlacionaron con éxito por un modelo cinético sencillo basado en las reacciones elementales propuestos en este trabajo. A la alta relación molar inicial de los reactantes los tres pasos elementales pueden ser considerados como irreversibles. Sin embargo, la relación de constantes de velocidad de reacción para la desacilación de monoglicérido a glicerol disminuyó al reducir la relación molar de etanol: aceite. Las velocidades de reacción son más lentas en n-hexano como medio de reacción en comparación con tert-pentanol y un sistema libre de disolvente, a las condiciones experimentales ensayadas en este trabajo. En este último caso, el etanol actúa como reactante y como disolvente para la reacción.

Index

1	INTRODUCTION	99.
2	MATERIALS AND METHODS	100
2.1	Materials	100
2.2	Ethanolysis reaction	100
2.3	Analysis of reaction products.....	101
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	102.
3.1	Ethanolysis reaction of fish oil	102.
3.2	Kinetic model.....	102.
3.3	Ethanolysis reaction in tert-pentanol as reaction medium.	106
3.3.1	Effect of the amount of catalyst.....	106
3.3.2	Effect of the reaction temperature	109
3.3.3	Effect of the initial molar reactant ratio.....	112
3.4	Ethanolysis reaction in other reaction mediums	116
4	CONCLUSIONS.....	120
5	REFERENCES	121

1. INTRODUCTION

Fish oil is one of the main sources of polyunsaturated omega-3 acids (n-3 PUFA) such as eicosapentaenoic acid (20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (22:6 n-3 fatty acids DHA). An adequate intake of omega-3 fatty acids helps to prevent cardiovascular diseases, arteriosclerosis, tuberculosis as well as some types of cancer.¹ The use of lipases to transform fish oil into derivatives rich in omega-3 fatty acids is an attractive alternative to the conventional chemical methods since lipases can operate under mild conditions, which is preferable for polyunsaturated fatty acids that can easily undergo oxidation. Enzymatic alcoholysis of fish oil by using 1,3-specific lipases is a simple method to obtain 2-MAG significantly enriched in EPA and DHA.² Furthermore the ethyl esters formed in the ethanolysis reaction are currently used as dietary supplement.³ The use of organic solvents for transesterification reactions has several objectives such as ensuring a homogeneous reaction mixture for reactants and products and increase of diffusion rate by reducing the viscosity of the reaction medium, minimizing thus mass transfer problems.⁴

The aim of this work is the study of the ethanolysis reaction of fish oil at atmospheric pressure and in different reaction media, catalyzed by the commercial immobilized lipase *Candida Antarctica* (Lipozyme®435). The most common solvents used in transesterification are hydrophobic organic solvents: hexane, n-heptane, petroleum ether, cyclohexane, 2-butanol and tert-butanol.⁵ One of the most useful solvents studied in the literature is tert-butanol since it is only moderately polar ($\log P=0.35$).⁴ However, tert-butanol has a quite high melting point (298 K) increasing the risk of solvent crystallization.⁶ In this work, the alcoholysis has been performed in the absence of any organic solvent and in two different organic solvents as reaction medium, tert-pentanol and n-hexane. Tert-pentanol is also a tertiary alcohol and it is more hydrophobic than tert-butanol, $\log P=0.96$, being suitable as solvent for this kind of reactions.⁶ It has already been successfully used in enzymatic glycerolysis and it has been recently used with good results in the ethanolysis of fish oil catalyzed by different immobilized lipases including *Candida antarctica* B (CALB) immobilized by anion exchange and hydrophobic adsorption.³ The main drawback of pure tert-pentanol is the high cost compared to tert-butanol.⁶ In most of the literature, no

explanation is provided about the amount of solvent necessary to create a homogeneous system in the ethanolysis process. In this work, the amount of solvent was based on previous work on liquid-liquid equilibria for the ethanolysis systems of fish oil in both organic solvents.⁷ This way, the amount of solvent added to create a homogeneous phase could be optimized. Solvents may also influence the residual water of the enzyme varying its catalytic activity. However, the *Candida antarctica* lipase B used in this work has been described to be still active at very low water content in the system.⁸ In addition, it has also a high resistance to alcohol deactivation.⁹

In this work, the effect of some kinetic parameters such as the ethanol:oil initial molar ratio (4:1 – 76:1), reaction temperature (293.2 – 323.2 K) and the amount of lipase (2.5 – 10 wt% based on total weight of substrates) has been investigated. Experimental data were correlated satisfactorily by a simple kinetic model based on the elementary reaction that may occur in this system.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

The refined fish oil, a mixture of tuna and sardine oil, was kindly provided by AFAMSA. Ethanol was purchased from Merck KGaA with a purity of 99.9% and a water content of 0.05%. Tert-pentanol was obtained from Merck with a purity of $\geq 99\%$ and a water content of 0.065%. n-Hexane was purchased from Lab-Scan Analytical Sciences with a purity of $\geq 99\%$ and a water content of 0.01%. Products were stored over activated 3 Å molecular sieves to keep them dried. The lipase used in this work was Lipozyme[®] 435 from *Candida antarctica* immobilized on a macroporous hydrophobic acrylic resin (food grade). It was kindly donated by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

2.2 Ethanolysis reaction

The mixture of fish oil and ethanol with and without the presence of an organic solvent (tert-pentanol and n-hexane) was incubated at different temperatures in an orbital stirrer water

bath. The temperature was controlled with a precision of ± 0.5 K. Based on previous studies on liquid liquid equilibrium for the ethanolysis system, the reaction mixture contains 30 wt% of the organic solvent to ensure an homogeneous reaction medium from the beginning of the reaction. The reaction was started by the addition of the lipase. At selected time intervals, the reaction mixture was withdrawn and filtered through a microfilter (0.45 μm , Sartorius RC) to stop the reaction by removing the lipase. All samples were stored at 255 K (-18 °C) prior to analysis and analyzed at least by duplicate.

2.3 Analysis of reaction products

The lipid profile (MAG, DAG, TAG and EE) was analyzed by a normal-phase high-performance liquid chromatography (NP-HPLC). Separations were carried out at room temperature in a Lichrospher Diol column (5 mm, 4 mm \times 250 mm) and detection was performed by an ELSD (Agilent Technologies 1200 Series Model, Santa Clara CA, United States) at 308 K (35 °C). The method and calibration procedure have been previously described in detail.¹⁰

The glycerol formed in the enzymatic alcoholysis has been determined by High-Temperature Gas Chromatography (HT-GC). A Hewlett Packard gas chromatograph (HP 6890 Series GC System) equipped with a flame ionization detector (FID), a fused silica capillary column of 30m \times 0.25mm i.d. coated with a 0.25 mm film thickness of 65% Phenyl Methylpolisiloxane (65HT) as a stationary phase and Agilent Technologies 7683B Series automatic injector has been used for this analysis. The GC method has been previously described in detail.⁷

The free fatty acid (FFA) content of the fish oil has been determined according to the AOCS Official Method Ca 5a-40 using an automatic titrator Methrom (Titrand 605).¹¹ The FFA content was found to be 0.23 ± 0.015 % expressed as percentage of oleic acid. Due to the low free fatty acid content, FFA neutralization was not significant. The fatty acid profile of the fish oil used in this work and different MAG fractions has been determined by gas chromatography by following the AOAC method.¹² Details of the gas chromatograph method can be found elsewhere.¹³

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Ethanolysis reaction of fish oil

Figure 2.1 shows a typical time course of the product composition in the ethanolysis reaction of fish oil with Lipozyme® 435 in the presence of tert-pentanol as reaction medium at 303.2 K, ethanol:oil molar ratio 76:1 with a 10 wt% lipase content based on the weight of reactants. The production of fatty acid ethyl esters is very rapid at the beginning of the reaction and then it becomes slower. The intermediate DAG is accumulated for a little while only in small amounts (less than 5 mole %) and then it is rapidly deacylated to MAG. The production of MAG reaches a maximum in 2 – 3 h reaction time. According to Esteban et al.¹⁴ technical grade Novozym 435 prefers TAG as substrate, since the deacylation of MAG to glycerol becomes important only when the TAG content in the reaction medium is very low (after 2-3 h reaction time). This can be also observed in Figure 2.1 on the lipid profile of TAG, MAG and glycerol. At the reaction conditions studied in this work, no free fatty acids were observed in the reaction medium (<0.1%). Muñio et al.¹⁵, also detected no FFA (<0.5%) when absolute ethanol (0.5% water) and absolute dry ethanol (0.02% water) were used in the alcoholysis of cod liver oil with ethanol by the lipase Novozym 435 at 72:1 molar ratio ethanol:oil.

3.2 Kinetic model

The enzyme kinetics and reaction mechanism for transesterification systems have been recently review by Gog et al. (2012).¹⁶ The most commonly used mechanism to describe the alcoholysis of triglycerides is the Ping-Pong Bi-Bi mechanism.¹⁶ Alcohol and substrate inhibition of enzyme are often considered.⁹ In many of these studies only initial changes of substrates were considered to estimate the kinetic parameters of the model and formation of di- and monoglycerides are not considered.¹⁷

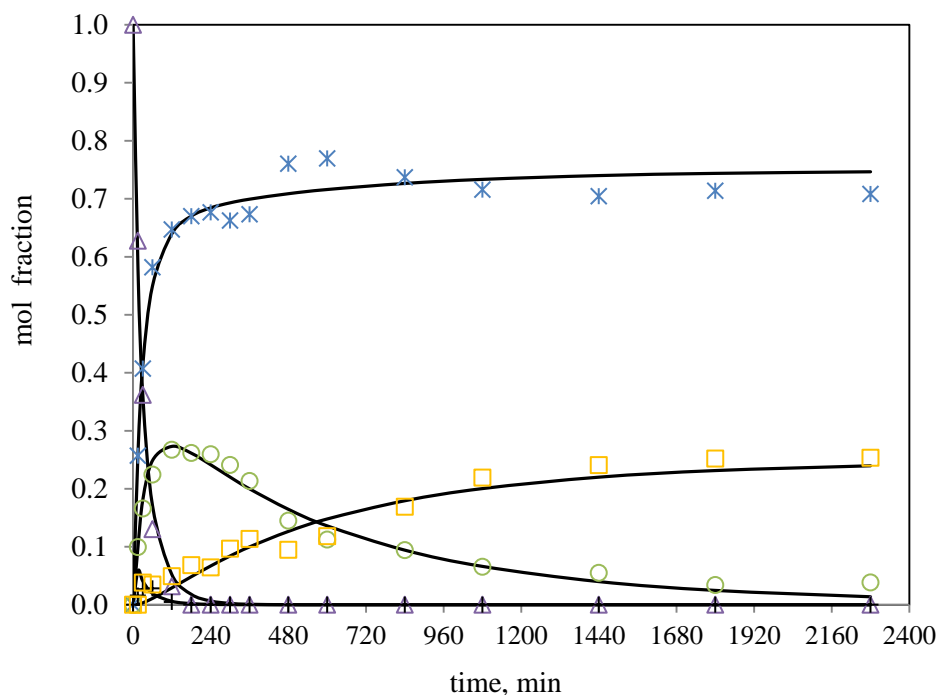
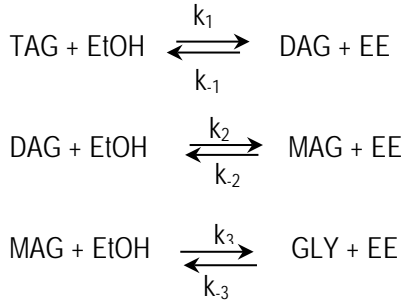


Figure 2. 1. Components profile in the ethanolsis of fish oil with lipase Lipozyme® 435: Δ triglyceride, + diglyceride, \circ monoglyceride, * ethyl esters, \square glycerol (MR = 76:1, 10 wt % lipase based on weight of reactants, 303 K). Continuous lines represent the kinetic modeling.

Pilarek and Szewczyk proposed a kinetic model for 1,3-specific enzymatic alcoholysis of triacylglycerols based on mass balances for each individual component assuming that the enzymatic alcoholysis of acyl bounds is an irreversible reaction following the Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competitive inhibition by alcohol.¹⁷ Other authors analyze the lipase-catalyzed ethanolsis by response surface methodology.¹⁸⁻²⁰

Camacho et al.²¹ proposed a mechanistic model based on the elementary reactions that may occur in the process. In this work, a simple model similar to the one proposed by Oliveira et al.²² has been considered. The main difference is that mono- and diglycerides have been taken into account since they were detected under the reaction conditions studied (Figure 2.1).

Lipase catalyzed ethanolsis of triglycerides takes places yielding one molecule of fatty acid ethyl ester and a glyceride containing one fewer ester bond at each step, that is diglycerides, monoglyceride and glycerol as last products ?:



Hydrolysis reaction has not been taken into account since no FFA were detected <0.1%. All the kinetic reactions can be considered as a pseudo homogeneous catalyzed reactions. The three reversible reactions have been considered as elementary reactions; therefore forward and reverse reactions are expected to follow a second order kinetic, being k_1, k_2 and k_3 the forward rate constant and k_{-1}, k_{-2} and k_{-3} the reverse rate constants for the lipase catalyzed reaction. In this kinetic study the ethanol/oil molar ratio exceeded to a large extent the stoichiometric ratio; therefore the consumption of ethanol during the ethanolsis reaction can be considered as negligible and the molar concentration of ethanol along the reaction was considered constant and it has been included in the forward rate constant. Concentrations of reaction products are expressed in ethanol and solvent-free basis. The reactions involved in the ethanolsis system are the following:

$$\begin{aligned}
\frac{dn_{\text{TAG}}/n_{\text{total}}}{dt} &= -k'_1 x_{\text{TAG}} + k'_{-1} x_{\text{DAG}} x_{\text{EE}} \\
\frac{dn_{\text{DAG}}/n_{\text{total}}}{dt} &= k'_1 x_{\text{TAG}} - k'_{-1} x_{\text{DAG}} x_{\text{EE}} - k'_2 x_{\text{DAG}} + k'_{-2} x_{\text{MAG}} x_{\text{EE}} \\
\frac{dn_{\text{MAG}}/n_{\text{total}}}{dt} &= k'_2 x_{\text{DAG}} - k'_{-2} x_{\text{MAG}} x_{\text{EE}} - k'_3 x_{\text{MAG}} + k'_{-3} x_{\text{GLY}} x_{\text{EE}} \\
\frac{dn_{\text{EE}}/n_{\text{total}}}{dt} &= k'_1 x_{\text{TAG}} - k'_{-1} x_{\text{DAG}} x_{\text{EE}} + k'_2 x_{\text{DAG}} - k'_{-2} x_{\text{MAG}} x_{\text{EE}} + k'_3 x_{\text{MAG}} \\
&\quad - k'_{-3} x_{\text{GLY}} x_{\text{EE}} \\
\frac{dn_{\text{GLY}}/n_{\text{total}}}{dt} &= k'_{-3} x_{\text{MAG}} - k'_{-3} x_{\text{GLY}} x_{\text{EE}} \tag{2.1}
\end{aligned}$$

where $n_{\text{TAG}}, n_{\text{DAG}}, n_{\text{MAG}}, n_{\text{EE}}$ and n_{GLY} are the moles of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, ethyl esters and glycerol respectively and n_{total} is the total number of

moles excluding the solvent and the ethanol to express concentrations in a solvent-ethanol-free basis. The effective forward and reverse rate constant are obtained by solving the set of differential equations simultaneously. In this work, the differential equations were solved numerically with a fourth order Runge-Kutta method and by reducing the experimental kinetic data minimizing the following objective function (O.F.):

$$O. F. = \frac{\sum_{\text{all samples}} \sum_{i=1}^n \text{abs}(x_{i,\text{exp}} - x_{i,\text{calc}})}{n_{\text{samples}}} \cdot 100 \quad [2.2]$$

by using the Simplex-Nelder-Mead method. The subscripts *i* refers to the different components in the ethanolysis system: TAG, DAG, MAG, EE and glycerol. The subscripts "exp" and "calc" are refer to the experimental and calculated mole fraction of the different components for each experimental kinetic data (n_{samples}). In this work, the effect of the organic solvent used as reaction medium, amount of lipase, reaction temperature and initial molar reactant ratio on the kinetic parameters was studied. As the regioisomers of DAG and MAG could not be distinguished with the applied analytical procedure, no difference was made between them in the model. The effective rate constants include the catalyst concentration and the rate constant for the catalyzed reaction can be expressed as a function of the lipase concentration, *C*:

$$k' = k \cdot C \quad [2.3]$$

The effect of temperature on the reaction rate has been described by the Arrhenius type equation:

$$k' = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad [2.4]$$

where k_0 is the preexponential factor, E_a is the activation energy of the reaction and *R* is the gas constant. The continuous lines in Figure 2.1 represent the results obtained with the kinetic model proposed in this work. It can be observed that the experimental data were correlated satisfactorily.

3.3 Ethanolysis reaction in tert-pentanol as reaction medium

A total of 9 ethanolysis kinetic experiments were performed in tert-pentanol as organic solvent ensuring a homogeneous medium from the beginning of the reaction. The amount of tert-pentanol in the liquid phase was 30wt% in all experiments. The effect of lipase amount, reaction temperature and initial reactant molar ratio was analyzed and kinetic parameters were obtained for each kinetic experiment.

3.3.1 Effect of the amount of catalyst

The effect of the lipase loading was studied by varying the lipase concentration from 2.5 to 10 wt % based on total weight of reactants (oil + ethanol). The reaction temperature was fixed at 293.2 K, and the initial reactant molar ratio (ethanol:oil) was 76:1.

An increase in the lipase loading leads to an increase in the reaction rate due to an increase in the total number of active sites of the lipase. This can be observed in Figure 2.2 where the MAG profile at different lipase concentration has been represented. By increasing the amount of lipase the maximum in the MAG concentrations is reached sooner and MAG degrades faster to glycerol. At 10 wt% catalyst loading the maximum in the MAG content in the reaction medium is reached at 120 minutes, whereas this value is delayed until 360 min and 480 min at 5 wt% and 2.5 wt% respectively.

Table 2.1 presents the effective forward and reverse reaction rates for the three consecutive reactions described in Equation 2.1 and the corresponding objective function (Ec.2.2). From Table 2.1 it can be observed that the reaction rate constants also increase by increasing the amount of lipase. Reaction constants corresponding to the reverse reaction can be considered negligible. Therefore, at high initial reactant molar ratio the three consecutive steps can be considered as irreversible. The regression of the kinetic data has been also performed considering the three steps as irreversible. Similar values of the forward reaction rates were obtained (data not presented) with similar objective function values (7.31, 8.76 and 8.27 at 2.5, 5 and 10 wt% respectively).

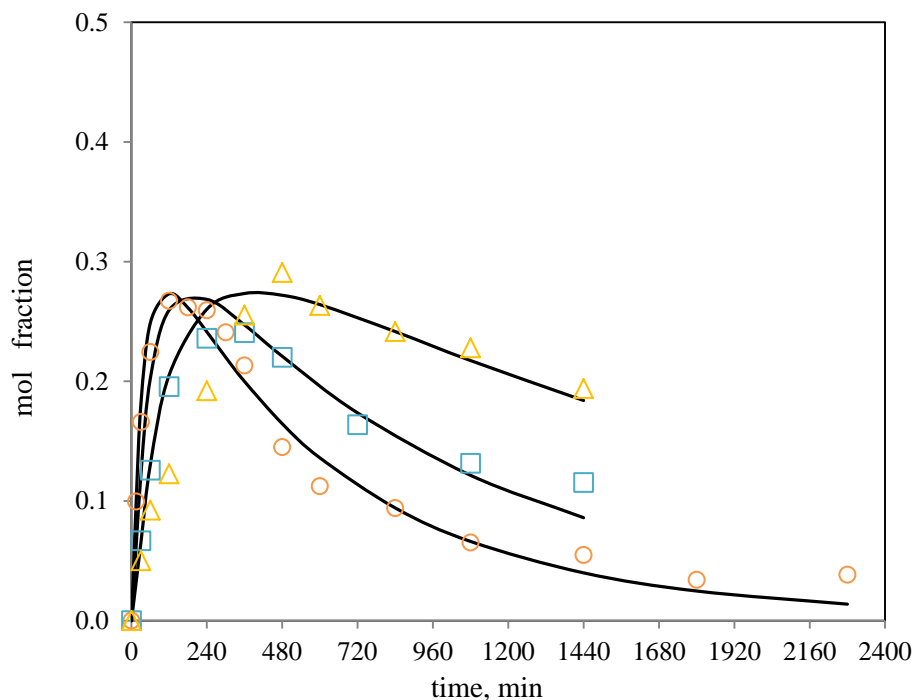


Figure 2.2 MAG profile in ethanolsis reaction at different lipase loadings (10 wt%, \circ ; 5wt%, \square ; 2.5 wt% \triangle): initial molar ratio 76:1, T = 293.15 K, tert-pentanol as reaction medium. Continuous lines represent the kinetic model.

Table 2.1 Reaction rate constant in the ethanolsis system in tert-pentanol at different lipase loading.

Lipase, % wt	k'_1	k'_{-1}	k'_2	k'_{-2}	k'_3	k'_{-3}	O.F.
2.5	$4.48 \cdot 10^{-3}$	$2.06 \cdot 10^{-10}$	$6.24 \cdot 10^{-2}$	$1.98 \cdot 10^{-9}$	$4.00 \cdot 10^{-4}$	$2.07 \cdot 10^{-8}$	8.27
5	$9.61 \cdot 10^{-3}$	$1.92 \cdot 10^{-8}$	$9.98 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \cdot 10^{-7}$	$8.76 \cdot 10^{-4}$	$2.14 \cdot 10^{-6}$	8.73
10	$1.62 \cdot 10^{-2}$	$2.07 \cdot 10^{-7}$	$1.57 \cdot 10^{-1}$	$1.96 \cdot 10^{-6}$	$1.40 \cdot 10^{-3}$	$2.09 \cdot 10^{-5}$	6.41

From the values shown in Table 2.1 it can be observed that the effective forward reaction rate k_2 is the highest of all the forward reaction rates. Therefore as soon as DAG is formed in the first step they are consumed to produce MAG and the corresponding ethyl ester according to the high value of k_2 .

This can also be observed in Figure 2.1 where DAG were only present in the reaction

medium at the very beginning of the process. MAG content increases until a maximum is reached since k_1 is higher than k_3 . When all the TAG are consumed the decrease in the MAG content starts since the value of k_3 is the lowest of all the forward reaction rates.

Based on equation 2.3, the reaction rate constant can be obtained by plotting the effective rate constant versus the catalyst concentration. Figure 2.3 shows the effective forward reaction rates (k'_1 , k'_2 and k'_3) as a function of the catalyst concentration. A linear dependence on lipase concentration can be observed where the slope is the rate constant at 293.2 K and ethanol:oil molar ratio of 76:1. Similar behavior has been observed in the methanolysis of *Brassica carinata* oil catalyzed by potassium hydroxide.²³ The values of the reaction rate constant are shown in Figure 2.3 with the corresponding regression coefficient. From the values of the reaction rate constant can be concluded that the effect of enzyme concentration is more pronounced in the DAG consumption to form MAG and the corresponding ethyl ester than in the other two reactions.

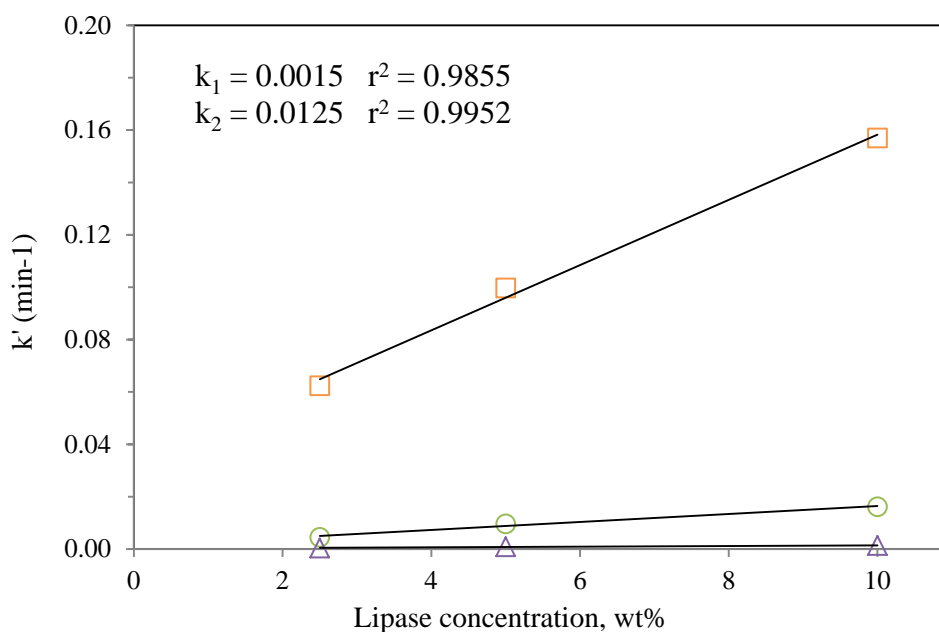


Figure 2. 3. Forward effective reaction rate constants as a function of lipase loading (k'_1 ○; k'_2 □; k'_3 △).

3.3.2 Effect of the reaction temperature

A series of ethanolsis reaction have been performed varying the temperature in the range 293 to 323 K. The initial reactant molar ratio was fixed at 76:1 with a lipase loading of 10wt%. All the kinetic increased by increasing temperature. As an example, Figure 2.4 shows the MAG profile and the ethyl ester profile at the four temperatures studied in this work. The maximum of MAG content is reached faster at higher reaction temperature. The heat of reaction is for many transesterification systems generally small; therefore the equilibrium conversion observed for the ethyl esters is essentially temperature independent.(see Figure2.4) For comparison, Fjerbeak et al. 2009 ⁴ reported an estimated heat of the reaction of -18.5 kJ /mol fatty acid methyl esters of FAME at 25°C.

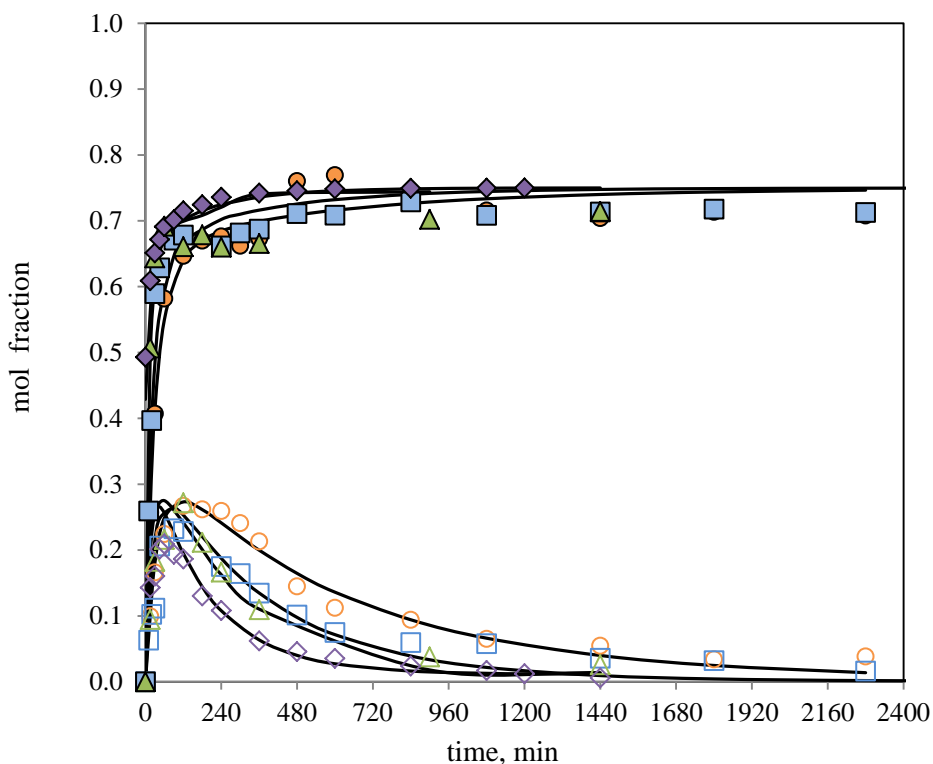


Figure 2. 4.Effect of temperature on MAG (open symbols) and ethyl esters (filled symbols) content in the reaction medium: 293.15 K ○, ●; 303.15 K □, ■; 313.15 K △, ▲; 323.15 K ◇, ◆. Initial molar reactant ratio = 76:1, catalyst loading 10 wt%. Continuous lines represent the kinetic model.

The effective reaction rate constants are listed in Table 2.2 with the corresponding objective function. At each reaction temperature, the slowest reaction rate of the forward steps was the reaction from monoglyceride to glycerol, in contrast to the reaction from diglyceride to monoglyceride. Due to large excess of ethanol, the three consecutive steps can be considered irreversible, specially the two first steps. The effective reaction rate k'_{-3} (from glycerol to monoglyceride) seems to be the most sensitive to the reaction temperature (see Table 2.2). The increase of k'_{-3} from 293 to 323 K is more than tenfold, whereas the increase in the effective forward reaction rates (k_1 , k_2 and k_3) is around threefold.

The temperature influence on the reaction rate was found to follow an Arrhenius type dependence (Eq. 2.4). The activation energy and the pre-exponential factor for each consecutive reaction can be calculated by plotting the logarithm of the effective calculated reaction rate constant versus the reciprocal of absolute temperature. (Figure 2.5).

Table 2.2 Apparent reaction rate constant in the ethanolysis system in tert-pentanol at different reaction temperatures

T, K	k'_1	k'_{-1}	k'_2	k'_{-2}	k'_3	k'_{-3}	O.F.
293	$1.62 \cdot 10^{-2}$	$2.07 \cdot 10^{-7}$	$1.57 \cdot 10^{-1}$	$1.96 \cdot 10^{-6}$	$1.40 \cdot 10^{-3}$	$2.09 \cdot 10^{-5}$	6.41
303	$2.26 \cdot 10^{-2}$	$4.52 \cdot 10^{-7}$	$2.08 \cdot 10^{-1}$	$1.62 \cdot 10^{-6}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$	$9.05 \cdot 10^{-5}$	8.76
313	$3.38 \cdot 10^{-2}$	$1.50 \cdot 10^{-9}$	$4.31 \cdot 10^{-1}$	$1.98 \cdot 10^{-8}$	$2.78 \cdot 10^{-3}$	$3.27 \cdot 10^{-4}$	9.36
323	$4.26 \cdot 10^{-2}$	$2.03 \cdot 10^{-7}$	$5.67 \cdot 10^{-1}$	$2.05 \cdot 10^{-7}$	$4.54 \cdot 10^{-3}$	$2.83 \cdot 10^{-4}$	10.10

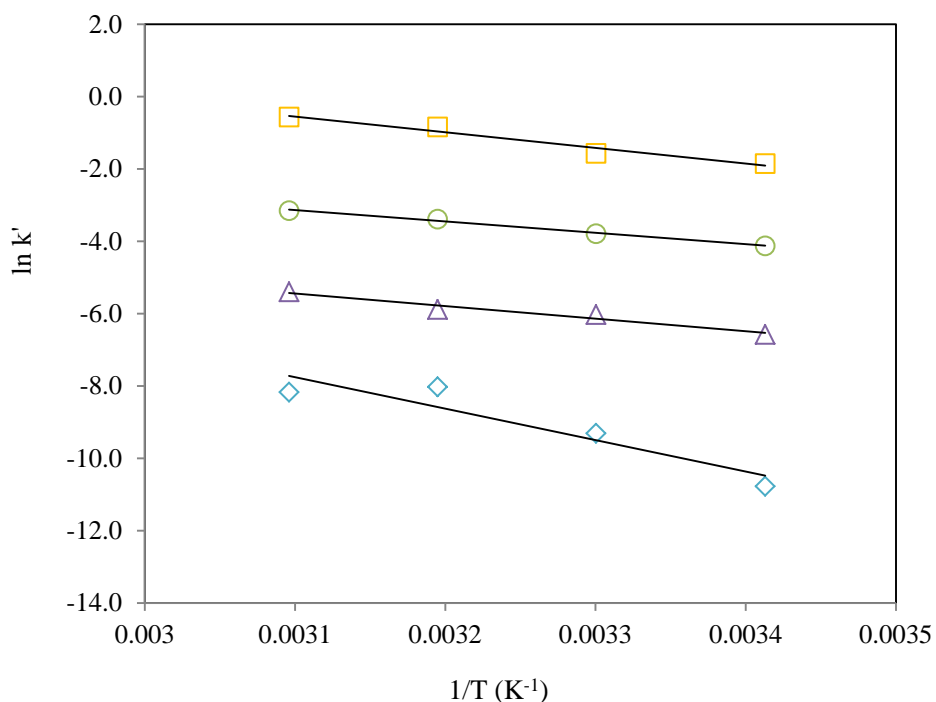


Figure 2. 5 Arrhenius plot of apparent reaction rate: k'1 \circ ; k'2 \square ; k'3 \triangle ; k'-3 \diamond . Lipase loading 10 wt%, initial molar ratio 76:1, tert-pentanol as reaction medium

These values are presented in Table 2.3. According to the tendency in the effective reaction rates, the higher value found for the activation energy correspond to the reaction from glycerol to monoglyceride, being the most sensitive step to the reaction from glycerol to monoglyceride, being the most sensitive step to the reaction temperature. This behavior has been also described by Nouredini and Zhu ²⁴, in the study of methanolysis of soybean oil with sodium hydroxide. These authors also found for the third reaction step that the forward reaction has lower activation energy than the reverse reaction (21.68 kJ/mol versus 41.31 kJ/mol)²⁴. Not much data of activation energy for ethanolysis reaction of oil by lipases has been reported in the literature. ⁹ reported a value for the activation energy of 17.3 kJ/mol for the global reaction rate of ethanolysis of waste cooking oil to fatty acid ethyl esters in the range between 297 to 320 K, catalyzed by Novozyme 435.⁹

Table 2. 3 Activation energies and preexponential factors for the ethanolysis reaction at initial molar ratio 76:1 with a lipase loading of 10 wt%, tert-pentanol as reaction medium

Step	1	2	3	-3
E_a (kJ/mol)	26.10	35.98	28.91	72.32
k_0	$7.33 \cdot 10^2$	$3.88 \cdot 10^5$	$2.08 \cdot 10^2$	$2.23 \cdot 10^8$
r^2	0.9932	0.9632	0.9603	0.8699

Step:1: triglyceride to diglyceride; 2: diglyceride to monoglyceride; 3: monoglyceride to glycerol; -3 glycerol to monoglyceride.

3.3.3 Effect of the initial molar reactant ratio.

To determine the effect of ethanol/oil initial molar ratio, ethanolysis reaction were carried out at different molar ratios at 10 wt % lipase loading and two different reaction temperatures (303 and 323 K). The ethanol:oil ratio was varied in the range 4:1-76:1. Figure 2.6 shows the MAG and ethyl ester profiles at the different initial molar ratios. The ethanolysis reaction rate increased by increasing the excess of ethanol in the reaction medium.

Regarding the MAG content, it can be observed that when the molar ratio ethanol:oil decreased the maximum reached in the MAG content in the reaction mixture also decreased. When the ethanol:oil ratio decreased from 76:1 to 4:1, the maximum MAG content decreased from 24 % to 16%. The same behavior in the production of MAG when varying the molar reactant ratio in the ethanolysis of different type of oils catalyzed by lipases has been found in the literature.^{15,25,26}

The experimental kinetic data at different reactant molar ratio were correlated with the model proposed in this work. The forward and reverse reaction rates are presented in Table 2.4 with the corresponding objective function. At each molar ratio, the reaction from diglyceride to monoglyceride is the fastest of all the steps. In general, the forward reaction rate constants decreased by decreasing the initial reactant molar ratio, while the opposite is observed for the reverse reaction rate constants.

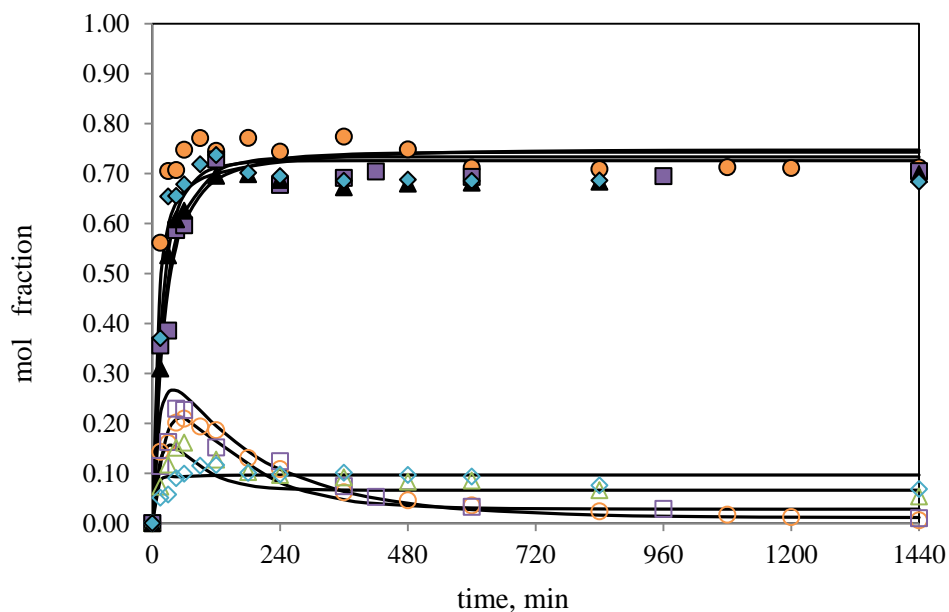


Figure 2. 6. Effect of initial molar ratio ethanol:oil on MAG (open symbols) and ethyl esters (filled symbols) content in the reaction medium: 76:1 ○, ●; 38:1 □, ■; 10:1 △, ▲; 4:1 ◇, ◆. Reaction temperature = 323 K, catalyst loading 10 wt%. Continuous lines represent the kinetic model.

Although, the conversion of TAG to DAG and of DAG to MAG can be considered as irreversible, due to the low value of the effective reverse reaction rates for these two first steps compared with the corresponding effective forward reaction rates. However, the ratio k_3/k_{-3} (i.e. the equilibrium constant), corresponding to the deacylation of monoglyceride to glycerol continuously decreased by decreasing the molar ratio ethanol:oil. Its values were 26.7, 8.8, 5.4 and 1.6 for the initial ethanol:oil molar ratios of 76:1, 38:1 10:1 and 4:1, respectively. This behavior can be clearly observed in Fig.2.6 where the MAG profiles are flatter at molar ratio of 4:1 than 76:1 because the monoglyceride consumption decreases with decreasing initial molar ratio. The lipase from *Candida antarctica* is a non regiospecific lipase, however it behaves as 1,3 specific at a great excess of ethanol.²⁷ According to this, at the highest molar ratio studied in this work (76:1), the maximum observed in the MAG production should correspond to 2-MAG accumulation. However, after reaching this maximum, the 2-MAG content was decreased. This behavior was also observed in the literature considering two different approaches (i) acyl-migration can happen converting 2

MAG into 1(3)-MAG and the 1,3 specific *Candida antarctica* could act to form glycerol as the final degradation product and ethyl esters or (ii) *Candida antarctica* does not act as specific since reaction medium conditions have been changed, being the 2 MAG the only substrate for the lipase.^{14,15}

Table 2. 4 Apparent reaction rate constant in the ethanolysis system in tert-pentanol at different initial molar ratio ethanol:oil (RM) with a lipase loading of 10 wt%..

MR	T, K	k'_1	k'_{-1}	k'_2	k'_{-2}	k'_3	k'_{-3}	O.F.
76:1	303	$2.26 \cdot 10^{-2}$	$4.52 \cdot 10^{-7}$	$2.08 \cdot 10^{-1}$	$1.62 \cdot 10^{-6}$	$2.41 \cdot 10^{-3}$	$9.05 \cdot 10^{-6}$	8.76
38:1	303	$1.99 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \cdot 10^{-5}$	$1.60 \cdot 10^{-1}$	$3.29 \cdot 10^{-6}$	$4.62 \cdot 10^{-3}$	$5.24 \cdot 10^{-4}$	11.74
8:1	303	$8.24 \cdot 10^{-3}$	$1.62 \cdot 10^{-5}$	$1.06 \cdot 10^{-1}$	$8.77 \cdot 10^{-6}$	$3.57 \cdot 10^{-3}$	$6.62 \cdot 10^{-4}$	7.65
4:1	303	$3.84 \cdot 10^{-3}$	$1.69 \cdot 10^{-4}$	$7.88 \cdot 10^{-2}$	$7.10 \cdot 10^{-5}$	$6.20 \cdot 10^{-3}$	$3.83 \cdot 10^{-3}$	13.86
76:1	323	$4.26 \cdot 10^{-2}$	$2.03 \cdot 10^{-7}$	$5.67 \cdot 10^{-1}$	$2.05 \cdot 10^{-7}$	$4.54 \cdot 10^{-3}$	$2.83 \cdot 10^{-4}$	10.10
38:1	323	$2.08 \cdot 10^{-2}$	$5.72 \cdot 10^{-8}$	$1.65 \cdot 10^{-1}$	$9.38 \cdot 10^{-9}$	$7.64 \cdot 10^{-3}$	$1.27 \cdot 10^{-3}$	9.87
10:1	323	$1.90 \cdot 10^{-2}$	$2.06 \cdot 10^{-6}$	$4.70 \cdot 10^{-1}$	$1.98 \cdot 10^{-5}$	$2.18 \cdot 10^{-2}$	$9.82 \cdot 10^{-3}$	10.82
4:1	323	$2.32 \cdot 10^{-2}$	$3.84 \cdot 10^{-8}$	$2.19 \cdot 10^{-1}$	$5.58 \cdot 10^{-7}$	$9.08 \cdot 10^{-2}$	$6.81 \cdot 10^{-2}$	10.10

According to Irimescu et al.²⁸, the regioespecificity of the lipase depends on the type of reaction and the initial composition of the reaction medium. Table 2.5 shows the fatty acid profile of the MAG fraction at the maximum reached in the MAG profile during the reaction course at the different molar ratios. Since the lipase behaves as 1,3 specific at a great excess of ethanol, the fatty acid profile reported at the highest molar ratio studied in this work would correspond to the fatty acid profile at the sn-2 position. The main difference in the fatty acid profile at the maximum MAG content was found in the content of DHA, probably because it is preferable bound at the sn-2 position in the triacylglyceride.¹⁰

At molar ratios higher than 8:1 the mole percentage of DHA in the MAG fraction is around 45%, however at molar ratio of 4:1 this percentage decreases down to 29%. This supports the loss of regioespecificity of *Candida antarctica* at low ethanol:oil molar ratio.

Table 2. 5 Fatty acid (FA) distribution of the fish oil and at the maximum of MAG at different initial molar ratio ethanol:oil in tert-pentanol and in different reaction medium (tert-pentanol, n-hexane, solvent free)

FA MR	Fatty acid composition at the maximum in the MAG fraction						
	Fish oil	Tert-pentanol ^a				n-Hexane ^b	Solvent free ^b
		4:1	8:1	38:1	76:1	76:1	76:1
C14:0	4.8 ± 0.2	4.0 ± 0.1	3.4 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.5	6.0 ± 0.7	5.0 ± 0.5
C16:0	23.5 ± 0.2	20.7 ± 0.3	19.1 ± 1.1	18.2 ± 0.2	17.0 ± 0.9	19.7 ± 3.5	17.4 ± 2.9
C16:1	7.0 ± 0.1	6.5 ± 0.1	5.6 ± 0.3	6.2 ± 0.2	7.3 ± 0.5	6.6 ± 0.2	6.5 ± 0.4
C18:0	6.1 ± 0.1	6.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.6	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.7	0.6 ± 0.1
C18:1n-9	18.7 ± 0.2	18.2 ± 0.4	12.4 ± 0.7	10.9 ± 0.7	11.8 ± 0.5	11.3 ± 0.5	12.7 ± 1.9
C18:1n-7	3.0 ± 0.2	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
C18:2n-6	2.4 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.7 ± 0.7	0.9 ± 0.1	2.5 ± 0.1	3.2 ± 0.2
C18:4n-3	n.d	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.9 ± 0.8	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C20:1n-9	1.9 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C20:3n-3	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.9	0.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1
C20:5n-3	6.5 ± 0.1	6.1 ± 0.2	3.4 ± 0.1	5.1 ± 0.4	6.1 ± 0.1	5.4 ± 0.4	5.6 ± 0.1
C22:5n-3	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.5
C22:6n-3	21.8 ± 0.1	28.7 ± 0.8	45 ± 0.1	44.0 ± 2.4	47.8 ± 2.7	41.6 ± 2.7	45.5 ± 0.2
SFA	34.4 ± 0.4	30.7 ± 0.6	24.6 ± 1.5	25.8 ± 1.1	22.2 ± 1.6	27.3 ± 3.8	23.0 ± 4.2
MUFA	30.6 ± 0.6	28.6 ± 1.2	21.7 ± 1.7	20.30 ± 1.8	19.5 ± 1.2	19.4 ± 0.9	19.8 ± 2.5
PUFA	35.0 ± 0.6	40.7 ± 1.1	53.7 ± 0.4	53.90 ± 4.7	58.3 ± 2.8	53.3 ± 3.3	57.2 ± 1.8

SFA: total saturated fatty acids; MUFA: total monounsaturated fatty acids; PUFA: total polyunsaturated fatty acids; n.d no detected; a=293K; b=303K.

3.4 Ethanolysis reaction in other reaction mediums

Ethanolysis reaction was also conducted in hexane and in a solvent free reaction system to compare the behavior of Lipozyme® 435 in other reaction media. Ethanolysis was performed at a molar ratio of 76:1 with a lipase loading of 10 wt% at three different temperatures in n-hexane and in a solvent-free reaction medium. Figure 2.7 shows the component profile for the reaction products in n-hexane at 303.2K. The behavior is qualitatively similar to the one described in Figure 2.1 for tert-pentanol as reaction medium, although the kinetics in n-hexane are slower.

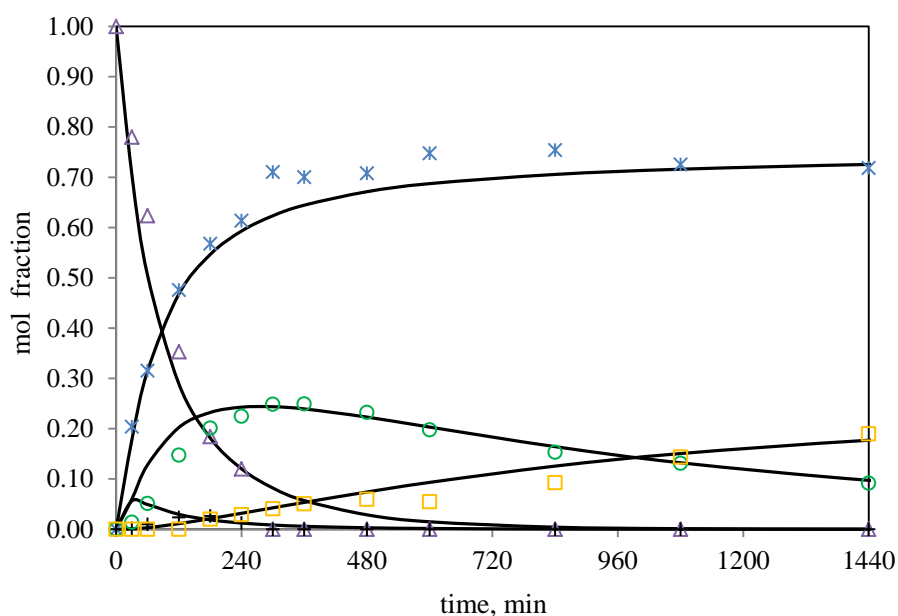


Figure 2. 7. Components profile in the ethanolysis of fish oil in n-hexane with lipase Novozyme 435: Δ triglyceride, + diglyceride, ○ monoglyceride, * ethyl esters, □ glycerol (MR = 76:1, 10 wt % lipase based on weight of reactants, 303 K). Continuous lines represent the kinetic modeling.

For a better comparison Figure 2.8 shows the ethyl ester and the MAG profile in the three reaction media. The reaction products profile in the solvent-free system is similar to the profile obtained during the reaction in tert-pentanol. Due to the high excess of ethanol used in these kinetics experiments, there are no mass transfer limitations by poor immiscibility of

fish oil and ethanol. Ethanol acts as both solvent reaction medium and reactant. Although, two phases exist at beginning of the ethanolysis⁷, the change in the polarity of the reaction mixture because of the production of ethyl esters and monoglycerides favors a kinetic control of the ethanolysis process. In any case, due to the initial immiscibility of both reactants, the alcoholysis in the presence of a solvent would be recommended when the alcoholysis reaction is carried out at industrial scale, where the mass transfer problems could become more important.

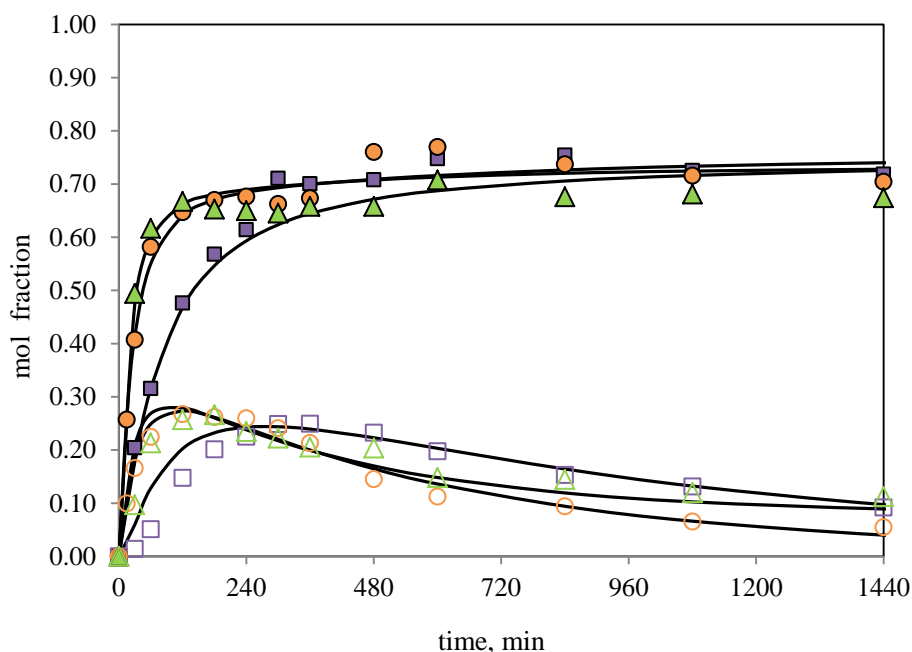


Figure 2. 8. Effect of reaction medium on MAG (open symbols) and ethyl esters (filled symbols) content in the reaction medium: tert-pentanol \circ, \bullet ; n-hexane \square, \blacksquare ; solvent-free $\triangle, \blacktriangle$. Initial molar reactant ratio = 76:1, reaction temperature = 293 K, catalyst loading 10 wt%. Continuous lines represent the kinetic model.

The maximum in the MAG content is reached at 120 min, approximately, in a solvent-free and in tert-pentanol as reaction medium, whereas this maximum is reached at 360 min in n-hexane. This can be related to the hydrophobicity of the support of Lipozyme[®] 435 and the different solvent polarity. Tert-pentanol is more polar than n-hexane ($\log P_{\text{hexane}} = 3.5$ and $\log P_{\text{tert-pentanol}} = 0.96$). Piyatheerawong et al. observed that CALB was able to maintain its active conformation after being in contact with dry ethanol.⁸ Therefore tert-pentanol and

solvent free medium at high molar ratio (76:1) do not cause any activity loss despite their polarity. However Lipozyme® 435 is immobilized in a hydrophobic support and n-hexane could be preferably adsorbed in the support blocking an easy access of the reactants, mainly the polar ethanol, to the active site of the lipase. Table 2.5 shows similar fatty acid profiles with a high DHA content obtained for different reaction media in the MAG fraction at the maximum reached. Ethanolysis kinetic data in a solvent-free system and in n-hexane have been correlated to the model proposed in this work (Table 2.6).

Table 2.6 Apparent reaction rate constant in the ethanolysis system in n-hexane and in solvent-free reaction medium at different reaction temperatures (MR = 76:1, lipase loadin = 10 wt%).

T, K	k'_1	k'_{-1}	k'_2	k'_{-2}	k'_3	k'_{-3}	O.F.
n-Hexane							
293	$5.09 \cdot 10^{-3}$	$4.53 \cdot 10^{-10}$	$5.46 \cdot 10^{-2}$	$1.80 \cdot 10^{-12}$	$9.52 \cdot 10^{-4}$	$1.62 \cdot 10^{-4}$	10.44
303	$7.03 \cdot 10^{-3}$	$1.78 \cdot 10^{-11}$	$7.28 \cdot 10^{-2}$	$4.86 \cdot 10^{-11}$	$1.48 \cdot 10^{-3}$	$1.92 \cdot 10^{-4}$	8.21
323	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$3.33 \cdot 10^{-11}$	$1.69 \cdot 10^{-1}$	$3.07 \cdot 10^{-11}$	$3.55 \cdot 10^{-3}$	$8.60 \cdot 10^{-4}$	5.93
Solvent-free system							
293	$2.26 \cdot 10^{-2}$	$2.37 \cdot 10^{-11}$	$1.44 \cdot 10^{-1}$	$1.94 \cdot 10^{-10}$	$1.47 \cdot 10^{-3}$	$8.14 \cdot 10^{-4}$	9.15
303	$2.64 \cdot 10^{-2}$	$2.09 \cdot 10^{-11}$	$1.77 \cdot 10^{-1}$	$1.85 \cdot 10^{-10}$	$1.78 \cdot 10^{-3}$	$9.77 \cdot 10^{-4}$	8.89
323	$4.07 \cdot 10^{-2}$	$2.73 \cdot 10^{-11}$	$1.96 \cdot 10^{-1}$	$1.87 \cdot 10^{-10}$	$2.20 \cdot 10^{-3}$	$1.48 \cdot 10^{-3}$	8.59

The two first steps can be considered as irreversible since the effective reverse reaction rates are very small compared to the forward reactions. However, the effective forward and reverse reaction rates of the third step were of the same order (see the MAG profiles in Figure 2.8). Figure 2.9 and 2.10 show the Arrhenius plot for n-hexane and solvent-free systems, and the corresponding activation energy are tabulated in Table 2. 7.

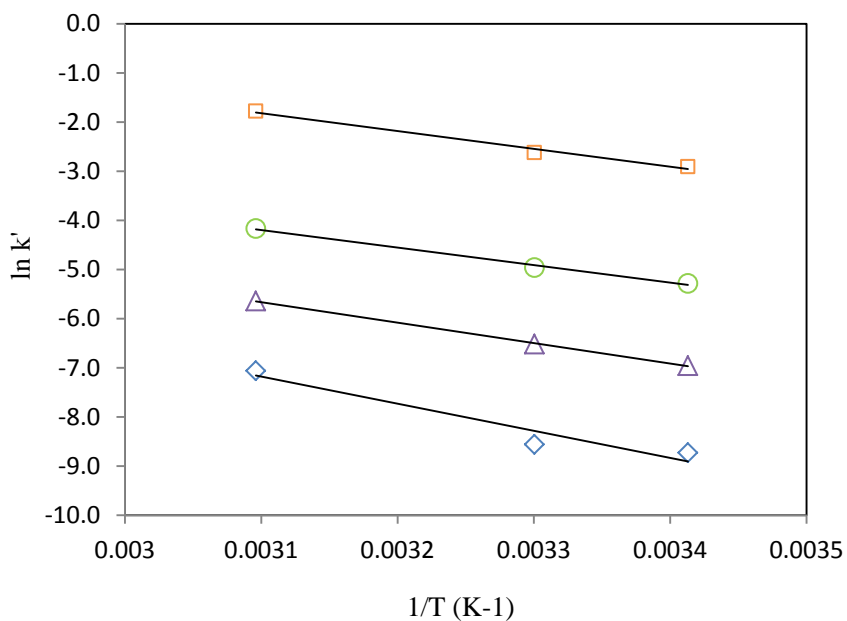


Figure 2. 9 Arrhenius plot of apparent reaction rate: : k'1 ○; k'2 □; k'3 △; k'-3 ◇. Lipase loading 10 wt%, initial molar ratio 76:1, n-hexane as reaction medium.

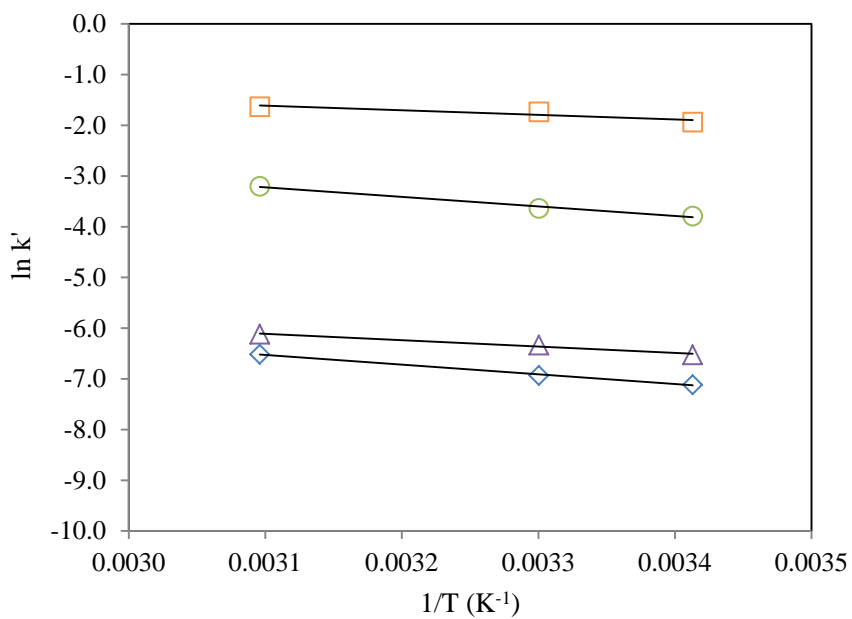


Figure 2. 10. Arrhenius plot of apparent reaction rate: : k'1 ○; k'2 □; k'3 △; k'-3 ◇. Lipase loading 10 wt%, initial molar ratio 76:1, solvent-free reaction medium.

Table 2. 7 Activation energies and preexponential factors for the ethanolysis reaction at initial molar ratio 76:1 with a lipase loading of 10 wt%, tert-pentanol as reaction medium

Step	1	2	3	-3
n-Hexane				
E_a (kJ/mol)	29.65	30.16	34.62	45.83
k_0	$9.92 \cdot 10^2$	$1.25 \cdot 10^4$	$1.39 \cdot 10^3$	$2.01 \cdot 10^4$
r^2	0.9947	0.9878	0.9995	0.9309
Solvent-free				
E_a (kJ/mol)	15.65	7.53	10.42	15.89
k_0	$1.36 \cdot 10^1$	$0.33 \cdot 10^1$	$1.08 \cdot 10^{-1}$	$0.55 \cdot 10^{-1}$
r^2	0.9893	0.8792	0.9813	0.9969

Step:1: triglyceride to diglyceride; 2: diglyceride to monoglyceride; 3: monoglyceride to glycerol; -3 glycerol to monoglyceride.

4 CONCLUSIONS

The ethanolysis reaction catalyzed by the commercial enzyme Lipozyme[®] 435 was carried out at different conditions to determine the effect of some kinetic variables on the MAG and EE production. In a typical reaction course the initial production of EE is very rapid, the DAG is accumulated for a little while and then it is rapidly deacylated to MAG. The MAG production reaches a maximum and it is deacylated to glycerol. The experimental kinetic data were satisfactorily correlated by a simple kinetic model based on the elementary reactions proposed in this work. From this model, kinetic parameters, such as the forward and reverse reaction rate constants and activation energies were evaluated. At high ethanol:oil molar ratio values, the three reaction steps can be considered as irreversible due to the high values of the effective forward reaction rate constants compared to the values of the reverse reaction rate constants.

The reaction rate was found to increase with increasing amount of lipase. The MAG maximum is reached faster but MAG also degrades faster to glycerol. The higher the reaction temperature, the sooner the maximum MAG content is reached. The maximum MAG content was decreased by decreasing the initial ethanol:oil molar ratio. Additionally,

the ratio of the forward and reversed reaction rate constants for the third step (deacylation of monoglyceride to glycerol) decreased with decreasing the molar ratio ethanol:oil.

At high initial ethanol:oil molar ratio (76:1) the reaction rate is similar in a tert-pentanol as reaction medium and in a solvent-free system, where ethanol acts as both solvent reaction medium and as reactant; the reaction rate in *n*-hexane is slower. This can be related with the hydrophobicity of the support of Lipozyme[®] 435 and the different solvent polarity, *n*-hexane being non-polar.

5 REFERENCES

1. Feltes, M. M. C., Oliveira, D., Block, J. M. & Ninow, J. L. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. *Food and Bioprocess Technology* **6**, 17–35 (2012).
2. Zuyi, L. & Ward, O. P. Lipase-catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil. *Enzyme and Microbial Technology* **15**, 601–606
3. Moreno-Pérez, S., Guisan, J. M. & Fernandez-Lorente, G. Selective Ethanolysis of Fish Oil Catalyzed by Immobilized Lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 63–69 (2013).
4. Fjerbaek, L., Christensen, K. V. & Norddahl, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 1298–1315 (2009).
5. Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S. & Budge, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification : Review. *Am. J. Biochem. and Biotech.* **6**, 54–76 (2010).
6. Damstrup, M. L. *et al.* Production of Heat-Sensitive Monoacylglycerols by Enzymatic Glycerolysis in tert -Pentanol : Process Optimization by Response Surface Methodology. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **83**, 27–33 (2006).
7. Bucio, S. L., Solaesa, Á. G., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Melgosa, R. Liquid–Liquid Equilibrium for Ethanolysis Systems of Fish Oil. *J. Chem. Eng. Data* **58**, 3118–3124 (2013).
8. Piyatheerawong, W., Iwasaki, Y., Xu, X. & Yamane, T. Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **28**, 19–24 (2004).
9. Chesterfield, D. M., Rogers, P. L., Al-Zaini, E. O. & Adesina, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. *Chem. Eng. J.* **207-208**, 701–710 (2012).

10. Solaesa, Á. G., Bucio, S. L., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Rebolleda, S. Characterization of triacylglycerol composition of fish oils by using chromatographic techniques. *J. Oleo. Sci.* **63**, 449–460 (2014).
11. AOAC Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL,. *American Oil Chemists' Society: Champaign, IL*, (1990).
12. AOAC Determination of FAMES. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. *AOAC* (1995).
13. Rebolleda, S., Rubio, N., Beltrán, S., Sanz, M. T. & González-Sanjosé, M. L. Supercritical fluid extraction of corn germ oil: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *J. Supercrit. Fluids.* **72**, 270–277 (2012).
14. Esteban, L. *et al.* Synthesis of 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic alcoholysis of fish oils using different reactor types. *Biochem. Engineering J.* **44**, 271–279 (2009).
15. Muñoz, M. d. M. *et al.* Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases. *Process Biochemistry* **43**, 1033–1039 (2008).
16. Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C. & Irimie, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renew. Energy* **39**, 10–16 (2012).
17. Pilarek, M. & Szewczyk, K. W. Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *J. Biotechnol.* **127**, 736–744 (2007).
18. Torres, C. F., Moeljadi, M. & Hill, C. G. Lipase-catalyzed ethanolysis of fish oils: multi-response kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 274–81 (2003).
19. Chen, W. *et al.* Lipase-catalyzed Hydrolysis of Linseed Oil :Optimization Using Response Surface Methodology. *Journal of Oleo Science* **63**, 619–628 (2014).
20. Stojanovic, M. *et al.* Lipase-Catalyzed Synthesis of Ascorbyl Oleate in Acetone: Optimization of Reaction Conditions and Lipase Reusability. *J. Oleo. Sci.* **62**, 591–603 (2013).
21. Páez, B. C., Medina, A. R., Rubio, F. C., Moreno, P. G. & Grima, E. M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 845–853 (2003).
22. De Oliveira, D. & Livio, M. A. T. A Kinetic Study of Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Palm Kernel Oil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 59–68 (2000).
23. Vicente, G., Martínez, M. & Aracil, J. Kinetics of Brassica carinata Oil Methanolysis. *Energy Fuels* **20**, 1722–1726 (2006).
24. Noureddini, H. & Zhu, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**, 1457–1463 (1997).

25. Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y. & Yamane, T. Two-step enzymatic synthesis of docosahexaenoic acid-rich symmetrically structured triacylglycerols via 2-monoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**, 743–748 (2001).
26. De Oliveira, D. *et al.* Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121-124**, 231–241 (2005).
27. Shimada, Y. *et al.* Regiospecific Analysis by Ethanolysis of Oil with Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Lipids* **38**, 1281–1286 (2003).
28. Irimescu, Iwasaki, Y. & Hou, C. T. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 879–883 (2002).

Capítulo 3

Comparación de lipasas en la etanolisis de aceite de pescado. Fraccionamiento de los productos de reacción mediante CO₂ supercrítico

RESUMEN

En este capítulo se ha estudiado la etanolisis de aceite de pescado en diversos medios de reacción catalizada con lipasa inmovilizada Lipozyme[®] RM IM (*Rhizo-mucor miehei*). Se han analizado los efectos de los parámetros que afectan a la reacción tales como: la relación molar (etanol: aceite) y la temperatura, así como el disolvente empleado en la reacción.

Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos previamente con la enzima Lipozyme[®] 435. Las principales diferencias encontradas son: 1) la lipasa Lipozyme[®] RM IM, produce diacilglicerol (entre un 5 a 7% mol), no desaparece con el tiempo tan rápido como con la Lipozyme[®] 435; 2) Lipozyme[®] 435 es específica solamente a una relación molar 76:1, mientras que con Lipozyme[®] RM IM es específico sin afectar las relaciones molares iniciales; 3) la lipasa Lipozyme[®] RM IM, no es un catalizador eficaz para etanolisis de aceite de pescado, en un medio libre de disolvente, pero en tert-pentanol o hexano es un catalizador eficiente, sin embargo, Lipozyme[®]435 a la condición libre de disolvente a las mismas condiciones de reacción en 180 minutos de reacción alcanza un máximo de 26.6% mol 2-MAG.

Los mejores resultados con la lipasa Lipozyme[®] RM IM entre los efectos estudiados son: 10% en peso de lipasa, relación molar inicial de 4:1 (etanol: aceite de pescado), 293.2 K, en tert-pentanol como disolvente orgánico, obteniéndose 21.72 ± 2.2%mol MAG, 68.20 ± 1.49%mol EE y 1.46 ± 0.2% mol DAG a las 6 horas, obteniendo un porcentaje molar de 53.6 ± 0.6% PUFA's de la fracción de MAG. Con Lipozyme[®]435 resultados anteriores muestran que en medio de tert-pentanol, 10% en peso de lipasa, a una relación molar inicial de 76:1 y 293 K, se obtiene 26.75% en moles de MAG y 64.76% en moles de éteres de etilo, en 120 minutos de reacción, obteniendo 58.3 ± 2.8%mol PUFA's en la fracción de MAG. En general la velocidad de la reacción es más lenta con la lipasa Lipozyme[®] RM IM que con Lipozyme[®] 435.

Por último, se ha estudiado el fraccionamiento de los productos de reacción de etanolisis de pescado con CO₂ supercrítico, logrando separar los EE's y concentrando los 2-MAG.

Índice

1	INTRODUCCION	131
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	132
2.1	Materiales.....	132
2.2	Métodos.....	132
2.2.1	Reacción de etanolisis	132
2.2.2	Análisis de productos y fracciones	133
2.2.3	Especificidad (2-MAG)	133
2.2.4	Valoración del fraccionamiento con CO ₂ -SC.....	136
3	RESULTADOS Y DISCUSION	137
3.1	Evaluación de diferentes lipasas en la reacción de etanolisis	137
3.1.1	Efecto de la relación molar inicial de reacción.	138
3.1.2	Efecto de la temperatura de reacción.....	142
3.1.3	Etanolisis en otros medios de reacción.....	142
3.2	Fraccionamiento de los productos de reacción con CO ₂ supercrítico.....	144
4	CONCLUSIONES	148
5	REFERENCIAS	149

1 INTRODUCCION

Como ya se ha explicado en el capítulo anterior, el empleo de lipasas para transformar el aceite de pescado en derivados lipídicos ricos en ácidos grasos omega-3 es una alternativa atractiva. Entre las reacciones de transformación de lípidos, esta tesis se ha enfocado en la etanolisis enzimática del aceite de pescado. Uno de los objetivos de este capítulo es la comparación de diferentes lipasas comerciales en la reacción de etanolisis de aceite de pescado, en concreto la lipasa Lipozyme® RM IM (*Rhizomucor miehei*) inmovilizada sobre una resina macroporosa de intercambio aniónico de base débil y la lipasa Lipozyme® 435 (*Candida Antarctica*) inmovilizada en una resina acrílica macroporosa hidrófoba cuyos resultados se han mostrado en el Capítulo 2.

La etanolisis con Lipozyme® RM IM se estudiará en dos disolventes orgánicos, tert-pentanol y hexano con diferente log P (0.96 y 3.5, respectivamente), así como en ausencia de cualquier disolvente orgánico. Además, también se estudiará el efecto de la relación molar inicial de etanol: aceite (4:1-76:1) y la temperatura de reacción (293.2 y 303.2 K), para determinar las condiciones a las que se obtiene la máxima composición de 2-MAG en la reacción.

Los resultados obtenidos se compararán con los resultados previamente presentados para la lipasa Lipozyme® 435¹ en términos de cinética de reacción, rendimiento y especificidad, para obtener la máxima composición de 2-MAG y concentración de PUFA's.

En la Tabla 3.1 se recogen las características de las dos lipasas empleadas en esta Tesis doctoral.

Tabla 3. 1. Características de las lipasas empleadas en este estudio²

Lipasa	Soporte	Especificidad
Lipozyme® 435 (<i>Cándida antártica</i>)	Resina macroporosa acrílica hidrófoba	1,3,2
Lipozyme ® RM IM (<i>Rhizomucor miehei</i>)	Resina macroporosa de intercambio aniónico	1>3>>2

Otro de los objetivos en este trabajo de investigación es la evaluación del fraccionamiento

de los productos de reacción con CO₂ supercrítico, para separar los EE's y obtener concentrados de 2-MAG, analizando la influencia de la presión (10.5 a 18.5MPa) y la temperatura (313.2-343.2K), evaluando el factor de separación de EE y el factor de enriquecimiento de los MAG en la fase pesada, así como el efecto del fraccionamiento en los componentes del perfil de ácidos grasos en el extracto y la fase pesada.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

El aceite de pescado refinado fue proporcionado amablemente por AFAMSA y es una mezcla de atún y aceite de sardina. El etanol se adquirió de Merck KGaA con una pureza de 99.9% y un contenido de agua de 0.05%, tert-pentanol se obtuvo de Merck, que tiene una pureza de $\geq 99\%$ y un contenido de agua de 0.065%, hexano fue adquirido de Lab-Scan Analytical Sciences con una pureza de $\geq 99\%$ y un contenido de agua de 0.01%. Las lipasas utilizadas para este trabajo son: lipasa inmovilizada de Lipozyme® RM IM (*Rhizomucor miehei*) y Lipozyme®435 (*Candida antártica*). El cloroformo y metanol se adquirieron de VWR Prolabo con una pureza de 99%. Ácido bórico con una pureza del 99.8%. Las placas de TLC son de sílice gel 60 F254 se obtuvieron de Merck KGaA. El CO₂ es adquirido en Carbuos Metálicos, \geq CO₂ líquido 99.9%.

2.2 Métodos

2.2.1 Reacción de etanolisis

Se preparó una mezcla homogénea que contiene 30% en peso del disolvente orgánico con una relación molar inicial de etanol: aceite de pescado (4:1 a 76:1), basado en estudios anteriores sobre el equilibrio líquido-líquido para el sistema etanolisis. La mezcla se incubó a la temperatura en estudio en un baño de agua con un agitador orbital y la reacción se inició mediante la adición de la lipasa seleccionada. A intervalos de tiempo dado la mezcla de reacción se detiene por filtración, para su posterior análisis.

2.2.2 Análisis de productos y fracciones

Los métodos analíticos empleados en el análisis de los productos de reacción, tanto en términos de lípidos neutros como en perfil de ácidos grasos se han descrito en el capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral. (ver capítulo 2, sección 2.3)

2.2.3 Especificidad (2-MAG)

Para estudiar la especificidad de la enzima y valorar la formación de isómeros 1(3) MAG's y 2-MAG's formados en la alcoholisis enzimática por ambas lipasas se ha realizado un análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) siguiendo el siguiente protocolo. Se utilizaron placas de TLC de sílice gel 60 F254 (Merck KGaA). La placa se activa después de la inmersión en una solución hidroetanólica (50%, v / v) de ácido bórico en porcentaje en peso de 1.2%, se deja secar y se activa por calentamiento a 378K durante 30 min, se enfría está en un desecador.³ Una vez que se encuentra activada se toman alícuotas de las mezclas de reacción, se aplican en la placa y se seca nuevamente.

La placa se desarrolla en dos etapas con diferentes mezclas de disolventes para separar los compuestos por su polaridad. En la primera etapa se emplea una mezcla con la siguiente composición volumétrica de cloroformo, metanol y agua 64:10:1, respectivamente y se coloca en la cubeta de cromatográfica. Cuando está saturada la cubeta se coloca la placa. Al alcanzar la fase móvil la mitad de la placa (fase estacionaria), se saca de la cubeta y se deja secar. En la segunda etapa se utiliza una mezcla de disolventes a la relación en volumen de cloroformo, metanol y ácido acético 97.5:2.5:1, respectivamente. Una vez saturada la segunda cubeta cromatográfica se coloca la placa anterior ya seca en esta cubeta hasta que la fase móvil suba por la fase estacionaria hasta un centímetro antes de terminar la placa, sacar y secar. Una alícuota de una solución a concentración conocida de 2-monoleína se utilizó como referencia. Las bandas se visualizaron mediante tinción con vapores de yodo al final del proceso.

Una vez realizada la comparación de las lipasas comerciales Lipozyme® RMIM y Lipozyme®435 en la etanolisis de aceite de pescado, se desarrolla el estudio del fraccionamiento de los productos de etanolisis mediante CO₂ supercrítico, como se muestra en el esquema de la Figura 3.1.

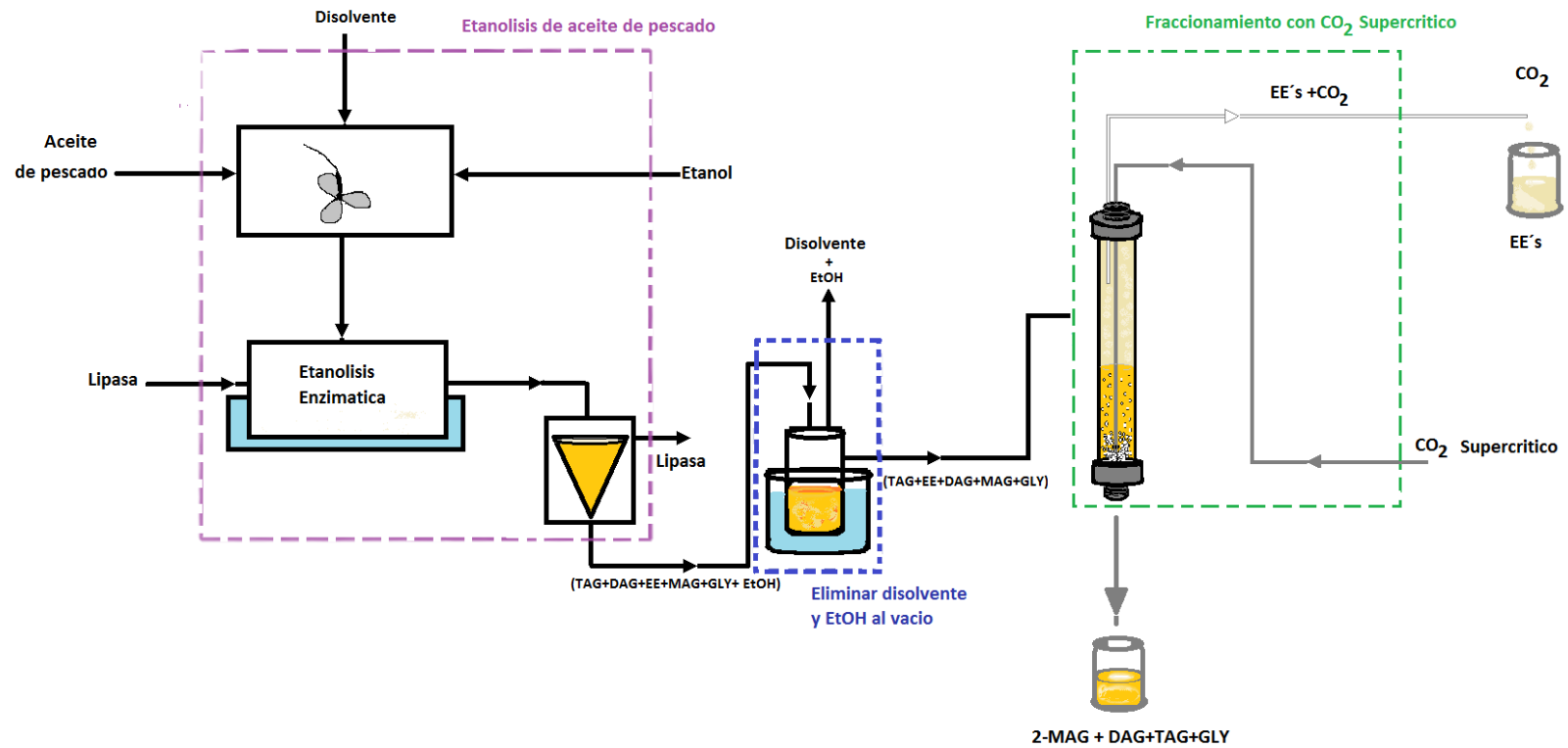


Figura 3. 1 Esquema del proceso de etanolisis enzimática de aceite de pescado y del fraccionamiento de los productos con CO₂ presurizado (con previa eliminación de etanol y disolvente).

Equipo de CO₂ supercrítico

El fraccionamiento de los productos de reacción se llevó a cabo mediante CO₂-SC empleando la planta que se describe en el apéndice A.⁴ Esta consta de una celda de extracción (40 ml de capacidad), donde se añadió un difusor (1/16 " de diámetro, 0.030" de espesor con un tamaño de poro de 2 micras de acero inoxidable) para burbujear el CO₂ a las condiciones en estudio. El equipo de CO₂ tiene dos bombas de jeringa (ISCO 260 DM), que trabajan alternativamente y proporcionan un flujo permanente, para obtener la presión deseada.

Procedimiento de fraccionamiento

La valoración del fraccionamiento de los productos de etanolisis utilizando la tecnología del CO₂ como fluido supercrítico se realizó con los productos de una cinética de etanolisis de aceite de pescado con la lipasa Lipozyme® 435 al 10% en peso con respecto a los reactivos, partiendo de una relación molar 76:1 (etanol: aceite) a 293.2 K, donde se encuentran presentes todos los compuestos que intervienen en la reacción, pasando a una etapa de evaporación a vacío usando un evaporador rotatorio (Heibold VV2000, Schwabach, Alemania) a 313.2K, para obtener una mezcla de compuestos libre de etanol y de tert-pentanol, como se visualiza en la Figura 3.1. El fraccionamiento se llevó a cabo a temperatura controlada con una precisión de ± 0.5 K. El CO₂ despresurizado se cuantificó con un medidor de flujo totalizador. El periodo de fraccionamiento se realizó de un tiempo de 30 min.

Un total de 10 experimentos se ejecutaron a diferentes condiciones de operación, ver la Tabla 3.2. Las experiencias R1-10 se realizaron para evaluar la influencia de la presión y de la temperatura del fraccionamiento, en el rendimiento de extracción de EE's en función del contenido en masa de EE's en la mezcla original. El flujo de dióxido de carbono se ajustó a 2.1 ± 0.5 g / min y 14 gramos de la mezcla de productos de reacción se cargaron en la celda de extracción.

Tabla 3. 2 Condiciones experimentales en el fraccionamiento con CO₂-SC

Run	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
p, MPa	10.5	13.5	15.5	18.5	10.5	13.5	15.5	10.5	13.5	15.5
T, K	313.2			328.2			343.2			

2.2.4 Valoración del fraccionamiento con CO₂-SC

Fracción de extracción (RE)

La fracción de extracción de los EE's utilizando CO₂ como disolvente verde, se determinó por la ecuación 3.1, es la cantidad total de esteres extraída por el disolvente, a las condiciones en estudio es:

$$RE_{EE} = \left[\frac{Q_{EE}}{Q'_{EE}} \right] \quad [3.1]$$

donde, RE_{EE} es la fracción de extracción de los EE's, Q_{EE} es la masa de EE's que se extrae y Q'_{EE} es la masa total EE's en la mezcla antes del fraccionamiento.

Factor de enriquecimiento de EE (β_{EE})

Al estudiar el fraccionamiento de EE's y acilglicerolos utilizando CO₂, se calculó el factor de enriquecimiento de los EE's, que muestran cuántas veces la fase más ligera es más concentrada en este compuesto, que la fase del refinado. Se determina como sigue:

$$\beta_{EE} = \left[\frac{Y_{EE}}{X_{R EE}} \right] \quad [3.2]$$

donde β_{EE} es el factor de enriquecimiento de los EE's, Y_{EE} es la fracción en masa del componente EE's en la fase ligera o extracto, $X_{R EE}$ es la fracción en masa del componente EE's en la fase pesada o refinado.

Al fraccionar utilizando el CO₂, sabemos por estudios previos que tiene mayor solubilidad los EE's en este disolvente, por los datos de solubilidad reportados por Nilsson y col.⁵, por ende los MAG se concentrarán en la fase del refinado.

Factor de concentración de los MAG's (α_{MAG})

El factor de concentración de la fracción de masa de MAG en la fase pesada de la mezcla al final del fraccionamiento:

$$\alpha_{MAG} = \left[\frac{X_{R\ MAG}}{X_{F\ MAG}} \right] \quad [3.3]$$

donde, α_{MAG} es el factor de concentración del componente MAG en la fase pesada después del fraccionamiento, $X_{R\ MAG}$ corresponde a la fracción en masa del componente MAG en el refinado, $X_{F\ MAG}$ es la fracción en masa de MAG en la alimentación.

3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Evaluación de diferentes lipasas en la reacción de etanolisis

En la Figura 3.2 se muestra la comparación de las cinéticas de etanolisis de aceite de pescado realizadas con las lipasas: Lipozyme® RM IM y Lipozyme® 435, en presencia de tert-pentanol como medio de reacción al 30% en masa, a una relación molar de 76:1 (etanol: aceite), con una concentración del 10% en peso de lipasas a 303.2 K.

En la Figura 3.2.a., se observa que la producción de esteres etílicos es rápida y similar con ambas lipasas. La producción de DAG's en fracción molar es notable en el curso de la reacción con Lipozyme® RM IM obteniendo un máximo de 5.7%mol DAG a 240 min de reacción y aun a las 24hrs de reacción contiene un 3.4%mol DAG/mol. Sin embargo, en la reacción con Lipozyme® 435 es apenas perceptible la producción molar de DAG ya que es desacilado rápidamente a MAG como se observa en la Figura 3.2.b. La producción de MAG alcanza un máximo en porcentaje molar con Lipozyme® RM IM en 240 min de reacción y es de 21.66% en moles, la desacilación de MAG a glicerol es muy lento con esta lipasa ya que aun a los 1440 min de reacción se tiene un 16%mol de MAG. Por lo contrario, con la lipasa Lipozyme® 435 a las mismas condiciones de reacción se alcanza un máximo en porcentaje molar de 24.51% en 120 min y después de este tiempo se produce la desacilación de MAG a glicerol ya que a los 1440 min es de 3.6%mol MAG.

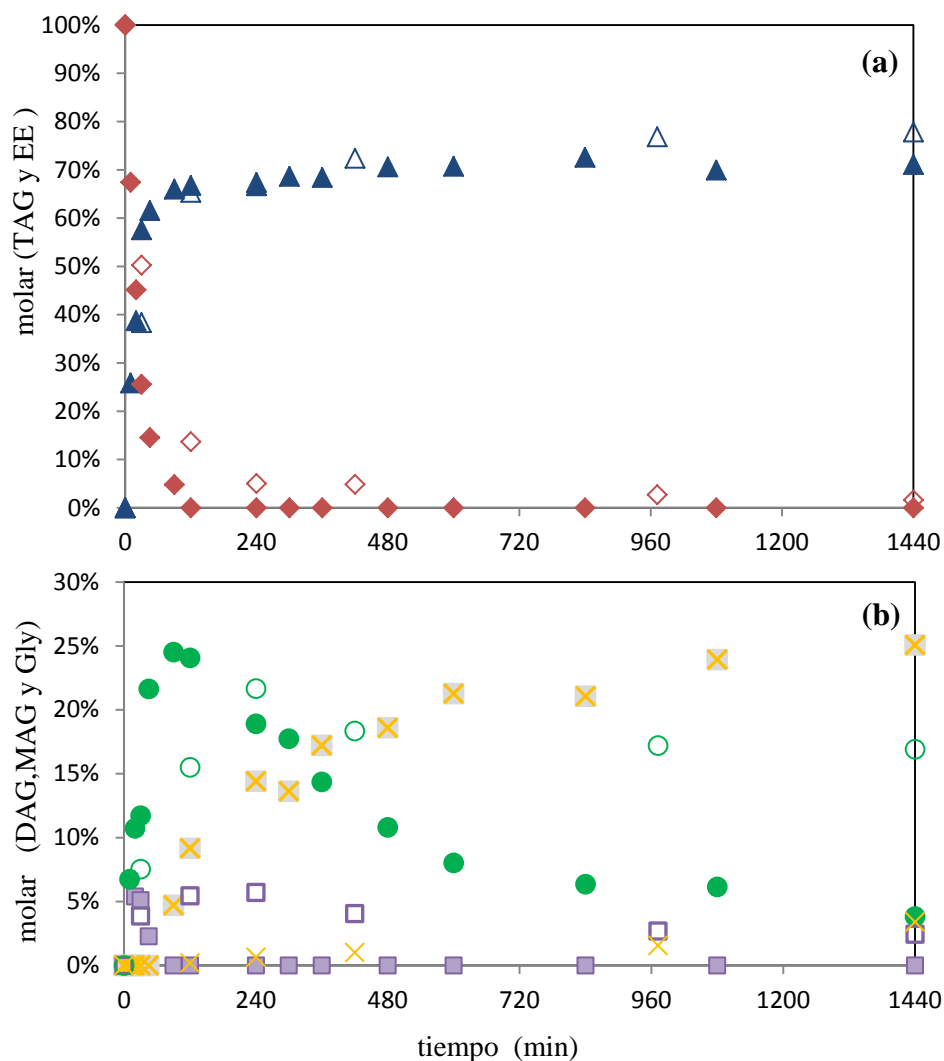


Figura 3. 2 Perfil de los componentes de la etanolisis de aceite de pescado con las lipasas: Liposyme[®] RM IM: \diamond triglyceride, \square diglyceride, \circ monoglyceride, \triangle ethyl esters, \times glycerol y con Lipozyme 435: \blacklozenge triglyceride, \blacksquare diglyceride, \bullet monoglyceride, \blacktriangle ethyl esters, \boxtimes glicerol.

3.1.1 Efecto de la relación molar inicial de reacción.

Se han realizado cinco cinéticas de etanolisis de aceite de pescado para estudiar el efecto de la relación molar inicial de los reactivos en etanolisis de aceite de pescado con lipasa Lipozyme[®] RM IM, en presencia de un 10% (w/w) de carga de lipasa con respecto a los

reactantes, a 293.2 K en tert-pentanol como medio de reacción. En la Figura 3.3 se muestra el contenido en fracción molar de MAG y DAG en el transcurso del tiempo a las diferentes relaciones molares en estudio, estos porcentajes decrecen cuando las relaciones molares iniciales van incrementando. La máxima producción o concentración de MAG y de DAG a una relación molar inicial de 4:1 son de $20.57 \pm 0.3\text{mol\%}$ MAG a un tiempo de 360 minutos de reacción y $7.13 \pm 0.4\text{mol\%}$ DAG a los 240 minutos mientras que para una relación molar inicial de 76:1 se obtiene un máximo contenido de $16.43 \pm 0.5\text{mol\%}$ MAG a los 1440 min de reacción y de $4.85 \pm 0.2\text{mol\%}$ DAG a los 360 minutos. Las cinéticas se realizaron por triplicado.

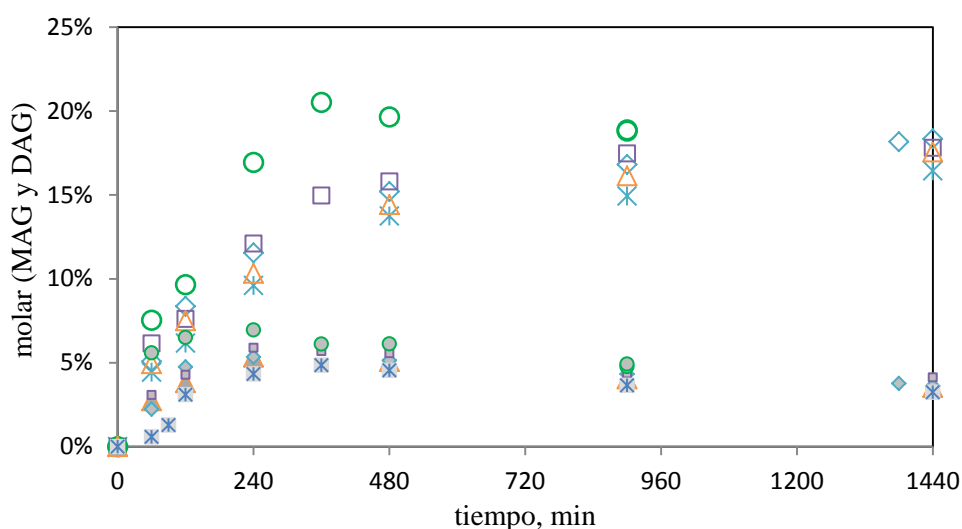


Figura 3. 3 Efecto de la relación molar de etanol:aceite en el contenido de MAG (símbolos huecos) y DAG (símbolo relleno) en el medio de reacción en el transcurso del tiempo (4:1 \circ, \bullet ; 8:1 \square, \blacksquare ; 19:1 \diamond, \blacklozenge ; 38:1 $\triangle, \blacktriangle$; 76:1 \ast, \blackast). Condiciones de reacción: 293 K, carga de la lipasa 10 wt% Lipozyme[®] RM IM, 30wt% tert-pentanol.

Composición de ácidos grasos de la fracción de MAG's

Se han analizado los perfiles de ácidos grasos de la fracción de MAG a un tiempo de 480 minutos de reacción para las relaciones molares 8:1 a 76:1 y para la relación molar 4:1 se analizó la fracción de máximo rendimiento de 2-MAG (ver Tabla 3.3). La mayor diferencia en el perfil de ácidos grasos, se encontró en el porcentaje molar de DHA. A relaciones molares iniciales de reacción de 4:1 se obtuvo un porcentaje molar de $39.33 \pm 0.64\%$ de

DHA, este porcentaje molar de DHA disminuye al aumentar la cantidad de etanol ya que a una relación molar inicial de 76:1 este porcentaje decreció hasta $32.10 \pm 0.43\%$ de DHA. Por lo tanto la obtención de porcentaje molar de PUFA's es mayor a una relación molar inicial de 4:1 siendo $54.9 \pm 0.57\%$, disminuyendo hasta $49.4 \pm 0.46\%$ para una relación molar de 76:1.

Tabla 3.3 Composición de Ácidos grasos (FA) del aceite de pescado en porcentaje molar y para las diferentes fracciones de MAG de las diferentes relaciones molares iniciales de etanol: aceite en tert-pentanol, a 293 K y 10% en peso de Lipozyme® RM IM.

FA/RM	Aceite	4:1 ^a	8:1 ^b	19:1 ^b	38:1 ^b	76:1 ^b
C14:0	4.8 ± 0.2	4.86 ± 0.02	5.27 ± 0.04	6.13 ± 0.03	5.94 ± 0.05	5.7 ± 0.2
C16:0	23.5 ± 0.2	17.95±0.12	19.50± 0.30	21.64±0.14	21.13±0.01	18.7 ± 0.3
C16:1	7.0 ± 0.1	6.25 ± 0.04	6.09 ± 0.01	6.32 ± 0.05	6.2 ± 0.1	7.0 ± 0.1
C18:0	6.1 ± 0.1	2.26 ± 0.09	1.87 ± 0.01	1.07 ± 0.08	2.47 ± 0.01	2.66 ± 0.01
C18:1n-9	18.7 ± 0.2	11.55±0.07	11.17± 0.06	12.83±0.03	14.9 ± 0.2	14.52±0.03
C18:1n-7	3.0 ± 0.2	1.66 ± 0.01	1.47 ± 0.01	0.82 ± 0.06	n.d	2.10 ± 0.01
C18:2n-6	2.4 ± 0.1	2.40 ± 0.01	2.32 ± 0.01	1.40 ± 0.1	2.80 ± 0.07	2.97 ± 0.01
C18:3n-3	0.7 ± 0.1	0.30 ± 0.08	0.29 ± 0.05	n.d.	1.56 ± 0.07	n.d
C18:4n-3	n.d	1.57 ± 0.03	1.52 ± 0.01	0.77 ± 0.06	1.56 ± 0.07	1.52 ± 0.01
C20:1n-9	1.9 ± 0.1	0.92 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.36 ± 0.03	n.d	n.d
C20:3n-3	2.0 ± 0.1	2.54 ± 0.01	2.55 ± 0.02	1.29 ± 0.09	1.63 ± 0.03	2.70 ± 0.01
C20:5n-3	6.5 ± 0.1	7.40 ± 0.05	7.08 ± 0.07	8.01 ± 0.04	6.80 ± 0.07	8.02 ± 0.01
C22:5n-3	1.6 ± 0.1	1.89 ± 0.01	1.92 ± 0.01	0.98 ± 0.07	1.97 ± 0.05	2.06 ± 0.01
C22:6n-3	21.8 ± 0.1	39.33±0.64	35.9 ± 0.4	35.35±0.20	34.6 ± 0.4	32.1 ± 0.4
SFA	34.4 ± 0.4	25.4 ± 0.3	27.6 ± 0.4	28.8 ± 0.3	29.5 ± 0.05	27.1 ± 0.5
MUFA	30.6 ± 0.6	19.7 ± 0.1	20.8 ± 0.2	20.3 ± 0.2	21.1 ± 0.3	23.6 ± 0.1
PUFA	35.0 ± 0.6	54.9 ± 0.6	51.6 ± 0.6	50.8 ± 0.6	49.4 ± 0.7	49.4 ± 0.5

n.d = no detectado; a=360min; b=480min.

La TLC de la Figura 3.4 muestra la regiespecificidad de las lipasas Lipozyme® RM IM y Lipozyme® 435 de los productos de la reacción de etanolisis de aceite de pescado en tert-pentanol a 293.2 K, a diferentes relaciones molares iniciales (RM) de 4:1 y 76:1. Para la enzima Lipozyme® 435 el punto de la reacción a la relación molar inicial 76:1 corresponde al máximo en la producción de MAG (240min, ver capítulo 2, Figura 2.4); mientras que la Lipozyme® RM IM se corresponde en los tiempos de reacción de 240 min, para las relaciones molares iniciales 4:1 y 76:1. En la Figura 3.4, se muestra el patrón de 2monooleína para validar la formación de 2-MAG's con las dos lipasas en los diferentes relación molares iniciales, se puede observar que Lipozyme® RM IM es (1,3) específico y su especificidad no es dependiente de la relación molar. Sin embargo, la especificidad de Lipozyme® 435 depende de la relación molar inicial, comportándose como específica 1,3, en un gran exceso de etanol y no específica para una relación molar de 4:1. Muñio y col. en 2008⁶, así como Irimescu y col. en 2002⁷ mencionan que un alto rendimiento 2-MAG, se obtiene usando lipasa Novozym® 435 con una relación molar RM=77:1 (etanol: aceite) y que la regiespecificidad de Lipozyme® 435 depende del tipo de la reacción y de la composición inicial, así como del medio de reacción.

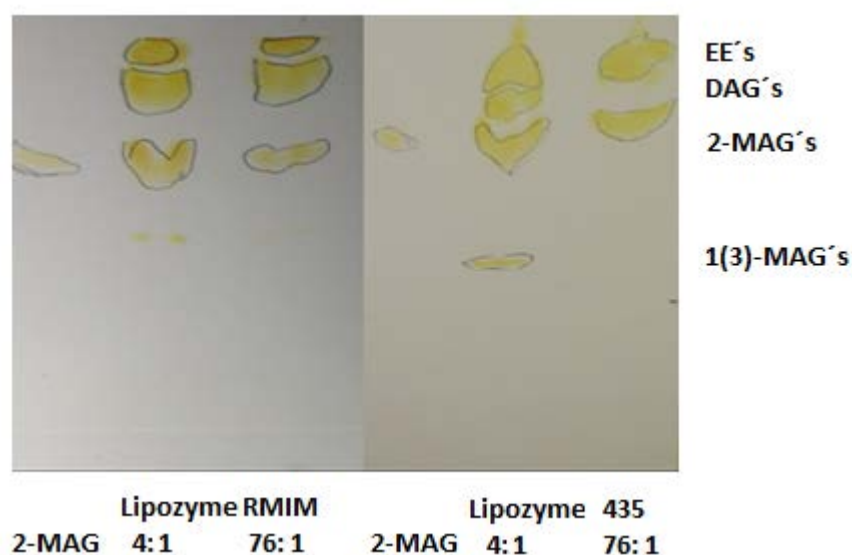


Figura 3. 4 TLC mostrando la especificidad de las lipasas Lipozyme® RM IM y Lipozyme® 435 en la etanolisis con aceite de pescado para diferentes relaciones molares iniciales RM= 4:1 y 76:1, en tert-pentanol a 293.2 K, con 10% en peso de lipasa, a los 240 min de reacción.

3.1.2 Efecto de la temperatura de reacción

Se han llevado a cabo dos cinéticas de etanolisis de aceite de pescado variando la temperatura 293.2 y 303.2 K. La relación molar inicial se fijó en un punto de partida 4:1 con una carga de 10% en peso de Lipozyme® RM IM, tert-pentanol como medio de reacción a 30% en peso. La Figura 3.5 muestra la composición de DAG, MAG y EE formados durante la etanolisis a las dos temperaturas estudiadas, donde se observa que la conversión de equilibrio es independiente de la temperatura de reacción. La velocidad de reacción es ligeramente superior a 303.2 K que a 293 K.

Con la Lipasa Lipozyme® RMIM a una temperatura de 293.2 K se alcanza a un tiempo de 360 min de reacción, una concentración máxima de 21.69% mol de MAG y una composición máxima de 6.63 %moles de DAG en un tiempo 90 minutos de reacción.

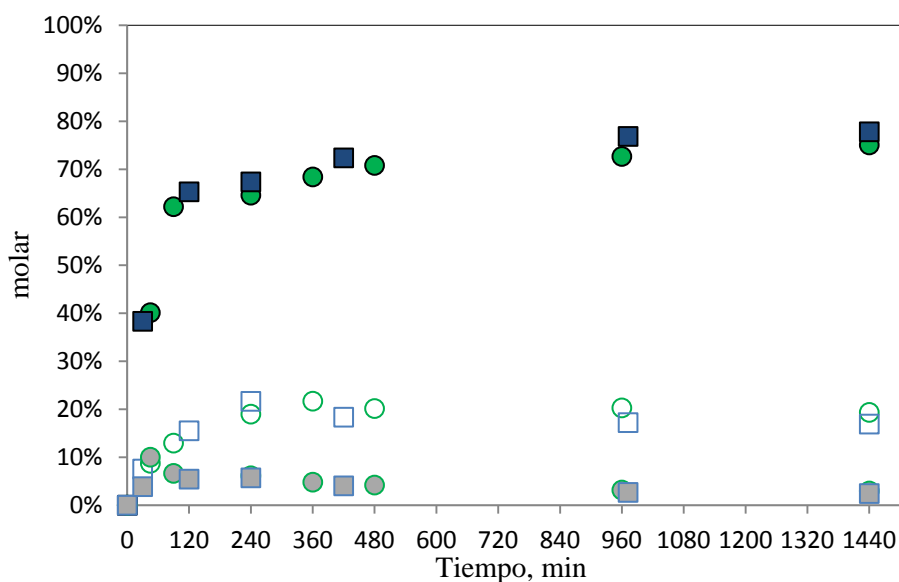


Figura 3. 5. Efecto de la temperatura en la composición de EE (símbolos rellenos), MAG's (símbolos huecos) y DAG's (símbolos rellenos de gris), contenidos en el medio de reacción en el transcurso del tiempo: 293.15 K ●, ○, ●; 303.15 K ■, □, ■. Condiciones de reacción: RM = 4:1, carga del catalizador 10 % en peso de Lipozyme® RMIM

3.1.3 Etanolisis en otros medios de reacción

La reacción de etanolisis también se ha llevado a cabo en otros medios de reacción, en concreto hexano y en medio libre de disolvente. En el Capítulo 1, se estudiaron los

sistemas de etanolisis en tert-pentanol y en hexano a las temperaturas de 303.2 y 323.2 K , donde se estudió que con una concentración del 30% en peso de tert-pentanol o hexano en la mezcla de los reactivos de etanolisis se obtiene una sola fase,⁸ sin embargo, la actividad de las lipasas inmovilizadas puede verse afectada por la polaridad del disolvente. Lipozyme® RM IM no es un catalizador eficaz para una reacción etanolisis en medio de reacción libre de disolventes, como comenta Manuel Criado y Cristina Otero en 2010⁹, pero como se muestra en la Figura 3.6, en medio de reacción con tert-pentanol o hexano es un catalizador eficaz para producir esteres etílicos (EE's) y 2-MAG. En la Figura 3.6 se observa la influencia del medio de reacción de etanolisis de aceite de pescado en la composición molar de los productos. En el sistema de reacción con tert-pentanol a las condiciones de reacción se obtienen porcentajes molares de 69.18 ±0.03% mol de EE's, 18.84±0.01% mol de MAG y 6.12±0.01% mol de DAG; aunque en el sistema con hexano muestra una buena conversión solo se obtienen 14.87 ± 0.009 % mol de MAG al mismo tiempo de reacción. Esto concuerda con lo mencionado por Soumanou y Bornscheuer en 2003¹⁰, donde valoraron el rendimiento al transesterificar aceite de girasol con *R. miehei*, utilizando diversos tipos de disolventes, encontraron un efecto en la velocidad de alcoholisis al variar el tipo de disolvente orgánico.

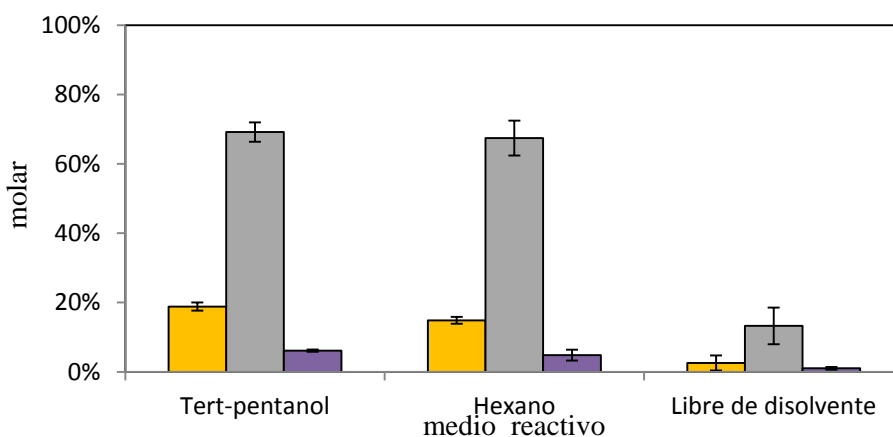


Figura 3. 6 Efecto del disolvente orgánico en la reacción de etanolisis de aceite de pescado y en medio de reacción libre de disolventes. Condiciones de reacción RM=4:1 a 323.2 K, con 10% en peso de Lipozyme RM IM a 240 minutos de reacción. MAG (rectángulo=■), EE (rectángulo=■), DAG (rectángulo=■).

3.2 Fraccionamiento de los productos de reacción con CO₂ supercrítico.

En el presente trabajo se estudió la separación de los productos de la reacción de etanolisis de aceite de pescado empleando dióxido de carbono supercrítico. Las condiciones experimentales y resultados obtenidos para las experiencias de fraccionamiento se presentan en la Tabla 3.4. Se han llevado a cabo fraccionamientos a tres temperaturas entre 313.2 y 343.2 K en un intervalo de presión entre 10.5 y 18.5 MPa. La relación de disolvente (kg CO₂/ kg de mezcla) que fue empleada en las experiencias es de 8.88 ± 0.45 .

La Tabla 3.4 muestra la composición del extracto en porcentaje en masa de lípidos neutros para todas las experiencias realizadas y la fracción de extracción en masa de EE's extraída por el disolvente, a las condiciones en estudio. La fracción de extracción es mayor cuando aumenta la presión debido a la solubilidad de los EE's, pero este no es un indicativo de la pureza del extracto.

Se puede observar que la composición de EE's en el extracto es mayor a menor presión y que al aumentar a 18.5 MPa esta decrece debido al aumento de la solubilidad de los MAG, DAG y TAG en CO₂ a estas condiciones, esto concuerda con los resultados obtenidos por Nilsson y col. en 1991⁵, que estudiaron la solubilidad para el ácido oleico y oleato de metilo, así como mono-, di-, y triglicéridos (MO, DO, y TO) en CO₂ fluido supercrítico (50 y 60 °C) y que reportan que a 50 °C y 172 bar estos compuestos son solubles en CO₂. Soto y col. en 2014¹¹ estudiaron el proceso de separación de FAME y MAG-DAG por el CO₂ líquido y supercrítico, mencionando que a condiciones más suaves con CO₂ en estado líquido o supercrítico de fraccionamiento sería posible separar los FAME (98% en peso de pureza) de mezcla MAG / DAG operando en 298 K / 64 bar, y 298 K / 75 bar. Demostrando ser una técnica de procesamiento útil para cambiar la composición lipídica con el fin de obtener productos de alto valor funcional.

Tabla 3. 4 Composición del extracto obtenido mediante fraccionamiento con CO₂-SC y la fracción de extracción.

Experiencias	T K	Presión MPa	Productos del extracto				RE _{EE}
			%EE	%MAG	%DAG	%TAG	
R1	313.2	10.50	98.47 ± 0.02	1.53 ± 0.02	0.000	0.00	0.169
R2		13.50	96.56 ± 0.05	3.44 ± 0.05	0.000	0.00	0.592
R3		15.50	95 ± 1	5 ± 0.1	0.000	0.00	0.653
R4		18.50	87 ± 3	7 ± 2	0.60 ± 0.05	5.4 ± 0.5	0.681
R5	328.2	10.50	98.87 ± 0.06	1.13 ± 0.06	0.000	0.00	0.129
R6		13.50	97.1 ± 0.6	2.9 ± 0.6	0.000	0.00	0.361
R7		15.50	96.11 ± 0.09	3.89 ± 0.09	0.000	0.00	0.509
R8	343.2	10.50	98 ± 1	2.0 ± 0.7	0.000	0.00	0.135
R9		13.50	97.2 ± 0.5	2.8 ± 0.5	0.000	0.00	0.293
R10		15.50	97.88 ± 0.04	2.12 ± 0.04	0.000	0.00	0.415

La Figura 3.7 muestra los factores de enriquecimiento de los EE y los factores de concentración de los MAG en el refinado de las 10 experiencias realizadas, podemos observar que estos factores se incrementan cuando aumentamos la presión y disminuyen al aumentar la temperatura de fraccionamiento. Por lo tanto la separación por fraccionamiento con CO₂ de los éteres así como el concentración del refinado en MAG a temperaturas moderadas y presiones bajas es un buen método de separación de los productos etanolisis, como mencionan Soto y col. (2014)¹¹ que el CO₂ como fluido supercrítico y el uso de CO₂ líquido son buenos medios para la separación por fraccionamiento de los esteres de etilo o ácidos grasos etílicos a partir de los productos de reacción logrando concentrar los 2-MAG sintetizados de la alcoholisis enzimática a temperaturas moderadas.

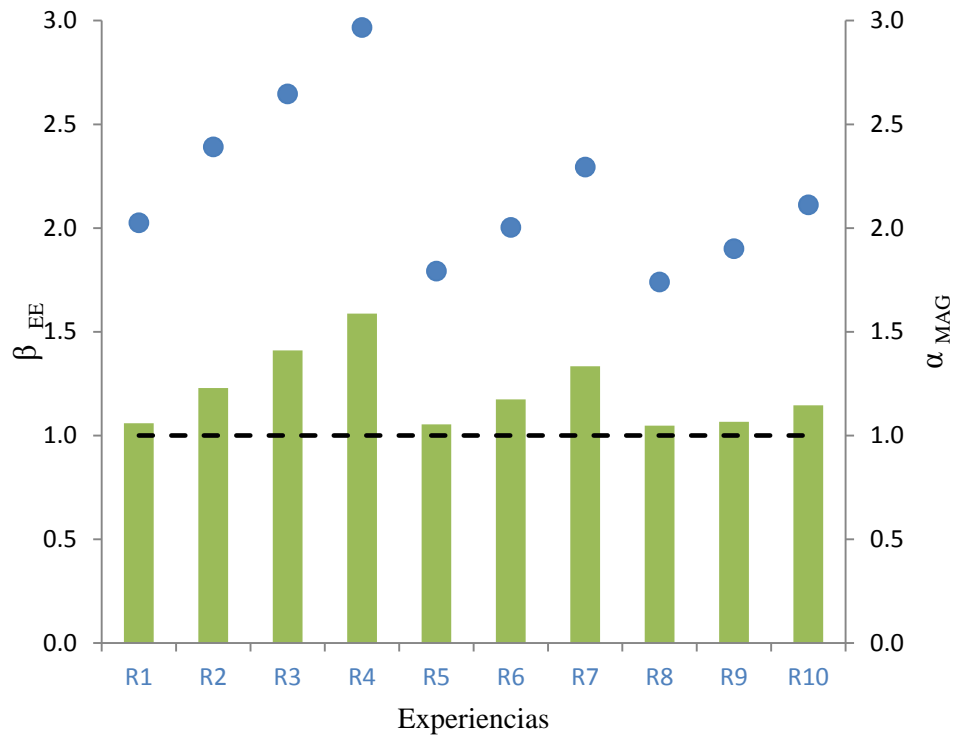


Figura 3. 7 Muestra el factor de enriquecimiento de los EE's (β_{EE}) en la fase ligera (símbolo, ●) y el factor de concentración de MAG (α_{MAG}) en el refinado (símbolo, ■), a las diferentes condiciones en estudio.

Durante las experiencias realizadas de fraccionamiento la fase ligera fue recogida durante los 30 minutos de separación, obteniendo las dos fases que se esterifican para analizar los ácidos grasos. (Ver Tabla 3.5)

La Tabla 3.5 muestra la composición de ácidos grasos en la mezcla de alimentación al fraccionamiento y la respuesta del efecto del fraccionamiento en los componentes del perfil de ácidos del extracto y el refinado expresado como factor de separación de ácidos grasos (β_{AG}). Estos resultados muestran cómo se enriquece el extracto en ácidos grasos de cadena corta como el ácido mirístico (C14:0) y el ácido palmítico (C16:0).

Tabla 3. 5 Perfil de ácidos grasos de la mezcla de partida y el factor de separación ácidos grasos (β_{AG})

FA	Mezcla original	$\beta_{AG} = \left[\frac{F_{AGi} \text{ extracto}}{F_{AGi} \text{ refinado}} \right]$									
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
C14:0	3.4	1.9	1.6	1.6	1.5	1.6	1.9	1.9	1.0	1.9	2.1
C16:0	19.1	1.4	1.4	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6
C16:1	6.3	1.4	1.3	1.3	1.3	1.2	1.5	1.4	1.0	1.6	1.4
C18:0	5.5	1.2	1.2	1.3	1.3	1.1	1.2	1.3	1.0	1.1	1.2
C18:1n-9	17.5	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1
C18:4n-3	2.3	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0
C20:1n-9	2.0	0.9	1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9
C20:3n-3	1.9	0.9	1.0	1.0	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.9
C20:5n-3	6.7	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0
C22:5n-3	1.7	0.6	0.7	0.8	0.7	1.0	0.6	0.6	1.0	0.4	0.5
C22:6n-3	24.3	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
SFA	29.6	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.5	1.4	1.5	1.5	1.5
MUFA	31.7	1.1	1.1	1.6	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
PUFA	38.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6

Al aumentar la temperatura a una presión de 10.5 MPa la selectividad de los ácidos de cadena corta disminuye, esto se observa al comparar los factores de separación de los compuestos ácido mirístico (C14:0) y del ácido palmitoleico (C16:1) de las experiencias R1, R5 y R8, sin embargo, al comparar las experiencias R3, R6 y R9 que se realizaron a 13.5MPa al incrementar la temperatura respectivamente el factor de separación se incrementa para los ácidos (C14:0, C16:0 y C16:1). Se observa que la selectividad del CO₂ por el C14:0 se pierde al aumentar la presión de 10.5 a 18.5 MPa a una temperatura de 303.2 K ya que pasa de 1.9 a 1.5 respectivamente, pero a una temperatura de 328 K y 343 K al incrementar la presión del fraccionamiento de 10.5 a 15.5 MPa la selectividad de estos ácidos se favorece. Para todas las condiciones de operación estudiadas, los valores de β_{AG} obtenidos para el ácido oleico (C18:1n-9) y del ácido estearidónico (C18:4n-3) son prácticamente los mismos se encuentran entre 1.1 y 1, para los ácidos eicosatrienoico, eicosapentaenoico (EPA) los valores son muy similares pero ya son

menores o iguales a 1 en algunas experiencias lo que indica la dificultad de fraccionar estos compuestos, para el ácido docosapentaenoico (DPA) la dificultad de fraccionar es mayor ya que el factor β_{AG} es menor de hasta 0.6. DHA mantiene un factor de separación entre 0.4 y 0.5 a las diferentes condiciones de fraccionamiento estudiadas, por ende los PUFA's mantienen un factor de separación entre 0.6 y 0.7. Esto concuerda con lo reportado por Antunes Corrêa y col. (2008)¹² que estudiaron la posibilidad de utilizar CO₂ supercrítico (SC-CO₂) para concentrar los ácidos grasos poliinsaturados.

4 CONCLUSIONES

Se ha estudiado, la etanolisis de aceite de pescado a presión atmosférica catalizada con la lipasa inmovilizada comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® RM IM) para la obtención de monoglicéridos (MAG) y ésteres etílicos. Se ha observado que el medio de reacción afecta a la cinética de etanolisis, obteniendo velocidades de reacción muy lentas en medio libre de disolvente.

Comparando las cinéticas de etanolisis de aceite de pescado con las lipasas inmovilizadas Lipozyme® RM IM y Lipozyme® 435 en tert-pentanol como medio de reacción se encontraron las siguientes diferencias: 1) la lipasa Lipozyme® RM IM, produce diacilglicerol (entre un 5 a 7% mol), este no desaparece con el tiempo tan rápido como con la otra lipasa; 2) Novozym® 435 es específica solamente a una relación molar 76:1, mientras que con Lipozyme® RM IM es específico sin afectar las relaciones molares iniciales (4:1 a 76:1); 3) lipasa Lipozyme® RM IM, no es un catalizador eficaz para etanolisis de aceite de pescado en un medio libre de disolvente, pero en tert-pentanol o hexano es un catalizador eficiente, sin embargo, Novozym® 435 a la condición libre de disolvente a las mismas condiciones de reacción en 180 minutos de reacción alcanza un máximo de 26.6% mol MAG. 4) Las velocidades de reacción son más lentos con lipasa Lipozyme® RM IM en comparación con Lipozyme® 435.

En el fraccionamiento de los productos de reacción mediante CO₂ presurizado se ha logrado separar los EE's en el extracto logrando una pureza mayor al 98% (313.2 K y 10.5MPa); las condiciones a las cuales se obtiene el mayor concentrando de 2-MAG en la celda son 313.2 K a 18.5 MPa, incrementando la concentración de PUFA's en un 15% en el refinado.

5 REFERENCIAS

1. S.L. Bucio, A.G. Solaesa, R.Melgosa, M.T.Sanz, S. B. Kinetic Study for the Ethanolsis of Fish Oil Catalyzed by Lipozyme® 435 in Different ReactionMedia. *J. Oleo Sci.* **64**, (2015).
2. Fajardo, A. R. Purificación de Omega-3 mediante reacciones enzimaticas. 118–120 (2005).
3. Henderson RJ, T. Thin-layer chromatography. In. *Lipids analysis: a practical approach*. Oxford: IRL Press 65–111 (1992).
4. Murga, R., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Cabezas, J. L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* **23**, 113–121 (2002).
5. Nilsson, W. B., Gauglitz, E. J. & Hudson, J. K. Solubilities of Methyl Oleate , Oleic Acid , Oleyl Glycerols , and Oleyl Glycerol Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 87–91 (1991).
6. Muñío, M. D. M. *et al.* Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolsis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases. *Process Biochemistry* **43**, 1033–1039 (2008).
7. Irimescu, Iwasaki, Y. & Hou, C. T. Study of TAG ethanolsis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 879–883 (2002).
8. Bucio, S. L., Solaesa, Á. G., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Melgosa, R. Liquid–Liquid Equilibrium for Ethanolsis Systems of Fish Oil. *J. Chem. Eng. Data* **58**, 3118–3124 (2013).
9. Criado, M. & Otero, C. Optimization of the synthesis of lower glycerides rich in unsaturated fatty acid residues obtained via enzymatic ethanolsis of sesame oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 246–258 (2010).
10. Soumanou, M. M. & Bornscheuer, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 97–103 (2003).
11. Soto, G., Hegel, P. & Pereda, S. Supercritical production and fractionation of fatty acid esters and acylglycerols. *J. of Supercritical Fluids* **93**, 74–81 (2014).
12. Corrêa, A. P. A., Peixoto, C. A., Gonçalves, L. A. G. & Cabral, F. A. Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide. *J. of Food Engineering* **88**, 381–387 (2008).

Capítulo 4

Chapter 4

Study of the influence of process parameters on liquid and supercritical CO₂ extraction of oil from rendered materials: fish meal and oil characterization.

ABSTRACT

Liquid and supercritical CO₂ has been used to extract the remaining fat content from rendered fish meal. It has been investigated the effect of pressure (10.0 – 40.0 MPa) and temperature (298.2 – 352.2 K) on the extraction kinetics and on the oil obtained as well as on the rendered fish meal. Extraction curves are initially linear with a slope close to the oil solubility value in pressurized CO₂. Based on previous fish oil solubility data reported in the literature, a general equation has been proposed to correlate fish oil solubility data as a function of temperature and density of CO₂. Characterization of extracted oil was performed by determining the fatty acid composition and some physical parameters such as color.

RESUMEN

El CO₂ líquido y supercrítico se ha utilizado para extraer el contenido de grasa restante de la harina de pescado comercial. Se ha investigado el efecto de la presión (10.0 – 40.0MPa) y la temperatura (298.2 – 352.2 K) sobre la cinética de extracción así como las características del aceite obtenido y en la harina procesada. Las curvas de extracción son inicialmente lineales con una pendiente cercana al valor de la solubilidad en aceite en CO₂ presurizado. Basado en datos de solubilidad de aceites de pescado encontrados en la literatura, una ecuación general se ha propuesto para correlacionar los datos de solubilidad del aceite de pescado como una función de la temperatura y la densidad de CO₂. Caracterización de aceite extraído se realizó mediante la determinación de la composición de ácidos grasos y algunos parámetros físicos tales como el color.

Índex

1	INTRODUCTION	157
2	MATERIALS AND METHODS	158
2.1	Raw material.....	158
2.2	Supercritical fluid extraction equipment and procedure	159
2.3	Analytical methods	159
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	161
3.1	Influence of process pressure and temperature on the extraction yield.....	161
3.2	Modelling of the supercritical fluid extraction	165
3.3	Characterization of the extracts and fish meal.....	169
3.3.1	Fatty acid composition of the extracts	170
3.3.2	Color.....	172
3.3.3	Trace toxic elements	173
4	CONCLUSIONS.....	173
5	REFERENCIAS	174

1 INTRODUCTION

Fish meal is one of the primary products resulting from the rendering process of fish discards, being Peru and Chili the two major producers.¹ The other main product is the oil fraction. Fish meal is the clean, dried, ground tissue of undecomposed whole fish or fish cutting, with or without the extraction of part of the oil.²

Total protein in fishmeal can be higher than 70 % with good digestibility of its amino acids which makes it an excellent source of nutritive protein. It is used to supplement other proteins in diets for farmed animals. Due to its high nutritional quality, fish meal could be used to obtain fish protein concentrates (FPC) for human consumption. The specification for some types of FPC demands very low fat content, to eliminate fishy taste and odour and rancid during storage since most of the flavour is in the oil fraction.³ Additionally, low-fat protein hydrolysate from fish is a promising product for the future.

The method of solvent extraction has been frequently employed when producing fish protein concentration with a fat content less than 1 % (FPC, type A). The solvent most commonly used is isopropanol, although other solvents such as ethanol⁴ and isohexane⁵ have been also successfully used. In the solvent production method temperature reached values up to 75 °C.⁶ However, removal of the oil by solvent extraction is expensive and traces of solvent in the final product made solvent extracted FPC commercially unsuccessful.⁴

In this work, high pressure CO₂ has been employed to reduce the fat content of rendered fish meal. Liquid and supercritical CO₂ can selectively extract the fat without affecting the protein.⁷ CO₂ is a gas under ambient conditions that allows an easy separation of the processed products and no residual solvent in the feed matrix. It is considered a "green solvent", being non-toxic, non-flammable and relative non-expensive.

On the other hand, the quality of the oil extracted by liquid or supercritical CO₂ can be of better quality than the oil extracted by solvent extraction. Although solvent extraction of rendered material with organic solvents reached a high yield extraction (> 99%) the quality of the oil extracted is quite low.⁸

The oil obtained after conventional solvent extraction is frequently dark and polymerized and it is not suitable for refining for human consumption.⁹

SFE has been also investigated in the literature as a promising technique to reduce some types of pollutants in fish oil during extraction, such as dioxins and dioxins-like PCBs (polychlorinated biphenyls) and toxic elements such as lead, cadmium, arsenic and mercury.¹⁰ The aim of this work is the study of the influence of some extraction parameters such as pressure (10.0 – 40.0 MPa) and temperature (298.2 – 352.2 K) on the extraction of the residual oil from rendered fishmeal from the last step of the rendering process. A general equation correlating previous fish oil solubility data similar to the one obtained by Del Valle et al (2012)¹¹, for vegetable oils in high-pressure CO₂ has been also obtained.¹¹ This way, the slope of the first part of the extraction curve is compared with the expected oil solubility data at the operating conditions. The Sovova's mathematical model was used to describe the extraction kinetics.¹² Characterization of fish meal extracts obtained by pressurized-CO₂ has been performed in terms of their fatty acid profile and other parameters such as color. The remained fish meal has been characterized by determining the total protein content and toxic elements.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Raw material

The raw material used in this work was fish meal kindly donated by SARVAL Bio-Industries Noroeste, S.A.U. The composition of the fish meal was 7.2 ± 0.2 % fat content determined by Soxhlet extraction with n-hexane.¹³ The moisture content, 5.2 ± 0.3 %, was determined by drying in an oven at 378 K for 16 h up to constant weight. Crude protein content was determined with the Kjeldahl method and multiplying the nitrogen content by 6.25¹⁴, being 65.4 ± 0.7 %. Total ash content, 22.2 ± 0.3 %, was determined according to AOCS (ignition at 873 K for 2 h).¹⁵ The particle size distribution of fish meal was determined by using a vibratory sieve shaker (CISA, model RP.09) founding that nearly 85 % of the fish meal particles have a particle size between 0.15 and 0.5 mm: $p > 2$ mm, 3.0 ± 0.3 ; $p > 1$ mm, 7.7 ± 0.3 ; $p > 0.5$ mm, 26.9 ± 2.5 ; $p > 0.25$ mm, 38.0 ± 1.4 ; $p > 0.15$ mm, 19.7 ± 3.1 ; $p < 0.15$ mm, 4.7 ± 1.1 . Fish meal was used for pressurized CO₂ extraction without sieving.

2.2 Supercritical fluid extraction equipment and procedure

The extraction experiments were carried out in a semi-batch laboratory SFE-plant whose P&I diagram has been previously described.¹⁶ In a SFE experiment, around 14 grams of fish meal were loaded in the extractor (40 ml capacity). Two syringe pumps (ISCO 260 DM), that work alternatively, provide an uninterrupted flow of CO₂ (Carbueros metálicos, liquid CO₂ ≥ 99.9 %) compressed up to the desired operating pressure. The pressurized solvent was pre-heated up to the desired extraction temperature before entering the extractor. The extractor was held in an oven whose temperature is controlled within an accuracy of ± 0.5 K. The carbon dioxide flow was set to 9.5 ± 0.5 g/min. Depressurized CO₂ was quantified with a totalizer flow meter. Extraction yield was determined gravimetrically by measuring the extract weight at different time intervals.

A total of ten experiments were carried out under different extraction conditions (Table 4.1). Runs 1 to 7 were performed to evaluate the influence of extraction pressure and temperature on the extraction yield under supercritical conditions. Runs 8 to 10 were carried out with liquid CO₂ at 298.2 K and different operating pressures.

Table 4. 1 Experimental conditions in the extraction with LCO₂ and SCCO₂ of fish meal

Run	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
p, MPa	20.0	30.0	39.5	30.0	30.0	30.0	30.0	10.0	20.0	30.0
T, K	313.2	313.2	313.2	323.2	333.2	343.2	353.2	298.2	298.2	298.2

2.3 Analytical methods

Determination and quantification of fatty acids profile

The fatty acids profile was determined by the AOAC method.¹⁷The fatty acid methyl esters were firstly prepared and then analyzed by gas chromatography (GC) in a Hewlett Packard gas chromatograph (6890N Network GC System) equipped with an auto-sampler (7683B series) and a flame ionization detector (FID). The separation was carried out with helium (1.8 mL/min) as carrier gas. A fused silica capillary column (OmegawaxTM-320, 30m×0.32mm i.d.) was used. The column temperature was programmed starting at a

constant temperature of 180 °C during 20 min, heated to 200 °C at 1 °C/min, held at 200 °C during 1 min, heated again to 220 °C at 5 °C/min and finally held at 220 °C for 20 min. A split injector (50:1) at 250 °C was used. The FID was also heated to 250 °C. Most of the fatty acid methyl esters were identified by comparison of their retention times with those of chromatographic standards (Sigma Chemical Co.). Their quantification was made by relating the peaks area to the area of an internal standard (methyl tricosanoate) as indicated by the AOAC method¹⁷. Calibration curves were made for several pairs formed by the internal standard + several representative chromatographic standards in order to find the corresponding response factors.

Color determination

Color (CIELab parameters) was evaluated for some of the oils extracted. CIELab parameters were calculated automatically by a suitable programme installed in a Konica Minolta CM-2600d/2500d spectrophotometer using the illuminant D65 (daylight source) and a 10° standard observer (perception of a human observer) following the CIE recommendations. L, a, b values describe lightness, redness-greenness, and yellowness-blueness changes in color were expressed as:¹⁸

$$\Delta E = \sqrt{(L_{reference} - L)^2 + (a_{reference} - a)^2 + (b_{reference} - a)^2}$$

Toxic trace element determination

Toxic trace elements, chromium, arsenic, cadmium, mercury and lead were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS-Agilent 7500cx) with collision cell for all routine applications. All samples were digested using a system of closed vessel microwave oven, along with internal standards. The digested samples were cooled and dilute with deionized water for powders were 250 and 50 for liquids. Concentrations of the toxic elements were determined using standard solutions prepared in the same acid matrix from to Pb, Cd, Cr, Cu, As (0-40 ppb) and Hg (0-20 ppb).¹⁹

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Influence of process pressure and temperature on the extraction yield

The effect of extraction pressure on the extraction yield was evaluated under supercritical conditions from 20.0 MPa to 39.5 MPa at a constant temperature of 313.2 K (runs 1-3). Runs 8 to 10 have been carried out with LCO₂ at 298.2 K and pressure has been varied from 10.0 to 30.0 MPa. The results are shown in Figures 4.1a and 4.1b respectively. All the extraction curves consist of one straight section forming the equilibrium part, followed by a curved line whose shape is controlled by internal diffusion. It can be also observed that most of the extraction, at each operating conditions, is performed in the first part of the extraction. The extraction curves indicate that, at a constant temperature, the higher the pressure the higher the extraction rate, what may be attributed to the higher density of CO₂ which leads to higher solvent power. An increase of oil solubility when extraction pressure is increased has been also reported for similar extractions of fat from other rendered materials such as poultry meal.⁸ As it will be explained in section 3.2 the first part of the extraction is controlled by this thermodynamic parameter and it can be fitted to a straight line. From Figures 4.1a and 4.1b it can be also observed that extraction yields show a significant dependence with extraction pressure (ranging from 64 to 91 % at 20.0 and 39.5 MPa respectively under SC conditions and from 63 to 83 % at 10.0 and 30.0 MPa with LCO₂), due probably to the lower solvation power of the CO₂. However in the extraction of fat from poultry meal, Orellana et al.⁸ observed no significant dependence on extraction yield with pressure and temperature (6.9 – 34.5 MPa).

The temperature has been changed in the range 313.2 to 353.2 K at constant operating pressure, 30 MPa. The results are shown in Figure 4.2. Under constant operating pressure, an increase in temperature leads to a decrease in CO₂ density while the solute volatility increases. For many supercritical fluids extractions a retrograde solubility phenomenon below a "cross-over point" has been described. That means that below the "cross-over" point the lower density of CO₂ at higher operating temperature is not compensated by an increase in the solute volatility.

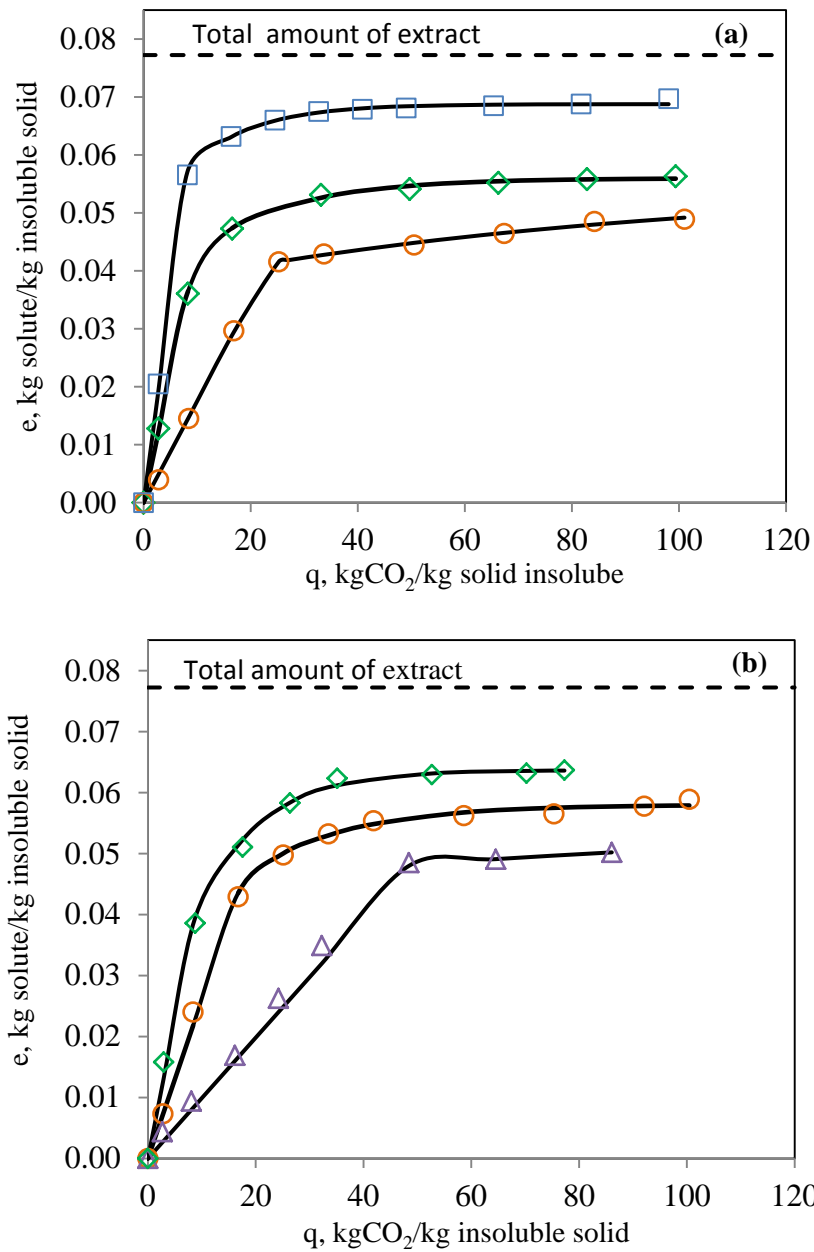


Figure 4. 1. Influence of extraction pressure on fish oil yield from fish meal (a) SC conditions at 313.2 K (○ 20.0 MPa; ◇ 30 MPa; □ 39.5 MPa) (b) LCO₂ at 298.2 K (△ 10.0 MPa; ○ 20.0 MPa; ◇ 30 MPa); The solid lines correspond to the model of Sovová.^{12,20}

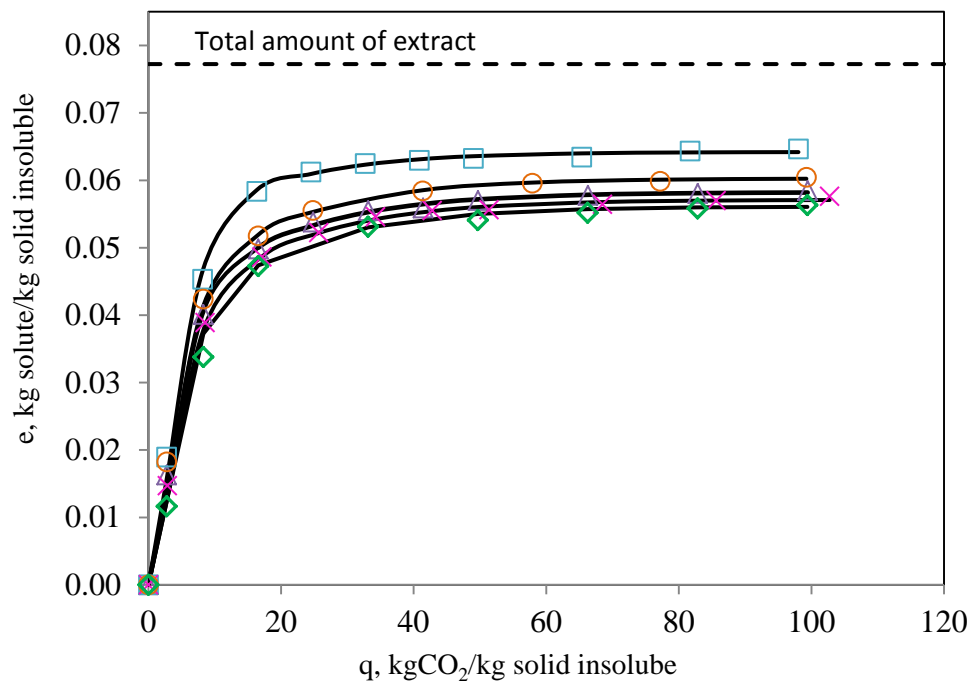


Figure 4. 2. Influence of extraction temperature on fish oil yield from fish meal at constant extraction pressure of 30 MPa (□ 353.2 K; ○ 343.2 K; △ 333.2 K; × 323.2 K; ◇ 313.2 K). The solid lines correspond to the model of Sovová¹²

From Figure 4.3 it can be observed that the slope of the initial part of the extraction curves at the four temperatures studied, corresponding to the fish oil solubility is close to each other. That means that the decrease of solvating power of CO₂ due to lower density by increasing operating temperature is of the same order as the increases in the vapour pressure of the solute with temperature. In the literature it has been reported a “cross over” pressure of approximately 35.0 MPa for the solubility of oils and fats.²¹

Orellana expected (based on extraction curves) a “cross-over” around 40.0 MPa for the fat extracted for poultry meal. This value is also of the same order as the crossover pressure usually observed in vegetable oils.²² This fact can be also observed in Figures 4.3a and Figure 4.3b where extraction curves under SC-CO₂ and L-CO₂ are compared at operating pressures of 20.0 and 30.0 MPa respectively. Figure 4.3a shows that L-CO₂ can be advantageous when working at low operating pressure, since high solubility of fish oil is obtained at low a temperature, due to the mentioned retrograde solubility phenomenon,

which is beneficial for capital and operating costs.⁸ This fact could be also interesting, since in the literature it has been reported that fish protein concentrates produced at low temperatures (293.2 K) has higher emulsifying properties than at high temperatures (323.2K).⁴ At higher operating pressure (Figure 4.3b) the slope of the first part of the extraction curves becomes closer.

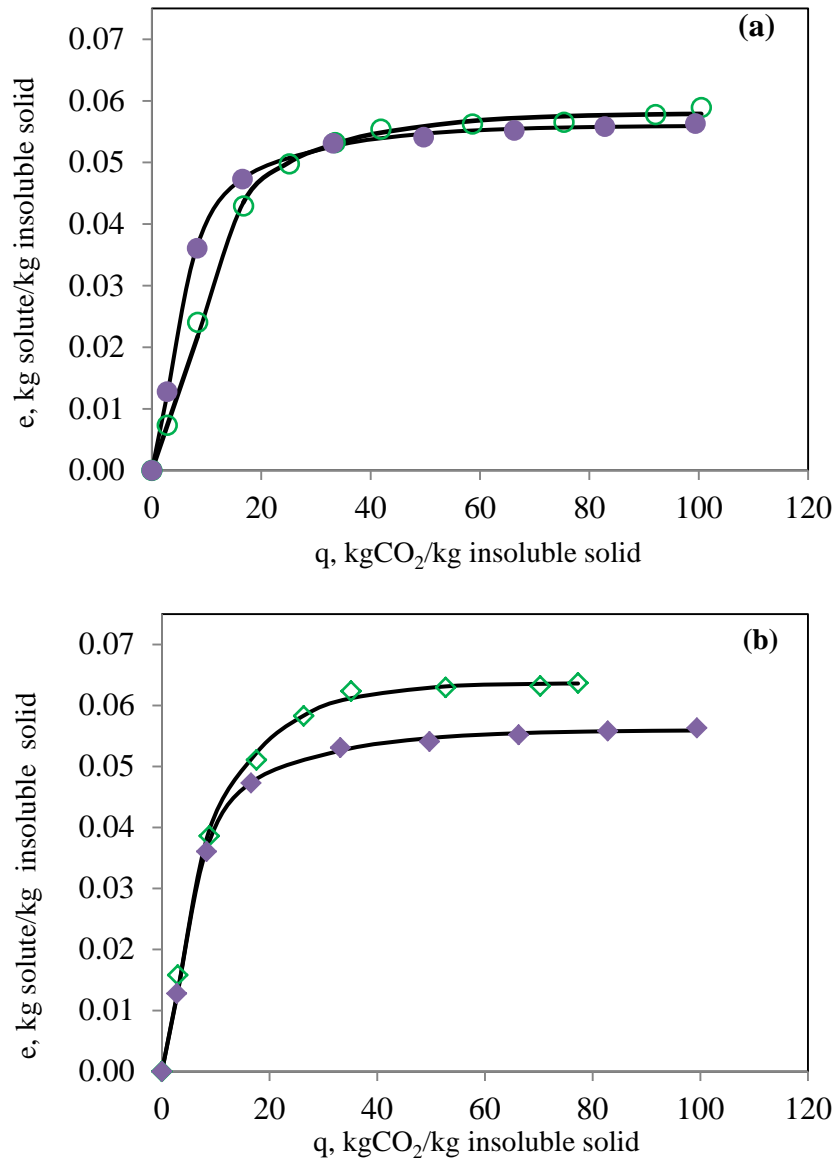


Figure 4. 3. Influence of pressurized CO₂ state on fish oil extraction yield from fish meal at 20.0 MPa (○ 313.2 K, ● 298.2 K) and 30.0 MPa (◇ 313.2 K, ◆ 298.2 K). The solid lines correspond to the model of Sovová^{12,20}

3.2 Modelling of the supercritical fluid extraction

In this work, the model proposed by Sovová²⁰ was used to describe the experimental extraction curves. This type of model assumes that the solute is regarded as a single pseudo compound which can lead to some errors since several components are generally involved in the extraction of the fish oil. In the model of Sovová the extraction yield is expressed as:

$$e = \frac{E}{N_m} \quad [4.1]$$

where E is the amount of extract (kg) and N_m the charge of insoluble solid (kg) in the extractor. The dimensionless amount of solvent consumed is obtained by:

$$q = \frac{Q t}{N_m} \quad [4.2]$$

where Q is the solvent flow rate (kg/h) and t the extraction time (h). Based on this model, the extraction curves consist of two parts, a straight section followed by a curved line.

During the first one, the easily accessible solute from broken cells is transferred directly to the fluid phase, while in the second one the solute from intact cells diffuses first to broken cells and then to the fluid phase.

Orellana et al.⁸ established that in the fat extraction of poultry meal the first part of the extraction is governed by the solubility equilibrium, being the slope of the extraction curve. For vegetable oil extraction, Sovová²⁰ found that extraction curves are initially linear with a slope close to the value of oil solubility in CO₂. In this work, the initial slope from the extraction curves was evaluated and compared with data of fish oil solubility in carbon dioxide. All the solubility data of fish oil in high pressure CO₂ found in the literature (Table 4.2) has been correlated with two equations: Chrastil equation²³ and a General Model proposed by del Valle et al.¹¹ to predict the solubility of vegetable oils in high-pressure CO₂. The Chrastil equation²³ is a log-log relationship between c_{sat} and the density of the pure SCF, rewritten by del Valle et al.¹¹ to express the solubility in weight-by-weight (g kg⁻¹ oil/SCF):

$$\log c_{sat} = \log c_{sat}^o + (k-1) \log \left(\frac{\rho}{\rho^o} \right) - \frac{\Delta H}{2.303R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^o} \right) \quad [4.3]$$

where c_{sat}^0 is the solubility of the oil at reference conditions of absolute temperature T_0 and SCF density (ρ_0); k provides the amount of solvent molecules to form the so-called solvat-complex; ΔH is the total heat required to synthesize the solvato complex and R the universal gas constant.

Recently, del Valle et al. (2012)¹¹, proposed a General Model to correlate vegetable solubility data obtained by introducing two empirical modifications to improve the fitting capabilities of Chrastil equation (eq. 1):

$$\log c_{sat} = \log c_{sat}^0 + \left[(k^0 - 1) + \alpha \left(\frac{\rho - \rho^0}{\rho^0} \right) + \beta \left(\frac{\rho - \rho^0}{\rho^0} \right)^2 \right] \log \left(\frac{\rho}{\rho^0} \right) - \frac{\Delta H^0}{2.303R} \left[1 + \gamma \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^0} \right) \right] \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^0} \right) \quad [4.4]$$

where k^0 is the association number at ρ^0 , ΔH^0 is the total heat required to synthesize the solvato complex at T^0 , and α , β and γ are empirical parameters.

The same reference condition (313.2 K and 30 MPa) as the one adopted by del Valle et al. (2012)¹¹ has been considered in this work. The parameters for both models (equation 4.3 and 4.4) has been obtained for solubility data presented in Table 4.2 by means of the Levenberg-Marquardt method for nonlinear least squares curve-fitting by Statgraphics Centurion XVI²⁴ and are listed in Table 4.3. In the fitting procedure some solubility data were not included when they were identified as outliers when plotting the corresponding isotherm. Table 4.3 also summarizes some statistical parameters of the fitting such as the correlation coefficient (r^2) and the mean relative deviation for all experimental fish oil solubility data employed in the correlation procedure:

$$MRD = \frac{\sum_{all \ exp. \ solubility \ data} abs(c_{sat}^{exp} - c_{sat}^{calc}) / c_{sat}^{exp}}{n_{sikybukuty \ data}} \cdot 100 \quad [4.5]$$

where c_{sat}^{exp} is the experimental solubility data and c_{sat}^{calc} the solubility data calculated by the two models used in this work.

Table 4. 2 Oil solubility values considered in the correlation to equation (4.3) and (4.4).

Fish oil	T, K	p, MPa	c ^{sat} (g·kg ⁻¹ oil /CO ₂)	Reference
Fish oil	313 - 353	20 - 35	0.6 – 12.7 ^a	Ikawa ²⁵
Sand eel	293 - 393	10 – 65	0.4 – 92.5	Borch-J ²⁶
Cod liver	313 - 333	20 - 30	1.60 – 7.08	Catchpole ²⁷
Ropufa 30 w-3 Food oil	301 - 323	7.8 – 29.4	0.52 – 7.1	Correa ²⁸
Speckled	313 - 333	10 - 40	0.13 – 14.4	Lopes ²⁹

Graphical lecture.

Table 4. 3 Parameters of Equation 4.3 and 4.4 in the correlation of fish oil solubility data

Model	c _{sat} ⁰	k ⁰	α	β	ΔH ⁰ (kJ·mol ⁻¹)	γ	r ²	MRD (%)
Chrastil	7.86	11.194	--	--	88.69	--	0.9787	12.0
General Model	8.18	10.400	-8.863	-18.32	77.25	-306.8	0.9839	10.4

From Table 4.3 it can be observed that the lowest relative deviation was found for the General Model proposed by Del Valle (10.4 % vs 12 % for the Chrastil model), although it has double of model parameters.¹¹ For the General Model the fish oil solubility data at the reference condition (313 K and 30 MPa) has been found to be 8.18 g·kg⁻¹. This value is very close to the value found by del Valle et al. (2012) at the same reference condition when correlating vegetable oil solubility data (8.07 g·kg⁻¹).¹¹ Lopes et al. (2012)²⁹ also showed that solubility of fish oils are of the same order of magnitude as the solubility of vegetable oils. Solubility data obtained at temperatures different from 313 K were corrected by dividing the reported solubility data by the temperature-correction term (TCT) of the General Model in a similar way as Del Valle et al. (2012)¹¹ in the correlation of vegetable oil solubility data:

$$TCT = \exp\left\{-4035\left[1 - 307\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{313}\right)\right]\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{313}\right)\right\} \quad [4.6]$$

The corrected (at 313.2 K) initial slope values obtained from the first part of the extraction curves have been plotted in Figure 4.4 as a function of pure CO₂ density together with the solubility data calculated by the General Model and all the experimental fish oil solubility data used in the fitting procedure. As it can be observed, the values of the slope of the first part of the extraction are of the same order of the solubility of fish oil in CO₂.

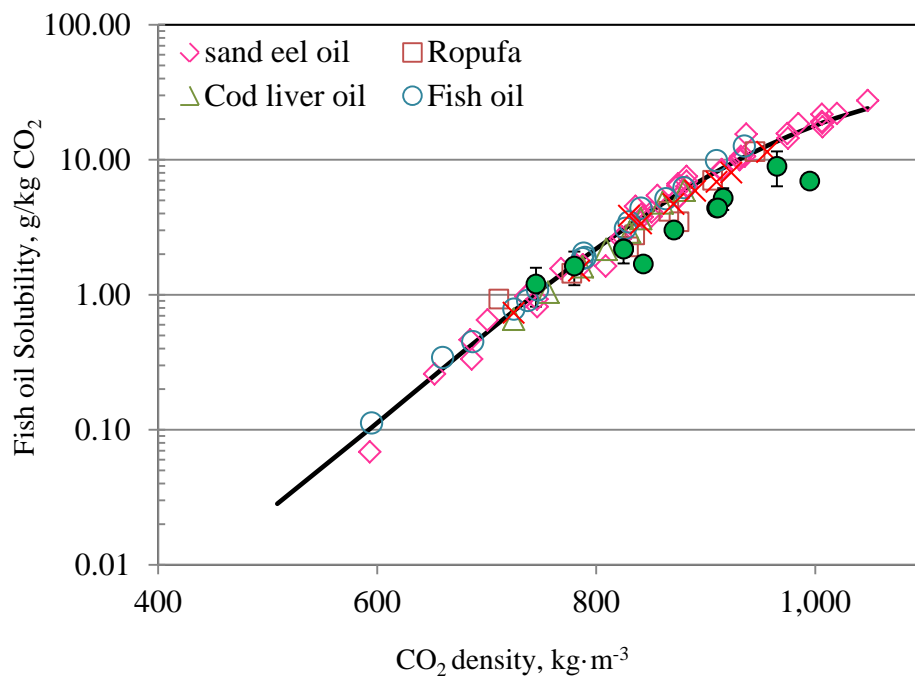


Figure 4. 4. Corrected (at 313.2 K) experimental solubility values of fish oil as function of pure CO₂ density. (● experimental data points of oil extraction from fish meal); (—) prediction of del Valle et al.¹¹ General Model.

Based on these findings, equation (4.7) and equation (4.8) proposed by Sovová¹² were used to evaluate the first and second part of the extraction curve respectively:

$$e = q y_s, \text{ for } 0 \leq q \leq q_c \quad [4.7]$$

$$e = x_u [1 - C_1 \exp(C_2 q)] , \text{ for } q > q_c \quad [4.8]$$

C_1 and C_2 are adjusting constants, y_s is the experimental solubility datum, q_c the crossing point and x_u is the solute concentration in the untreated solid (kg solute/kg insoluble solid). The constants C_1 and C_2 of the model and the concentration in the untreated solid, x_u , were estimated using the nonlinear regression through Marquardt's algorithm in Statgraphics X64. The values of experimental and calculated extraction yields, e , were compared through the mean relative deviation:

$$MRD = \frac{1}{n} \left(\sum_n \left| \frac{e_{exp} - e_{calc}}{e_{exp}} \right| \right) \cdot 100 \quad [4.9]$$

The calculated extraction curves are plotted in Figures 4.1-4.3. From these Figures a good agreement can be observed between experimental data and model correlation. According to Sovová, the volumetric fraction of broken cells in the particles, called grinding efficiency, r , and the solid-phase mass transfer coefficient, $k_s a_s$, can be estimated from constants C_1 , C_2 and co-ordinate q_c at the crossing point: ¹²

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 q_c / 2) \quad [4.10]$$

$$k_s a_s = (1 - r) (1 - \varepsilon) \dot{Q} C_2 / N_m \quad [4.11]$$

In equation (4.9) solvent flow rate is expressed in $\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$. Fitting parameters along with the estimated values of the grinding efficiency and solid-phase mass transfer coefficients are presented in Table 4.4. The grinding efficiency estimated was quite high to all extractions and it can be concluded that the volumetric fraction of broken cells in the fish meal can be as high as 0.7. The crossing point, q_c , was found to increase with a decrease in the solubility value. The solid-phase mass transfer coefficient, $k_s a_s$, increases with operating pressure (R1-R3 and R8-R10) and decreases at high operating temperatures (R7)

3.3 Characterization of the extracts and fish meal

The lowest oil content remaining after CO_2 extraction was around 0.7 % reached at 39.5 MPa and 313.2 K. On the other hand the highest oil content in the treated fish meal was around 2.5%, obtaining the same value both under supercritical conditions 20.0 MPa/313.2K

and with LCO₂ (10.0 MPa/298.2 K).

Table 4. 4 Values of the C₁, C₂ parameters, X_u, q_c, estimated grinding efficiency r, solid-phase mass transfer coefficient, k_sa_s and mean relative deviation.

Experiment	y _s	x _u	C ₁	C ₂	q _c	R	k _s a _s	MRD
R1	0.0017	0.0612	0.3835	0.0071	25.3	0.65	1.2·10 ⁻⁵	3.3
R2	0.0044	0.0560	0.3899	0.0562	8.3	0.69	8.0·10 ⁻⁵	1.1
R3	0.0070	0.0688	0.3254	0.0838	8.2	0.77	8.8·10 ⁻⁵	1.1
R4	0.0045	0.0571	0.4303	0.0625	8.6	0.67	9.8·10 ⁻⁵	1.7
R5	0.0048	0.0582	0.3937	0.0619	8.3	0.70	8.7·10 ⁻⁵	2.2
R6	0.0050	0.0603	0.3944	0.0631	8.3	0.70	8.8·10 ⁻⁵	3.6
R7	0.0054	0.0642	0.2626	0.0669	8.2	0.80	6.1·10 ⁻⁵	2.5
R8	0.0010	0.0508	0.7349	0.0477	48.4	0.77	5.0·10 ⁻⁵	9.8
R9	0.0026	0.0580	0.5475	0.0550	16.7	0.65	8.9·10 ⁻⁵	1.8
R10	0.0045	0.0637	0.8304	0.8716	8.8	0.44	2.2·10 ⁻⁵	3.0

3.3.1 Fatty acid composition of the extracts

Table 4.5 shows the fatty acid composition of the lipids of the different extracts obtained from fish meal. The extracts obtained with SCCO₂ and LCO₂ showed similar fatty acid profiles containing approximately 31.8-33.4 % of saturated fatty acids, 37.8-10.4 % of monounsaturated and 27-28.95 % of polyunsaturated. Table 4.5 also presents the fatty acid composition of the lipids obtained with n-hexane in a Soxhlet's extractor. Comparing both fatty acid profiles it can be observed that slightly higher percentage of PUFA (31.2 %) and slower percentage of SFA (31.6 %) are obtained with n-hexane that with CO₂. A similar trend in the fatty acid profiles was observed in the SCCO₂ extraction of lipids from Brazilian redspotted shrimp waste Sánchez-Camargo et al (2011)²¹, when comparing with the fatty acid profile obtained with petroleum ether Soxhlet's extract. These authors explain this difference in terms of the selectivity of SCCO₂ to fractionate the oil.

Table 4. 5 Fatty acid composition of n-hexane Soxhlet extract and SCCO₂ and LCO₂ extracts from fish meal.

Fatty acid	n-hexane	313.2 K 30 MPa	323.2 K 30 MPa	333.2 K 30 MPa	343.2 K 30 MPa	353.2 K 30 MPa	313.2 K 20 MPa	313.2 K 39.5 MPa	298.2 K 10 MPa	298.2 K 20 MPa	298.2 K 30 MPa
C14:0	3.1±0.5	4.0±0.2	3.7±0.1	3.9±0.1	3.9±0.1	4.1±0.1	3.9±0.1	4.1±0.2	3.9±0.1	3.8±0.1	3.8±0.1
C16:0	19.7±0.1	21.1±0.1	20.4±0.2	20.5±0.2	20.8±0.2	21.3±0.3	21.1±0.3	21.2±0.4	20.6±0.1	20.2±0.3	20.1±0.1
C16:1	5.2±0.1	5.7±0.1	5.4±0.1	5.6±0.1	5.6±0.1	6.1±0.3	5.6±0.1	5.9±0.3	5.6±0.1	5.6±0.1	5.5±0.1
C17:1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
C18:0	6.3±0.1	6.4±0.2	6.4±0.1	6.2±0.1	6.3±0.1	6.4±0.1	6.5±0.1	6.6±0.1	6.1±0.1	6.0±0.1	6±0.1
C18:1n-7	3.2±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.4±0.1	3.6±0.1	3.4±0.1	3.6±0.1	3.4±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1
C18:1n-9	20.6±0.4	22.4±0.2	22.0±0.3	22.1±0.2	22.5±0.1	23.1±0.3	22.3±0.3	23.5±0.4	21.8±0.2	21.7±0.1	21.7±0.5
C18:2n-6	4.2±0.1	4.6±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.7±0.1	4.8±0.1	4.6±0.1	4.8±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1
C18:3n-3	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1±0.1	1±0.1	1.1±0.1	1±0.1	--	1±0.1	1±0.1	1±0.1
C20:1n-9	3.4±0.1	3.6±0.2	3.7±0.1	3.6±0.1	3.6±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1	3.7±0.2	3.4±0.1	3.5±0.1	3.5±0.1
C20:3n-3	1.5±0.1	1.3±0.1	1.2±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1
C20:5n-3	5.1±0.2	4.4±0.1	4.2±0.1	4.3±0.1	4.4±0.1	4.8±0.1	4.3±0.1	4.8±0.3	4.5±0.1	4.6±0.1	4.7±0.1
C22:5n-3	1.7±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	1.4±0.1	1.7±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.5±0.1
C22:6n-3	15.9±0.9	13.0±0.2	13±0.2	13.5±0.6	13.1±0.5	14.2±0.3	12.8±0.2	14.5±0.3	13.4±0.3	13.7±0.3	13.9±0.4
SFA	31.6±0.7	33.4±0.6	33.1±0.6	33.2±0.7	33.3±0.6	31.7±0.7	33.1±0.6	33±1.0	32.8±0.7	32.4±0.4	32.3±0.6
MUFA	37.2±0.8	38±0.8	39.8±0.5	39.0±0.4	39.4±0.5	40.4±0.5	39.9±0.7	38.4±0.7	38.9±0.5	38.9±0.6	38.8±0.5
PUFA	31±2.0	28.8±0.8	27.1±0.4	28±1.0	27±1.0	27.9±0.3	27.0±0.7	28.2±0.4	28.2±0.8	28.7±0.8	29.0±0.9

3.3.2 Color

L, a and b values were measured for the oil extracted with SCCO₂ and with LCO₂ (Table 4.6). SCCO₂ and LCO₂ oil had similar values of lightness (L*) and yellowness. However oil extracted by SCCO₂ present higher redness values (a*) that could be also visually observed due to the red color of the lipid extract probably due to higher levels of pigments such as astaxanthin.¹⁸ Oil extracted by Soxhlet with n-hexane presented a darker color probably due to partial degradation that causes a change in the color.³⁰ According to this, CIELab presented much lower values for the redness and yellowness and lower value for the lightness (L*) than the oil extracted with pressurized CO₂ (see Table 4.6). Table 4.6 also shows CIELab parameters determined before and after extraction in the fish meal to show any effect of treatment on color of fish meal. Both, SCCO₂ and LCO₂ treated fish meal had higher L values, lower a values and higher b values compared to the untreated fish meal. Lighter color of SC-CO₂ extracted samples has been attributed in the literature to the extraction of pigments with SCCO₂ as previously mentioned.³¹ According to this result, the color change, ΔE, was higher in the fish meal after SCCO₂ extraction. This change in color after extraction would be positive since a product with lighter color could be desirable as a protein source in certain prepared foods.³²

Table 4. 6 Effect of extraction on the fish oil and residual meal color.

Sample	Color parameters			ΔE
	Lightness (L*)	Redness (a*)	Yellowness (b*)	
Fish oil				
SCCO ₂	21.58 ± 1.1	3.55 ± 0.5	2.77 ± 0.70	6.17 ± 1
LCO ₂	20.64 ± 1.2	2.70 ± 0.90	2.84 ± 1.1	6.15 ± 1
Soxhlet (hexane)	21.15 ± 0.5	0.77 ± 0.04	-0.49 ± 0.06	8.33 ± 1
Fish meal				
Untreated	34.5 ± 0.5	5.2 ± 0.2	14.2 ± 0.6	
After SCCO ₂	42.7 ± 0.7	3.7 ± 0.1	16.8 ± 0.5	9 ± 2
After LCO ₂	42 ± 1	4.01 ± 0.04	16.4 ± 0.7	8 ± 2

Supplied by AFAMSA being a mixture of sardine and tuna fish oil

3.3.3 Trace toxic elements

Toxic elements, chromium, arsenic, cadmium, mercury and lead were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in the fish meal before treatment and after SCCO₂ and LCO₂ extraction. Lower values were found in the fish meal than the values set by the US-EPA and CE, for the all the toxic elements analyzed in this work. At the experimental conditions used in this study, most of the toxic elements remain in the fish meal from 59 % for Chromium to 98.6 % for Cadmium (see Table 4.7)

Table 4. 7 Effect of SCCO₂ and LCO₂ extraction on the content of toxic element in fish meal.

Toxic element	Cr	As	Cd	Hg	Pb
Concentration in fish meal, ppm					
	3.0 ± 0.1	7.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.29 ± 0.01	0.38 ± 0.06
% Remaining in fish meal					
After SCCO ₂	62 ± 8	95 ± 14	99 ± 13	94 ± 16	77 ± 19
After LCO ₂	59 ± 8	89 ± 14	94 ± 9	89 ± 15	73 ± 12
Limit by US-EPA and EC (ppm)					
	8.00	0.10	0.20	0.50	4.00

4 CONCLUSIONS

High pressure carbon dioxide extraction has been studied as a procedure to reduce the fat content from rendered fish meal to obtain fish protein concentrates, type A. Extraction experiments have been performed at different extraction pressure (10.0 – 39.4 MPa) and temperature (298.2 K – 353.2 K). The initial oil content of fish meal was 7.2 ± 0.2 %. The lowest oil content in the fish meal was 0.7 % at 39.5MPa and 313.2 K. The extraction curves obtained indicate that the extraction process may be controlled by the solubility of the oil in SC-CO₂ in the first stage of the extraction since initial slopes are close to values of fish oil solubility data when comparing with previous fish oil solubility data previously published.

Nomenclature

a_s = specific area between the regions of intact and broken cells (m^{-1})

C_1, C_2 = fitting parameters

e = extraction yield, ($kg\ extract \cdot kg\ insoluble\ solid^{-1}$)

E = extract (kg)

k_s = solid-phase mass transfer coefficient (s^{-1})

n = number of experimental data

N_m = charge of insoluble solid (kg)

O.F. = objective function

Q = solvent flow rate ($kg \cdot h^{-1}$)

q = relative amount of the passed solvent ($kg\ solvent \cdot kg\ insoluble\ solid^{-1}$)

q_c = relative amount of the passed solvent when all the solute in broken cells has been extracted ($kg\ solvent \cdot kg\ insoluble\ solid^{-1}$)

r = grinding efficiency (fraction of broken cells)

t = extraction time (h)

x_u = concentration in the untreated solid ($kg\ solute \cdot kg\ solid\ insoluble^{-1}$)

y_s = solubility ($kg\ solute \cdot kg\ solvent^{-1}$)

5 REFERENCIAS

1. Tacon, A. G. J. & Metian, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* **285**, 146–158 (2008).
2. Meeker, D. L. *Essential Rendering*. 314 (Arlington, Virginia, 2006).
3. FAO Concentrados de proteína, accessed February 10, 2015 at [<http://www.fao.org/docrep/003/x6899e/x6899e04.htm#3.4FishProteinConcentrates\(FPC\)>](http://www.fao.org/docrep/003/x6899e/x6899e04.htm#3.4FishProteinConcentrates(FPC))
4. Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**, 43–81 (2000).
5. Baron, C. P., Borresen, T. & Jacobsen, C. Comparison of Methods to Reduce Dioxin and Polychlorinated Biphenyls Contents in Fishmeal: Extraction and Enzymatic Treatments. *J. Agric Food Chem.* **55**, 1620–1626 (2007).

6. Kristinsson, H. G., Theodore, A. E. & Ingadottir, B. Chemical processing methods for protein recovery from marine by-products and underutilized fish species. Maximising the value of marine by-products 144–168 (2007).
7. Vaquero, E. M., Beltrán, S. & Sanz, M. T. Extraction of fat from pigskin with supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 37, 142–150 (2006).
8. Orellana, J. L., Smith, T. D. & Kitchens, C. L. Liquid and supercritical CO₂ extraction of fat from rendered materials. *J. Supercrit. Fluids* 79, 55–61 (2013).
9. FAO Produccion de harina y aceite de pescado. Fisheries and Aquaculture Departmen (1986).doi:92-5-102464-2
10. Hajeb, P. et al. Optimisation of the supercritical extraction of toxic elements in fish oil. *Food Additives & Contaminants*: 31, 1712–1722 (2014).
11. Del Valle, J. M., Fuente, J. C. de la & Uquiche, E. A refined equation for predicting the solubility of vegetable oils in high-pressure CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 67, 60–70 (2012).
12. Sovova, H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *J. Supercrit. Fluids*. 33, 35–52 (2005).
13. AOAC Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, Champaign, IL. Association of Official Analytical Chemists (1990).
14. Genf, S. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. ISO 1 (E) 5983 1–4 (International Organization for Standardization: 1979).
15. AOAC Official method 942.05 Determination of Ash in Food. AOAC 95, 1392–1397 (2012).
16. Murga, R., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Cabezas, J. L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J. Supercritical Fluids* 23, 113–121 (2002).
17. AOAC Official Method 991.39: Fatty Acids in Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Methyl and Ethyl Ester. Gas Chromatographic Method. Association of Official Analytical Chemists (1995).
18. Bragadottir, M., Pálmadóttir, H. & Kristbergsson, K. Composition and Chemical Changes during Storage of Fish Meal from Capelin (*Mallotus villosus*). *J. Agric Food Chem.* 52, 1572–1580 (2004).
19. Pacquette, L., Szabo, A., Thompson, J. & S., B. Aplicación de plasma de acoplamiento inductivo / espectrometría de masas para la medición de cromo, selenio y molibdeno en la fórmula infantil y de adultos productos nutricionales: Primera acción 2011.19. *J.AOAC International* 95, 588–598 (2012).
20. Sovová, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *J. Supercritical Fluid* 66, 73–79 (2012).
21. Sánchez-Camargo, A. P., Martínez-Correa, H. A., Paviani, L. C. & Cabral, F. A. Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted

- shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). *J. Supercrit. Fluids* 56, 164–173 (2011).
22. Rebolleda, S., Beltrán, S., Sanz, M. T., González-Sanjosé, M. L. & Solaesa, Á. G. Extraction of alkylresorcinols from wheat bran with supercritical CO₂. *J Food Engineering* 119, 814–821 (2013).
 23. Chrastil, J. Solubility of solid and liquid in supercritical gases. *J. Phys. Chem.* 86, 3016–3021 (1982).
 24. StatPoint Technologies Statgraphics Centurion XVI. 1–16
 25. Ikawa, N., Nagase, Y., Imanishi, N. & Fukuzato, R. Separating polyunsaturated fatty acid by supercritical fluid extraction and chromatography. *Technology Review* 12, 40–43 (1991).
 26. Borch-Jensen, C. & Møllerup, Jc. Phase equilibria of fish oil in sub- and supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilib.* 138, 179–211 (1997).
 27. Catchpole, O. J., Grey, J. B. & Noermark, K. A. Solubility of Fish Oil Components in Supercritical CO₂ and CO₂ + Ethanol Mixtures. *J. Chem. Eng. Data* 43, 1091–1095 (1998).
 28. Corrêa, A. P. A., Peixoto, C. A., Gonçalves, L. A. G. & Cabral, F. A. Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide. *J Food Engineering* 88, 381–387 (2008).
 29. Lopes, B. L. F. et al. Selectivity of supercritical carbon dioxide in the fractionation of fish oil with a lower content of EPA + DHA. *J Supercritical Fluids* 61, 78–85 (2012).
 30. FAO The production of fish meal and oil. (Roma, 1986).
 31. Dunford, N. T., Temelli, F. & Leblanc, E. Supercritical CO₂ Extraction of Oil and Residual Proteins from Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) as Affected by Moisture Content. *J. Food Sci.* 62, 289–294 (1997).
 32. Wehling, R., Froning, G., Cuppett, F. S. & Niemann, L. Extraction of cholesterol and other lipids from dehydrated beef using supercritical carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem* 40, 1204–1207 (1992).

Conclusiones

CONCLUSIONES

En la primera etapa de esta Tesis Doctoral se estudió la obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados a partir de aceite de pescado mediante etanolisis enzimática empleando diferentes lipasas.

Se inició con la evaluación de los sistemas de etanolisis Etanol-Aceite-Tert-pentanol y Etanol-Aceite-Hexano, con el fin de mejorar la miscibilidad entre los reactantes etanol y aceite de pescado, a 303.15 y 323.15 K, obteniéndose los diagramas de equilibrio líquido-líquido para los sistemas en estudio.

El siguiente paso fue el estudio cinético de la etanolisis de aceite de pescado catalizada por las lipasas Lipozyme® 435 y Lipozyme® RM IM en diferentes medios de reacción. Así mismo, se determinó el efecto de los parámetros que afectan a la reacción tales como: la carga de enzima, la relación molar (etanol: aceite), la temperatura y el disolvente empleado en la reacción. En general, la velocidad de la reacción fue más lenta con la lipasa Lipozyme® RM IM que con la lipasa Lipozyme® 435. Con la lipasa Lipozyme®435 en medio de tert-pentanol, 10% en peso de lipasa, a una relación molar inicial de 76:1 y 293 K, se produjeron 26.75% en moles de MAG y 64.76% en moles de éteres de etilo, a un tiempo de reacción de 120 minutos, obteniendo $58.3 \pm 2.8\%$ mol PUFA's en la fracción de MAG.

Por último se estudió el fraccionamiento de los productos de reacción de etanolisis de pescado con CO₂ supercrítico, logrando separar a bajas temperaturas y presiones los EE's en el extracto y concentrando los 2-MAG en el refinado. Así mismo, se logró concentrar los PUFA's en el refinado en forma de 2-MAG.

Como segundo gran objetivo, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la obtención de concentrados de proteína, con un porcentaje inferior al 1% en masa de aceite, utilizando para ello CO₂ supercrítico a partir de harina de pescado comercial. Se estudió el efecto de las condiciones de presión y temperatura en las cinéticas de extracción. Se logró obtener un concentrado de proteína de pescado con un 0.7% en masa de aceite, realizando la extracción del aceite con CO₂ a las condiciones de 39.5MPa y 313 K.

Apéndice A

Equipo de extracción con CO₂

Índice

A.1	EQUIPO DE EXTRACCIÓN CON CO ₂ PRESURIZADO.....	185
1.1	Planta de laboratorio de extracción con CO ₂	185
1.2	Planta de laboratorio de fraccionamiento con CO ₂	185
A.2	MODO DE OPERACIÓN	185
2.1	Extracción con CO ₂	185
2.2	Fraccionamiento con CO ₂	186
A.3	REFERENCIA.....	186

A.1 EQUIPO DE EXTRACCIÓN CON CO₂ PRESURIZADO

El equipo básico de extracción con fluidos supercríticos (SFE), consta de una celda o recipiente de extracción donde se coloca la materia prima, dos bombas que permiten que el CO₂ se cargue del cilindro al sistema de extracción y funcionan alternativamente, proporcionan un flujo ininterrumpido. Además, se instalan otros elementos, tales como intercambiadores de calor, válvulas, controladores de temperatura y de presión, así como elementos de seguridad (disco de ruptura). La planta de SFE utilizada para la extracción de aceite de la harina de pescado en este trabajo es una planta a escala de laboratorio, en la Figura A.1, se muestra el diagrama y especificaciones del mismo.

1.1 Planta de laboratorio de extracción con CO₂

La planta de laboratorio de SFE utilizado para el estudio de la cinética de extracción (Capítulo 1), fue diseñado para funcionar a presiones de hasta 50 MPa, temperaturas de hasta 393 K y en el flujo de CO₂ hasta 5 kg / h (Figura A.1).

Componentes del equipo

Consta de dos bombas de jeringa (ISCO 260 DM), que trabajan alternativamente y proporcionan un flujo ininterrumpido de CO₂ líquido comprimido hasta la presión de trabajo deseada. El CO₂ presurizado se pre-calienta hasta la temperatura de extracción antes de entrar en el extractor que se encuentra en un horno de aire (Spame, 230V, 50 Hz), donde se controla la temperatura (± 0.1 K). El extractor (capacidad de 40 ml) está equipado con dos filtros de fibra de vidrio en los extremos para permitir la distribución de CO₂ en toda la sección de extractor y para prevenir la salida de sólidos. El CO₂ que abandona el extractor pasa a través de una válvula de aguja, lo que permite la descompresión de la mezcla con la precipitación del soluto en el separador. El CO₂ que sale del separador a presión atmosférica y la temperatura, se cuantifica con un medidor de flujo totalizador. También está equipado con otros elementos como un criostato, discos de ruptura, válvula de purga, etc.

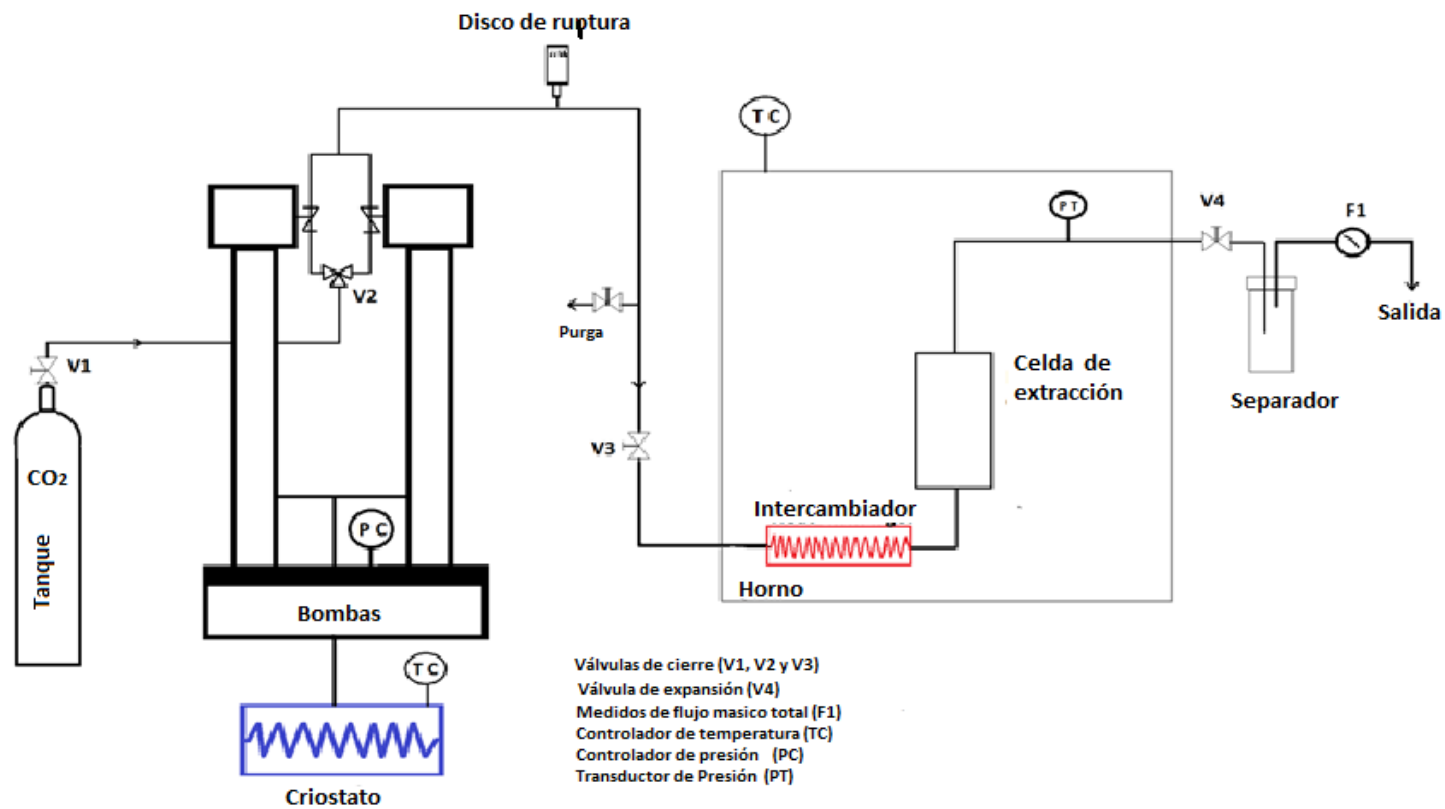


Figura A. 1. Diagrama de flujo de la planta de laboratorio de SFE

1.2 Planta de laboratorio de fraccionamiento con CO₂

La planta de SFF utilizada para la extracción o separación de esteres de la mezcla de productos de la reacción de etanolisis de este trabajo, es una planta a escala de laboratorio que consta de una celda o recipiente de capacidad de 40ml, consta de los mismos componentes y diagrama que el equipo de SFE, pero se le añadió un difusor de acero inoxidable (1/16 " de diámetro, 0.030" de espesor con un tamaño de poro de 2 micras, marca Vici Jour®) para micro-burbujear CO₂, ver esquema de la Figura A.2.

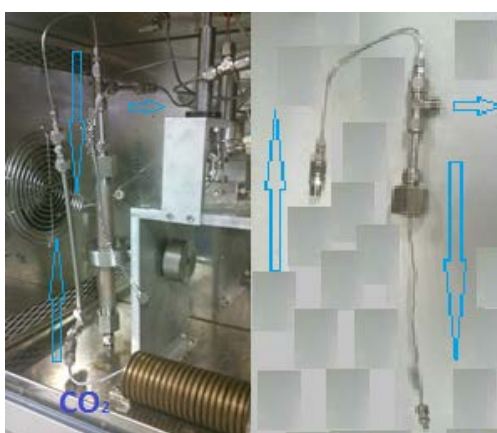


Figure A. 2 Esquema del extractor por fraccionamiento con CO₂

A.2 MODO DE OPERACIÓN

2.1 Extracción con CO₂

Para el estudio de la cinética de extracción a diferentes condiciones de p y T (Capítulo 4), 14g de harina de pescado se cargaron en el extractor, posteriormente se colocó la celda de extracción en el equipo. Se presuriza CO₂ hasta que presión operativa y se ajusta la temperatura del horno de extracción antes de abrir la válvula de expansión y se da comienzo a la extracción.

Para la obtención de la cinética de extracción, el separador, donde se recogió el extracto, se pesó en diferentes intervalos de tiempo hasta el final de la extracción.

2.2 Fraccionamiento con CO₂

Para el estudio del fraccionamiento de los productos de etanolisis utilizando la tecnología del CO₂ como fluido supercrítico a diferentes presiones y temperaturas (Capítulo 3), se utilizó el mismo que el equipo que en los procesos de extracción, incorporando un difusor de acero inoxidable para micro-burbujear CO₂ a las condiciones de estudio del fraccionamiento. La celda tiene una capacidad de 40ml y se colocan 14 g de la mezcla de productos de la reacción de etanolisis seleccionada haciendo burbujear CO₂ a las condiciones en estudio desde el fondo del recipiente hasta que se satura en la parte superior. El fraccionamiento se realizó durante 30 minutos. Consta de dos separadores, el primero donde se recoge el grueso del extracto y consta de un segundo separador que contiene tert-pentanol para asegurar la recogida de todo el extracto.

REFERENCIA

1. Murga, R., Sanz, M.T., Beltrán, S., Cabezas, J.L., Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 23 (2), 113-121, (2002).

Apéndice B

Métodos analíticos

Índice

B.1. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA LA CARACTERIZACION DEL ACEITE Y HARINA DE PESCADO	193
1.1 Medida del tamaño de partículas de la harina.....	193
1.2 Humedad de la harina de pescado.....	193
1.3 Grasa.....	194
1.4 Ceniza.....	194
1.5 Proteína.....	194
1.6 Color.....	195
1.7 Determinación de metales.....	195
1.8 Densidad.....	196
1.9 Determinación del grado de acidez	196
1.10 Determinación del índice de peróxidos.....	197
1.11 Rancimat.....	199
1.12 Contenido en agua (Método Karl-Fischer).....	200
B.2. CARACTERIZACION DE PRODUCTOS DE ETANOLISIS.....	201
2.1 Determinación de lípidos neutros	201
2.2 Determinación de la composición en ácidos grasos por CG	203
2.3 Especificidad (2-MAG) por TLC.....	206
B.3. REFERENCIAS.....	208

B.1. PROCEDIMIENTOS ANALITICOS PARA LA CARACTERIZACION DEL ACEITE Y HARINA DE PESCADO

1.1 Medida del tamaño de partículas de la harina

La determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaños de la harina de pescado se realiza mediante el uso de un agitador de tamiz vibratorio (CISA modelo RP.09), para partículas en el rango de 2mm a 0.15mm. La distribución de tamaño de partícula de la harina de pescado se muestra en la Tabla B.1

Tabla B 1 Distribución y tamaño de partícula de la harina de pescado

Tamaño de partícula, p	%
p>2mm	2.97 ± 0.26
p>1mm	7.66 ± 0.03
p>0.5mm	26.93 ± 2.54
p>0.25mm	37.99 ± 1.37
p>0.15mm	19.73 ± 3.06
p<0.15mm	4.71 ± 1.14

1.2 Humedad de la harina de pescado

Este método sirve para calcular la humedad de cualquier matriz. Es una adaptación de la norma AOAC 934.01¹ (Método para determinar la humedad en Alimentación Animal).

Material y equipos

Balanza analítica

Estufa a 378 K (105°C)

Desecador

Platillos de papel de aluminio para humedad

Procedimiento:

Se pesa un platillo de aluminio para humedad (Po). Sobre el platillo, se pesa la cantidad (P1) correspondiente de muestra. Se introduce el platillo con la muestra húmeda en la estufa a 378K y se deja desecar hasta pesada constante (aproximadamente 18 horas). Una vez transcurrido ese tiempo, se saca la muestra y se deja enfriar en un desecador durante

30 minutos. Finalmente se pesa la muestra seca (P2)

Cálculos:

$$\% \text{Humedad} = \frac{P_2 - P_1}{P_1 - P_0} \times 100$$

Po: peso del platillo de aluminio vacío

P1: peso de platillo + muestra húmeda

P2: peso de platillo + muestra seca

El contenido en humedad de la harina de pescado en esta tesis está reportado en la Tabla B.2.

1.3 Grasa

El extractor automático marca BUCHI B-811 se utiliza para la extracción sólido-líquido de muestras con disolventes o mezclas de disolventes de composición conocida y la posterior concentración o secado del extracto. El equipo realiza el proceso de extracción en tres etapas: extracción, lavado y secado.

Es importante a la hora de determinar la cantidad de grasa que las muestras están previamente desecadas o tratadas mediante hidrólisis según su naturaleza. El contenido en grasa de la harina se determinó utilizando éter de petróleo como disolvente y fue igual a la determinación en hexano, estos valores se muestran en la Tabla B. 2

1.4 Ceniza

La determinación de la ceniza se realizó por el Método AOAC Oficial 942.05², realizando la ignición a 873 K (600 °C) durante 2 h. Obteniendo una composición en masa para la harina de pescado, esta se muestra en la Tabla B.2.

1.5 Proteína

Contenido de proteína cruda se determinó con el método de Kjeldahl y multiplicando el contenido de nitrógeno por 6,25.³ El porcentaje de proteína cruda de la harina de pescado se muestra en la Tabla B.2.

Tabla B 2 Composición de la harina de pescado

Materia	Ceniza %	Proteína Cruda %	Humedad %	Grasa Cruda %
Harina de pescado	22.18	65.59	5.11	7.12

1.6 Color

El color del aceite y de la harina de pescado se midió por triplicado usando un colorímetro (Minolta CM-2002; Osaka, Japan). El iluminante utilizado es el D65 y el ángulo de observador es de 10°. Los resultados del parámetro color se determinan con el sistema CIE-LAB, calculándose la luminosidad (L^*), el componente rojo-verde (a^*) y el componente amarillo-azul (b^*). En la Tabla B.3 se muestran los parámetros de color del aceite y harina.

Tabla B 3 Parámetros de color de los subproductos de la industria pesquera (Materia prima)

Subproductos	Parámetros de color		
	Luminosidad(L^*)	Rojo-verde (a^*)	Amarillo-azul (b^*)
Harina de pescado	34.5 ± 0.5	5.2 ± 0.2	14.2 ± 0.6
Aceite de pescado	19.65 ± 2.4	6.32 ± 0.8	2.2 ± 0.6

1.7 Determinación de metales

La determinación de ciertos metales se realizó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS Agilent modelos 7500cx) con celda de colisión. Las muestras de harina se digieren en un sistema de horno de microondas cerrado, junto con estándares internos.⁴ Las muestras digeridas se enfriaron y se diluyen con agua des-ionizada, en 250 ml para las muestras de harina y 50ml para los aceites. Las concentraciones de los elementos tóxicos se determinaron utilizando soluciones estándar preparadas de la misma matriz de ácido a partir de Fe, Cu, Pb, Cd, Cr, Cu, As (0-40 ppb) y Hg (0-20 ppb). La

concentración de metales pesados para harinas y aceite de pescado, se muestran en la Tabla B.4.

Tabla B 4 Concentración de metales en la harina y el aceite utilizado, en ppm.

Elementos	Harina	Aceite
Cr	3.0 ± 0.1	-
As	7.8 ± 0.2	0.207 ± 0.009
Cd	1.6 ± 0.1	-
Hg	0.29 ± 0.01	0.0097 ± 0.002
Pb	0.38 ± 0.06	0.019 ± 0.0002
Fe	-	47.64 ± 0.1
Cu	-	0.086 ± 0.002
Zn	-	0.298 ± 0.02

1.8 Densidad

Se utiliza el densímetro modelo DMA 5000, Anton Paar. Se fija la temperatura con una precisión de ± 0.001 °C. El resultado de la densidad tiene una repetitividad de ± 0.000001 g/ml. Rango de medida de la temperatura 273-353 K (0 °C a 80 °C) y de la densidad de 0 a 3g/ml.

La densidad del aceite utilizado se encuentra en la Tabla B.5

1.9 Determinación del grado de acidez

La acidez del aceite es una expresión del contenido en % de los ácidos grasos libres, también se denomina grado de acidez o índice de acidez, y expresa el peso, en mg, de KOH necesario para neutralizar un gramo de aceite.

Se utiliza un valorador automático Metrohm, modelo 905 Titrand, conectado a un ordenador portátil.

Reactivos:

Etanol de 95 %:

Éter di-etílico

Solución etanólica de KOH 0,1 N

Procedimiento:

Estandarización del KOH

Pesar aproximadamente 200 mg de Ftalato y disolver en 50 ml de agua destilada. Valorar con la potasa. Hacer por triplicado.

$$f = \frac{m}{V * 20,423}$$

m: masa exacta de Ftalato (mg)

V: ml de KOH

Medida de la acidez

- Pesar 1 g de aceite (por triplicado)
- Añadir 75 ml de etanol:éter
- Valorar con la solución etanólica de KOH

Cálculos

$$Acidez(\% oleico) = \frac{V * N * 282.5}{10 * P}$$

V: volumen de ml de la solución de KOH utilizada

N: normalidad de la solución de KOH

P: peso de muestra (g)

La acidez del aceite de pescados utilizado se muestra en la Tabla B.5.

1.10 Determinación del índice de peróxidos

El índice de peróxidos es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas.

La muestra problema, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con solución de yoduro potásico. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico. Se utiliza un valorador automático Metrohm, modelo 905 Titrande, conectado a un ordenador

portátil.

Reactivos

Cloroformo

Ácido acético glacial

Solución acuosa saturada de yoduro potásico recién preparada: 30 g/ 100 ml

Solución acuosa de tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.01 N

KIO_3 desecado en estufa a 453 K (180 °C) durante la noche y enfriado en desecador durante 2 h.

H_2SO_4 al 25 %.

Procedimiento

Estandarización del tiosulfato

Pesar aproximadamente 5 mg de KIO_3 y disolver en 80 ml de agua destilada. Añadir 0.8 ml de la solución de KI y 10 ml de disolución de H_2SO_4 . Valorar con la solución de tiosulfato.

$$f = \frac{p}{0,3567 * V}$$

p: mg KIO_3

V: ml tiosulfato

Medida de peróxidos

Pesar 1 g de aceite en un matraz

Añadir 10 ml de cloroformo (estabilizado con etanol) y disolver la muestra por agitación

Añadir 15 ml de ácido acético

Añadir 1 ml de yoduro potásico

Cerrar rápidamente el matraz y agitar durante 1 minuto. Mantener en oscuridad durante 5 minutos

Añadir 75 ml de agua destilada

Valorar con el tiosulfato sódico 0.01 N

Paralelamente se realiza un ensayo en blanco. Si el blanco gasta más de 0.05 ml del tiosulfato 0.01 N hay que sustituir los reactivos

Cálculos

$$IP(\text{meqO}_{2\text{activo}} / \text{kg}_{\text{grasa}}) = \frac{V * N * 1000}{P}$$

V: ml de tiosulfato muestra – ml tiosulfato blanco

N: normalidad exacta del tiosulfato

P: peso en gramos de la muestra

El índice de peróxido del aceite se muestra en la Tabla B.5.

1.11 Rancimat

Cuando una grasa animal o vegetal se estropea se percibe por el deterioro del olor y sabor (enranciamiento). Esto es debido a alteraciones químicas causadas por el oxígeno atmosférico. Este proceso de oxidación lento producido a temperatura ambiente se denomina autooxidación. Esta oxidación tiene lugar en varias etapas resultando diferentes productos de descomposición, como peróxidos en una primera oxidación, y alcoholes, aldehídos y ácidos carboxílicos en sucesivas oxidaciones.

Con el método RANCIMAT, la muestra se expone a un flujo de aire y a una temperatura constante entre 323 K y 493 K (50 y 220°C). Los compuestos muy volátiles producidos por la oxidación, se transfieren a un vaso junto con el flujo de aire, donde se absorben en la disolución de medida (agua destilada) donde se registra la conductividad en continuo. Así los ácidos orgánicos se detectan por el aumento de la conductividad, el tiempo transcurrido hasta la formación de esos productos de reacción oxidativa se denomina tiempo de inducción o periodo de inducción, siendo un buen indicador de la estabilidad a la oxidación del producto.

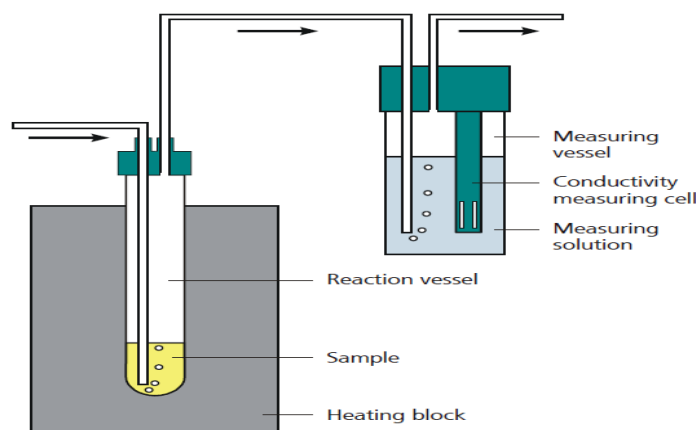


Figura B. 1. Esquema del Rancimat (modelo 743, Methrom).

Funcionamiento

Cantidad de muestra: Se ha de introducir suficiente muestra para cubrir el capilar. Para muestras de aceite de pescado se introducen 3g. Flujo de aire 20 l/h a 110°C de temperatura, una cantidad de agua 50ml de agua.

Tabla B 5 Propiedades del aceite de pescado

Propiedades	Datos
Densidad	0.9175g/ml(303.15 K) / 0.9065g/ml(323.15K)
Grado de acidez	0.233 %oleico
Índice de peróxidos	6.426 meqO ₂ /Kg de aceite
Estabilidad de aceite (OSI)	0.7033±0.015 h

1.12 Contenido en agua (Método Karl-Fischer)

Se determinó el contenido de agua de los disolventes empleados. Con el equipo Mitsubishi CA-20 que utiliza el método coulombimétrico. El intervalo de medida va desde 10µg a 100 mg de agua.

B.2. CARACTERIZACION DE PRODUCTOS DE ETANOLISIS

2.1 Determinación de lípidos neutros

Los lípidos neutros se determinan con el HPLC-ELSD (procedimiento 2DEP-LAB-PC-205). El método cromatográfico (fase normal) basado en Schaefer et al. (2003)⁷, es el siguiente:

Tabla B. 6 Método para determinar el perfil de lípidos neutros.

Método:	t (min)	% B
Columna: Lichrosphere DIOL-5 250 x 4.6 mm, 5 μ m	0	0
Flujo: 1 ml/min	1	0
Disolvente A: Isooctano	10	10
Disolvente B: Metil tertbutileter con 0.1% de ácido acético	22	44
Detector: T ^a 35°C, presión 3.5 bar, gain 7	30	100
	42	80
	47	0

Con este método se detectan y cuantifican los siguientes compuestos: escualeno, ceras, derivados del colesterol, ésteres etílicos y metílicos (a tiempo similar que el escualeno), triglicéridos, ácidos grasos libres, 1,2-diglicéridos, 1,3-diglicéridos colesterol y monoglicéridos.

En una muestra real los picos aparecen agrupados por familias: triglicéridos (TAG), esterés etílicos (EE), ácidos grasos (FA), 1,3-diglicéridos (1,3-DAG), 1,2-diglicéridos (1,2-DAG) y monoglicéridos (MAG). Para la cuantificación, se utilizan las curvas de calibrado, suponiendo que todos los componentes de una misma familia tienen el mismo factor de respuesta.

La Figura B.2 muestra dos Cromatogramas de los puntos de la cinética de etanolisis de aceite de pescado con Lipozyme RMIM a las 2 y 16 h de reacción, donde se visualizan los picos agrupados por familias, en el tiempo de retención de 3.4 a 4.5 los EE's (esterés de etilo), en el RT (tiempo de retención) de 6 a 8 los TAG's, los FA (ácidos grasos) en un rango de 12 a 15, los DAG's se visualizan a un RT de 18 a 21 y los MAG's en el

rango de tiempo de retención de 28 a 30.

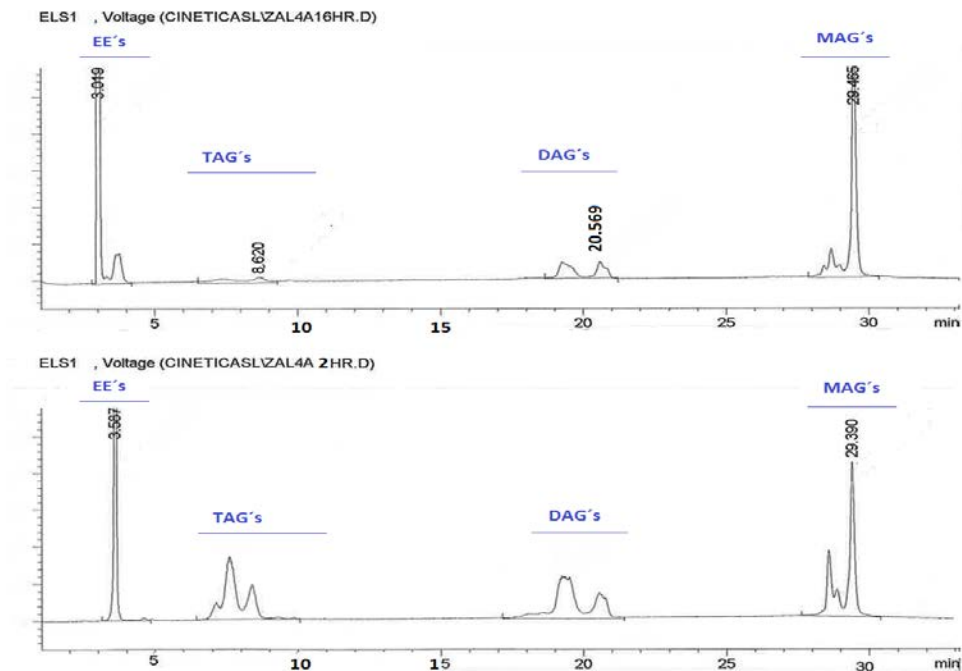


Figura B. 2 Cromatogramas de dos puntos de cinética de etanolisis de aceite de pescado con Lipozyme RM IM a 2 y 16 h de reacción

Procedimiento

Las muestras se diluyen en viales a una concentración de 3mg/ml en tert-pentanol para evitar saturación. Hacer, al menos, dos réplicas de cada punto de reacción y de la mezcla inicial. Pinchar en el HPLC unos 10 μ L para cuantificar los triglicéridos y los productos de la reacción (cuidado que no se sature la señal).

Las fracciones de MAG de las reacciones de etanolisis enzimáticas a diferentes condiciones de relaciones molares iniciales y con los diferentes disolventes como medio de reacción fueron obtenidas por: HPLC-ELSD. El disolvente se evaporó bajo vacío usando un evaporador rotatorio (Heibolph VV2000, Schwabach, Alemania) a 40°C. Las fracciones obtenidas por fraccionamiento con CO₂ presurizado y las obtenidas por HPLC-ELSD, se analizaron para establecer su perfil de ácidos grasos, por ende determinar el porcentaje molar de PUFA's obtenido por el método AOAC 991.39⁸ que a continuación se explica a detalle.

2.2 Determinación de la composición en ácidos grasos por CG

El contenido en ácidos grasos se determina por el método oficial de la AOAC⁸ que se basa en la ruptura de todos los glicéridos y posterior derivatización a ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Estos ésteres metílicos se analizan por cromatografía de gases (Agilent 6890N GC system) con detector de ionización de llama (FID) y helio como gas portador. Se utiliza una columna capilar OmegawaxTM-320, 30m x 0.32mm.

Para la identificación se han utilizado sustancias patrón (Sigma) y para la cuantificación se utiliza como patrón interno el metil-tricosanato (C23:0).

Para la derivatización se sigue el método de la AOAC, pero en la parte correspondiente al análisis cromatográfico se han realizado unas pequeñas modificaciones.

Materiales

NaOH [0.5 N en metanol]

BF₃

Isooctano

NaCl [sol. Saturada en H₂O]

Patrón interno C23 (Ácido Tricosanoico)

Procedimiento

1. En un tubo de ensaye con rosca y tapa colocar 25mg de la muestra a derivatizar.
2. Agregar 1 ml de la solución concentrada del patrón interno [1mg/ml en isooctano] y agitar la muestra durante 30 segundos.
3. Adicionar 1.5 ml de la solución de NaOH, tapar el tubo de ensaye para agitar durante un minuto y calentar a 95°C durante 5 minutos, pasado este tiempo enfriar.
4. Secar el tubo, destapar y agregar 2 ml de BF₃, tapar para agitar durante 1 minuto y colocar en una gradilla en el baño maría a 95°C durante 30 minutos. Una vez pasado este tiempo, sacar la gradilla del baño maría, enfriar y secar cada tubo de ensaye.
5. Destapar el tubo de ensaye, agregar 1ml de isooctano, tapar para agitar durante 30segundos, pasado este tiempo destapar y agregar 5 ml de la solución saturada de NaCl, tapar para homogenizar por 30 segundos y dejar en reposo durante 5 minutos.
6. Tomar 1ml de la primera fase del tubo de ensaye y colocarlo en un vial ámbar para su análisis por cromatografía de gases según el método indicado en la Tabla B.7.

Tabla B. 7 Método para perfil de ácidos grasos.

Método:	T ^a horno (°C)	Tiempo (min)	Rampa T ^a (°C/min)
Columna: Omegawax-320, 30m x 0.32mm	180	0	
Inyector: 250°C			
Detector (FID): 250°C	200	1	1
Gas portador: Helio, 1.8 ml/min			
Split 1:50	220	0	5
Inyección: 1 µl	220	15	

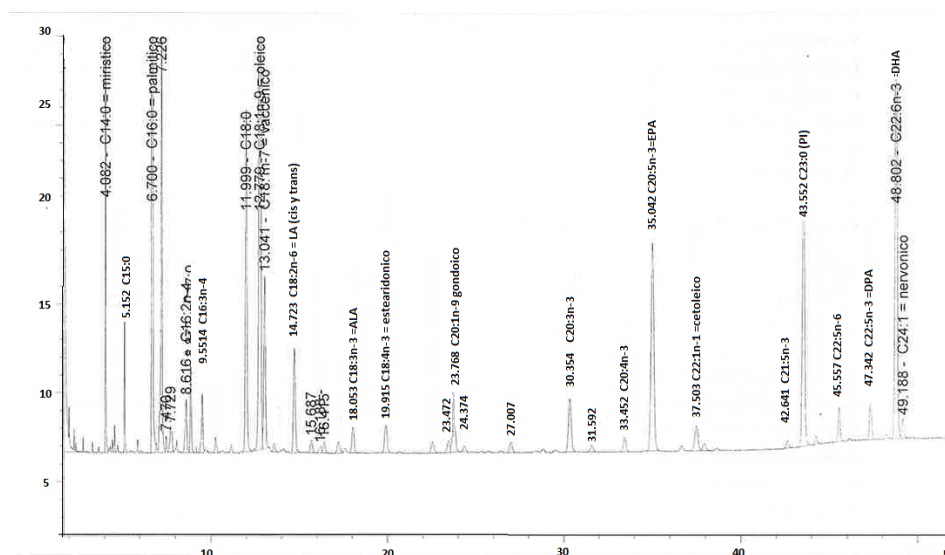


Figura B. 3 Cromatograma de una mezcla patrón con los ésteres de ácidos grasos identificados

La concentración de ácido graso se calcula por la siguiente formula:

$$[C_{\text{ácido } i}] = \left[\left(\frac{\text{área } Ci}{\text{área } PI} \right) * \left(\frac{\text{mg } PI}{\text{mg } Cm} \right) * \left(\frac{\text{factor } R}{\text{factor } conv} \right) \right] * 1000$$

Donde $C_{\text{ácido } i}$ es la concentración en mg/g del ácido i , $\text{área } Ci$ área del compuesto i , $\text{área } PI$ es el área del patrón interno, $\text{mg } PI$ son los microgramos del patrón interno (1mg), $\text{mg } Cm$ son los microgramos de la muestra, factor R es el factor de respuesta

(regresión- curva de calibrado), el factor conv es el factor de conversión de esteres a ácidos en función del peso molecular. En la Tabla B.8 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite que se utilizó en esta tesis para la etanolisis.

Tabla B 8 Perfil de ácidos grasos del aceite utilizado

Ácidos grasos		Aceite de pescado		Sn-2
Nombre	Formula	w%	mol%	
Mirístico	C14:0	3.3 ± 0.5	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.5
Palmitico (P)	C16:0	19.5 ± 0.5	23.5 ± 0.2	17 ± 0.9
Palmitoleico (Po)	C16:1	5.4 ± 0.6	7.0 ± 0.1	7.3 ± 0.5
Stearico (S)	C18:0	6 ± 0.15	6.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Vaccenico (V)	C18:1n-7	3 ± 0.15	3.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Oleico (O)	C18:1n-9	18 ± 0.6	18.7 ± 0.2	11.8 ± 0.50
Linoleico (Lo)	C18:2n-6	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2
Linolenico (Ln)	C18:3n-3	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	n.d.
Steriadonico (St)	C18:4n-3	0.9 ± 0.3	n.p	0.5 ± 0.1
Eicosenoico (G)	C20:1n-9	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.1	n.d.
Eicosatrienoico (Et)	C20:3n-3	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Eicosapentaenoico (Ep)	C20:5n-3	6.9 ± 0.6	6.5 ± 0.1	6.1 ± 0.1
Docosapentaenoico (Dp)	C22:5n-3	2 ± 0.2	1.6 ± 0.1	2.3 ± 0.1
Docosahexaenoico (Dh)	C22:6n-3	27.0 ± 0.9	21.8 ± 0.4	47.8 ± 2.7
SFA		30.8 ± 0.15	34.4 ± 0.4	22.2 ± 1.6
MUFA		30.0 ± 0.4	30.6 ± 0.6	19.5 ± 1.2
PUFA		39.1 ± 0.9	35.0 ± 0.6	58.3 ± 2.8

2.3 Especificidad (2-MAG) por TLC

Para estudiar la especificidad de la enzima y valorar la formación de 1(3) MAG's y 2-MAG's formados en la alcoholólisis enzimática por ambas lipasas se ha realizado un análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) siguiendo el siguiente protocolo:

Material

Placas de TLC de sílice gel 60 F254 (Merck KGaA)

Ácido bórico [1.2% en volumen]

Metanol

Cloroformo

Ácido acético

Agua

Yodo

Procedimiento o protocolo

1. La placa se activa después de la inmersión en una solución hidroetanólica (50%, v / v) de ácido bórico en porcentaje en peso de 1.2%, durante 5 minutos, posterior a este tiempo se saca de la solución y se seca.
2. Una vez seca se activa por calentamiento a 105°C durante 30 min, se saca de la estufa y se enfría en un desecador.⁹
3. Una vez que se encuentra activada se toman alícuotas de las mezclas de reacción y se aplican en la placa y se seca nuevamente.
4. La placa se desarrolla en dos etapas con diferentes mezclas de disolventes para separar los compuestos por su polaridad.

Primera etapa Una mezcla con la siguiente composición volumétrica de cloroformo, metanol y agua (64: 10: 1, respectivamente) se coloca en la cubeta de cromatográfica

Cuando la fase móvil satura la cubeta se coloca la placa y cuando la fase móvil o eluyente sube por capilaridad hasta la mitad de la placa (fase estacionaria), se debe sacar de la cubeta y dejar secar

Segunda etapa Con una mezcla de disolventes a la relación en volumen de cloroformo, metanol y ácido acético (97,5:2,5:1, respectivamente) se satura la segunda cubeta cromatográfica.

Una vez saturada se coloca la placa anterior ya seca hasta que la fase móvil suba por la fase estacionaria hasta un centímetro antes de terminar la placa, sacar y secar.

(Una alícuota de una solución a concentración conocida de 2-monoleína (Sigma Aldrich) se utilizó como referencia).

5. Las bandas se visualizaron mediante una tinción con vapores de yodo al final del proceso.

Se muestra una TLC de puntos de reacción en la Figura B.4.

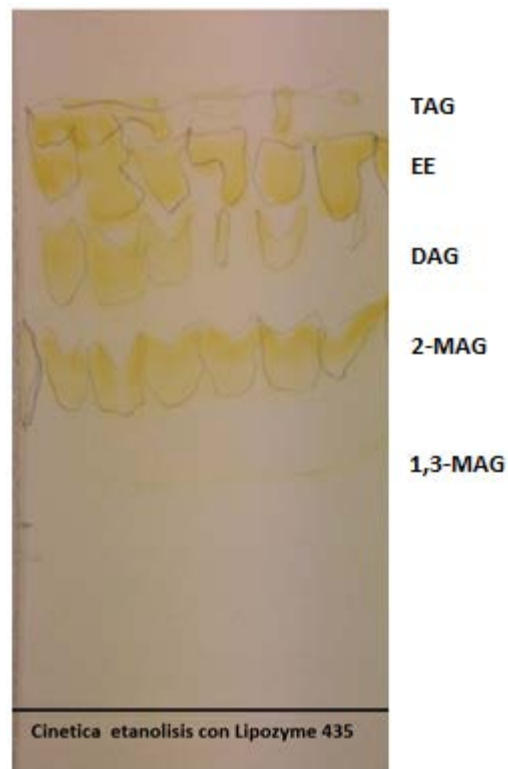


Figura B. 4 TLC de puntos de reacción de etanolisis de aceite de pescado con Lipozyme®435

B.3. REFERENCIAS

1. AOAC Official Method 934.01 Moisture in Animal Feed. (1984).
2. AOAC Official method 942.05 Determination of Ash in Food. AOAC **95**, 1392–1397 (2012).
3. Genf, S. Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. ISOI (E) 5983 1–4 (International Organization for Standardization: 1979).
4. Pacquette, L., Szabo, A., Thompson, J. & S., B. Aplicación de plasma de acoplamiento inductivo / espectrometría de masas para la medición de cromo, selenio y molibdeno en la fórmula infantil y de adultos productos nutricionales: Primera acción 2011.19. Journal of AOAC International **95**, 588–598 (2012).
5. Perona, J. S. & Ruiz-Gutiérrez, V. Characterization of the Triacylglycerol molecular species of fish oil by reversed-Phase high performance liquid chromatography. J. Liq. Chrom. & Rel. Technol **22**, 1699–1714 (1999).
6. Solaesa, Á. G., Bucio, S. L., Sanz, M. T., Beltrán, S. & Rebolleda, S. Characterization of triacylglycerol composition of fish oils by using chromatographic techniques. J. Oleo. Sci. **63**, 449–460 (2014).
7. Schaefer, A., Kuchler, T., Simat, T. J. & Steinhart, H. Migration of lubricants from food packagings Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection. Journal of Chromatography A **1017**, 107–116 (2003).
8. AOAC Official Method 991.39: Fatty Acids in Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Methyl and Ethyl Ester. Gas Chromatographic Method. Association of Official Analytical Chemists (1995).
9. Henderson RJ, T. Thin-layer chromatography. In. Lipids analysis: a practical approach. Oxford: IRL Press 65–111 (1992).