

Universitat de Lleida

Extracció reactiva de llavors oleaginoses per a la preparació de monoglicèrids

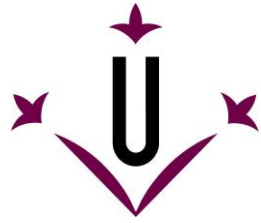
Rubén Torregrosa García

<http://hdl.handle.net/10803/385622>



Extracció reactiva de llavors oleaginoses per a la preparació de monoglicèrids
està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-CompartirIgual 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/)

(c) 2016, Rubén Torregrosa García



Universitat de Lleida
Departament de Química

Extracció reactiva de llavors oleaginoses per a la preparació de monoglicèrids

Memòria presentada per Rubén Torregrosa García per optar al grau de Doctor
per la Universitat de Lleida

Treball realitzat al Departament de Química de la Universitat de Lleida sota la
direcció de:

Dr. Ramon Canela i Garayoa
Dra. Mercè Balcells i Fluvià

Programa de Doctorat 0002 – Sistemes Agrícoles, Forestals i Alimentaris

*“[...] como Sísifo,
empeñado en subir,
para luego bajar
por pendientes imposibles.”*

Nacho Vegas – Cerca del cielo (Canción de Juanito Oiarzabal)

Agraïments

Voldria expressar el meu agraïment en primer lloc al Ramon Canela i la Mercè Balcells per esdevenir molt més que els directors d'aquest treball.

Als meus pares i els meus germans pel seu suport i la seva confiança en mi.

A la Montse per tot.

A tota la gent amb la que he tingut l'oportunitat de treballar, als laboratoris i fora d'ells, del Departament de Química de la UdL. Si fes una llista es quedaria curta, així que us podeu donar tots per agraïts!

A tot l'equip humà d'Axeb Biotech i Just Global Comm & Int'l Marketing per tot el suport explícit i implícit, per l'oportunitat i també per l'aventura.

Als meus amics, puntals imprescindibles perquè l'estructura completa no caigui.

SUMMARY

Chemical or chemoenzymatic transformation of triglycerides enables the production of several valuable substances for chemical, energy, pharmaceutical, food and cosmetic industry. Monoglycerides, due to its amphiphilic structure, are one of these substances being the most widely used emulsifiers in food, pharmaceutical and cosmetic industry. Even though they can be obtained by chemical methods, enzymatic methods involve some technological and environmental advantages as the use of mild reaction conditions and the reduction of reaction by-products.

In this work, a two-step method has been developed to prepare monoglyceride enriched extracts from soybean and sesame seeds. In the first step, direct extraction, hydrolysis and esterification of triglycerides present in seeds is performed with glycidol and solketal, both glycerol derivatives owning a free hydroxyl group. Reactions are catalyzed with lyophilized mycelium of *Rhizopus oryzae* in solvent-free conditions. The second step is the cleavage of solketal ring (1,2-acetonide structure) using acid catalysts.

Various reaction times and temperatures have been assayed for the esterification step for both glycerols derivatives. A microwave assisted cleavage method in the presence of ion exchange resins has been developed for the second step. This procedure has been compared with other methods already described. Furthermore, the content of tocopherols in the extracts has been evaluated.

Only solketal and soybean have allowed the achievement of satisfactory reaction yields in the first step. Regarding the second step, although the developed microwaved assisted method reported high yields for the cleavage of purified solketal esters, it has failed to provide reaction yields over 5 % when mixtures of solketal esters from the direct transformation of soybean triglycerides obtained in first step are used.

The maximum yield of monoglycerides in the two-step reaction process is 81 % using the following conditions: the first step catalyzed by lyophilized mycelium of *Rhizopus oryzae* in solvent-free conditions and carried out with a hydrolysis and esterification reaction temperature of 50 °C and a reaction time of 24 h for hydrolysis and 6 h for esterification using solketal; in the second step, for the cleavage of the protected glycerol (solketal), a solvent mixture of acetonitrile:1 M HCl in 4:1 (v/v) with a reaction time of 6 h at room temperature has been used.

RESUMEN

La transformación química o quimioenzimática de triglicéridos permite la obtención de numerosas sustancias de valor para la industria química, energética, farmacéutica, agroalimentaria o cosmética. Los monoglicéridos son unos de estos derivados de los triglicéridos que, debido a su estructura anfifílica, son los emulsionantes más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Aunque pueden ser obtenidos mediante vía química, su obtención enzimática comporta algunas ventajas tanto tecnológicas como medioambientales, como el uso de condiciones de reacción suaves o la disminución de los subproductos de la reacción.

En este trabajo se ha desarrollado un método en dos etapas para la obtención de extractos ricos en monoglicéridos a partir de semillas de soja y de sésamo. La primera etapa, consta de una hidrólisis y esterificación directa, catalizada con micelio liofilizado de *Rhizopus oryzae* en condiciones de ausencia de solvente, de los triglicéridos contenidos en las semillas empleando glicidol y solketal, derivados de glicerol que presentan un hidroxilo libre. La segunda etapa ha consistido en la desprotección del grupo 1,2-acetonido, que protegía el glicerol en el caso de solketal, mediante el empleo catalizadores ácidos.

Para la primera etapa de esterificación se han ensayado diferentes condiciones de tiempo y temperaturas de reacción, y se han evaluado ambos alcoholes. Para la segunda etapa se ha desarrollado un método de desprotección con calentamiento mediante microondas en presencia de una resina de intercambio iónico que ha sido contrastado con otros métodos descritos en la bibliografía. Por otro lado, se ha evaluado el contenido de tocoferoles en los extractos obtenidos en la primera etapa y después de las dos etapas. De entre los dos alcoholes empleados en la reacción de esterificación y las dos semillas ensayadas, únicamente el solketal y la semilla de soja han permitido obtener rendimientos de reacción satisfactorios para la primera etapa. En cuanto a la segunda etapa, el método de desprotección desarrollado con calentamiento mediante microondas, pese a reportar rendimientos elevados para la desprotección de ésteres de solketal puros, no ha permitido la obtención de rendimientos superiores al 5 % al utilizar mezclas de ésteres de solketal resultantes de la transformación directa de los triglicéridos presentes en la semilla de soja obtenidos en la primera etapa.

El rendimiento máximo de obtención de monoglicéridos en el extracto final de reacción ha sido del 81 %, empleando las siguientes condiciones: la primera etapa ha sido catalizada por micelio liofilizado de *Rhizopus oryzae* en condiciones de ausencia de solvente, llevada a cabo a una temperatura de reacción de hidrólisis y esterificación de 50 °C y un tiempo de reacción de hidrólisis de 24 h y de reacción de esterificación de 6 h utilizando solketal; en la segunda etapa de desprotección del 1,2-acetonido, presente en el solketal, se ha utilizado como solvente una mezcla de acetonitrilo:HCl 1M en proporción 4:1 (v/v), con un tiempo de reacción de 6 h a temperatura ambiente.

RESUM

La transformació química o quimioenzimàtica de triglicèrids permet l'obtenció de nombroses substàncies valuoses per a la indústria química, energètica, farmacèutica, agroalimentària o cosmètica. Els monoglicèrids són uns d'aquests derivats dels triglicèrids que, degut a la seva estructura amfifílica, són els emulsionants més àmpliament utilitzats a la indústria alimentària, farmacèutica i cosmètica. Tot i que poden ser obtinguts mitjançant una via química, la seva obtenció enzimàtica suposa alguns avantatges tant tecnològics com mediambientals, com l'ús de condicions de reacció suaus o la disminució dels subproductes de la reacció.

En aquest treball s'ha desenvolupat un mètode en dues etapes per a l'obtenció d'extractes rics en monoglicèrids a partir de llavors de soja i de sèsam. La primera etapa, d'hidròlisi i esterificació directa amb glicidol i solketal, derivats de glicerol que presenten un hidroxil lliure; dels triglicèrids continguts en les llavors, s'ha catalitzat amb miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae* en condicions d'absència de solvent. La segona etapa ha estat la desprotecció del glicerol protegit en forma de 1,2-acetonid (solketal) amb catalitzadors àcids.

Per a la primera etapa d'esterificació s'han assajat diferents condicions de temps i temperatures de reacció i s'ha avaluat els dos alcohols, glicidol i el solketal. Per a la segona etapa s'ha desenvolupat un mètode de desprotecció amb escalfament mitjançant microones en presència d'una resina de bescanvi iònic que ha estat contrastat amb d'altres mètodes descrits a la bibliografia. D'altra banda, s'ha avaluat el contingut de tocoferols als extractes obtinguts a la primera etapa i després de totes dues etapes. D'entre els dos alcohols emprats i les dues llavors assajades, només el solketal i la llavor de soja han permès obtenir rendiments de reacció satisfactoris per a la primera etapa. Pel que fa a la segona etapa, el mètode de desprotecció desenvolupat amb escalfament mitjançant microones, tot i reportar rendiments elevats per a la desprotecció d'esters de solketal purs, no ha permès l'obtenció de rendiments de reacció superiors al 5 % al fer servir mesclures d'esters de solketal resultants de la transformació directa dels triglicèrids presents a la llavor de soja obtinguts a la primera etapa.

El rendiment màxim d'obtenció de monoglicèrids a l'extracte final de reacció ha estat del 81 %, amb les següents condicions: la primera etapa ha estat catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae* en condicions d'absència de solvent, portada a terme a una temperatura de reacció d'hidròlisi i esterificació de 50 °C i un temps de reacció d'hidròlisi de 24 h i de reacció d'esterificació de 6 h emprant solketal; a la segona etapa de desprotecció del 1,2-acetonid, present al solketal, s'ha emprat com a solvent una barreja acetonitril:HCl 1M en proporció 4:1 (v/v), amb un temps de reacció de 6 h a temperatura ambient.

Relació d'abreviatures

BSTFA: N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

FA: Àcid gras

FAME: Èster metílics d'àcids grassos

FFA: Àcid gras lliure

GC: Cromatografia de gasos

GC-FID: Cromatografia de gasos amb detecció de ionització de flama

GC-MS: Cromatografia de gasos amb detecció espectromètrica de masses

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució

RMN: Ressonància magnètica nuclear

SNK: Student-Newman-Keuls

TBME: *tert*-Butil metil èter

TFA: Àcid trifluoroacètic

TGC: Triglicèrids

Taula de Continguts

Agraïments	i
SUMMARY	iii
RESUMEN	iv
RESUM	v
Relació d'abreviatures	vi
Taula de Continguts	vii
1 Introducció	1
1.1. Lipases.	3
1.1.1. Aplicacions de les lipases.	5
1.1.2. Font i obtenció de lipases.	6
1.1.3. Immobilització de lipases.	6
1.1.4. Aplicacions de les lipases en sistemes en absència de solvent ("Solvent-free systems").	7
1.2. <i>Rhizopus oryzae</i>.	10
1.2.1. La lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> .	10
1.3. Monoglicèrids.	12
1.3.1. Aplicacions dels monoglicèrids.	12
1.3.2. Obtenció enzimàtica de monoglicèrids.	13
1.3.2.1. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant hidròlisi de triacilglicèrids.	15
1.3.2.2. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant gliceròlisi.	16
1.3.2.3. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant esterificació d'àcids grassos o transesterificació d'èsters d'àcids grassos amb glicerol.	17
1.3.2.3.1. Ús de glicerols protegits.	19
1.4. Tocoferols	21
1.4.1. Vitamina E.	21
1.4.2. Activitat antioxidant dels tocoferols.	22
1.5. Microones.	24
	vii

1.5.1.	Aparells monomode i multimode.	25
1.5.2.	Aplicacions de la síntesi orgànica assistida per microones.	26
2	Antecedents	27
3	Objectius	31
4	Material i Mètodes	35
4.1.	Instrumentació.	37
4.1.1.	Cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC).	37
4.1.2.	Ressonància magnètica nuclear.	37
4.1.3.	Cromatògrafs de gasos.	37
4.1.4.	Microones.	37
4.2.	Material biològic.	38
4.2.1.	Llavors de soja i sèsam.	38
4.2.1.1.	Determinació de la humitat de les llavors de soja i sèsam.	38
4.2.1.2.	Determinació del greix brut de les llavors de soja i sèsam.	38
4.2.1.3.	Extracció de tocoferols de les llavors de soja i sèsam.	39
4.2.1.4.	Perfils acídics de llavors de soja.	39
4.2.2.	Preparació de miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i>.	40
4.2.2.1.	Obtenció de la suspensió d'espores de <i>Rhizopus oryzae</i> .	40
4.2.2.2.	Cultiu de <i>Rhizopus oryzae</i> .	40
4.2.2.3.	Obtenció del miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	40
4.2.2.4.	Perfil acídic de miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	40
4.3.	Material químic.	42
4.3.1.	Preparació de patrons d'èster de solketal i glicidol de les llavors de soja i sèsam.	42
4.3.1.1.	Extracció dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam.	42
4.3.1.2.	Reacció d'esterificació amb PS-Carbodiimida.	43
4.3.2.	Síntesi d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga.	43
4.3.2.1.	Mètode assistit per microones.	43
4.3.2.2.	Mètode amb escalfament convencional.	44
4.4.	Metodologies experimentals.	46
4.4.1.	Monitorització de l'activitat lipàsica de <i>Rhizopus oryzae</i>.	46

4.4.1.1.	Determinació del sistema de monitorització.	46
4.4.1.2.	Monitorització de l'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	48
4.4.2.	Obtenció dels èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos continguts a les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> en absència de solvent.	49
4.4.2.1.	Hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	49
4.4.2.1.1.	Addició de l'alcohol en un sol moment.	50
4.4.2.1.2.	Addició fraccionada de l'alcohol.	50
4.4.2.2.	Hidròlisi dels triglicèrids de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	51
4.4.3.	Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos.	52
4.4.3.1.	Desenvolupament d'un mètode assistit per microones.	52
4.4.3.1.1.	Proves preliminars.	52
4.4.3.1.1.1.	Estudi de desprotecció usant aigua com a dissolvent.	52
4.4.3.1.1.2.	Estudi de desprotecció usant etanol com a dissolvent.	53
4.4.3.1.1.3.	Estudi de desprotecció amb resina de bescanvi iònic.	54
4.4.3.1.1.3.1.	Activació de la resina de bescanvi iònic IR120Na.	54
4.4.3.1.1.3.2.	Proves preliminars amb resina de bescanvi iònic IR120Na com a catalitzador.	55
4.4.3.1.1.4.	Estudi de desprotecció utilitzant diferents alcohols i resina de bescanvi iònic IR-120Na.	56
4.4.3.1.1.5.	Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i resina de bescanvi iònic IR120Na.	57
4.4.3.1.1.6.	Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i diferents resines sulfòniques.	58
4.4.3.1.1.7.	Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga en presència de <i>tert</i> -butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament per microones.	59
4.4.3.2.	Mètodes d'escalfament convencional.	59
4.4.3.2.1.	Mètodes de referència.	60
4.4.3.2.2.	Desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític en presència d'1-pentanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.	61
4.4.3.2.3.	Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga en presència de <i>tert</i> -butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.	61
4.4.4.	Obtenció de monoglicèrids a partir de llavor de soja.	62
4.4.4.1.	1a Etapa: Hidròlisi i esterificació amb solketal dels àcids grassos de la llavors de soja catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	62
4.4.4.2.	2a Etapa: Reacció de desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de llavor de soja.	63
4.4.4.2.1.	Reacció de desprotecció en presència de <i>tert</i> -butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na.	63
4.4.4.2.2.	Reacció de desprotecció en presència d'àcid trifluoroacètic.	63
4.4.4.2.3.	Reacció de desprotecció en presència d'acetonitril i àcid clorhídric.	63
4.5.	Determinacions i mètodes d'anàlisi instrumental.	64

4.5.1. Anàlisi de tocoferols (HPLC).	64
4.5.1.1. Preparació de mostres.	64
4.5.1.2. Preparació de patrons.	64
4.5.2. Anàlisi de triglicèrids residuals d'hidròlisi (HPLC).	65
4.5.2.1. Preparació de mostres.	65
4.5.2.2. Preparació de patrons.	66
4.5.3. Anàlisi d'èsters de solketal i glicidol d'àcids grassos	66
4.5.3.1. Preparació de mostres.	67
4.5.3.2. Preparació de patrons.	67
4.5.4. Anàlisi de monoglicèrids (GC).	67
4.5.4.1. Preparació de mostres.	68
4.5.4.2. Preparació de patrons.	68
4.5.5. Anàlisi dels àcids grassos majoritaris de les llavors	68
4.5.5.1. Preparació de mostres.	68
4.5.5.2. Preparació de patrons.	69
4.5.6. Perfils acídics (GC).	69
4.5.6.1. Preparació de mostres.	69
4.5.6.2. Preparació de patrons.	69
4.5.7. Confirmació de productes per massa atòmica (GC-MS).	69
4.5.7.1. Preparació de mostres.	70
4.5.8. Anàlisi quantitativa de monoglicèrids (RMN).	70
4.5.8.1. Preparació de mostres.	70
4.5.9. Anàlisi d'èsters de solketal d'àcids grassos (RMN).	70
4.5.10. Anàlisi estadística de dades.	70
5 Resultats i Discussió	71
5.1. Material biològic.	73
5.1.1. Llavors de soja i sèsam.	73
5.1.1.1. Determinació de la humitat, matèria seca i greix brut de les llavors de soja i sèsam.	73
5.1.1.2. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol de les llavors de soja i sèsam.	74
5.1.1.3. Perfil acídic de la llavor de soja i del miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	74
5.2. Material químic.	76

5.2.1. Preparació de patrons d'èster de solketal de les llavors de soja i sèsam.	76
5.2.2. Síntesi d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga.	76
5.2.2.1. Mètode assistit per microones.	76
5.2.2.2. Mètode amb escalfament convencional.	77
5.3. Metodologies experimentals.	79
5.3.1. Monitorització de l'activitat lipàsica de <i>Rhizopus oryzae</i>.	79
5.3.1.1. Resultats de les proves preliminars.	80
5.3.1.2. Seguiment de l'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	82
5.3.2. Obtenció dels èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos continguts a les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> en absència de solvent.	83
5.3.2.1. Hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	84
5.3.2.1.1. Addició de l'alcohol en un sol moment.	84
5.3.2.1.2. Addició fraccionada de l'alcohol.	92
5.3.2.1.3. Tractament estadístic i discussió.	101
5.3.2.1.3.1. Productes de reacció.	101
5.3.2.1.3.2. Tocoferols.	103
5.3.2.2. Hidròlisi dels triglicèrids de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	104
5.3.3. Desprotecció de l'1,2-acetònid dels èsters d'àcids grassos amb solketal.	109
5.3.3.1. Desenvolupament d'un mètode assistit per microones.	109
5.3.3.1.1. Proves preliminars.	110
5.3.3.1.1.1. Estudi de les condicions de desprotecció usant aigua o etanol com a dissolvent.	110
5.3.3.1.1.2. Proves preliminars amb resina de bescanvi iònic com a catalitzador.	110
5.3.3.1.2. Estudi de desprotecció utilitzant diferents alcohols i resina de bescanvi iònic IR-120Na.	111
5.3.3.1.3. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i resina de bescanvi iònic IR-120Na.	112
5.3.3.1.4. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i diferents resines sulfòniques.	113
5.3.3.1.5. Desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketal de diferents àcids grassos de cadena llarga en presència de <i>tert</i> -butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament amb microones.	115
5.3.3.2. Mètodes d'escalfament convencional.	116
5.3.3.2.1. Mètodes de referència.	117
5.3.3.2.2. Desprotecció de l'1,2-acetònid del palmitat de solketal en presència d'1-pentanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.	118

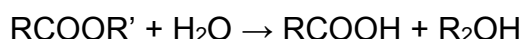
5.3.3.2.3.	Desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketal de diferents àcids grassos de cadena llarga en presència de <i>tert</i> -butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.	118
5.3.4.	Obtenció de monoglicèrids a partir de llavor de soja.	121
5.3.4.1.	1a Etapa: Hidròlisi i esterificació amb solketal dels àcids grassos de la llavors de soja catalitzada per miceli liofilitzat de <i>Rhizopus oryzae</i> .	122
5.3.4.2.	2a Etapa: Reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketal d'àcids grassos de llavor de soja.	123
5.3.4.3.	Tocoferols obtinguts als extractes finals.	124
6	Conclusions	127
7	Bibliografia	131

1 Introducció

1.1. **Lipases.**

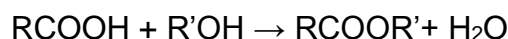
Segons el *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB), les lipases són triacilglicerol acilhidrolases (EC 3.1.1.3) ("IUBMB Nomenclature Home Page," 2014). A més de ser les principals responsables de la hidròlisi d'acilglicèrids, poden acceptar com a substrat d'altres èsters de pes molecular baix o elevat, així com èsters tiòlics, amides o èsters de poliols. Les reaccions catalitzades per lipases es poden classificar en dues categories (Gandhi, 1997):

- Hidròlisi:

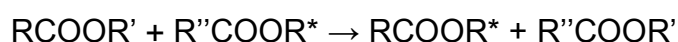


- Síntesi: Aquesta categoria es pot dividir en d'altres quatre subcategories.

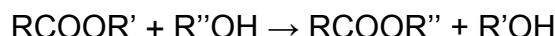
- Esterificació:



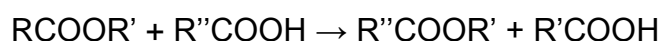
- Interesterificació:



- Alcohòlisi:



- Acidòlisi:



A més d'aquestes reaccions, les lipases poden també catalitzar d'altres reaccions com aminòlisi, amonòlisi, hidrazinòlisi, oximòlisi i perhidròlisi, permetent obtenir carboxamides, hidrazides, àcids hidroxàmics i peràcids respectivament (Faber, 1997).

Les lipases es troben àmpliament distribuïdes en espècies animals i vegetals, així com en microorganismes (genèticament modificats o no), capaços de produir-les de forma exògena o endògena (Balcão et al., 1996). Depenent de la font, les lipases poden tenir un pes molecular comprès entre 20 i 75 kDa i poden presentar activitat a pH entre 4 i 9, i a temperatures entre 25 i 70 °C (tot i que el seu òptim es troba entre 30 i 40 °C) (Castro et al., 2004). A més de selectivitat per substrat (capacitat d'hidrolitzar un tipus particular d'èster d'àcid gras), presenten regioselectivitat (capacitat d'hidrolitzar grups carboxílics en posició *sn*-1 i *sn*-3, o bé en posició *sn*-2) i estereoselectivitat (capacitat de diferenciar entre dos enantiòmers en un substrat racèmic) (Muralidhar et al., 2002).

La naturalesa del medi de reacció i especialment el contingut d'aigua, influeix de manera notable a l'activitat enzimàtica. Tot i que el medi natural dels enzims és un medi aquós, és possible també l'ús de sistemes no aquosos. Aquests sistemes permeten una millora de la solubilitat dels productes de reacció de baixa polaritat; la inhibició de reaccions secundàries induïdes per l'aigua; evitar l'equilibri termodinàmic desfavorable de nombrosos processos en medi aquós i millorar la recuperació dels productes de reacció en solucions aquoses. En un medi no natural com és un medi no aquós, les lipases no només mantenen la seva activitat, també poden mostrar noves propietats, com una elevada estabilitat, una alteració de la selectivitat (que pot ser controlada mitjançant la modificació del solvent) i una "memòria molecular", o capacitat de l'enzim de modificar la seva capacitat catalítica enfront a un substrat relacionat amb un lligand amb el que ha estat en contacte prèviament, sota unes determinades condicions d'obtenció (Adamczak and Krishna, 2004; Klivanov, 2003; Torres et al., 2000). Tot i això, si l'activitat d'aigua del medi, a_w , és massa baixa, l'activitat enzimàtica pot ser molt reduïda o fins i tot inexistent; si és massa elevada, per contra, augmenta el nombre de reaccions no desitjades que es poden donar, disminuint l'activitat enzimàtica, normalment degut a l'agregació del catalitzador (Halling, 1992). Els dissolvents hidrofílics tendeixen a allunyar les molècules d'aigua de la superfície de l'enzim, fent disminuir l' a_w , tot i que això es pot regular mitjançant l'addició de petites quantitats d'aigua al medi (Adamczak and Krishna, 2004; Chamorro et al., 2001; Zaks and Klivanov, 1988).

Modificant el medi de reacció de les lipases (dissolvent del medi, addició d'additius com amines quirals o aquirals, èters corona o sals), es pot alterar també la enantiopreferència d'aquestes (Berglund, 2001; Hirose et al., 1992).

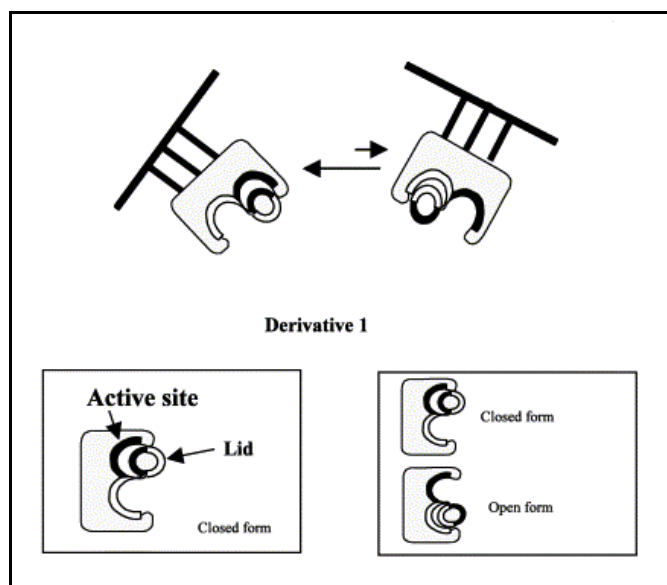


Figura 1. Possibles conformacions de les lipases. Adaptat de Palomo et al., 2002.

Les lipases poden existir en dues formes estructurals possibles (Figura 1): La primera, en que el lloc actiu de la lipasa queda aïllat del medi de reacció per una cadena helicoidal d'un oligopèptid anomenada "lid" (tapa), és considerada

la forma inactiva (tancada); L'altra, que presenta la "tapa" desplaçada i el lloc actiu exposat al medi de reacció, és considerada la forma activa de la lipasa (oberta). En un medi aquós homogeni, es troba un equilibri entre aquestes dues estructures, desplaçat cap a la forma tancada. Si existeix interacció amb una interfase hidrofòbica, com gotes d'oli, proteïnes hidròfobes, altres lipases o suports hidrofòbics, la estructura oberta s'adsorbeix a aquesta interfase i l'equilibri es desplaça llavors cap a la forma oberta (Cabrera et al., 2009; Palomo et al., 2002).

1.1.1. Aplicacions de les lipases.

L'interès de les lipases pel que fa a les nombroses aplicacions industrials radica en la seva capacitat de catalitzar la formació d'una àmplia varietat de productes amb una alta puresa, i consegüentment alt valor afegit, que resulta de la seva especificitat pel substrat i la seva estereoespecificitat. A més, degut a les baixes energies d'activació involucrades als processos enzimàtics, l'ús de temperatures de reacció baixes implica una reducció de consum energètic i una disminució de la degradació tèrmica de reactius i productes que fa que les lipases tinguin un gran interès en processos industrials (Balcão et al., 1996).

L'àmbit d'aplicació industrial de les lipases inclou les indústries d'oleoquímics no alimentaris (sabons, surfactants, etc.), formulació de detergents, manufactura de paper o la indústria alimentària. A més, la seva versatilitat permet la seva utilització com a biocatalitzador en síntesi orgànica de molècules específiques per a les indústries d'agroquímics, farmacèutica i química fina (Schmid and Verger, 1998).

La substitució de procediments químics tradicionals per a la modificació i la derivatització de greixos, olis i substàncies relacionades ha esdevingut un dels camps més importants on s'ha desenvolupat l'aplicabilitat de lipases a escala industrial (Gandhi, 1997). Per exemple, el procés fisicoquímic per a la producció d'àcids grassos mitjançant hidròlisi d'olis i greixos, implica pressions de l'ordre de 45 atm i temperatures al voltant de 250 °C durant un temps de 2 h de reacció, amb un rendiment de 96-98 % d'hidròlisi. És necessària la destil·lació dels àcids grassos resultants per tal d'eliminar el color i els subproductes. L'alternativa enzimàtica del procés industrial, la hidròlisi enzimàtica, es porta a terme a pressió atmosfèrica y temperatura entre 40 °C i 60 °C, permetent un cost energètic menor. El cost global es veu reduït també pel fet de que l'equipament industrial necessari no té perquè ser resistent a les condicions que implica el procés fisicoquímic com les altes pressions o corrosió provocada pels catalitzadors. Els productes obtinguts mitjançant aquest bioprocés tenen millor olor i color i són generalment més purs, ja que es minimitza la degradació tèrmica, permetent, a més, l'obtenció d'àcids grassos a partir d'olis inestables que continguin àcids grassos amb múltiples insaturacions (Gandhi, 1997; Park et al., 1988).

Als últims anys s'ha estès l'aplicació de lipases com a biocatalitzador per a l'obtenció de biodièsel (essencialment èsters d'àcids grassos), gràcies als

avantatges respecte la síntesi química tradicional: les lipases no només presenten una alta estabilitat en les condicions de reacció, també poden ser reutilitzades varies vegades sense pèrdua d'activitat (Adamczak et al., 2009).

1.1.2. Font i obtenció de lipases.

Tot i que les lipases són produïdes per microorganismes, plantes i animals, les lipases comercials disponibles són principalment d'origen fúngic o bacterià, degut principalment als menors costos de producció respecte les altres fonts naturals i a la facilitat de modificació de les seves propietats (Akoh et al., 2007; Antczak et al., 2009; Jaeger and Reetz, 1998). A la Taula 1 es troben diferents exemples de lipases comercials. El seu cost d'obtenció, però, limita l'aplicabilitat per a l'obtenció a gran escala de biocombustible i altres productes químics, principalment degut als processos de purificació dels enzims. Això ha fet que s'intensifiqués la recerca de microorganismes com bacteris, llevats i fongs filamentosos que poden, potencialment, ser utilitzats com a biocatalitzadors en forma de cèl·lules senceres o "whole-cells", gràcies a la presència de proteïnes funcionals a la superfície cel·lular (Fukuda et al., 2008). El fet de no necessitar purificació addicional suposa un avantatge significatiu respecte a les lipases purificades (Jin and Bierma, 2010; Zeng et al., 2006). D'altra banda, l'avanç en el coneixements dels gens que codifiquen per l'expressió de lipases, ha permès l'ús de cèl·lules senceres de microorganismes transformats als quals s'expressen lipases caracteritzades d'altres microorganismes (Adachi et al., 2013).

Taula 1. Exemples de lipases microbianes comercials. Adaptat de Jaeger and Reetz, 1998.

Origen	Organisme productor	Aplicació biotecnològica	Comercialització
Fúngic	<i>Candida rugosa</i> ^a	Síntesi orgànica	Amano, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Fluka, Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Síntesi orgànica	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> ^b	Additiu per a detergents	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Processat d'aliments	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano
Bacterià	<i>Burkholderia cepacia</i> ^c	Síntesi orgànica	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Additiu per a detergents	Genencor
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Additiu per a detergents	Genencor
	<i>Chromobacterium viscosum</i> ^d	Síntesi orgànica	Asahi, Biocatalysts

^aAbans anomenat *Candida cylindracea*
^bAbans anomenat *Humicola lanuginosa*
^cAbans anomenat *Pseudomonas cepacea*
^dLa lipasa de *C. viscosum* és idèntica a la lipasa de *Burkholderia glumae*

1.1.3. Immobilització de lipases.

La immobilització d'enzims pot ser definida com la unió dels enzims lliures o solubles a diferents tipus de suports, resultant en la reducció o pèrdua de la mobilitat d'aquests (Ali Khan and Alzohairy, 2010). La raó principal per a la immobilització d'enzims és l'aïllament del biocatalitzador dels productes de

reacció i la possibilitat de reutilització per tal d'incrementar la seva productivitat. Per a les reaccions catalitzades per lipases, la immobilització pot permetre, a més, establir unes condicions de reacció en absència d'aigua necessàries per a la síntesi d'èsters i la interesterificació (Christensen et al., 2003). La immobilització de les lipases sobre suports hidrofòbics pot permetre l'activació de l'enzim donat que l'equilibri entre les dues possibles formes estructurals de les lipases es manté a la major part de lipases immobilitzades (veure Figura 1) (Cabrera et al., 2009; Palomo et al., 2002).

Existeixen diverses tècniques per a la immobilització d'enzims. Els aspectes a tenir en compte per al desenvolupament o l'elecció d'una tècnica d'immobilització són (Holm and Cowan, 2008):

- La immobilització ha d'incrementar l'estabilitat tèrmica i la vida útil de l'enzim.
- L'enzim ha de mantenir la seva activitat després del procés d'immobilització.
- El procés d'immobilització ha de ser reproduïble.
- Ha de ser un procés eficient econòmicament i no consumir massa recursos per a la producció.
- Els materials i equipaments per a la producció han de ser adequats per a la obtenció d'enzims d'una puresa acceptable per a una aplicació determinada.
- Des d'un punt de vista d'aplicació, l'enzim ha de ser físicament robust.

Les tendències actuals de la immobilització de lipases es mouen cap a la cerca de nous suports i de noves tècniques d'immobilització. D'entre diferents suports, els nanomaterials i els suports porosos amb elevada àrea superficial reporten bons resultats (Kalantari et al., 2012). Respecte a les noves aproximacions a la immobilització de lipases, s'ha obtingut bons resultats amb la immobilització sobre la superfície cel·lular de la mateixa cèl·lula de la qual s'obté l'enzim o sobre cèl·lules diferents (Shu et al., 2010).

1.1.4. Aplicacions de les lipases en sistemes en absència de solvent (“Solvent-free systems”).

Els dissolvents s'empren als processos industrials principalment com a suport que permet el transport de sòlids, la dissolució de reactius immiscibles, la formació d'una fase homogènia per tal de superar els efectes de transferència de massa i la millora de la velocitat de les reaccions. També contribueixen a dissipar la calor de reacció i s'utilitzen com a diluents per millorar la selectivitat de les reaccions. No obstant això, són una font principal de compostos orgànics volàtils (VOCs) i contaminació (Yadav and Thorat, 2012). Per tal de minimitzar les quantitats de residus tòxics i subproductes derivats dels processos químics, és necessari el disseny de nous mètodes sintètics més respectuosos amb el medi ambient. En aquests processos, els

dissolvents orgànics són especialment importants, ja que normalment s'utilitzen en grans quantitats.

Tot i que als processos industrials els dissolvents orgànics són reciclats sempre que és possible, l'eficiència de la recuperació rarament és completa. Això significa que una part dels solvents utilitzats per la indústria química, inevitablement acabarà al medi ambient. Actualment, alguns dels dissolvents alternatius que s'investiguen per a l'aplicació en síntesi química orgànica són els líquids iònics, l'aigua i els gasos en estat supercrític, en particular CO₂, tot i que, des d'un punt de vista ecològic, la millor alternativa és l'absència de solvent (Metzger, 1998). A part de la reducció de l'impacte a l'entorn, altres beneficis dels processos en absència de dissolvent, o "solvent-free", són les reduccions dels costos de producció, de les dimensions dels reactors que hi intervenen i possibles disminucions dels temps de reacció. La disminució de la mida dels reactors es tradueix en una disminució de la inversió (Yadav and Thorat, 2012). Com a resultat d'això, als últims anys han augmentat a un ritme constant els treballs on es presenten diferents tipus de reaccions en absència de solvent, com polimeritzacions, addició de radicals, reaccions iòniques, reaccions en fase sòlida i reaccions fotoquímiques (Walsh et al., 2007). Cal afegir que l'absència de solvent té un interès particular per a la indústria alimentària, on s'apliquen estrictes regulacions pel que fa a l'ús de dissolvents orgànics.

L'interès pel que fa a l'ús de sistemes lliures de solvent a les reaccions catalítiques enantioselectives i a les transformacions catalitzades per enzims, també ha anat en augment, però de manera més moderada en comparació amb l'interès per altres reaccions orgàniques (Walsh et al., 2007).

A la Taula 2 es descriuen diferents tipus de biotransformacions amb sistemes lliures de solvent classificades en funció de les condicions de cada síntesi en concret. Segons aquesta classificació, les reaccions es poden portar a terme amb enzims immobilitzats o en la seva forma lliure, amb un o més substrats en proporcions properes a l'estequiometria o amb un d'ells en excés. A més, es poden donar en sistemes amb barreja monofàsica, bifàsica líquid-líquid o bifàsica líquid-sòlid (Yamane, 2001).

Taula 2. Classificació de les biotransformacions en absència de solvent. Adaptada de Yamane, 2001.

Nombre de Fases	Monofàsic (homogeni, líquid)
	Bifàsic (heterogeni, líquid)
	Bifàsic (heterogeni, sòlid)
Nombre de Substrats	Un substrat
	Dos substrats
	Proporcions properes a l'estequiometria Excés d'un dels substrats
Sistemes complexos	Substrat fos/Mescles eutèctiques
	Substrat derivatitzat per tal d'incrementar la miscibilitat
Enzim	Lliure (pols d'enzim en suspensió)
	Immobilitzat a un suport sòlid

Les reaccions catalitzades per lipases tenen lloc a la interfase entre la fase aquosa que conté l'enzim i la fase oli (Al-Zuhair et al., 2003). Un sistema en absència de dissolvent no és més que una barreja dels reactants on es donen aquestes dues fases. La fase aquosa té dues funcions: dissoldre la lipasa i proveir d'un dels reactants. El rati aigua/oli és un factor important que afecta a la velocitat de reacció i està relacionat amb l'àrea de la interfase. Aquesta àrea, doncs, que es veu afectada pel sistema de barrejat i la concentració del substrat, determina la velocitat de reacció (Huang et al., 2010).

La utilització de lipases en sistemes en absència de solvent a escala industrial inclou l'obtenció de triglicèrids simètrics (1,3-diestearoil-2-oleoilglicerol, 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerol o 1,3-behenoil-2-oleoilglicerol), d'additius alimentaris i fàrmacs d'alt valor (èsters simples d'alquil i terpenil com isovalerat d'etil, oleat d'heptil, acetat de geranil i acetat de citronelil), glicèrids rics en àcids grassos poliinsaturats per aplicacions biomèdiques, èsters d'alcohols C2-C8 per a aplicacions en cosmètics (miristat d'isopropil, palmitat d'isopropil o palmitat de 2-etilhexil) (Yamane, 2001).

1.2. *Rhizopus oryzae*.

1.2.1. La lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Rhizopus oryzae produeix principalment dos tipus de lipases amb valors de massa molecular de 34 i 31 kDa. La lipasa de 34kDa (ROL 34) es troba lligada a la paret cel·lular, mentre que la lipasa de 31 kDa (ROL 31) està lligada a la membrana cel·lular (Figura 2). Durant el cultiu en suspensió, qualsevol lipasa produïda serà excretada al medi, i la quantitat de lipasa lligada a la membrana cel·lular decau amb el temps. En canvi, s'ha comprovat que grans quantitats de lipasa queden retingudes entre les cèl·lules al realitzar una immobilització del miceli fúngic durant el seu cultiu (Fukuda et al., 2009). Tot i que la relació entre la morfologia cel·lular i la secreció d'enzim depèn de la soca fúngica i el tipus d'enzim, la immobilització cel·lular va inhibir la secreció de ROL31 al medi de cultiu de la soca IFO 4697 de *R. oryzae* (Hama et al., 2006). Igualment s'ha de considerar que la producció de lipasa, extracel·lular o lligada a la cèl·lula, per part de *R. oryzae* es veu fortament condicionada per les condicions del cultiu (Gandolfi et al., 2001).

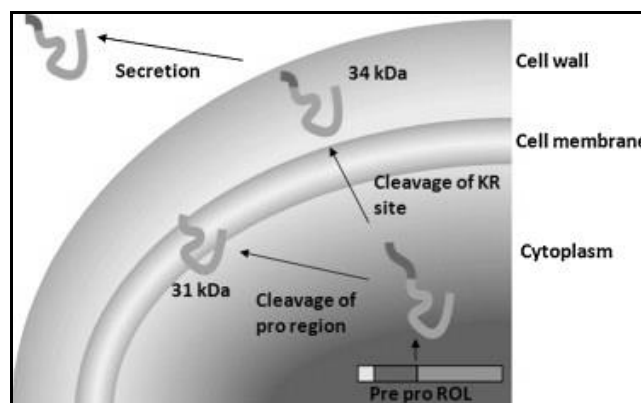


Figura 2. Esquema de la maduració de la lipasa de *R. oryzae* (ROL) i localització a les cèl·lules. L'ancoratge de la regió Pro del precursor de la lipasa Pre-pro ROL determina la producció de dos lipases, ROL 31, localitzada a la membrana cel·lular, i ROL 34, que és transportada a la paret cel·lular, des d'on pot ser secretada a l'exterior (Fukuda et al., 2009).

La purificació dels enzims lligats a les cèl·lules pot ser costosa i de vegades resulten relativament inactius fora del seu medi cel·lular o parcialment hidrolitzats per altres enzims durant els procediments de fraccionament cel·lular. Tot i això, l'activitat dels enzims encara lligats a la cèl·lula microbiana pot ser directament explotada en diverses biotransformacions emprant cèl·lules senceres liofilitzades (Bell et al., 1978; Converti et al., 2002; Molinari et al., 2000, 1995).

Durant el procés de liofilització, l'estructura secundària dels enzims pateix un canvi de conformació, provocant una pèrdua d'activitat. L'addició de crioprotectors i lioprotectors, com sucres i ciclodextrines, pot prevenir el dany estructural de les lipases a totes dues fases del procés de liofilització. L'efecte

dels diferents additius sobre l'activitat de la lipasa y sobre la seva estabilitat durant el procés de liofilització ve determinada, entre d'altres possibles factors, pel tipus i la concentració dels additius, el temps de liofilització o el contingut d'aigua (Shu et al., 2010).

Entre d'altres exemples d'aplicació, s'ha utilitzat cèl·lules senceres liofilitzades de diferents soques de *R. oryzae* per a l'obtenció d'èsters alifàtics amb aromes característics, amb rendiments satisfactoris d'obtenció de butirat de geranil mitjançant una addició tant semicontínua com contínua dels substrats (144 g/L en 264 h i 142 g/L en 48 h respectivament) (Molinari et al., 1995); per a la producció de biodièsel en absència de solvent o amb *tert*-butanol com a solvent, a partir d'olis de soja (rendiments entre 70-90%), de jatrofa (rendiment de 90%) i de llavor de raïm (rendiments entre 60-90%) (Fukuda et al., 2008); per a la resolució de barreges racèmiques d'alcohols secundaris mitjançant esterificació en solvent orgànic (Molinari et al., 1998); per a la esterificació enantioselectiva de l'àcid (*R,S*)-2-fenilpropanoic amb diferents alcohols en presència de dissolvents orgànics (Gandolfi et al., 2001); per a l'obtenció d'èsters de metil i de solketil a partir dels acilglicèrids continguts en diferents llavors oleaginoses en absència i presència de dissolvents orgànics, aconseguint rendiments moderats i alts (Torres et al., 2003b) o per a l'obtenció de biodièsel a partir d'oli de fregit usat (Balasubramaniam et al., 2012).

En quant a lipasa immobilitzada de *R. oryzae*, s'ha emprat per a la obtenció d'acetat de butil (component principal de l'aroma de pinya), amb Celite 545 com a suport (Ben Salah et al., 2007); per a la síntesi, en presència i absència de solvent, d'oleat de 1-butil en diversos suports d'immobilització (CaCO₃, Celite 545, Silica gel 60, Carboximetil Sephadex i Amberlite IRC-50); per a la resolució enantioselectiva de (*S*)-2-(1-hidroxi-3-butenil)-5-metilfuran, amb suports de sol-gel i resina Sepabeads EC-EP; per a la síntesi de triglicèrids estructurats, amb suport de Accurel MP1000 (Muñío et al., 2009); per a la interesterificació de greix làctic i oli de soja, amb una matriu híbrida de polisiloxà–alcohol polivinílic com a suport (Paula et al., 2010) o per a l'obtenció de margarines lliures d'àcids grassos trans mitjançant la transesterificació de derivats d'oli de palma (Sellami et al., 2012).

Les últimes aproximacions a l'ús de la lipasa de *R. oryzae* han estat conduïdes mitjançant l'aplicació de la tecnologia recombinant per tal de fer expressar el gen que codifica per la producció de l'enzim en un altre microorganisme, com *Escherichia coli* (Di Lorenzo et al., 2005) o *Pichia pastoris* (Barrigón et al., 2013; Ben Salah et al., 2009) i les biotransformacions en nous medis de reacció com líquids iònics (Arai et al., 2010; Oromí-Farrús et al., 2009) o CO₂ en estat supercrític (Chen et al., 2013; Hobbs and Thomas, 2007; Kawakami et al., 2009).

1.3. Monoglicèrids.

L'estructura dels monoacilglicerols (també anomenats monoglicèrids o MAG's) està formada per una molècula de glicerol esterificat amb un radical acil en posició 1 o 3, 1(3)-monoglicèrid, o 2, 2-monoglicèrid (Figura 3).

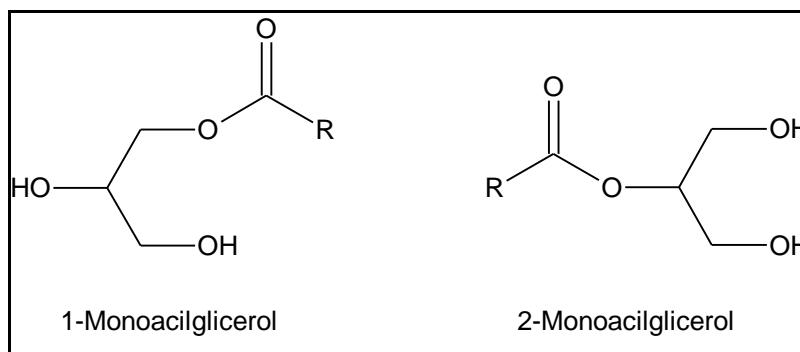


Figura 3. Estructura dels monoglicèrids.

1.3.1. Aplicacions dels monoglicèrids.

L'interès dels monoglicèrids recau en la seva estructura amfipàtica que comprèn una cadena alifàtica lipofílica i dos grups hidroxils a la part hidrofílica. Aquesta estructura provoca un efecte surfactant que estabilitza les emulsions (Eychenne and Mouloungui, 1999).

Els monoglicèrids són els emulsionants més emprats a les indústries alimentària, farmacèutica i cosmètica (Thude et al., 1997). A la indústria alimentària s'empenen per estabilitzar emulsions a salses, aliments fornejats, margarines o productes làctics (Kaewthong et al., 2005), a la indústria farmacèutica, com a aglutinants per a comprimits o com a emol·lients per a fàrmacs transdèrmics d'alliberació lenta i a la indústria cosmètica com a agents texturitzants (Jackson and King, 1997). S'ha trobat un possible efecte preventiu de desordres cardiovasculars per a alguns monoacilglicerols que contenen àcids grassos *n*-3-poliinsaturats com l'àcid eicosapentaenoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA) (Bornscheuer, 1995). Algunes altres aplicacions de monoglicèrids concrets es troben recollides a la Taula 3 (Freitas et al., 2008).

A més del seu ús com a emulsionants, diferents monoglicèrids han mostrat activitats bacteriostàtiques i bactericides. Per exemple, el monolaurat de gliceril inhibeix el creixement i la producció de toxina de *Staphylococcus aureus* (Kelsey et al., 2006), i monoglicèrids amb llargades de cadena del grup acil d'entre C10-C14 tenen propietats bactericides contra *Helicobacter pylori* (Petschow et al., 1996).

Taula 3. Exemples d'aplicació de diferents monoglicèrids. Adaptat de Freitas et al., 2008.

Monoglicèrid	Aplicació
Monopentadecanoilglicerol	Additiu per a productes capil·lars
Monodecanoilglicerol	Presenta propietats antivíriques i antimicrobianes
Monododecanoilglicerol	Presenta propietats antivíriques, antibacterianes i antiprotozoiques
Monooctadecenoilglicerol	Utilitzada com a sistema alliberador de fàrmacs
Monoeicosatetraenoilglicerol	Lligand endogen receptor de cannabinoides en teixits cerebrals i intestinals
Monoetanoilglicerol	Millora la qualitat de greixos com per exemple, la margarina
Lactat de monogliceril	Utilitzat a la indústria de dolços i pastes fornejades
Succinat de monogliceril	Agent modificador de masses
Citrat de monogliceril	Emulsionant altament hidrofílic, utilitzat en margarines, productes làctics i salses

1.3.2. Obtenció enzimàtica de monoglicèrids.

L'obtenció industrial de monoglicèrids per via química es porta a terme mitjançant un procés continu o discontinu de gliceròlisi d'olis i greixos a alta temperatura (220-250 °C) emprant catalitzadors inorgànics alcalins sota atmosfera de nitrogen (Bornscheuer, 1995; Singh and Mukhopadhyay, 2012).

El producte obtingut d'aquesta manera presenta, degut als subproductes de la reacció, un color enfosquit a més de sabors i aromes indesitjables. A més, el rendiment d'obtenció de monoglicèrids és baix o moderat (30-60 %) (Kaewthong et al., 2005; Yang et al., 2005). La destil·lació molecular és un procés que cal afegir en el cas dels monoglicèrids destinats a la indústria alimentària, degut a que les barreges de diferents acilglicerols no funcionen tan bé com a emulsionants com el producte pur (Bornscheuer, 1995).

Els diferents desavantatges que presenta la via química han donat lloc a la via enzimàtica com una alternativa vàlida per a l'obtenció de monoglicèrids. L'ús de lipases, com a biocatalitzadors del procés, permet portar a terme les reaccions a baixes temperatures i pressió atmosfèrica (Yang et al., 2005).

Existeixen tres estratègies sintètiques principals per a la síntesi enzimàtica de monoglicèrids (Figura 4) (Bornscheuer, 1995; Freitas et al., 2008):

- A. La hidròlisi selectiva de triglicèrids emprant lipases 1,3-regioespecífiques, amb l'obtenció de 2-monoglicèrids.
- B. La gliceròlisi d'olis i greixos, amb 1-monoglicèrids com a producte predominant.
- C. L'esterificació d'àcids grassos o d'èsters d'àcids grassos amb glicerol, amb l'obtenció d'una barreja de monoglicèrids amb 1-monoglicèrids com a producte predominant.

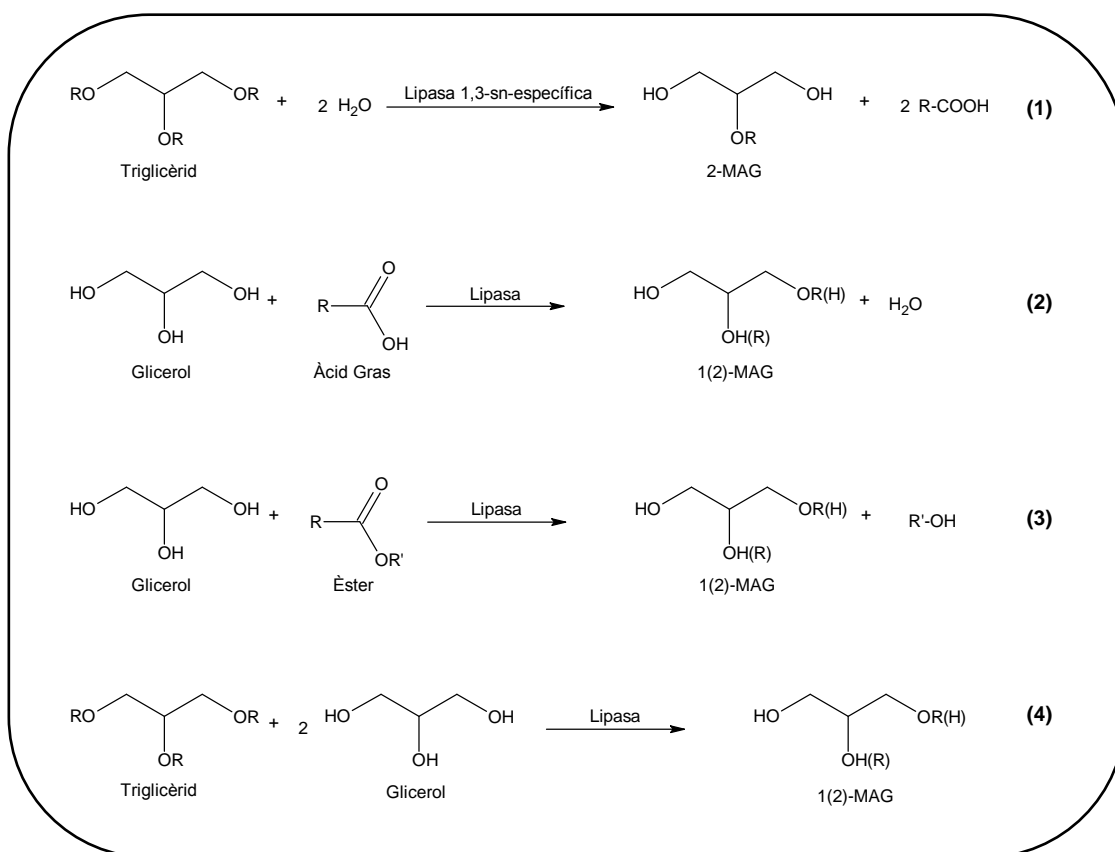


Figura 4. Diagrama esquemàtic dels mètodes enzimàtics per a la obtenció de monoglicèrids. Hidròlisi selectiva amb lipases 1,3-*sn*-específiques (equació 1), esterificació d'àcids grassos (equació 2) o transesterificació d'èsters (equació 3) amb glicerol i gliceròlisi de triglicèrids (equació 4). Per facilitar l'esquematzació, no es mostren tot els subproductes de les reaccions. R: radical acil; R': radical alquil. Adaptat de Bornscheuer, 1995.

Alguns exemples d'aquests tres mètodes es troben descrits a la Taula 4 (Freitas et al., 2008).

Taula 4. Síntesi de monoglicèrids via catàlisi enzimàtica mitjançant diferents mètodes (A: Hidròlisi; B: Gliceròlisi; C: Esterificació o transesterificació. Adaptada de Freitas et al., 2008 i Weiss, 1990. Abreviatures: MTBE, *tert*-butil metil èter; LRO, lipasa de *R. oryzae* (fúngica); LPF, lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (bacteriana); LHL, lipasa de *Humicola lanuginosa* (fúngica); LPC, lipasa de *Pseudomonas cepacea* (bacteriana); LPP, lipasa de pàncreas porcí (d'origen animal); LCV, lipasa de *Chromobacterium viscosum* (bacteriana); LPCam, lipasa de *Penicillium camembertii* (fúngica); LCR, lipasa de *Candida rugosa* (fúngica); LRM, lipasa de *Rhizomucor miehei* (fúngica); LCA-B, lipasa de *Candida antarctica* B (fúngica).

Mètode	Receptor del grup acil	Donador del grup acil	Sistema de reacció	Rendiment (%)	Lipasa
A	Aigua	Oli de palma	Micel·les reverses	78	LRO
	Etanol	Trioleïna	Etanol	84	LPF
	Butanol	Tricaprina	Butanol/dos fases	87	LHL
	Etanol	Tripalmitina	MTBE	97	LRO
	Etanol	Trilaurina	Etanol	75	LPC
	Aigua	Trioleïna	Tampó fosfat	67	LPP
B	Glicerol	Oli de palma	Micel·les reverses	30	LRO
	Glicerol	Sèrum boví	Sense solvent	72	LPF
	Glicerol	Trioleïna	Micel·les reverses	50	LCV
	Glicerol	Trioleïna	Sense solvent	96	LCV
C	Glicerol	Àcid pentadecà	Sense solvent	96	LPCam
	Glicerol	Àcid oleic	Tamís molecular/Sense solvent	74	LPCam
	Glicerol	Àcid làuric	Micel·les reverses	55	LCR
	Glicerol	Àcid làuric	Micel·les reverses	62	LRO
	Glicerol	Àcid oleic	Tamís molecular/Hexà	72	LPCam
	Glicerol	Laurat de vinil	Èter/Hexà 1:1	90	LRM
	Glicerol	Àcid oleic	Micel·les reverses	42	LRM
	Glicerol	Àcid làuric	Micel·les reverses	11	LPC
	Glicerol	Oleat d'etil	Acetona	68	LCA-B
	Glicerol	Àcid palmític	Hexà	61	LRO

1.3.2.1. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant hidròlisi de triacilglicèrids.

L'ús de lipases 1,3-*sn*-específiques permet la hidròlisi dels enllaços èster en posició 1 del glicerol, evitant que la reacció d'hidròlisi de triglicèrids sigui completa. D'aquesta manera, s'obté 2-monoglicèrid, tot i que amb baix rendiment, ja que per cada mol de triacilglicèrid només es produeix 1 mol de 2-monoglicèrid davant dels 2 mol d'àcids grassos lliures obtinguts. A més, és dona una migració espontània del radical acil del monoglicèrid, de la posició 2 a la posició 1 del glicerol (Compton et al., 2007; Holmberg and Osterberg, 1988).

Algunes estratègies permeten l'augment del rendiment d'obtenció de 2-monoglicèrid, com la precipitació dels àcids grassos formats mitjançant l'addició

de sal, desplaçant així l'equilibri cap a la formació de 2-monoglicèrid (Bornscheuer, 1995), o la utilització d'un sistema de reacció amb microemulsions (Holmberg and Osterberg, 1988).

A la Taula 5 es troben alguns exemples de preparació de monoglicèrids mitjançant hidròlisi de triglicèrids emprant diferents sistemes de reacció i diferents substrats per al biocatalitzador.

Taula 5. Exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant hidròlisi enzimàtica de triglicèrids.

Substrat	Biocatalitzador	Sistema de reacció	Rendiment	Referència
Trioleïna, triglicèrids poliinsaturats	Novozym 435	Sense Solvent	72-94%	(Irimescu et al., 2002)
Trioleïna	Enzim cru aïllat del tracte intestinal de <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Solució tampó Tris-HCl pH 7,7	70%	(Gottsche et al., 2005)
Oli vegetal	Enzim cru de llavors de civada	Solucions tampó a diferents pH (valors de pH de 5 a 11)	20%	(Piazza and Foglia, 2006)
Oli de tonyina	Lipasa AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>tert</i> -butil metil èter	25%	(Pawongrat et al., 2007)
Oli de peix, trioleïna, triglicèrids monoinsaturats i poliinsaturats	Enzim cru aïllat del tracte digestiu de salmó	Solució tampó fosfat 100mM pH 8,0	20%	(Bogevik et al., 2008)
Oli de <i>Echium plantagineum</i> i oli de peix	Lipasa pancreàtica porcina	Solució tampó TRIS pH 8,0	79%	(Rincón et al., 2013)

1.3.2.2. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant gliceròlisi.

El glicerol ha esdevingut una elecció interessant per a la producció biotecnològica de compostos d'interès com els monoglicèrids, degut a les grans quantitats que són generades amb la producció de biodièsel (Kapoor and Gupta, 2012). A diferència de la reacció d'hidròlisi, l'obtenció de monoglicèrids mitjançant gliceròlisi de triglicèrids permet la conversió de tots tres àcids grassos en els seus corresponents monoglicèrids. És possible l'ús de lipases regioselectives i no regioselectives, ja que s'ha observat una posterior migració del grup acil del monoglicèrid format de manera que s'estableix un equilibri en la concentració dels productes formats amb una relació 9:1 (1-MAG:2-MAG). Aquest equilibri s'assoleix en un temps que depèn fortament de la temperatura, la polaritat i el pH del medi en que es troba i que pot estar entre els 15 min i les 48 h (Compton et al., 2007; Fureby et al., 1996).

Els rendiments d'obtenció de monoglicèrids mitjançant gliceròlisi enzimàtica són en general baixos (30-50%) degut a l'equilibri desfavorable de la reacció. S'ha seguit diverses estratègies per tal de desplaçar aquest equilibri cap a la formació de monoglicèrid, com són la presència o absència de dissolvents orgànics, sistemes en estat sòlid, micel·les reverses o sistemes trifàsics (Freitas et al., 2008; Yang et al., 2005).

A la Taula 6 es troben alguns exemples d'obtenció enzimàtica de monoglicèrids mitjançant gliceròlisi enzimàtica de triglicèrids.

Taula 6. Exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant gliceròlisi enzimàtica. Adaptada de Freitas et al., 2008.

Substrat	Biocatalitzador	Sistema de reacció	Rendiment
Oli de palma	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>	Acetona/Isooctà	56%
Mantega	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacea</i>	Sense solvent	22%
Oli de palma	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i>	Sense solvent	14%
Oli de gira-sol	Novozym 435	<i>tert</i> -Butanol	60-70%
Oli de gira-sol	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	<i>tert</i> -Butanol/ <i>tert</i> -Pentanol	47-56%

1.3.2.3. Síntesi enzimàtica de monoacilglicèrids mitjançant esterificació d'àcids grassos o transesterificació d'èsters d'àcids grassos amb glicerol.

Els productes de la reacció enzimàtica d'esterificació d'àcids grassos o de la transesterificació d'èsters d'àcids grassos amb glicerol poden ser, en funció de la regioselectivitat de la lipasa utilitzada: 1 i 2-monoglicèrids, 1,3 i 1,2-diglicèrids, triglicèrids i, només en el cas de la transesterificació, alcohol (Figura 5). Les lipases 1,3-específiques permeten obtenir com a productes de reacció 1-monoglicèrids i 1,3-diglicèrids. Quan les lipases emprades com a biocatalitzador no són regioespecífiques, els productes obtinguts són 1 i 2-monoglicèrids, 1,3 i 1,2-diglicèrids i triglicèrids. A més, es pot donar migració del radical acil dins de les estructures de monoglicèrids i diglicèrids (Freitas et al., 2008).

Les condicions de reacció han de dirigir la catàlisi enzimàtica cap a la reacció de síntesi i no cap a la hidròlisi. El factor més important que permet això és el control de la quantitat i l'activitat d'aigua del sistema (Bornscheuer, 1995). S'han seguit diferents estratègies per tal d'evitar la presència d'aigua al medi: portar a terme la reacció sota pressió reduïda (Miller et al., 1988) o en presència d'agents dessecants (tamisos moleculars o d'altres) (Torres et al., 2002).

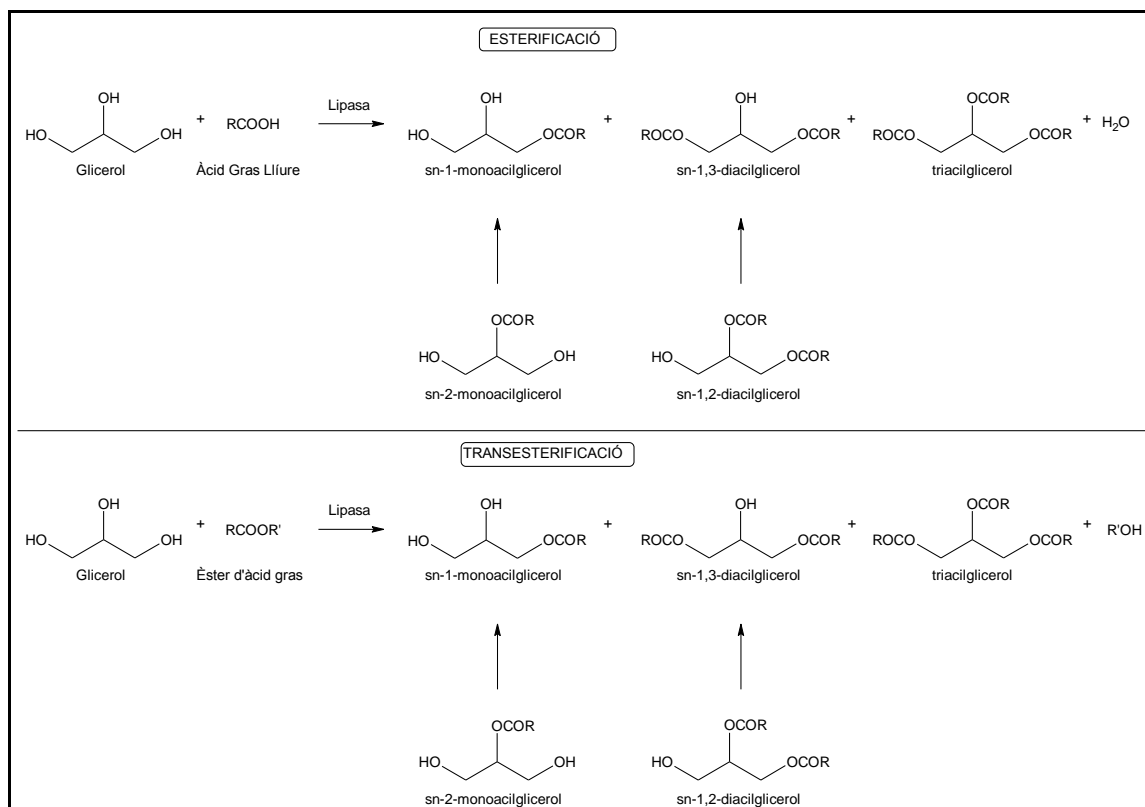


Figura 5. Reaccions d'esterificació i transesterificació d'àcids grassos o èsters d'àcids grassos amb glicerol catalitzades per lipases. Adaptada i ampliada de Monteiro et al., 2003.

Altres factors que influencien en les reaccions enzimàtiques d'esterificació i transesterificació són:

- La llargada de la cadena del radical acil: algunes lipases presenten selectivitat en funció de la llargada de cadena del radical acil, tant si el donador d'acil és un àcid (Ottosson and Hult, 2001) com si és un anhidrid d'àcid (Batovska et al., 2004).
- Inhibició del catalitzador pel substrat alcohol: diferents estudis mostren una inhibició reversible de l'activitat enzimàtica en presència d'excés de l'alcohol emprat com a substrat (Pfeffer et al., 2007).
- Polaritat del solvent: la baixa solubilitat del glicerol en solvents apolars orgànics redueix la velocitat de la reacció i afavoreix la reacció d'acilació dels monoglicèrids i diglicèrids que es van formant (Freitas et al., 2008). Per tal d'evitar això, s'han seguit diferents estratègies de modificació de la polaritat del medi de reacció, com l'ús de diferents tipus de solvents o, en absència d'aquest, reaccions en micel·les reverses o adsorció selectiva del glicerol en un suport sòlid (Bornscheuer, 1995).

A la Taula 7 es troben diferents exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant esterificació o transesterificació catalitzades per lipases.

Taula 7. Exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant esterificació o transesterificació catalitzades per lipases. Adaptada i ampliada de Bornscheuer, 1995; Ceni et al., 2010.

Substrat	Biocatalitzador	Sistema de reacció	Rendiment
Àcid oleic	Lipasa de <i>Staphylococcus simullans</i>	Absència de solvent	71%
Àcid làuric	Lipozyme IM	Hexà/ <i>tert</i> -butanol	65%
Àcid linoleic conjugat	Lipasa de <i>Penicillium camembertii</i>	Absència de solvent	87%
Àcid càpric/Àcid làuric/Àcid mirístic	Lipozyme IM	Absència de solvent	52-57%
Àcid làuric	Lipozyme IM	Absència de solvent	61%
Oleat d'etil	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	Diferents solvents	7-68%
Benzoat de metil	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	Isopropanol	29%

1.3.2.3.1. Ús de glicerols protegits.

Per tal d'evitar la subseqüent acilació dels monoglicèrids, una de les estratègies més emprades és l'esterificació o transesterificació amb glicerols protegits (Figura 6). Consisteix en la esterificació d'un àcid gras o la transesterificació d'un èster d'àcid gras, catalitzada enzimàticament per una lipasa, amb un glicerol amb dos dels tres grups hidroxil bloquejats. És necessària una etapa posterior per tal de desprotegir el glicerol, obtenint així el regioisòmer pur de monoglicèrid (Bornscheuer, 1995). Utilitzant lipases estereoselectives s'aconsegueix a més l'estereoregioisòmer pur (Partali et al., 1992; Romano et al., 2006).

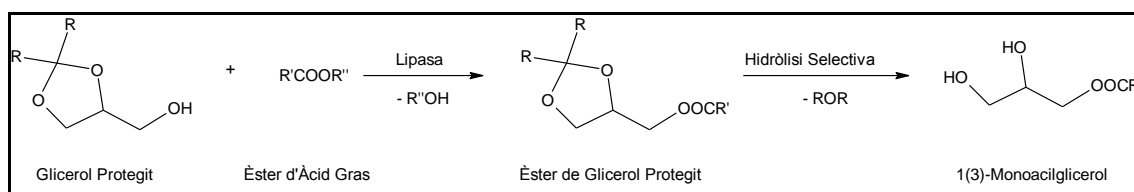


Figura 6. Obtenció de monoglicèrids mitjançant transesterificació amb glicerol protegit catalitzada per lipasa i posterior hidròlisi selectiva. Adaptat de Bornscheuer, 1995.

Els glicerols protegits més utilitzats són 1,2-O-*rac*-isopropilidè-*sn*-glicerol (2,2-dimetil-1,3-dioxolà-4-metanol o solketal) (Bornscheuer and Yamane, 1995; Villeneuve et al., 1998) i 2,3-epoxi-1-propanol (glicidol) (Lozano et al., 2004; Zhao et al., 2008). D'altres glicerols protegits emprats han estat diferents 1,2-cetals de glicerol (Romano et al., 2006).

La desprotecció del glicerol un cop obtingut l'èster suposa una etapa important de la reacció. S'han utilitzat diferents mètodes per a la desprotecció d'èsters de solketal, com són: reflux amb àcid *p*-toluensulfònic en presència de tetrahidrofuran i aigua (Halldorsson et al., 2004), les reaccions dels èsters amb

àcid trifluoroacètic, amb àcid clorhídric o amb àcid fòrmic (Akoh, 1993; Villeneuve et al., 1998), emprant àcid bòric en 2-metoxietanol o iode en metanol (Bornscheuer and Yamane, 1995). Condicions de reacció fortament àcides resulten en la interesterificació entre dos molècules de monoacilglicerol, amb la subseqüent formació de diacilglicerols i glicerol com a subproductes i la migració del grup acil a altres posicions dins del glicerol (Akoh, 1993; Bornscheuer and Yamane, 1995).

A la Taula 8 es troben alguns exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant esterificació o transesterificació amb glicerols protegits catalitzada per lipases.

Taula 8. Exemples d'obtenció de monoglicèrids mitjançant esterificació o transesterificació amb glicerols protegits, catalitzades per lipases.

Substrat	Biocatalitzador	Glicerol protegit	Sistema de reacció	Rendiment	Referència
Èsters vinílics d'àcids grassos	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Solketal	Presència/Absència de solvent	Fins al 100%	(Bornscheuer and Yamane, 1995)
Decanodioat de dimetil	Lipozyme	Solketal	Sense solvent	95%	(Villeneuve et al., 1998)
Àcid oleic i àcid eicosapentanòic	Lipases de <i>Mucor miehei</i> i de <i>Candida antarctica</i>	Solketal	Hexà	Fins a 88%	(Akoh, 1993)
Àcid butíric	Lipasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	Glicidol	Heptà	52% (ee=56%)	(Romano et al., 2006)
Àcid palmític	Novozyme 435	Solketal	Diclorometà	98%	(Wang et al., 2013)

1.4. Tocoferols

1.4.1. Vitamina E.

Vitamina E és un terme que comprèn un grup de potents antioxidants liposolubles. Les anàlisis estructurals mostren que les molècules amb activitat antioxidant de vitamina E inclouen quatre tocoferols (α , β , γ i δ) i quatre tocotrienols (α , β , γ i δ) (Figura 7). La forma més abundant a la natura és l' α -tocoferol, que és també la forma més activa biològicament (Brigelius-Flohe and Traver, 1999).

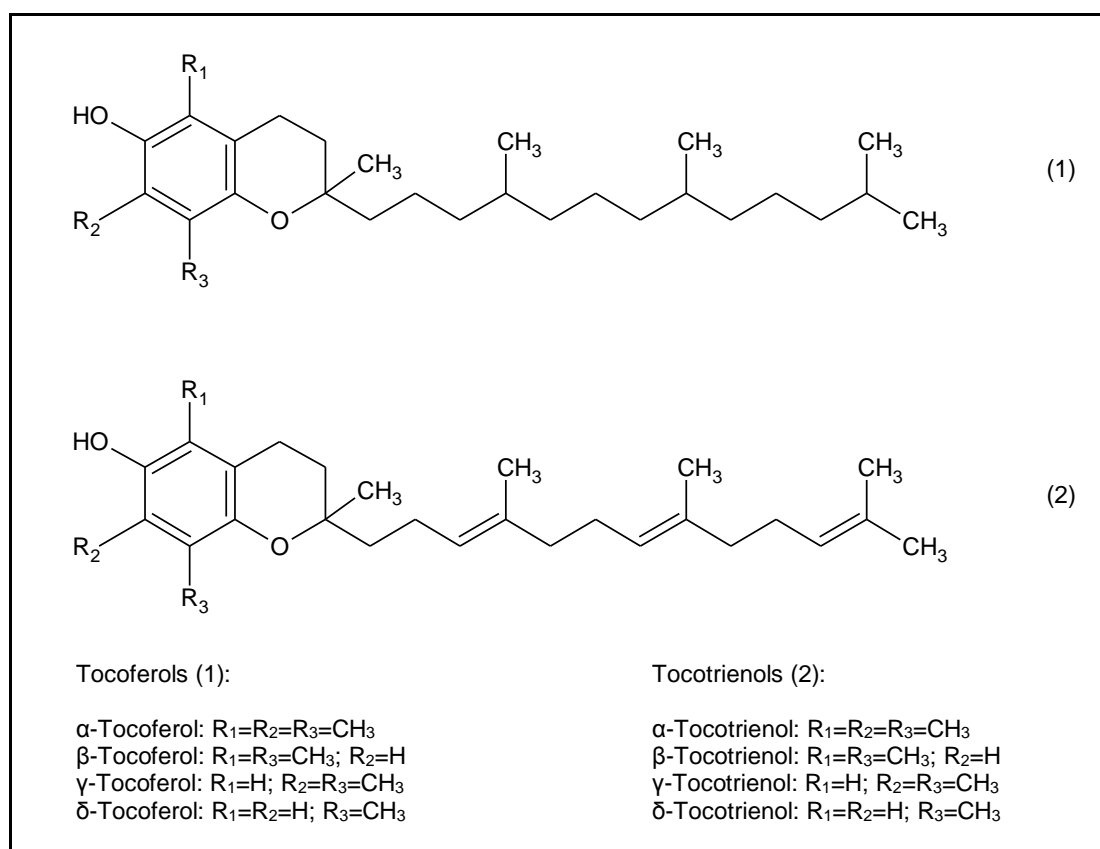


Figura 7. Estructura i nomenclatura dels tocoferols i tocotrienols segons IUPAC (JCBN), 1982.

Els tocoferols i tocotrienols són compostos amb capacitat d'inhibir l'oxidació lipídica de forma efectiva en aliments i sistemes biològics. No són sintetitzables per humans ni animals, fent indispensable la seva ingesta amb la dieta (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996). Es troben a cereals sencers, llavors, fruits secs, fulles verdes, carns, peix, llet i ous. Els tocoferols són presents a llavors oleaginoses, olis, carn y parts verdes de plantes superiors, mentre que els tocotrienols són presents a germinats i les fraccions de fibra d'algunes llavors i cereals (Seppanen et al., 2010).

Estudis epidemiològics han mostrat que aportacions elevades de vitamina E a la dieta estan correlacionades amb un risc reduït de desordres cardiovasculars, mentre que això no succeeix amb aportacions d'altres antioxidants a la dieta com la vitamina C i el β -carotè. Aquest fet suggereix que la vitamina E pot tenir altres papers específics més enllà de la seva funció antioxidant (Brigelius-Flohe and Traver, 1999).

1.4.2. Activitat antioxidant dels tocoferols.

La capacitat antioxidant dels tocoferols és deguda a la seva capacitat de donar els seus hidrògens fenòlics a radicals lliures lipídics i retardar els processos de peroxidació lipídica autocatalítica (Seppanen et al., 2010).

A la Figura 8 es troba esquematitzat el mecanisme d'acció dels tocoferols en quant a la seva capacitat antioxidant: Els àcids grassos, i de manera més pronunciada els poliinsaturats (LH), poden formar radicals d'alquil ($L\cdot$) en oxidar-se en presència d'un iniciador ($X\cdot$, equació 1). Aquests radicals alquil reaccionen ràpidament amb l'oxigen formant radicals peroxi ($LOO\cdot$) (equació 2), que reaccionen amb més àcids grassos produint peròxids ($LOOH$) (equació 3). Els tocoferols (AH) inhibeixen aquesta oxidació per radicals lliures reaccionant amb els radicals peroxi i aturant així la propagació en cadena de la reacció, (equació 4) i amb els radicals alcoxi inhibint la descomposició dels hidroperòxids i reduint la formació d'aldehids (equació 5). D'aquesta manera, els tocoferols es comporten com uns antioxidants que aturen la reacció en cadena d'oxidació competint amb el substrat (LH) pels radicals peroxi (equació 3). Els radicals tocoferols poden formar productes no radicalaris, com dímers, peròxids estables o d'altres derivats d'alquil (Frankel, 1996).

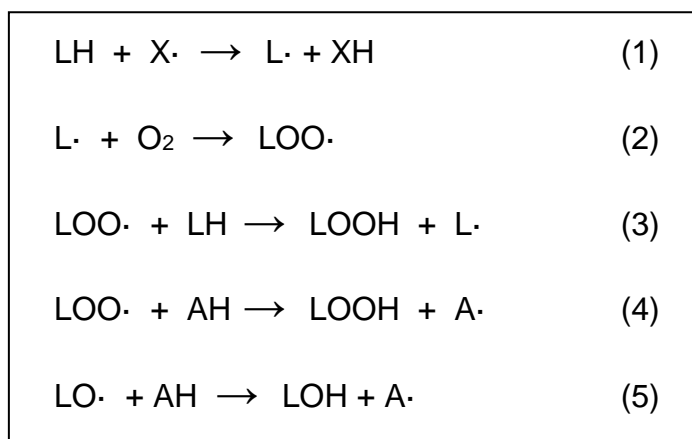


Figura 8. Mecanisme antioxidant lipídic dels tocoferols.
 LH, àcid gras; $X\cdot$, iniciador; $L\cdot$, radical d'alquil;
 $LOO\cdot$ radical peroxi; $LOOH$, peròxid; AH, tocoferols; $LO\cdot$,
 radical alcoxi.

La capacitat antioxidant dels tocoferols fa que puguin ser emprats com additius antioxidants en sistemes lipídics, en productes alimentaris, com nata o mantega (Lampi and Piironen, 1998) i no alimentaris, com olis lubricants (Xiao

et al., 2008). A més, poden ser utilitzats com a antioxidants en sistemes bifàsics en emulsió (Huang et al., 1994).

1.5. **Microones.**

Als últims anys, la indústria química ha adoptat el concepte de “Química Verda” com a punt de trobada dels reptes clau de la ciència de preservar la salut de la població i de l’entorn i, a la vegada, assolir processos comercialment profitosos (García-Vidal et al., 2006). En aquest context, entre els mètodes de reacció no convencionals en síntesi orgànica, la irradiació amb microones per a l’activació de reactius suposa una alternativa a l’escalfament convencional com a tècnica de subministrament d’energia a les reaccions, utilitzant la capacitat d’alguns líquids i sòlids de transformar l’energia electromagnètica en calor (Gupta et al., 2009).

A l’espectre electromagnètic, la radiació de microones es troba localitzada entre l’infraroig i les radiofreqüències, a un marge de freqüències d’entre 0,3 i 300 GHz (Roy and Gupta, 2003). A una reacció portada a terme mitjançant escalfament convencional, els reactius són activats per una font de calor externa. La calor es transmet als reactius i el solvent passant primer a través de les parets del recipient. Les microones, en canvi, són transmeses directament a les molècules de la barreja de reacció amb un ràpid augment de la temperatura. Com que el procés no està limitat per la conductivitat tèrmica del recipient, el resultat és l’escalfament localitzat pràcticament instantani de qualsevol substància amb conductivitat iònica o amb capacitat d’estar en forma dipolar i així, donar lloc a una rotació de la molècula (Gupta et al., 2009). Al ser irradiades amb microones, les molècules amb capacitat de ser polaritzades per efecte d’un camp elèctric, capacitat que ve donada per la constant dielèctrica, es realineen contínuament amb el camp oscil·lant. Això provoca que l’energia electromagnètica es transformi en calor (Roy and Gupta, 2003). Aquest efecte és conegut com l’efecte tèrmic de la irradiació amb microones.

Els avantatges de l’escalfament mitjançant microones sobre l’escalfament convencional són (Gupta et al., 2009):

- Escalfament ràpid.
- Inèrcia menyspreable.
- Facilitat de maneig.
- Millor homogeneïtat de la temperatura amb transmissió ràpida de l’energia als reactius i solvents.
- Escalfament selectiu de les molècules polars.

A més d’aquest efecte tèrmic, alguns investigadors opinen que existeixen efectes addicionals pel fet de que les velocitats de reacció assolides en alguns processos són tan elevades que no es poden atribuir tan sols a un efecte tèrmic. Aquests efectes addicionals són anomenats efectes no tèrmics de la irradiació amb microones (Roy and Gupta, 2003). D’altres atribueixen aquests efectes no tèrmics a un “sobreescaïment” dels solvents, efecte que es demostraria pel fet de que es poden observar valors de temperatura d’ebullició més elevats quan s’irradia un solvent amb microones en comparació amb un escalfament convencional (Perreux and Loupy, 2001).

1.5.1. Aparells monomode i multimode.

Tot i que s'han utilitzat aparells de microones domèstics en nombrosos estudis (Das Sharma et al., 2008; Martínez-García and Martínez, 2008; Patane et al., 2009), existeixen dos tipus principals de microones per a ús científic: monomode i multimode (Leadbeater and Schmink, 2007).

A un aparell monomode (Figura 9), el seu disseny, principalment pel que fa a la distància entre la matèria a irradiar i l'emissor de microones (magnetró), permet la creació d'un patró permanent d'ona electromagnètica homogeni (Taylor et al., 2005). Aquest tipus d'aparells processen una sola mostra per experiment, i permeten l'ús de vials tancats amb volums de treball d'entre 0,2 i 20 mL o vials oberts fins a volums de 125 mL (Leadbeater and Schmink, 2007). Tenen l'avantatge d'aconseguir un escalfament més ràpid que els aparells multimode i de permetre una distribució més homogènia de l'energia, amb un millor control de la irradiació.

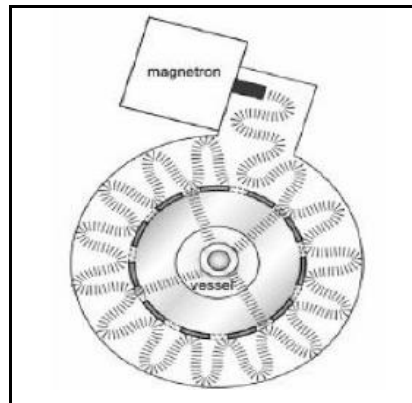


Figura 9. Distribució de la radiació a un aparell monomode. Font: Taylor et al., 2005.

A un aparell multimode (Figura 10), en canvi, s'evita deliberadament la formació d'un patró d'ona permanent i es potencia la dispersió de la radiació a l'interior de l'aparell, amb l'objectiu d'augmentar la superfície d'escalfament. D'aquesta manera, permet la irradiació de diverses mostres simultàniament. Aquests equipaments es fan servir per escalar reaccions i per portar a terme processos analítics com calcinacions o extraccions. A diferència dels aparells monomode, no permeten controlar de forma eficient l'escalfament de totes les mostres irradiades (Leadbeater and Schmink, 2007; Taylor et al., 2005).

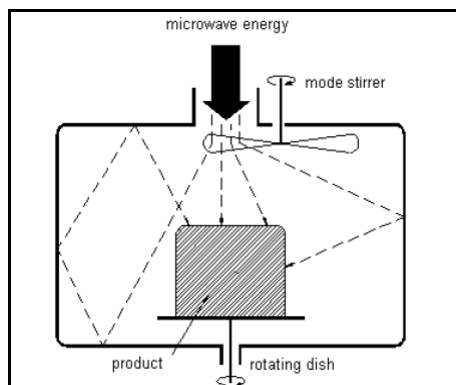


Figura 10. Distribució de la radiació a un aparell multimode. Font: Taylor et al., 2005.

1.5.2. Aplicacions de la síntesi orgànica assistida per microones.

La principal característica de la síntesi orgànica assistida per microones és la reducció dels temps de reacció. Addicionalment, l'elevat nombre de publicacions al respecte, mostren altres aspectes interessants per a la síntesi química, com són la utilització de condicions de reacció amb temperatures moderades, l'obtenció de rendiments elevats i l'augment de la puresa dels productes obtinguts mitjançant la reducció de reaccions secundàries. La combinació de condicions de reacció en absència de solvent i la irradiació amb microones suposen clars avantatges per a l'anomenada química verda (De Cozar et al., 2010).

Els tipus de reaccions orgàniques assistides per microones inclouen, entre d'altres, reaccions de Diels-Alder, racemitzacions, hidrogenacions, hidròlisis, deshidratacions, esterificacions, cicloadicions, epoxidacions, reduccions, condensacions i reaccions de protecció i desprotecció (Taylor et al., 2005), a més de nombroses reaccions catalitzades per enzims com lipases, proteases, cel·lulases o fosfolipases (Roy and Gupta, 2003).

2 Antecedents

La present tesi doctoral sorgeix com una derivació de l'activitat científica del grup de recerca on s'ha portat a terme el treball que es presenta en aquesta memòria.

El primer precedent és un estudi de rastreig de fongs endofítics amb activitat lipàsica isolats de diferents plantes mediterrànies (Torres et al., 2003a). En aquest treball es va aïllar, a partir de mostres de fonoll (*Foeniculum vulgare*), una soca de *R. oryzae* amb activitat lipàsica, tant hidrolítica (va mostrar capacitat d'hidrolitzar tributirina durant el seu cultiu en medi sòlid) com sintètica (el miceli liofilitzat va mostrar capacitat de catalitzar la síntesi d'oleat de propil a partir d'àcid oleic i 1-propanol en isooctà a 26 °C).

Posteriorment, es va utilitzar el miceli liofilitzat d'aquesta soca de *R. oryzae* per portar a terme una extracció reactiva d'acilglicèrids continguts en llavors oleaginoses i en marro de cafè (Torres et al., 2003b). Els resultats d'aquest estudi van mostrar una bona capacitat del miceli liofilitzat per a l'obtenció dels èsters de metil (rendiments elevats) i de solketal (rendiments moderats) dels àcids grassos continguts en llavors de gira-sol i colza, en sistemes en presència de solvent (isooctà o hexà) i en absència de solvent, amb un temps total de reacció de 96 h i a una temperatura de 50 °C. Els rendiments van ser superiors per als sistemes amb solvent.

Els resultats del treball anterior van portar al desenvolupament d'un procés per a l'obtenció d'acilglicèrids de llavors oleaginoses en un sistema amb presència de solvent mitjançant un reactor de columna en dos etapes: una primera etapa d'extracció i hidròlisi dels triglicèrids continguts a les llavors i una segona d'esterificació dels àcids grassos amb diferents alcohols (Méndez et al., 2006). Els resultats d'aquest estudi van permetre optimitzar diferents paràmetres del procés d'obtenció d'èsters de solketal, com el flux d'addició de solketal i la temperatura de reacció. A més, es va assajar el comportament del biocatalitzador amb diferents llavors i amb diferents alcohols per a l'esterificació.

Els dos treballs anteriors van ser recollits a una tesi doctoral (Méndez, 2004), que inclou també un estudi cinètic de l'esterificació de l'àcid palmític amb 1-propanol, publicat l'any 2009 (Méndez et al., 2009). Els resultats d'aquest treball mostren que el comportament del miceli liofilitzat de *R. oryzae* s'ajusta a un mecanisme de reacció Ping-Pong Bi-Bi. Aquesta mateixa tesi abans citada, inclou un altre treball on es va combinar la capacitat regioselectiva del miceli liofilitzat de *R. oryzae* amb la capacitat estereoselectiva de la lipasa comercial Novozym 435 per a l'obtenció de (*R*)-4-clor-2-butanol.

Els diferents estudis realitzats amb miceli liofilitzat de *R. oryzae*, junt amb la necessitat mediambiental de reduir l'ús de dissolvents orgànics va motivar la realització d'un estudi exhaustiu de l'adequació d'aquest biocatalitzador en l'obtenció de productes d'alt valor com són els monoglicèrids. L'estratègia es va centrar en un procediment de dues etapes: una primera etapa d'extracció i esterificació amb alcohols protegits dels àcids grassos continguts en llavors oleaginoses i una segona etapa de desprotecció dels alcohols amb l'obtenció de monoglicèrids.

Les condicions de reacció suaus associades a les reaccions enzimàtiques van fer pensar que era possible un grau elevat de conservació dels tocoferols, abundants en llavors oleaginoses, durant tot el procés d'obtenció de monoglicèrids. D'aquesta manera, el producte final així obtingut seria un concentrat de monoglicèrids ric en tocoferols i, per tant, caldria esperar dues propietats, emulsionant i antioxidant, molt valuoses a la indústria alimentària.

3 Objectius

Es va plantejar com a objectiu general d'aquesta tesi doctoral l'establiment d'un procediment d'obtenció d'extractes rics en monoglicèrids a partir de llavors oleaginoses mitjançant dues etapes: una primera etapa d'hidròlisi dels triglicèrids vegetals i esterificació dels àcids grassos amb glicerols protegits, emprant miceli liofilitzat de *R. oryzae* com a biocatalitzador en absència de dissolvent i una segona etapa de desprotecció dels èsters de glicerols protegits mitjançant un mètode químic.

Per tal d'aconseguir aquest objectiu general, es van establir els següents objectius específics:

- El desenvolupament d'un mètode de determinació de l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat de *R. oryzae* utilitzat com a biocatalitzador de la primera etapa.
- La determinació de les condicions òptimes de les reaccions de la primera etapa d'hidròlisi dels triglicèrids i esterificació dels àcids grassos de les llavors de sèsam i soja amb solketal i glicidol, emprant miceli liofilitzat de *R. oryzae* com a biocatalitzador i en condicions d'absència de dissolvent.
- L'establiment d'un mètode químic per a la consecució de la segona etapa de desprotecció dels èsters de glicerols protegits mitjançant dos tipus d'escalfament, amb microones i convencional, que permeti l'obtenció d'1-monoglicèrids.
- La comparació, en termes de rendiments de reacció, dels mètodes químics desenvolupats per a la segona etapa amb altres mètodes de referència reportats a la bibliografia.
- El seguiment del contingut en alfa, gamma i delta-tocoferol del material vegetal al llarg de les dues etapes d'obtenció d'1-monoglicèrids.

4 Material i Mètodes

4.1. Instrumentació.

4.1.1. Cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC).

El cromatògraf de líquids d'alta resolució utilitzat està format per un injector Waters 717 plus Autosampler amb control de la temperatura, un desgassificador en línia Waters, una bomba binària Waters 1525 μ , detectors de difusió lluminosa Eurosep Instruments (ELSD) i de fluorescència Waters 2475, Software Millennium³² de Waters.

4.1.2. Ressonància magnètica nuclear.

L'equip de ressonància magnètica nuclear utilitzat ha estat un MERCURY plus AS400 MHz RMN Spectrometer Systems de VARIAN amb una sonda 400 AutoSwitchable 4 Nucleous Probe $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$, dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Lleida.

4.1.3. Cromatògrafs de gasos.

Cromatògraf de gasos Hewlett Packard GC System HP6890 amb detector FID-40x i software ChemStation Plus Rev. A.09,xx 2002,

Cromatògraf de gasos Trace 2000 series (ThermoQuest) GC amb detector FID-40x i software CHROM-CARD for Trace Windows 95/NT 4,0 Version 1,00

Cromatògraf de gasos FISIONS Instruments GC8000 series (ThermoQuest) amb un detector FID-40x i software Millennium³² de Waters.

Cromatògraf de gasos Agilent 7890A amb detector FID-40x i software GC ChemStation Rev. B.03,01-SR1,1 [317].

Cromatògraf de gasos Agilent 6890N acoblat a un detector selectiu de masses 5973 MSD. Analitzador tipus quadripol, amb ionització per impacte electrònic (IE) i ionització química positiva (PCI) i negativa (NCI), amb un interval de masses de 2-800 uma. Injectors "split/splitless" (S/SL) i "on column". Software MSD ChemStation versió D.00,0038

4.1.4. Microones.

Forn microones monomode Discover Labmate (CEM, Matthews, USA), equipat amb agitació magnètica i un sistema de refredament per aire comprimit.

4.2. Material biològic.

4.2.1. Llavors de soja i sèsam.

Les llavors de soja (*Glycine max*) i sèsam (*Sesamum indicum*), adquirides a una botiga especialitzada en llavors de la ciutat de Lleida, van ser congelades i posteriorment triturades amb un molinet equipat amb sistema de refrigeració (IKA Analysenmühle A10). La llavor triturada resultant va ser passada a través d'un sedàs d'1mm de pas i conservada a 4 °C.

Per a l'apartat 4.4.3, la llavor de soja va ser triturada fins a una textura de farina mitjançant un molí Cyclotec 1093 Sample Mill (FOSS).

4.2.1.1. Determinació de la humitat de les llavors de soja i sèsam.

El contingut d'humitat de les llavors de soja i sèsam va ser determinat per diferència de pesada abans i després de sotmetre 5 g de les mostres de llavor triturada a un dessecat a 130 °C en una estufa durant 1 h. El percentatge d'humitat ve donat per la fórmula:

$$\%H = \frac{(R + P) - D}{P} \cdot 100$$

On:

R: Pes del recipient buit (g).

P: Pes de la llavor abans de ser dessecada (g).

D: Pes del recipient amb la mostra dessecada (g).

H: Humitat (%).

Les determinacions es van realitzar per triplicat per a cada llavor.

4.2.1.2. Determinació del greix brut de les llavors de soja i sèsam.

La determinació del percentatge de greix brut de les llavors es va realitzar mitjançant un equip Det-Gras (6 places, J.P. Selecta), que basa el seu protocol de funcionament en el mètode Soxhlet d'extracció de greixos.

La mostra (3 g de llavor triturada) és introduïda en un didal de cel·lulosa porosa i l'aparell realitza la extracció col·locant el didal dins d'un vas d'alumini que conté 50 mL d'hexà i permet l'ajust d'una columna de destil·lació. Després de l'extracció durant 30 min a 130 °C, es deixa evaporar el solvent i es pot determinar la quantitat de greix extreta per diferència de pesada del vas d'alumini, segons la fórmula:

$$\% \text{ Greix Brut sobrematèria seca} = \frac{W3 - W2}{W1 \cdot \left(\frac{\%MS}{100} \right)} \cdot 100$$

On:

W1: Pes inicial de la mostra (g).

W2: Pes del vas d'alumini (g).

W3: Pes final del vas amb el contingut de greix extret (g)

%MS: Percentatge de matèria seca, determinat a partir de la humitat.

Les determinacions es van realitzar per triplicat per a cada llavor.

4.2.1.3. Extracció de tocoferols de les llavors de soja i sèsam.

L'extracció de tocoferols s'ha portat a terme segons la norma europea prEN 12822:1999 E (European Committee for Standardization CEN, 1999), seguint el següent protocol:

Dins d'un baló de 100 mL són introduïts 2 g de llavor triturada, 0,25 g d'àcid ascòrbic, 50 mL de metanol i 10 mL de solució KOH de concentració 60 g/100 mL. Desplaçat l'oxigen amb corrent d'argó, el baló es porta a reflux a 90 °C durant 1 h. Passat aquest temps, es refreda en un bany de gel i es filtra al buit. S'afegeix 50 mL de NaCl al 2% i s'extreuen els tocoferols amb 50 mL d'hexà:èter etílic 80:20 (4 extraccions). La part orgànica es renta amb 50 mL de NaCl al 2 % (4 rentats) i s'evapora a sequedat. El residu, que conté els tocoferols, es redissol en 50 mL d'hexà i es guarda en atmosfera inert a temperatura de congelació fins a la seva anàlisi per HPLC (apartat 4.5.1). Les extraccions es van realitzar per triplicat per a cada llavor.

4.2.1.4. Perfils acídics de llavors de soja.

Es va adaptar un mètode d'extracció i derivatització d'acilglicèrids assistit per microones desenvolupat al grup d'investigació (Tomàs et al., 2009).

S'introdueix 0,5 mL de solució de triundecanoïna 1 mg/mL en cloroform (estàndard intern) a un vial de reacció per a microones. S'evapora el dissolvent amb corrent de N₂ i s'addicionen 150 mg de soja triturada, 10 mg de BHT, 1 mL de metanol sec saturat amb nitrogen i 1 mL de clorotrimetilsilà. Es satura el vial amb nitrogen i es barreja amb vòrtex. Llavors es col·loca el vial a la cambra de reacció del microones i se li aplica el següent tractament:

Temperatura: **90 °C**

Temps: **2 min**

Pressió màxima: **250 psi**

Potència màxima: **250 W**

Rampa de temperatura: **20 s**

Després del tractament, i un cop fred el vial de reacció, s'addicionen 2 mL d'hexà:èter dietílic (1:1), s'agita i es neutralitza amb l'addició primer de 0,2 g de bicarbonat sòdic sòlid i després de 2 mL de solució saturada de bicarbonat sòlid. Es centrifuga el vial (5 min a 5000 rpm), es recupera la fase orgànica i s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre. El perfil acídic va ser determinat per cromatografia de gasos segons el mètode de l'apartat 4.5.6.

4.2.2. Preparació de miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

4.2.2.1. Obtenció de la suspensió d'espores de *Rhizopus oryzae*.

La soca fúngica *R. oryzae* UDLTA 3,142, aïllada pel nostre grup de recerca en un treball anterior (Torres et al., 2003a) com a fong endòfit del fonoll, *Foeniculum vulgare*, i conservada a temperatura de congelació, es va cultivar en plaques de Petri amb un medi PDA (20 g de glucosa, 200 mL d'extracte de patata, 800 mL d'aigua destil·lada i 15 g d'agar) durant 5 d a 28 °C. Es va preparar una suspensió d'espores en aigua i Tween 80 (0,02 %). Es van comptar les espores amb l'ajut d'una cambra de recompte (Cambra Thoma) i es va ajustar la concentració a $1-4 \cdot 10^6$ espores/mL.

4.2.2.2. Cultiu de *Rhizopus oryzae*.

Es va preparar un medi de cultiu sintètic amb la següent composició per 1L de medi: 2 g d'asparagina, 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $MgSO_4$, 5 mg d'hydroclorur de tiamina, 10 mL de solució mineral (que conté 0,145 g/L de $Fe(NO_3)_3 \cdot H_2O$, 0,088 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ i 0,0235 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$). El pH inicial del medi es va ajustar a pH 6 i es va distribuir en matrassos Erlenmeyer d'1 L (250 mL de medi), de 500 mL (150 mL de medi) i de 250 mL (100 mL de medi). Després de l'esterilització en autoclau (15 min a 121 °C), es va afegir un 1 % d'oli de girasol comercial i es va inocular la suspensió d'espores de concentració $1-4 \cdot 10^6$ espores/mL. El medi inoculat va ser incubat a 28 °C durant 5 d amb agitació orbital (200 rpm).

4.2.2.3. Obtenció del miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Es va filtrar al buit el contingut dels matrassos Erlenmeyer a través d'un embut Buchner amb paper de filtre i el miceli recuperat es va rentar dues vegades amb aigua desionitzada i dues vegades amb acetona. El miceli es va congelar (-25 °C) i es va liofilitzar durant 18 h, per ser després triturat amb un molinet i conservat a -25 °C.

4.2.2.4. Perfil acídic de miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

L'obtenció i quantificació dels èsters metílics d'àcids grassos del miceli liofilitzat de *R. oryzae* ens permet definir el perfil acídic d'aquest, que inclou tant

els àcids grassos constituents del mateix fong com els de les restes de l'oli emprat com a font de carboni al medi de cultiu per al seu creixement.

S'introdueix 0,5 mL de solució d'estàndard intern (1 mg/mL de triundecanoïna en cloroform) a un vial de reacció amb tap tarat i un cop evaporat el dissolvent amb corrent de N₂, s'addicionen 200 mg de mostra de miceli liofilitzat, 10 mg de butilhidroxitoluè (BHT), 1 mL de metanol sec saturat amb nitrogen i 0,5 mL de clorotrimetilsilà. Es satura el vial amb nitrogen, es tapa i es manté 1 h a 80 °C amb agitació magnètica. Un cop fred, s'addicionen 2 mL d'hexà:èter dietílic (1:1) i el vial s'agita amb vòrtex. Es neutralitza afegint 0,2 g de bicarbonat sòdic sòlid i seguidament 2 mL de solució saturada de bicarbonat sòdic. Després de la centrifugació dels vials (5 min a 5000 rpm), es recupera la fase orgànica i s'asseca amb sulfat magnèsic anhidre (Eras et al., 2008). El perfil acídic va ser determinat per cromatografia de gasos segons el mètode del apartat 4.5.6.

4.3. Material químic.

4.3.1. Preparació de patrons d'èster de solketal i glicidol de les llavors de soja i sèsam.

Es va voler obtenir, per a cada llavor, una barreja d'èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos propis de la llavor, que ens servís com a patró extern per a la quantificació dels èsters de solketal i glicidol obtinguts mitjançant l'esterificació amb miceli de *R. oryzae* com a biocatalitzador. Per fer-ho, es va portar a terme una primera extracció dels àcids grassos de les llavors i una esterificació posterior d'aquests amb solketal o glicidol mitjançant la resina PS-Carbodiimida (Figura 11), ja que estudis anteriors indiquen rendiments de reacció superiors al 50 % per a l'esterificació d'àcids grassos catalitzada per aquesta resina (Llovera et al., 2005).

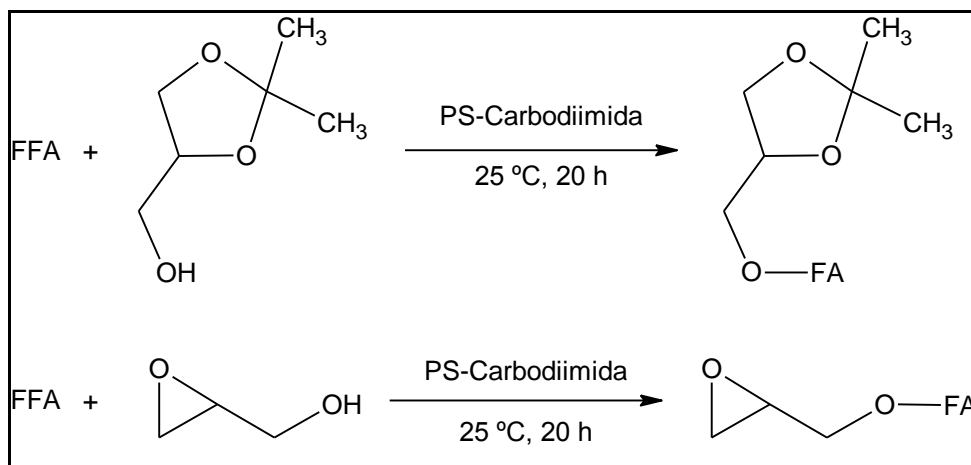


Figura 11. Reaccions d'esterificació dels àcids grassos de soja i sèsam amb els alcohols solketal i glicidol, catalitzada per la resina PS-Carbodiimida.

4.3.1.1. Extracció dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam.

Dos grams de llavor triturada de soja o sèsam són introduïts a un baló de 100 mL conjuntament amb 0,25 g d'àcid ascòrbic, 50 mL de metanol i 10 mL de KOH de concentració 60 g/100 mL. Es realitza una saponificació a 90 °C en reflux durant 1 h i es filtra la barreja al buit. S'addicionen 50 mL de NaCl 2 % i es realitzen 4 extraccions amb 50 mL d'hexà:èter etílic 80:20. Es conserva la part aquosa i la part orgànica es renta 4 cops amb NaCl 2 %. S'ajunten els volums de les fases aquoses tant de les extraccions com dels rentats, que contenen els àcids grassos, i s'ajusta el pH d'aquesta solució a un valor de pH=2 amb HCl 5N. Es tornen a extreure els àcids amb 3 volums de 50 mL de la solució d'hexà:èter etílic 80:20 i la fase orgànica es renta amb 3 volums de NaCl 2 % abans de dessecar amb MgSO₄ durant 1 h i es filtra. L'extracte filtrat és evaporat a sequedat per a la seva conservació a temperatura de congelació.

Els àcids grassos majoritaris extrets de cada llavor són quantificats mitjançant GC (apartat 4.5.5).

4.3.1.2. Reacció d'esterificació amb PS-Carbodiimida.

A un vial prèviament dessecat al dessecador en presència de P_2O_5 , s'afegeix la resina (2 equivalents). S'addicionen els àcids (1 equivalent total) prèviament evaporats a sequedat i redissolts en un volum determinat de CH_2Cl_2 (7-10 mL per gram de resina). La barreja resina-àcids es deixa agitant durant 2 h i s'addiciona l'alcohol (1,3 equivalents de solketal o glicidol). Es deixa agitant suaument en un agitador orbital durant aproximadament 18 h.

Acabada la reacció, es filtra la resina i aquesta es renta dues vegades amb 2 mL de CH_2Cl_2 . Tot seguit la fase orgànica es renta dues vegades amb 2 mL de solució saturada de $NaHCO_3$ i després dues vegades més amb 2 mL de solució saturada de $NaCl$. Finalment es desseca amb $MgSO_4$ durant 1 h i es filtra. L'extracte filtrat és evaporat a sequedat per a la seva conservació a temperatura de congelació.

L'anàlisi dels èsters formats, de solketal i glicidol, es va fer mitjançant GC (apartat 4.5.3).

4.3.2. Síntesi d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga.

4.3.2.1. Mètode assistit per microones.

Es va sintetitzar l'èster de solketal de l'àcid palmític (C16:0) utilitzant Novozyme com a catalitzador mitjançant escalfament per microones (Figura 12).

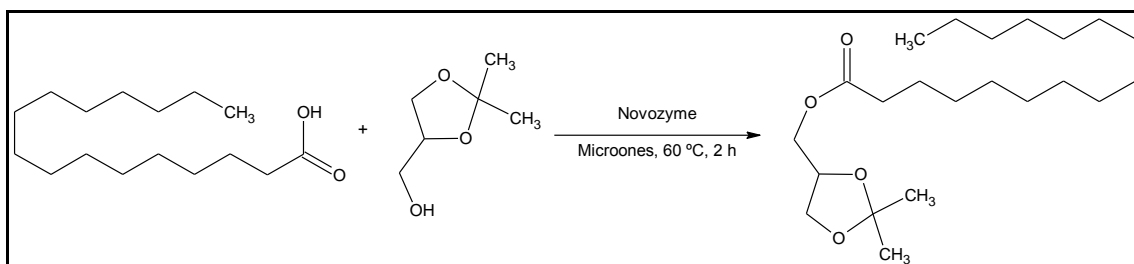


Figura 12. Síntesi amb microones de l'èster de solketal de l'àcid palmític catalitzada per Novozyme

En un vial de síntesi per microones es van pesar 100 mg d'àcid palmític amb 100 mg de solketal i 20 mg de Novozyme (proporció molar àcid:alcohol de 1:2). El vial va ser introduït al microones, on se li va aplicar el següent tractament:

Temperatura: **60 °C**
 Temps: **2 h**
 Pressió màxima: **250 psi**
 Potència màxima: **300 W**
 Rampa de temperatura: **20 s.**

Després del tractament, els productes de reacció van ser extrets amb 2 mL de TBME i filtrats a través d'un tub de filtració equipat amb un filtre de cel·lulosa. L'extracte va ser rentat amb 10 mL de solució saturada de NaHCO₃ i 5 mL de solució saturada de NaCl, mantenint l'agitació durant 2 h a temperatura ambient. Es va separar la fase orgànica per centrifugació (5 min a 1000 rpm) i es va evaporar el dissolvent amb corrent de N₂. El residu es va redissoldre amb 10 mL d'isooctà i es va rentar tres cops amb 5 mL d'acetonitril. L'isooctà es va assecar amb MgSO₄ sòlid, que va ser filtrat posteriorment, i es va evaporar a sequedat amb un evaporador rotatiu (140 mbar ± 30 mbar, 60 °C). El residu es va assecar en bomba de buit en presència de sílice durant 24 h.

El producte de reacció va ser confirmat mitjançant GC-MS (apartat 4.5.7).

4.3.2.2. Mètode amb escalfament convencional.

Mitjançant un mètode d'escalfament tèrmic convencional i utilitzant Novozyme com a catalitzador, es van sintetitzar els èsters de solketal dels següents àcids grassos: làuric (C12:0), mirístic (C14:0), palmític (C16:0), esteàric (C18:0) i oleic (C18:1) (Figura 13).

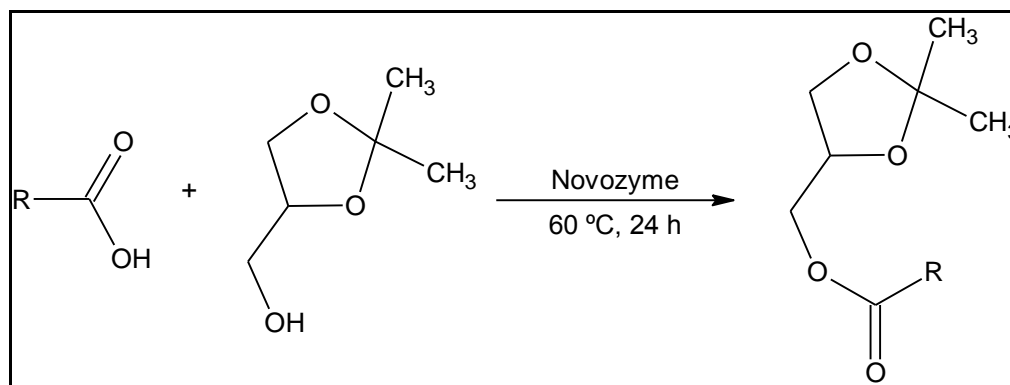


Figura 13. Síntesi amb escalfament convencional dels èsters de solketal dels àcids làuric, mirístic, palmític esteàric i oleic palmític catalitzada per Novozyme. R: C11:0, C13:0, C15:0, C17:0 i C17:1

En un vial de reacció es van barrejar 1 g d'àcid gras amb 1 g de solketal i 200 mg de Novozyme. Es va fer reaccionar la barreja durant 24 h a 60 °C i es van extreure els productes de reacció amb 100 mL d'hexà. Després de filtrar per tal de separar el biocatalitzador, es van afegir 100 mL de solució saturada de NaHCO₃ i 50 mL de solució saturada de NaCl. Es va mantenir en agitació durant 24 h i es van separar les fases orgànica i aquosa mitjançant centrifugació (5 min a 1000 rpm). La fase orgànica es va assecar amb MgSO₄, separat posteriorment per filtració, i es va evaporar a sequedat amb un evaporador rotatiu (300 mbar ± 50 mbar, 45 °C). El residu es va redissoldre en 50 mL d'isooctà i es va purificar mitjançant tres extraccions amb 50 mL d'acetonitril. L'isooctà es va assecar amb MgSO₄ sòlid, que es va separar per filtració, i es va evaporar a sequedat amb un evaporador rotatiu (140 mbar ± 30

mbar, 60 °C). El residu es va assecar en bomba de buit en presència de sílice durant 24 h.

El producte de reacció va ser confirmat mitjançant GC-MS (apartat 4.5.7).

4.4. Metodologies experimentals.

4.4.1. Monitorització de l'activitat lipàsica de Rhizopus oryzae.

Es va buscar una reacció model amb el doble objectiu de controlar l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat de *R. oryzae* al llarg del temps (durant el seu emmagatzematge a temperatura de congelació) i de comprovar les diferències d'activitat lipàsica entre diferents produccions de miceli. Les característiques específiques òptimes que es van buscar per a aquesta reacció enzimàtica van ser:

- a. Màxima especificitat de l'enzim a les condicions de reacció (concretament al temps de reacció i a la quantitat de miceli).
- b. Rendiment de reacció entre 10-20%, que coincideixi amb la fase estacionària de la reacció enzimàtica.
- c. Màxima reproduïbilitat.

4.4.1.1. Determinació del sistema de monitorització.

Es van assajar dos tipus de reaccions per a la quantificació de l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat d'acord al que s'observa a la figura 14:

- a. Esterificació, basada en la quantificació del producte generat enzimàticament a partir d'un àcid gras i un alcohol.
- b. Hidròlisi, basada en la quantificació de l'àcid gras lliure alliberat a partir d'un èster d'àcid gras (Beisson et al., 2000).

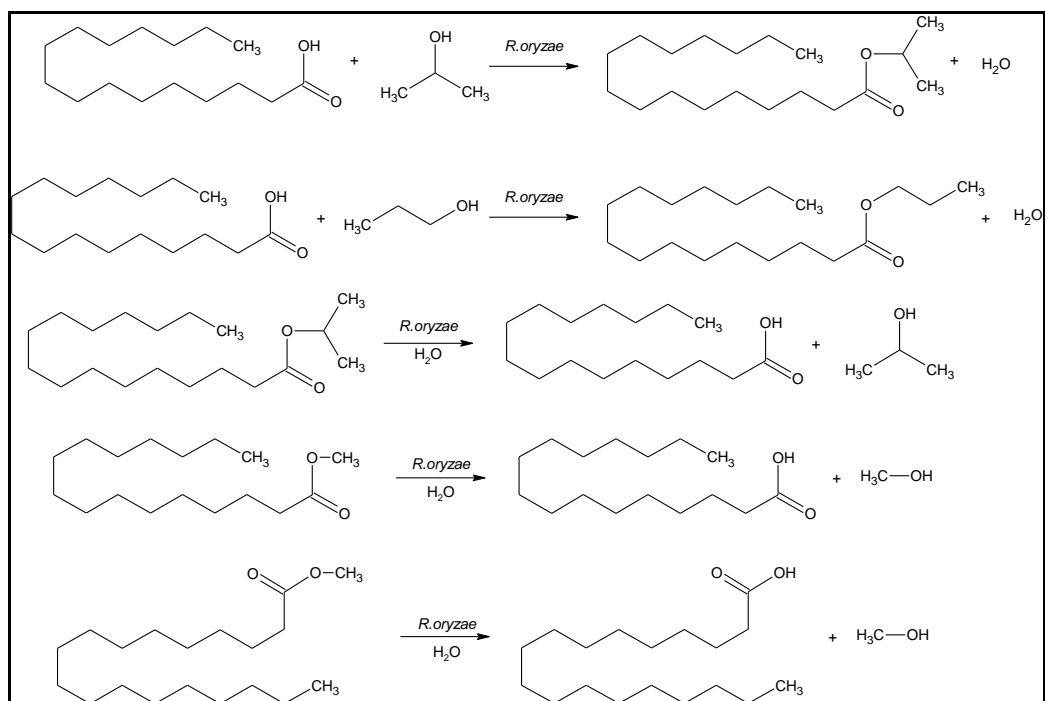


Figura 14. Reaccions assajades catalitzades per miceli liofilitzats de *R. oryzae* per a la monitorització de l'activitat lipàsica. Les diferents condicions de reacció estan indicades a la Taula 9.

Els productes de reacció van ser analitzats mitjançant GC segons la metodologia descrita als apartats 4.5.4 (reaccions d'esterificació) i 4.5.5 (reaccions d'hidròlisi), utilitzant com a patrons en aquest cas, els productes de reacció corresponents a cada assaig.

A la Taula 9 es presenten les diferents reaccions catalitzades per *R. oryzae* que es van assajar.

Taula 9. Reaccions assajades per a la monitorització de l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat de *R. oryzae*.

Reacció	Reactius i proporcions molars	Dissolvent	Volum total (mL)	Massa de miceli de <i>R. oryzae</i> (mg)	Condicions de Reacció
Esterificació	Àcid palmític:isopropanol 1:1	TBME	0,5	15 mg	40 °C / 30 min 40 °C / 1 h 40 °C / 2 h 40 °C / 6 h
Esterificació	Àcid palmític:isopropanol 1:1	Hexà	0,5	15 mg	40 °C / 30 min 40 °C / 1 h 40 °C / 2 h 40 °C / 6 h
Esterificació	Àcid palmític:1-propanol 1:1	Hexà	0,5	15 mg	40 °C / 15 min 40 °C / 30 min 40 °C / 1h
Esterificació	Àcid palmític:1-propanol 1:1	Hexà	1	15 mg	40 °C / 5 min 40 °C / 10 min 40 °C / 30 min
Esterificació	Àcid palmític:1-propanol 1:1	TBME	0,5	5 mg 10 mg 15 mg	40 °C / 5 min 40 °C / 15 min
Esterificació	Àcid palmític:1-propanol 1:1	TBME	0,5	5 mg* 10 mg* 15 mg*	40 °C / 5 min 40 °C / 15 min
Hidròlisi	Palmitat d'isopropil	Acetona:H ₂ O 1:1	1	5 mg 10 mg 15 mg	40 °C / 10 min 40 °C / 30 min
Hidròlisi**	Estearat de metil	Hexà	1	5 mg 10 mg 15 mg	40 °C / 10 min 40 °C / 30 min
Hidròlisi**	Estearat de metil	<i>tert</i> -Butanol	0,5	5 mg 10 mg 15 mg	40 °C / 5 min 40 °C / 15 min 40 °C / 30 min 40 °C / 45 min 40 °C / 1 h

*Agitació prèvia del miceli amb la solució d'àcid palmític durant 15 min a 40 °C

**Addició de 5 µL de H₂O per a portar a terme la hidròlisi

4.4.1.2. Monitorització de l'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Un cop escollida la reacció per al seguiment de l'activitat lipàsica (Figura 15), es va produir un nou lot de miceli de *R. oryzae* per tal de fer-ne el seguiment durant 20 mesos.

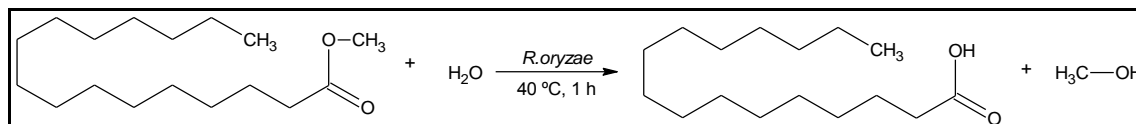


Figura 15. Reacció per a la monitorització de l'activitat lipàsica de *R. oryzae*.

Per a la reacció (Figura 15), es barregen en un vial Eppendorf 500 µL de solució d'estearat de metil 167,5 mM en *tert*-butanol amb 10 mg de miceli liofilitzat de *R. oryzae*, 20 µL de tridecà (estàndard intern) i 5 µL de H₂O. El vial s'introdueix en un bloc agitador Thermomixer, on es manté a 40 °C, durant 1 h, amb agitació a 1400 rpm. Un cop acabat el temps de reacció, es filtren els productes de reacció i les mostres es conserven a temperatura de congelació en atmosfera saturada de N₂ fins a la seva anàlisi. El seguiment de la reacció es va fer durant 20 mesos, amb un assaig d'activitat cada 2 mesos. Els productes de reacció van ser analitzats per cromatografia de gasos segons els mètode de l'apartat 4.5.5, utilitzant àcid esteàric com a patró.

4.4.2. Obtenció dels èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos continguts a les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae* en absència de solvent.

4.4.2.1. Hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Es van realitzar uns experiments per a la hidròlisi i esterificació en una sola etapa dels àcids grassos continguts en les llavors, utilitzant com a catalitzador el miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent (Figura 16). Es van assajar dues maneres d'addicionar l'alcohol (en una única addició o de forma fraccionada) per a la optimització de la barreja dels reactius.

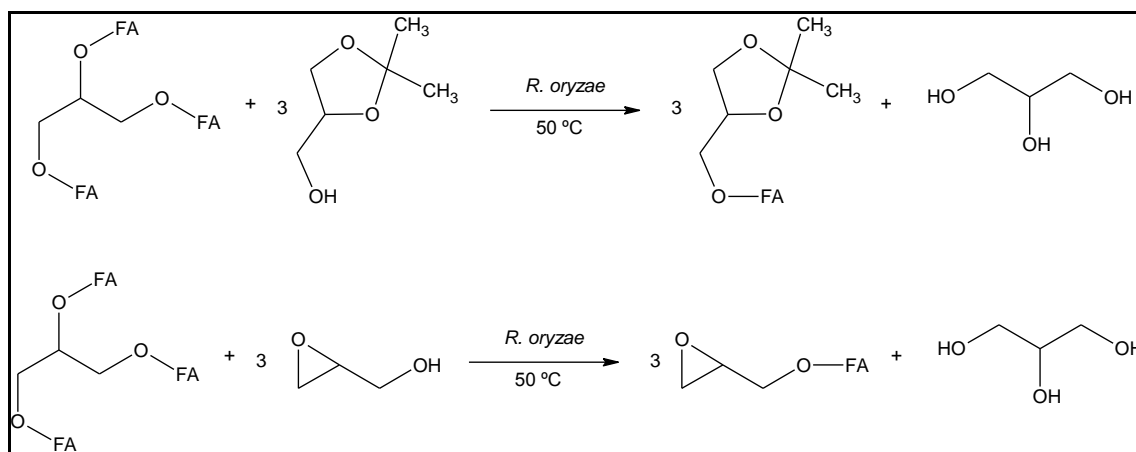


Figura 16. Reacció d'hidròlisi i esterificació dels àcids grassos de soja i sèsam amb els alcohols solketal i glicidol, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae*. Els temps de reacció assajats estan en funció de la manera com s'addiciona l'alcohol (en un sol moment o fraccionada).

4.4.2.1.1. Addició de l'alcohol en un sol moment.

Dins d'un tub Eppendorf es van introduir 120 mg de llavor triturada i 12 mg de miceli de *R. oryzae*. Després d'una homogeneïtzació d'1 min amb vòrtex a la màxima potència, el tub va ser introduït en un agitador Thermomixer, programat per mantenir la temperatura a 50 °C i l'agitació a 1400 rpm durant tota la reacció.

Donada per iniciada la hidròlisi de triglicèrids, aquesta es va mantenir durant diferents temps, 0, 4, 15 i 24 h, abans d'addicionar 20 µL de l'alcohol (solketal o glicidol) amb una bomba de perfusió (Harvard Apparatus Model 11 Single Syringe 55-1199) a un flux de 2 µL/min. El temps de reacció total va ser, en tots el casos, de 96 h.

Una vegada finalitzada la reacció, l'extracció dels productes es va dur a terme mitjançant l'addició d'1 mL d'hexà i mantenint l'agitació a 1400 rpm i la temperatura a 50 °C durant 20 min, filtrant posteriorment l'extracte. Els extractes i els residus sòlids van ser conservats per separat a temperatura de congelació per a l'anàlisi dels productes de reacció (apartat 4.5.3). La determinació del contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol tant dels extractes de reacció com dels residus sòlids es va fer segons el mètode cromatogràfic de l'apartat 4.5.1.

4.4.2.1.2. Addició fraccionada de l'alcohol.

Es van introduir 120 mg de llavor triturada i 12 mg de miceli de *R. oryzae* dins d'un tub Eppendorf i es va homogeneïtzar la barreja durant 1 min en un vòrtex a la màxima potència d'agitació.

La reacció d'hidròlisi de triglicèrids es va donar per començada amb la introducció del tub en un Thermomixer, programat per mantenir la temperatura a 50 °C i l'agitació a 1400 rpm, i es va mantenir durant diferents temps (0, 4, 15 i 24 h) abans d'iniciar l'addició de l'alcohol.

En aquest cas, la fase d'esterificació es va fer addicionant de forma fraccionada l'alcohol (solketal o glicidol), amb una bomba de perfusió (Harvard Apparatus Model 11 Single Syringe 55-1199) i a un flux de 2 µL/min. Es van realitzar 5 addicions de 4 µL d'alcohol, amb una agitació d'1 min amb vòrtex a la màxima potència després de cada addició. El temps total d'esterificació va ser de 6 o 96 h en el cas del solketal i de 6, 24 o 96 h per al glicidol.

L'extracció dels productes de reacció es va fer amb l'addició d'1 mL d'hexà al tub, mantenint l'agitació a 1400 rpm i la temperatura a 50 °C durant 20 min, per després filtrar l'extracte i dur a terme una segona extracció del sòlid amb el mateix volum d'hexà i en les mateixes condicions d'agitació i temperatura. En cada cas, els extractes es van ajuntar i van ser conservats, a temperatura de congelació, de la mateixa manera que el residu sòlid, per a l'anàlisi dels productes de reacció (apartat 4.5.3). La determinació del contingut d'alfa,

gamma i delta-tocoferol tant dels extractes de reacció com dels residus sòlids es va fer segons el mètode cromatogràfic de l'apartat 4.5.1.

4.4.2.2. Hidròlisi dels triglicèrids de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Es va optimitzar el procés d'hidròlisi de triglicèrids de soja i sèsam catalitzat per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de dissolvent, buscant les condicions de temps i temperatura adients per un màxim rendiment de reacció. A més, es van assajar diferents alternatives d'homogeneïtzació prèvia de la barreja del miceli amb la llavor triturada (Figura 17).

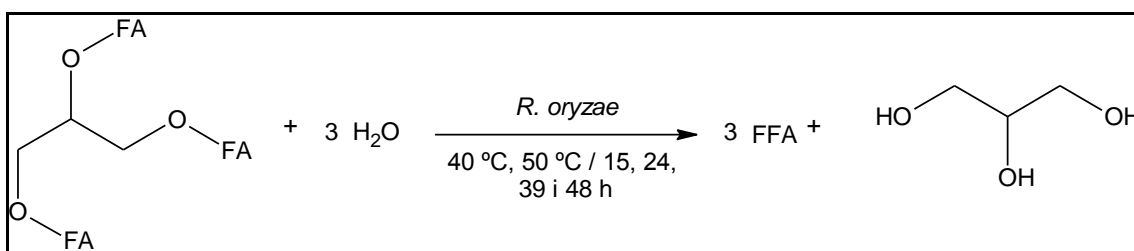


Figura 17. Reacció i condicions assajades de la hidròlisi de triglicèrids de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae*. FA: àcid gras; FFA: àcid gras lliure.

Dins d'un tub Eppendorf, es van introduir 120 mg de llavor triturada conjuntament amb 12 mg de miceli liofilitzat de *R. oryzae*. Es van assajar dos tipus d'homogeneïtzació prèvia de la barreja, amb un testimoni on no es donava aquesta etapa:

- *Homogeneïtzació prèvia amb vòrtex*: El vial de reacció es sotmet a una agitació amb vòrtex a la màxima potència durant 1 min.
- *Homogeneïtzació prèvia amb ultrasons*: El vial de reacció s'introdueix a un bany d'ultrasons durant 20 min.

Després d'aquesta homogeneïtzació prèvia, el tub va ser introduït a un agitador Thermomixer, que es va mantenir en agitació a 1400 rpm. Es van assajar dues temperatures: 40 i 50 °C i diferents temps de reacció: 15, 24, 39 i 48 h.

L'extracció dels productes de reacció es va realitzar amb l'addició d'1 mL d'hexà, mantenint, durant 20 min, l'agitació a 1400 rpm i la temperatura determinada per l'assaig. Es va dur a terme una reextracció dels productes de reacció amb 1 mL més d'hexà en les mateixes condicions que la primera. Tots dos extractes es van ajuntar i van ser conservats a temperatura de congelació. L'anàlisi dels productes de reacció es va fer segons el mètode cromatogràfic de l'apartat 4.5.2.

4.4.3. Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos.

4.4.3.1. Desenvolupament d'un mètode assistit per microones.

Es va desenvolupar un mètode per a la obtenció de monoglicèrids mitjançant la desprotecció dels èsters de solketal d'àcids grassos amb escalfament per microones, donat que alguns estudis reporten alts rendiments de reacció amb un escurçament dels temps de reacció amb aquest tipus d'escalfament per a reaccions d'obertura d'epòxids (García-Vidal et al., 2006; Ollevier and Nadeau, 2008).

La metodologia per a la desprotecció dels èsters de solketal d'àcids grassos mitjançant microones consisteix, en tots els casos, en la barreja dels reactius (30 mg d'èster de solketal de l'àcid gras o de barreja d'àcids grassos i la resta de components de la barreja segons la proporció, molar o en massa, indicada) en un vial de síntesi per a microones, l'aplicació del tractament i l'extracció dels productes de reacció amb 2 mL de TBME o de cloroform, filtrats a través d'un tub de filtració equipat amb un filtre de cel·lulosa. Els extractes obtinguts van ser conservats en atmosfera de nitrogen a temperatura de congelació.

Els productes de reacció van ser analitzats mitjançant GC-MS, GC-FID i RMN (apartats 4.5.4, 4.5.7 i 4.5.8).

4.4.3.1.1. Proves preliminars.

4.4.3.1.1.1. Estudi de desprotecció usant aigua com a dissolvent.

Es va fer servir l'èster de solketal de l'àcid palmític com a model per a la desprotecció de l'anell d'èsters de solketal d'àcids grassos que permeti obtenir l'1-monoglicèrid corresponent (Figura 18).

Les primeres proves es van realitzar utilitzant H₂O com a dissolvent i els àcids trifluoroacètic, clorhídric i acètic com a catalitzadors. Es van assajar diferents combinacions de reactius, temperatura i temps de reacció (Taula 10).

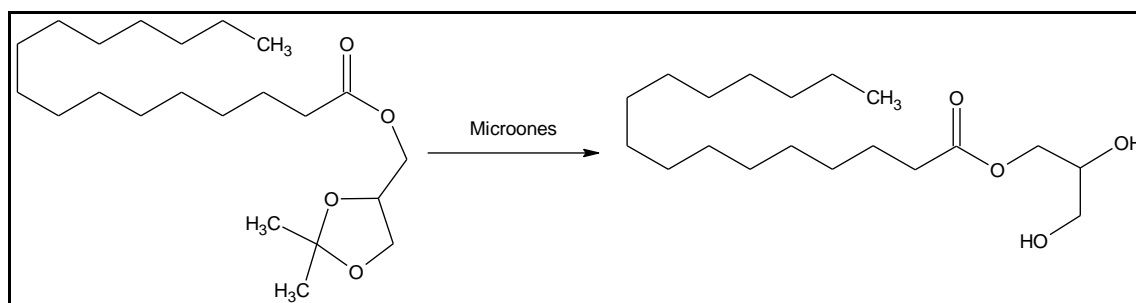


Figura 18. Reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones (proves preliminars) per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant aigua o etanol com a dissolvent. Els diferents catalitzadors assajats, així com les proporcions, temperatures i temps de reacció estan indicades a la Taula 10 i la Taula 11.

Es van realitzar dos blancs de reacció: l'èster, en absència de cap altre compost, va ser sotmès a dos tractaments d'escalfament per microones de 15 min de durada, a 120 °C i 80 °C respectivament.

Taula 10. Condicions de les proves preliminars per a la desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones i utilitzant H₂O com a dissolvent. Les proporcions molars s'indiquen respecte 1 mol d'èster de solketal de l'àcid palmític. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Proporció molar d'H ₂ O	Catalitzador		Condicions
	Compost	Relació molar èster:catalitzador	
70	.	1:0	80 °C, 15 min
70	.	1:0	120 °C, 15min
3	.	1:0	80 °C, 15 min
3	.	1:0	120 °C, 15min
3	.	1:0	175 °C, 15 min
3	TFA	1:0,1	80 °C, 15 min
3	TFA	1:0,1	120 °C, 15min
3	TFA	1:0,1	175 °C, 15 min
3	HCl	1:0,1	80 °C, 15 min
3	HCl	1:0,1	120 °C, 15min
3	HCl	1:0,1	175 °C, 15 min
3	CH ₃ COOH	1:0,1	80 °C, 15 min
3	CH ₃ COOH	1:0,1	120 °C, 15 min

4.4.3.1.1.2. Estudi de desprotecció usant etanol com a dissolvent.

La mateixa reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític de l'apartat anterior es va estudiar utilitzant etanol com a

dissolvent (Figura 18). En les proves preliminars realitzades es van assajar els mateixos àcids que en el cas anterior, en les condicions indicades a la Taula 11:

Taula 11. Condicions i proporcions de les proves prèvies per a la desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones amb etanol com a dissolvent. Les proporcions molars s'indiquen respecte 1 mol d'èster de solketal de l'àcid palmític. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Proporció molar de CH ₃ CH ₂ OH	Catalitzador		Condicions
	Compost	Relació molar èster:catalitzador	
1	.	1:0	80 °C, 15 min
1	.	1:0	120 °C, 15min
3	.	1:0	80 °C, 15 min
3	.	1:0	120 °C, 15min
3	TFA	1:0,2	80 °C, 15 min
3	TFA	1:0,2	120 °C, 15min
3	TFA	1:0,1	120 °C, 15min
3	TFA	1:0,1	175 °C, 15 min
3	HCl	1:0,1	80 °C, 15 min
3	HCl	1:0,1	120 °C, 15min
3	HCl	1:0,1	175 °C, 15 min
3	CH ₃ COOH	1:0,1	80 °C, 15 min
3	CH ₃ COOH	1:0,1	120 °C, 15 min

4.4.3.1.1.3. Estudi de desprotecció amb resina de bescanvi iònic.

4.4.3.1.1.3.1. Activació de la resina de bescanvi iònic IR120Na.

Es va assajar la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític fent servir com a catalitzador la resina de bescanvi iònic IR120Na (Amberlite IR-120Na, Carlo Erba) donat que els protons de la superfície d'aquesta resina es va demostrar que eren capaços de degradar l'anell d'oxirà d'olis vegetals epoxidats (Campanella and Baltanás, 2007).

Prèviament, va ser necessària l'activació de la resina per tal d'utilitzar-la en la seva forma àcida: es va fer passar 10 mL de HCl 2M per un pes aproximat de 1 g de resina dins d'un tub de filtració equipat amb un filtre de cel·lulosa. Seguidament es va fer passar H₂O fins a detectar pH neutre a la sortida amb l'ajut de paper indicador de pH. Un cop activada, va ser assecada durant 12 h mitjançant bomba de buit en presència de P₂O₅.

4.4.3.1.1.3.2. Proves preliminars amb resina de bescanvi iònic IR120Na com a catalitzador.

Utilitzant els mateixos dissolvents que a la resta de proves preliminars, es van assajar diferents temps de reacció, temperatures i diferents proporcions de resina IR120Na per a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític (Figura 19).

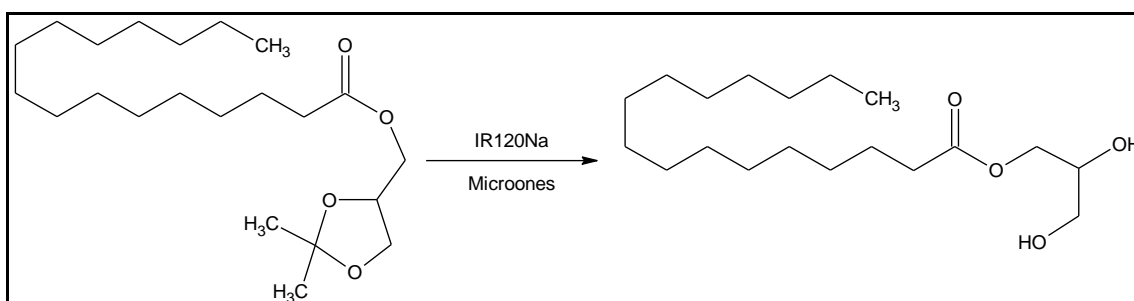


Figura 19. Reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant aigua o etanol com a dissolvent i catalitzada per la resina IR120Na. Les proporcions, temperatures i temps de reacció assajats estan indicades a la Taula 12.

Les diferents condicions assajades es troben a la Taula 12.

Taula 12. Relacions molars i en pes i condicions (temperatura, temps) assajades en les proves preliminars de desprotecció de de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones amb diferents dissolvents. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Dissolvent	Proporció èster:dissolvent:resina (*)	Condicions
H ₂ O	1:3:1	80 °C, 15 min
	1:3:1	120 °C, 15 min
	1:3:1	80 °C, 30 min
	1:3:1	50 °C, 15 min
	1:3:1	90 °C, 15 min
	1:3:1	70 °C, 15 min
	1:3:1	75 °C, 15 min
	1:3:1	85 °C, 15 min
	1:3:2	85 °C, 15 min
	1:3:3	85 °C, 15 min
CH ₃ CH ₂ OH	1:3:1	80 °C, 15 min
	1:3:1	120 °C, 15 min

(*)Proporció molar de dissolvent i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

4.4.3.1.1.4. Estudi de desprotecció utilitzant diferents alcohols i resina de bescanvi iònic IR-120Na.

Donat que alguns estudis indiquen la possibilitat d'utilització d'alcohols en medi àcid per a l'obertura d'epòxids (García-Vidal et al., 2006; Mirkhani et al., 2003), es van assajar, amb una proporció èster:alcohol:resina IR120Na activada 1:3:1 (proporció èster:alcohol molar i èster:resina en pes), els següents alcohols com a dissolvents: metanol, etanol, isopropanol, 1-butanol, *tert*-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol i 1-decanol (Figura 20).

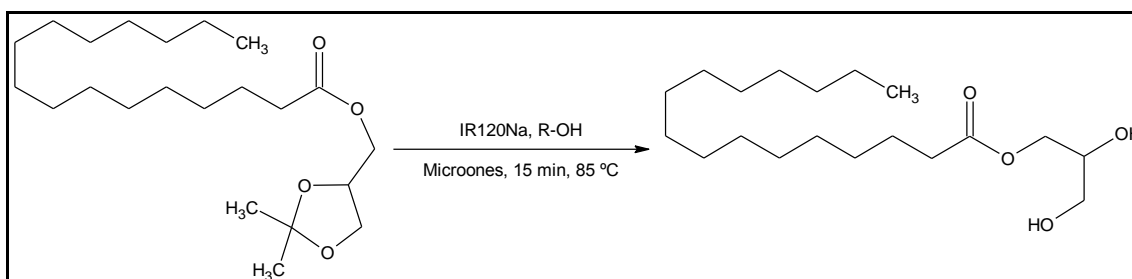


Figura 20. Reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant un alcohol com a dissolvent i catalitzada per la resina IR120Na. Els alcohols assajats van ser: metanol, etanol, isopropanol, 1-butanol, *tert*-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol i 1-decanol.

Les condicions assajades es troben a la Taula 13.

Taula 13. Relacions molars i en pes i condicions (temperatura, temps) assajades per a la desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones utilitzant diferents alcohols. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Alcohol	Proporció		Condicions
	èster:	dissolvent:resina	
	(*)		
Metanol	1:3:1		85 °C, 15 min
Etanol	1:3:1		85 °C, 15 min
Isopropanol	1:3:1		85 °C, 15 min
1-butanol	1:3:1		85 °C, 15 min
<i>tert</i> -butanol	1:3:1		85 °C, 15 min
1-pentanol	1:3:1		85 °C, 15 min
1-hexanol	1:3:1		85 °C, 15 min
1-heptanol	1:3:1		85 °C, 15 min
1-decanol	1:3:1		85 °C, 15 min

(*) Proporcions molars de dissolvent i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

4.4.3.1.1.5. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i resina de bescanvi iònic IR120Na.

Es va escollir l'1-pentanol per a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones en presència de la resina de bescanvi iònic IR120Na (Figura 21).

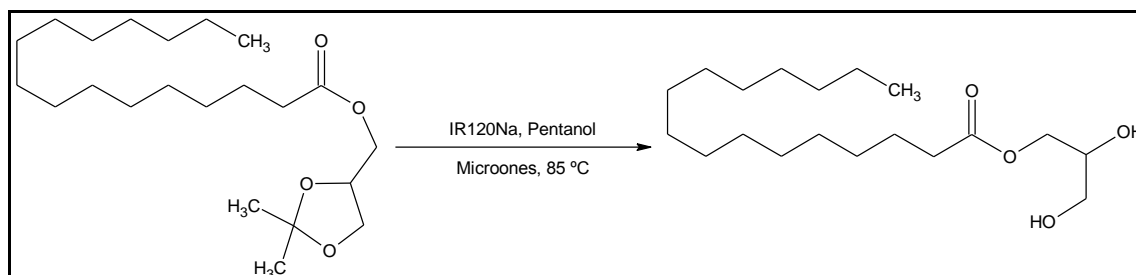


Figura 21. Reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant pentanol com a dissolvent i catalitzada per la resina IR120Na. Els temps de reacció i les proporcions assajades estan especificades a la Taula 14.

Es van assajar diferents proporcions de resina IR120Na i 1-pentanol, així com diferents temps de reacció (Taula 14):

Taula 14. Relacions molars i en pes i condicions (temperatura, temps) assajades per a la desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones utilitzant 1-pentanol i resina IR120Na. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Proporció èster:1-pentanol:resina (*)	Condicions
1:0:3	85 °C, 15 min
1:3:1	85 °C, 25 min
1:3:1	85 °C, 15 min
1:3:0,5	85 °C, 15 min
1:3:0,25	85 °C, 15 min
1:1:1	85 °C, 20 min
1:1:1	85 °C, 15 min
1:0,5:1	85 °C, 15 min
1:1:1,5	85 °C, 15 min
1:1:2	85 °C, 15 min
1:1:1	85 °C, 5 min
1:1:1	85 °C, 10 min

(*) Proporció molar d'1-pentanol i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

4.4.3.1.1.6. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i diferents resines sulfòniques.

Es van assajar dues noves resines sulfòniques: una corresponent a una nova remesa de la resina IR120Na (Amberlite IR-120Na, Carlo Erba), en endavant esmentada com IR120Na-B i una altra amb la resina IR120H (Amberlite IR-120 plus, Aldrich) presentada en la seva forma àcida. Es van comparar els seus comportaments respecte a la resina IR120Na utilitzada en l'assaig anterior, en endavant esmentada com IR120Na-A, per a la reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític (Taula 15).

Taula 15. Condicions i proporcions per a la desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones amb 1-pentanol i resines sulfòniques. Les proporcions molars s'indiquen respecte 1 mol d'èster de solketal de l'àcid palmític. Les proporcions en pes indiquen la proporció de massa de resina activada respecte la massa d'èster inicial. Per a tots els casos, la màxima potència assolible de microones és de 300 W, la pressió màxima està fixada a 250 psi i el temps de la rampa de temperatura programada és de 20 s.

Resina	Proporció èster:1-pentanol:resina (*)	Condicions
IR120H Plus	1:1:1	85 °C, 15 min
IR120H Plus	1:3:1	85 °C, 5 min
IR120H Plus	1:3:1	85 °C, 10 min
IR120Na-B	1:0,5:1	85 °C, 15 min
IR120Na-B	1:1:1	85 °C, 15 min

(*) Proporcions molars d'1-pentanol i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

Per tal d'observar l'efecte de la humitat i de fer més exhaustiva la comparació entre les dues resines en la seva forma de sal sòdica (IR-120Na de Carlo Erba, nova i antiga), nous lots de resina van ser activats i assecats fins a pes constant a un dessecador amb connexió a una bomba de buit i en presència de P₂O₅. Les resines seques van ser introduïdes a una cambra hermètica (dessecador) en presència d'un vas de precipitats amb 150 mL de H₂O durant diferents temps: 30 min, 1 h, 3 h i 6 h.

Totes les mostres de les dues resines van ser utilitzades per a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític en presència d'1-pentanol amb el següent tractament de microones:

Relació molar èster:1-pentanol 1:1
 Relació en pes èster:resina activada 1:1
 Temperatura: **85 °C**
 Temps: **15 min**
 Pressió màxima: **250 psi**
 Potència màxima: **300 W**
 Rampa de temperatura: **20 s**

4.4.3.1.1.7. Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga en presència de *tert*-butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament per microones.

Amb una relació molar d'èster:*tert*-butanol de 1:1 i una relació en pes èster:resina IR120Na activada de 1:1, i afegint tridecà com a estàndard intern, es van desprotegir els èsters de solketal dels àcids làuric (C12:0), mirístic (C14:0), palmític (C16:0), esteàric (C18:0) i oleic (C18:1) (Figura 22).

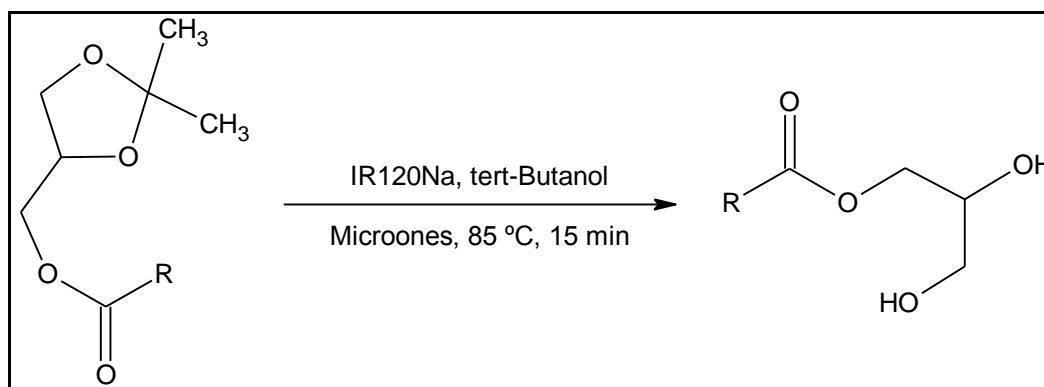


Figura 22. Reacció de desprotecció dels èsters de solketal de l'àcid palmític mitjançant microones per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant *tert*-butanol com a dissolvent i catalitzada per la resina IR120Na. R: C11:0, C13:0, C15:0, C17:0 i C17:1.

Les condicions del tractament amb microones van ser:

Temperatura: **85 °C**
 Temps: **15 min**
 Pressió màxima: **250 psi**
 Potència màxima: **300 W**
 Rampa de temperatura: **20 s**

4.4.3.2. Mètodes d'escalfament convencional.

La metodologia per a la desprotecció dels èsters de solketal d'àcids grassos mitjançant escalfament convencional consisteix, en tots els casos, en la barreja dels reactius (30 mg d'èster de solketal de l'àcid palmític, la resta de components de la barreja segons la proporció, molar o en pes, indicada) en un vial de reacció i l'aplicació de la temperatura de reacció amb agitació constant durant el temps de reacció indicat en cada cas. Els productes de reacció van

ser extrets amb 2 mL de TBME o de cloroform, filtrats a través d'un tub de filtració equipat amb un filtre de cel·lulosa i conservats en atmosfera de nitrogen a temperatura de congelació.

Els productes de reacció van ser analitzats mitjançant GC-MS, GC-FID i RMN (apartats 4.5.4, 4.5.7 i 4.5.8).

4.4.3.2.1. Mètodes de referència.

Per tal de comparar els resultats obtinguts en la desprotecció de l'èster de solketal mitjançant escalfament per microones, amb altres mètodes de desprotecció, es va fer una tria de condicions d'entre diferents mètodes d'escalfament convencional o d'absència d'escalfament trobats a la bibliografia (Akoh, 1993; Bornscheuer and Yamane, 1995; Halldorsson et al., 2004; Villeneuve et al., 1998). A la Taula 16 es poden veure les alternatives escollides.

Taula 16. Mètodes i condicions seleccionats per a la desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal amb escalfament convencional o a temperatura ambient.

Mètode	Condicions
Halldorsson <i>et al.</i> , 2004	Reflux amb àcid <i>p</i> -toluensulfònic i tetrahidrofuran, 12 h
Villeneuve <i>et al.</i> , 1998	Barreja amb acetonitril:HCl (aq) 1M 4:1 vol/vol, 6 h, temperatura ambient
Akoh, 1993	a) Àcid trifluoroacètic 90 % (aquós), 10 min, temperatura ambient b) HCl 50 % (aquós), 1 h, 75 °C c) Àcid fòrmic 50 % (aquós), 1 h, 75 °C d) HCl 10 % (aquós), 1 h, 75 °C
Bornscheuer <i>et al.</i> , 1995	a) Àcid bòric i 2-metoxietanol, 70 °C b) Solució d'1 % de iode en metanol (pes/volum), temperatura ambient c) HCl 50 % (aquós), 1 h, 75 °C d) Àcid trifluoroacètic 90 % (aquós), 10 min, temperatura ambient

La selecció es va fer d'acord als resultats descrits per al rendiment d'obtenció de monoglicèrid en posició 1 per a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític. Es el cas dels mètodes proposats per Halldorsson (Halldorsson et al., 2004), Villeneuve (Villeneuve et al., 1998) i Akoh (Akoh, 1993) (en aquest últim cas, utilitzant l'alternativa descrita amb àcid trifluoroacètic aquós al 90 % a temperatura ambient). En el cas del treball de Bornscheuer (Bornscheuer and Yamane, 1995) l'alternativa que presenta un millor resultat de rendiment utilitza també àcid trifluoroacètic aquós al 90 % durant 10 min a temperatura ambient. Com que les condicions coincideixen amb el treball anterior de Akoh, no es va provar cap altre mètode dels proposats per Bornscheuer.

4.4.3.2.2. Desprotecció de l'1,2 acetònid de l'èster de solketal de l'àcid palmític en presència d'1-pentanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.

Es va traslladar el mètode de desprotecció d'èsters de solketal amb microones a un escalfament convencional amb agitació magnètica, mantenint les mateixes proporcions de reactius (30 mg d'èster de solketal de l'àcid palmític, proporció molar èster:1-pentanol 1:1 i proporció en pes èster:resina activada 1:1) i la mateixa temperatura, 85 °C, per a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític (Figura 23). Es van provar diferents temps de reacció: 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h, 6h i 24 h.

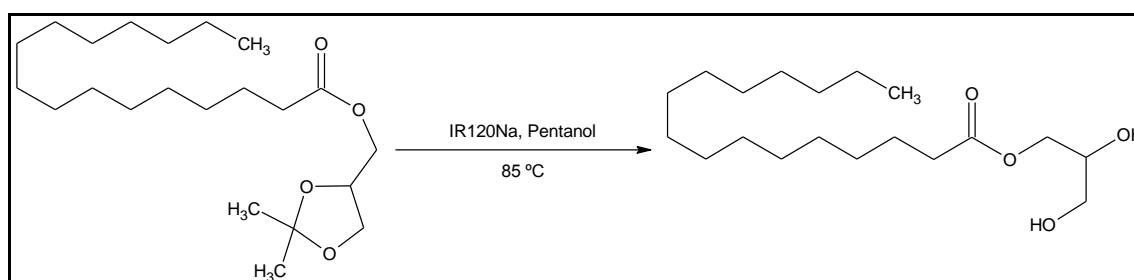


Figura 23. Esquema de la reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament convencional per a l'obtenció d'1-monopalmitina, utilitzant pentanol com a dissolvent i catalitzada per la resina IR120Na. Els temps de reacció assajats van ser: 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 6 h, i 24 h.

4.4.3.2.3. Desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga en presència de *tert*-butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.

Un cop traslladada la reacció de desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític a escalfament convencional es va decidir substituir l'1-pentanol per *tert*-butanol i es va assajar la reacció comparant entre portar-la a terme a vials oberts i tancats, amb agitació orbital (Thermomixer) en ambdós casos. També es van provar altres temps de reacció: 60, 75, 90, 105 i 120 min.

La temperatura va ser en tots els casos de 85 °C i es van mantenir les proporcions utilitzades en els casos anteriors d'èster de solketal de l'àcid palmític i de la resta de reactius (proporció molar èster:*tert*-butanol 1:1 i proporció en pes èster:resina activada 1:1).

Amb el temps de reacció òptim determinat, i mantenint la resta de condicions de reacció, es van desprotegir els èsters de solketal dels

àcids làuric (C12:0), mirístic (C14:0), palmític (C16:0), esteàric (C18:0) i oleic (C18:1), afegint tridecà com a estàndard intern (Figura 24).

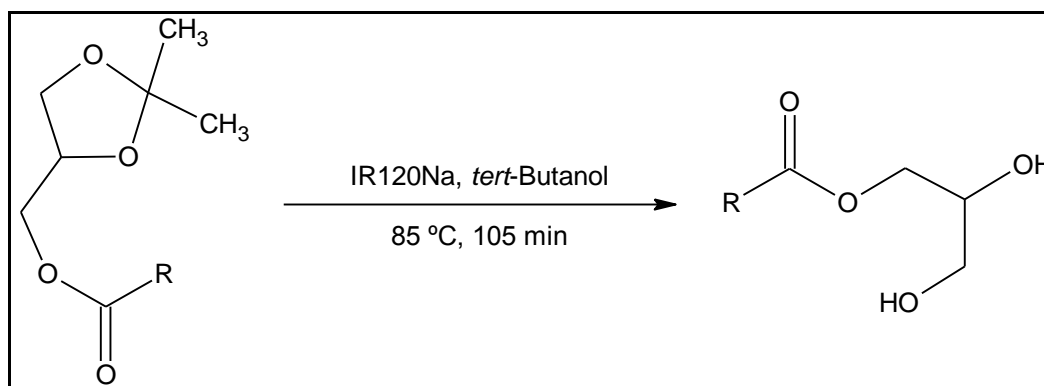


Figura 24. Esquema de la reacció de desprotecció de l'1,2 acetònid dels èsters de solketal de diferents àcids grassos mitjançant escalfament convencional per a l'obtenció d'1-monoglicèrid, utilitzant *tert*-butanol com a dissolvent i la resina IR120Na com a catalitzador. R: C11:0, C13:0, C15:0, C17:0 i C17:1.

4.4.4. Obtenció de monoglicèrids a partir de llavor de soja.

Es va realitzar l'obtenció de monoglicèrids a partir de llavor de soja mitjançant dues etapes. Els productes de reacció obtinguts després de totes dues etapes van ser analitzats per GC (quantificació, apartat 4.5.4), GC-MS (confirmació de productes, apartat 4.5.7) i RMN (confirmació i quantificació de productes, apartat 4.5.8). També es van quantificar els tocoferols dels extractes finals segons el mètode de l'apartat 4.5.1.

4.4.4.1. 1a Etapa: Hidròlisi i esterificació amb solketal dels àcids grassos de la llavors de soja catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

La primera etapa va consistir en la esterificació amb solketal dels àcids grassos de la soja mitjançant l'ús de miceli liofilitzat de *R. oryzae* com a biocatalitzador en absència de solvent. Això es va dur a terme segons la metodologia descrita a l'apartat 4.4.2.1.2 (addició fraccionada de l'alcohol). Els extractes orgànics obtinguts d'aquesta manera van ser evaporats per corrent de nitrogen i assecats en bomba de buit en presència de P₂O₅. Aquests extractes van ser el material de partida per a la segona etapa de l'obtenció de monoglicèrids.

50 µL dels extractes, abans de ser evaporats, van ser diluïts en hexà fins a un volum total de 1 mL per a la seva anàlisi segons el mètode de l'apartat 4.5.3.

4.4.4.2. 2a Etapa: Reacció de desprotecció de l'1,2 acetònid d'èsters de solketal d'àcids grassos de llavor de soja.

La segona etapa va consistir en la desprotecció dels èsters de solketal dels àcids grassos de llavor de soja obtinguts a la primera etapa. Es van assajar tres mètodes d'escalfament convencional i un d'escalfament amb microones.

4.4.4.2.1. Reacció de desprotecció en presència de *tert*-butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na.

A partir del material obtingut a la primera etapa, de pes conegut, i suposant una esterificació completa dels àcids grassos de llavor de soja amb solketal, es va afegir al vial una proporció molar d'èsters:*tert*-butanol 1:1 i una proporció en pes d'èsters:resina IR120Na activada 1:1. La reacció es va dur a terme amb escalfament convencional (durant 105 min a una temperatura de 85 °C amb agitació constant i els vials de reacció oberts) i amb escalfament mitjançant microones (85 °C, 15 min, pressió màxima 250 psi, potència màxima 300 W i rampa de temperatura de 20 s).

4.4.4.2.2. Reacció de desprotecció en presència d'àcid trifluoroacètic.

Es va adaptar el mètode descrit per Akoh i Bornscheuer (Akoh, 1993; Bornscheuer and Yamane, 1995), que utilitza una solució aquosa d'àcid trifluoroacètic 90%. Al material que prové de la primera etapa (30 mg) se li va afegir 500 µL de la solució TFA 90%. La reacció es va donar durant 10 min a temperatura ambient amb agitació constant. Els productes de reacció es van extreure dues vegades amb 2 mL de TBME. Aquest extracte orgànic va ser rentat 3 vegades amb un volum d'1 mL d'H₂O i es va assecat amb 0,1 g de MgSO₄ sòlid.

4.4.4.2.3. Reacció de desprotecció en presència d'acetonitril i àcid clorhídric.

Es va adaptar el mètode descrit per Villeneuve (Villeneuve et al., 1998), que utilitza una solució acetonitril:HCl (aq) 1M 4:1 vol/vol. Al material que prové de la primera etapa (30 mg) se li va afegir 2 mL de solució acetonitril:HCl 1M 4:1 i es va mantenir la reacció durant 6 h a temperatura ambient amb agitació constant. Un cop transcorregut el temps de reacció, es van afegir 15 mL d'H₂O i els productes es van extreure tres vegades amb 10 mL d'èter dietílic que van ser ajuntats i assecats amb 0,5 g de MgSO₄ sòlid. Es va filtrar al buit i l'èter va ser evaporat a 900 mbar i 40 °C.

4.5. Determinacions i mètodes d'anàlisi instrumental.

4.5.1. Anàlisi de tocoferols (HPLC).

El mètode d'anàlisi d' α -tocoferol, δ -tocoferol i γ -tocoferol per HPLC va ser el de la norma europea prEN 12822:1999 E, amb una modificació de la fase mòbil per tal de millorar la detecció. Aquesta modificació consisteix en l'addició de α -tocoferol a la fase mòbil per tal de bloquejar els llocs d'unió de la columna susceptibles d'adsorbir els tocoferols de la mostra (Hewavitharana et al., 2004).

Fase Estacionària: Lichrosorb® Si60, 5 μ m, 250 mm x 4 mm

Fase Mòbil: 4% 1,4-dioxà, 0,04% àcid acètic i 0,02 mg/L α -tocoferol en hexà.

Flux: 1,0 mL/min

Volum d'injecció 10 μ L

Detecció: Fluorimètrica, excitació a 295 nm i emissió a 330 nm

4.5.1.1. Preparació de mostres.

- *Extractes d'esterificació*: 100 μ L dels extractes obtinguts a la esterificació dels àcids grassos de les llavors amb solketal o glicidol, van ser diluïts en 900 μ L d'hexà per a la seva injecció.
- *Residus d'esterificació*: 50 mg del residu sòlid resultant de la reacció d'esterificació dels àcids grassos de les llavors amb solketal o glicidol van ser extrets amb 600 μ L d'hexà en un vial Eppendorf durant 20 min i a 50 °C amb una agitació de 1400 rpm dins d'un agitador Thermomixer. 100 μ L d'aquest extracte filtrat van ser diluïts en 900 μ L d'hexà per a la seva injecció.
- *Extractes de monoglicèrids*: 100 μ L dels extractes obtinguts després de la esterificació amb solketal i de la desprotecció de l'anell de solketal per a la obtenció de monoglicèrids a partir dels àcids grassos de la llavor de soja, van ser diluïts en 900 μ L d'hexà per a la seva injecció.
- *Extraccions de tocoferols de llavors*: 100 μ L de la solució obtinguda a l'extracció de tocoferols de llavors segons la norma europea prEN 12822:1999 E (apartat 4.2.1.3) van ser diluïts en 900 μ L d'hexà per a la seva injecció.

4.5.1.2. Preparació de patrons.

A partir d'una solució mare de 0,1 mg/mL de cada un dels patrons (α -tocoferol, δ -tocoferol i γ -tocoferol) en hexà es prepara una solució conjunta dels tres patrons de concentració 10 μ g/mL.

Es preparen dilucions de concentracions de 0,1, 0,5, 1, 1,5 i 2 µg/mL a partir de la solució patró conjunta. Als vials d'injecció, 100 µL dels diferents nivells de concentració de patrons són diluïts amb 900 µL d'hexà. La quantificació es realitza mitjançant una recta patró o a partir de la següent fórmula:

$$\rho = \frac{A_s \cdot c \cdot V \cdot V_{ST}}{A_{ST} \cdot m \cdot V_s \cdot 1000} \cdot 100$$

On:

ρ : Concentració de α -, δ - o γ -tocoferol en mg/100 g de mostra.

A_s : És l'àrea del pic de α -, δ - o γ -tocoferol obtinguda amb la mostra.

A_{ST} : És l'àrea del pic de α -, δ - o γ -tocoferol obtinguda amb la solució patró.

c : És la concentració de α -, δ - o γ -tocoferol a la solució patró (µg/mL).

m : És la massa de la mostra (g).

V_{ST} : És el volum d'injecció de la solució patró (µL).

V_s : És el volum d'injecció de la mostra (µL).

V : És el volum total de la solució de mostra per a l'assaig (µL).

4.5.2. Anàlisi de triglicèrids residuals d'hidròlisi (HPLC).

L'anàlisi dels triglicèrids residuals després de la hidròlisi dels triglicèrids de llavors catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* (apartat 4.4.2.2) es va fer mitjançant HPLC (Torres et al., 2003b). Les condicions d'anàlisi foren:

Fase estacionària: Symmetry C18 Waters.

Dimensions de la columna: 150 mm x 3,9 mm

Fase mòbil: Acetonitril + 0,1% àcid trifluoroacètic (solvent A); Acetona (solvent B).

Gradient: De 0-10 min, 0,28 mL/min (80% solvent A, 20% solvent B); de 10-27 min, 0,40 mL/min (50% solvent A, 50% solvent B); de 27-33 min, 1,5 mL/min (80% solvent A, 20% solvent B); de 33-40 min, 0,28 mL/min (80% solvent A, 20% solvent B).

Temps d'anàlisi: 40 min

Temps de delay: 10 min

Volum d'injecció: 10 µL

Detecció: UV ($\lambda=210$ nm) i ELSD (amplificació senyal 400 A; temperatura de nebulització 30 °C; temperatura evaporació 40 °C).

4.5.2.1. Preparació de mostres.

- *Extractes d'hidròlisi*: 100 µL dels extractes obtinguts a la hidròlisi dels triglicèrids de llavors catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* van ser evaporats a sequedat i diluïts fins a 1 mL amb acetona:acetonitril (1:1) per a la seva injecció.

4.5.2.2. Preparació de patrons.

La mateixa quantitat de llavor emprada per a la hidròlisi (120 mg) va ser sotmesa a les mateixes condicions de tractament en absència de miceli durant 48 h. Tot seguit es van extreure els triglicèrids amb dos volums d'1 mL d'hexà de la mateixa manera que les mostres. Considerant que en aquest extracte no hi pot haver hidròlisi deguda a l'acció del miceli, el seu contingut en triglicèrids és considerat del 100%, tenint en compte que aquest és un percentatge relatiu. A partir d'aquesta solució, és possible la preparació d'una recta patró amb diferents continguts relatius de triglicèrids (75%, 50%, 25%, 10% i 5% de triglicèrids).

100 µL de cada una d'aquestes solucions van ser diluïts fins a 1 mL amb acetona:acetonitril (1:1) per a la seva injecció.

4.5.3. Anàlisi d'èsters de solketal i glicidol d'àcids grassos (GC).

Per tal de quantificar, en bloc, el total d'èsters de solketal i glicidol formats a la reacció d'esterificació dels àcids grassos de llavors amb aquests alcohols (apartat 4.4.2.1), es va realitzar una anàlisi per cromatografia de gasos amb patrons de palmitat de solketal i palmitat de glicidol, amb les següents condicions cromatogràfiques:

Cromatògraf: FISIONS GC8000, detector FID
Columna: Columna capil·lar DB-1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
Gas portador: Hidrogen
Temperatura de l'injector: 250 °C
Split: 1:20
Rampa de temperatura: 50 °C per min, fins a 110 °C a 5 °C/min, fins a 260 °C a 10 °C/min i 260 °C per 14 min
Temperatura del detector: 300 °C
Estàndard Intern: Tridecà

De manera alternativa, els èsters de solketal i glicidol van ser analitzats amb un altre sistema cromatogràfic (per a tots dos mètodes, la preparació de mostres i patrons va ser la mateixa):

Cromatògraf: Agilent 7890A, detector FID
Columna: Columna capil·lar DB-1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
Gas portador: Hidrogen
Temperatura de l'injector: 280 °C
Split: 1:20
Rampa de temperatura: 50 °C per 5 min, fins a 110 °C a 5 °C/min i fins a 260 °C a 10 °C/min
Temperatura del detector: 250 °C
Estàndard Intern: Tridecà

4.5.3.1. Preparació de mostres.

- *Extractes d'esterificació:* 100 µL dels extractes obtinguts a l'esterificació dels àcids grassos de llavors catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* van ser diluïts en 900 µL d'hexà per a la seva injecció. Com a estàndard intern, van ser afegits 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL.

4.5.3.2. Preparació de patrons.

A partir d'una solució mare d'èster de solketal o de glicidol de l'àcid palmític de concentració 10 mg/mL en hexà, es van preparar una sèrie de dilucions amb les següents concentracions: 4, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 i 0,1 mg/mL.

Per a la seva injecció, 100 µL de cada una de les dilucions van ser rediluïts en 900 µL d'hexà. Es van afegir 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL com a estàndard intern.

4.5.4. Anàlisi de monoglicèrids (GC).

Els monoglicèrids obtinguts de la desprotecció dels èsters de solketal d'àcids grassos de soja (apartat 4.4.3) van ser analitzats amb el següent sistema cromatogràfic:

Cromatògraf: Agilent 7890A, detector FID
Columna: Columna capil·lar DB-1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
Gas portador: Hidrogen
Temperatura de l'injector: 280 °C
Split: 1:20
Rampa de temperatura: 70 °C per 1 min i fins a 280 °C a 15 °C/min
Temperatura del detector: 280 °C
Estàndard Intern: Tridecà

De manera alternativa, es va utilitzar un altre sistema cromatogràfic:

Cromatògraf: Agilent 7890A, detector FID
Columna: Columna capil·lar DB-1 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)
Gas portador: Hidrogen
Temperatura de l'injector: 280 °C
Split: 1:20

Rampa de temperatura: 50 °C per 5 min, fins a 110 °C a 5 °C/min i fins a 260 °C a 10 °C/min

Temperatura del detector: 250 °C

Estàndard Intern: Tridecà

4.5.4.1. Preparació de mostres.

La preparació de les mostres va ser la mateixa per als dos mètodes comentats anteriorment.

100 µL dels extractes obtinguts als apartats 4.4.3 i 4.4.4 van ser diluïts en 900 µL de TBME o cloroform per a la seva injecció. Com a estàndard intern, van ser afegits 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL en TBME o cloroform.

4.5.4.2. Preparació de patrons.

La preparació de patrons es va realitzar a partir d'una solució mare d'1-monopalmitina de 4,28 mg/mL en TBME o cloroform. Es va preparar una sèrie de dilucions de concentracions 1,61, 1,20, 0,77, 0,41 i 0,15 mg/mL. A cada una de les dilucions es va afegir 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL en TBME o cloroform.

4.5.5. Anàlisi dels àcids grassos majoritaris de les llavors (GC).

Posteriorment a l'extracció dels àcids grassos de les llavors de sèsam i soja per a l'esterificació amb resina PS-Carbodiimida (apartat 4.3.1), es van quantificar els àcids majoritaris, això és, l'àcid palmític, l'esteàric, l'oleic i el linoleic. El mètode cromatogràfic va ser el mateix que a l'apartat 4.5.3 i per a la quantificació es van tenir en compte els diferents factors de resposta dels diferents àcids grassos.

4.5.5.1. Preparació de mostres.

- *Extractes d'esterificació:* 100 µL dels extractes obtinguts a l'extracció d'àcids grassos de llavors de sèsam i soja van ser derivatitzats amb 50 µL de BSTFA (N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) en presència de 500 µL de piridina durant 15 min a temperatura ambient (modificació del mètode de derivatització de (Foglia et al., 2004). 100 µL d'aquesta solució d'àcids grassos derivatitzats van ser diluïts en 900 µL d'hexà i es van addicionar 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL com a estàndard intern.

4.5.5.2. Preparació de patrons.

Partint d'una solució mare de 10 mg/mL d'àcid palmític en hexà, es va preparar una sèrie de dilucions de concentracions 1, 0,5, 0,25, 0,1 i 0,05 mg/mL. 100 µL de cada una de les dilucions van ser derivatitzats amb 50 µL de BSTFA en presència de piridina durant 15 min a temperatura ambient. 100 µL d'aquesta solució van ser diluïts en 900 µL d'hexà i com a estàndard intern, es van afegir 10 µL de solució de tridecà 18,75 mg/mL.

4.5.6. Perfils acídics (GC).

Els èsters metílics d'àcids grassos de la llavor de soja (perfil acídic), així com del miceli liofilitzat de *R. oryzae* obtinguts segons les metodologies dels apartats 4.2.2.4 i 4.2.1.4 van ser analitzats per cromatografia de gasos:

Cromatògraf: Trace 2000 series (ThermoQuest), detector FID
Columna: Columna capil·lar SP-2330 30 m x 0,25 mm x 0,20 µm (Supelco)
Gas portador: Heli
Temperatura de l'injector: 250 °C
Split: 1:20
Rampa de temperatura: 120 °C per 1,5 min, fins a 185 °C a 25 °C/min, fins a 205 °C a 5 °C/min, fins a 230 °C a 30 °C/min i 230 °C per 2 min.
Temperatura del detector: 250 °C

4.5.6.1. Preparació de mostres.

Els extractes obtinguts als apartats 4.2.2.4 i 4.2.1.4 es dilueixen per a la seva injecció al cromatògraf: dilució 1/3 amb hexà:èter dietílic (1:1) dels extractes de soja i dilució 1/10 amb hexà:èter dietílic (1:1) dels extractes de miceli liofilitzat de *R. oryzae*.

4.5.6.2. Preparació de patrons.

Es fa servir una solució patró comercial d'èsters metílics d'àcids grassos (FAMES) 10 mg/mL en diclorometà.

4.5.7. Confirmació de productes per massa atòmica (GC-MS).

La confirmació per espectrometria de masses dels productes de reacció dels apartats 4.3.2, 4.4.3 i 4.4.4 es va fer amb el següent sistema analític:

Cromatògraf: Agilent 6890N, detector de masses 5973 MSD

Columna: Columna capil·lar SGE BPX5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies)

Gas portador: Hidrogen

Temperatura de l'injector: 280 °C

Split: 1:20

Rampa de temperatura: 50 °C per 5 min, fins a 110 °C a 5 °C/min i fins a 260 °C a 10 °C/min

Temperatura d'interfase: 280 °C

4.5.7.1. Preparació de mostres.

La preparació de mostres per a la seva injecció al cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses és la mateixa que es fa amb les mostres que s'analitzen al cromatògraf de gasos amb detecció FID per a cada un dels productes analitzats (apartat 4.5.4).

4.5.8. Anàlisi quantitativa de monoglicèrids (RMN).

Els monoglicèrids productes de les reaccions dels apartats 4.4.3 i 4.4.4 van ser quantificats mitjançant ressonància magnètica nuclear. Per a la caracterització dels productes es va realitzar l'experiment de ^1H amb un pols de 45° i un temps de relaxació d'1 s i per a la quantificació dels monoglicèrids a través de la integració de les àrees corresponents als senyals característics, es va aplicar un pols de 30° i un temps de relaxació de 5 s.

4.5.8.1. Preparació de mostres.

200 µL dels extractes van ser evaporats amb corrent de N_2 i acabats d'assecar amb bomba de buit dins d'un dessecador en presència de P_2O_5 . Aquests extractes secs es redissolen en 1 mL de dissolució 0,67 mg/mL d'1,4-diclorobenzé en cloroform deuterat com a estàndard intern.

4.5.9. Anàlisi d'èsters de solketal d'àcids grassos (RMN).

Els èsters de solketal d'àcids grassos sintetitzats a l'apartat 4.3.2 van ser caracteritzats mitjançant ressonància magnètica nuclear. 20 mg de cada èster de solketal van ser dissolts en 0,7 mL de cloroform deuterat i es van realitzar els experiments de ^1H i ^{13}C amb un pols de 30° i un temps de relaxació de 3 s.

4.5.10. Anàlisi estadística de dades.

Les anàlisis estadístiques de les dades generades es van fer mitjançant el programes de gestió de dades Microsoft Excel 2002 i SAS System for Windows 9,0.

5 Resultats i Discussió

5.1. Material biològic.

5.1.1. Llavors de soja i sèsam.

Es van caracteritzar les llavors de sèsam i soja utilitzades per tal de tenir ben definit el material vegetal de partida i conèixer els diferents paràmetres que influeixen en les transformacions quimioenzimàtiques aplicades en aquest estudi.

5.1.1.1. Determinació de la humitat, matèria seca i greix brut de les llavors de soja i sèsam.

Es va determinar el contingut en humitat, matèria seca i contingut de greix brut de les llavors utilitzades en aquest estudi. El contingut en humitat de les llavors determinarà la necessitat o no d'addició d'aigua per a la hidròlisi dels triglicèrids catalitzada per la lipasa de *R. oryzae*. El contingut de matèria seca ens dóna informació del pes sec de material vegetal de partida. Pel que fa al contingut de greix brut, dóna una idea de la quantitat de substrat lipídic sobre el qual pot actuar la lipasa.

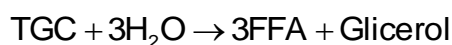
Les mostres que es van utilitzar per als experiments d'hidròlisi i esterificació dels àcids grassos de les llavors amb solketal i glicidol, corresponen a un lot de cada llavor (soja 1 i sèsam). Aquests varen ser triturats mitjançant un molí amb sistema de refrigeració (IKA Analysenmühle A10). Per als experiments d'obtenció de monoglicèrids (hidròlisi, esterificació amb solketal i desprotecció de l'alcohol) es va utilitzar un sol lot de llavor de soja (soja 2, adquirida al mateix establiment dos anys després de l'adquisició de la llavor de soja 1) que va ser triturat mitjançant un molí Cyclotec 1093 Sample Mill (FOSS). A la Taula 17 es presenten els resultats d'humitat, matèria seca i greix brut de les llavors de soja i sèsam.

Taula 17. Humitat (n=3) i greix brut (n=5) de les llavors de soja i sèsam. Resultats en percentatge \pm desviació estàndard.

	Sèsam	Soja 1	Soja 2
Humitat (%)	6,06 \pm 0,37	9,88 \pm 0,02	8,34 \pm 0,07
Greix Brut (%)	45,76 \pm 2,85	14,55 \pm 0,13	21,46 \pm 0,20
Matèria seca* (%)	93,94	90,12	91,66

*Matèria seca obtinguda per diferència entre el pes fresc i la humitat de la llavor

A partir del contingut de greix és possible predir el contingut d'aigua necessària per a la hidròlisi segons la reacció general:



On:

TGC: Triglicèrid.

FFA: Àcid gras lliure.

Si als diferents experiments es parteix de 120 mg de llavor, amb els percentatges de greix indicats a la Taula 17 (assumint l'error que suposa

equiparar el contingut de greix amb el contingut de triglicèrids) i considerant com a pes molecular promig dels triglicèrids 875 g/mol, són necessaris, per a la hidròlisi dels triglicèrids de soja 1, **1,26 mg d'aigua** (això és, un **1,05%**) i per a la hidròlisi dels triglicèrids de sèsam, **3,95 mg d'aigua** (és a dir, un **3,29%**). Per a la hidròlisi dels triglicèrids de soja 2 són necessaris **1,59 mg d'aigua** (**1,32%**). Així, segons els resultats mostrats a la Taula 17, l'aigua no suposa un factor limitant per a la reacció d'hidròlisi per cap de les dues llavors.

5.1.1.2. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol de les llavors de soja i sèsam.

Donat que es pretén optimitzar el contingut de tocoferols a l'extracte final de monoglicèrids obtingut a partir de les llavors, es va determinar el contingut inicial d'alfa, gamma i delta-tocoferols de les llavors de soja i sèsam.

Els resultats de la determinació de alfa, gamma i delta tocoferols de les llavors de soja (1 i 2) i de sèsam segons la norma europea prEN 12822:1999 E es presenten a la Taula 18.

Taula 18. Resultats de la determinació d'alfa, gamma i delta-tocoferol a les llavors de soja i sèsam (mg/100 g llavor ± desviació estàndard, n=3).

	α-Tocoferol	γ-Tocoferol	δ-Tocoferol
Soja 1	44,88 ± 5,76	112,70 ± 4,92	65,03 ± 7,34
Soja 2	14,72 ± 2,61	134,85 ± 8,47	70,25 ± 5,24
Sèsam	-	96,77 ± 3,66	103,31 ± 4,97

Per a la llavor de soja, els resultats de tots tres tocoferols es troben dintre dels rangs dels estàndards de composició d'olis vegetals crus. En canvi, per a la llavor de sèsam, només el contingut de gamma-tocoferol es troba dins del rang indicat, mentre que el contingut de delta-tocoferol es troba molt per sobre del valor estàndard segons el Codex Alimentarius (4-21 mg/kg) (Codex Committee on Fats and Oils, 2005).

5.1.1.3. Perfil acídic de la llavor de soja i del miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Es van determinar els perfils acídics de la llavor de soja i del miceli liofilitzat de *R. oryzae* per tal de conèixer les diferents proporcions de cada un dels àcids grassos majoritaris dels materials biològics de partida per a l'obtenció dels corresponents monoglicèrids.

A la Taula 19 es troben els resultats de la determinació del perfil acídic de miceli liofilitzat de *R. oryzae*, així com dels perfils acídics de tots dos lots de llavors de soja utilitzats. El perfil acídic de la llavor de sèsam no es va determinar degut a que les proves d'obtenció de monoglicèrids es van limitar finalment a les llavors de soja. De totes maneres l'àcid oleic i l'àcid linoleic són els dos àcids predominants a la llavor de sèsam amb percentatges propers al

40% cada un. Els altres dos àcids grassos que hi predominen són l'àcid palmític (10%) i l'àcid esteàric (7%) (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996).

Taula 19. Perfil acídic de dos llavors de soja i de miceli liofilitzat de *R. oryzae*.

Àcid Gras	%		
	<i>R. oryzae</i>	Soja 1	Soja 2
C10:0	n.d.	0,11	0,10
C12:0	0,87	3,21	3,18
C14:0	0,06	0,06	0,06
C15:0	0,04	n.d.	n.d.
C15:1	n.d.	0,03	0,03
C16:0	7,78	10,86	10,88
C16:1	0,08	0,25	0,51
C17:0	0,05	0,12	0,14
C17:1	n.d.	0,15	0,07
C18:0	4,18	3,73	3,70
C18:1trans	0,03	0,18	0,17
C18:1cis	26,89	16,95	16,80
C18:2trans	0,02	0,08	0,07
C18:2cis	56,67	54,76	54,79
C20:0	0,31	0,29	0,30
C18:3	0,89	7,97	7,99
C20:1	0,19	0,13	0,14
C21:0	0,05	0,07	0,07
C20:2	0,08	n.d.	n.d.
C22:0	0,83	0,70	0,81
C22:1	n.d.	0,09	n.d.
C23:0	0,05	0,08	0,06
C24:0	0,63	0,17	0,13
C24:1	0,03	n.d.	n.d.
Desconegut	0,19	n.d.	n.d.
TOTAL	100	100	100

Per a totes dues llavors de soja, els àcids grassos majoritaris són, per ordre decreixent d'abundància, l'àcid linoleic, l'oleic, el palmític i el linolènic. Destaca el fet que el contingut en àcids grassos insaturats és superior al 80% per a totes dues llavors. Aquests resultats, així com els resultats del contingut d'alfa, gamma i delta tocoferol, coincideixen amb les dades corresponents a la soja dels estàndards de composició d'àcids grassos d'olis vegetals crus del Codex Alimentarius (Codex Committee on Fats and Oils, 2005). Pel que fa al perfil acídic de la soja comparat amb el que s'ha trobat al miceli de *R. oryzae* es pot observar una menor quantitat de la majoria d'àcids menys en el cas dels àcids oleic (C18:1) i el lignocèric (C24:0), que presenten una major proporció relativa en el fong, i dels àcids esteàric (C18:0) i linoleic (C:18:2), amb una proporció molt similar entre l'oli de soja i el fong. Aquests resultats ens indiquen que en les proves posteriors amb soja i miceli, les proporcions d'oleic i lignocèric ens serviran com indicadors de possibles aportacions del miceli al resultat final de les hidròlisi de soja.

5.2. Material químic.

5.2.1. Preparació de patrons d'èster de solketal de les llavors de soja i sèsam.

Es va estudiar l'obtenció, per a les llavors de soja i sèsam, d'una barreja dels seus àcids grassos esterificats amb solketal i amb glicidol per ser utilitzada com a patró per a la quantificació dels èsters formats al procés d'hidròlisi i esterificació catalitzat per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de dissolvent. Per fer-ho, es va realitzar una primera extracció dels àcids grassos de les llavors i una posterior esterificació amb resina PS-Carbodiimida, donat que estudis anteriors mostren l'aplicabilitat d'aquesta resina per a la síntesi d'èsters d'àcids carboxílics (Llovera et al., 2005).

La reacció d'esterificació dels àcids grassos de soja o sèsam amb solketal o glicidol en presència de la resina PS-Carbodiimida no va tenir lloc per a cap de les dues llavors. Probablement, els àcids grassos de cadena llarga, tenen un impediment estèric per a la reacció amb aquesta resina, que sí que catalitza altres reaccions d'esterificació amb àcids carboxílics de cadena més curta amb rendiments superiors al 50 % (Llovera et al., 2005).

5.2.2. Síntesi d'èsters de solketal d'àcids grassos de cadena llarga.

Donat els perfils acídics determinats per a la llavor de soja i per al miceli liofilitzat de *R. oryzae*, es va considerar necessària la síntesi d'èsters de solketal dels àcids grassos majoritaris en tots dos materials de partida per tal de fer-los servir com a reactius de partida a l'estudi de desprotecció d'èsters de solketal d'àcids grassos (apartat 4.3.2). Es van utilitzar dos mètodes d'escalfament per a la síntesi: microones (per a la síntesi de l'èster de solketal de l'àcid palmític) i convencional (per a la síntesi dels èsters de solketal dels àcids làuric, mirístic, palmític, esteàric i oleic).

5.2.2.1. Mètode assistit per microones.

Es va assajar un mètode d'esterificació catalitzada per lipasa comercial (Novozyme) per a la preparació de l'èster de solketal de l'àcid palmític amb escalfament mitjançant microones, amb l'objectiu d'escurçar els temps de reacció respecte la síntesi mitjançant escalfament convencional. L'èster format, palmitat de solketil, serà utilitzat com a model de reacció a l'estudi de desprotecció d'èsters de solketal d'àcids grassos (apartat 4.4.3). Les condicions de reacció es troben descrites a l'apartat 4.3.2.1.

Amb les condicions emprades, el rendiment de reacció promig va ser del 51,26 % (n=2). Aquest resultat mostra que és possible la preparació enzimàtica d'èsters de solketal mitjançant escalfament amb microones a les condicions de

reacció assajades (2 h de reacció a 60 °C, proporció molar àcid:alcohol 1:2) amb rendiments moderats.

5.2.2.2. Mètode amb escalfament convencional.

Encara que els resultats de l'apartat anterior mostren que és possible la síntesi de l'èster de solketal de l'àcid palmític catalitzada per Novozyme amb escalfament per microones, es va decidir emprar un mètode d'escalfament convencional tot i que aquest suposi un temps de reacció de 24 h, molt superior a les 2 h del mètode d'escalfament amb microones. Aquesta decisió va estar motivada pel fet de que treballar amb microones fa que no es puguin emprar grans quantitats de reactius degut a la mida del receptacle per als vials de l'aparell de microones. Així, es va utilitzar un mètode d'escalfament convencional per a la preparació enzimàtica d'èster de solketal de l'àcid palmític (per ser utilitzats com a model de reacció a l'estudi de desprotecció d'èsters de solketal d'àcids grassos als experiments de tot l'apartat 4.4.3) i també dels èsters de solketal dels àcids làuric, mirístic, palmític, esteàric i oleic (per ser utilitzats com a model de reacció a l'estudi de desprotecció d'èsters de solketal d'àcids grassos als experiments dels apartats 4.4.3.1.1.7 i 4.4.3.2.3).

A la Taula 20 es presenten els rendiments de les reaccions de síntesi per escalfament convencional dels èsters de solketal dels àcids grassos: làuric (C12:0), mirístic (C14:0), palmític (C16:0), esteàric (C18:0) i oleic (C18:1).

Taula 20. Rendiments de les reaccions de síntesi d'èsters de solketal d'àcids grassos catalitzada per Novozyme. Condicions de reacció 60 °C, 24 h.

Producte de partida	Rendiment de Reacció (%)
Àcid Làuric (C12:0)	58,94%
Àcid Mirístic (C14:0)	64,32%
Àcid Palmític (C16:0)	55,44%
Àcid Esteàric (C18:0)	70,81%
Àcid Oleic (C18:1)	42,23%

En general, els rendiments obtinguts són moderats, amb un valor màxim de 70,81% de rendiment per a la síntesi d'èster de solketal de l'àcid esteàric. El valor de rendiment mínim correspon a la síntesi de l'èster de solketal de l'àcid oleic (42,23%). Aquest rendiment pot ser degut a que és l'únic àcid gras que presenta insaturacions i, amb les condicions emprades, això impliqui una menor selectivitat de l'enzim respecte la resta d'àcids grassos saturats.

Respecte la síntesi d'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones, el resultat trobat amb un escalfament convencional és pràcticament el mateix.

Les caracteritzacions dels productes mitjançant RMN (^1H i ^{13}C) segons el procediment descrit a l'apartat 4.5.9 reporten els següents resultats:

Espectres de protó (^1H):

Èster de solketal de l'àcid làuric:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0,88 (t, $J=7,03$ Hz, 3 H) 1,18 - 1,35 (m, 16 H) 1,37 (s, 3 H) 1,43 (s, 3 H) 1,53 - 1,69 (m, 2 H) 2,33 (t, $J=7,42$ Hz, 2 H) 3,73 (dd, $J=8,60, 6,25$ Hz, 1 H) 4,04 - 4,11 (m, 2 H) 4,16 (dd, $J=11,33, 4,69$ Hz, 1 H) 4,27 - 4,34 (m, 1 H).

Èster de solketal de l'àcid mirístic:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0,87 (d, $J=7,03$ Hz, 3 H) 1,16 - 1,34 (m, 20 H) 1,36 (s, 3 H) 1,42 (s, 3 H) 1,54 - 1,69 (m, 2 H) 2,32 (t, $J=7,42$ Hz, 2 H) 3,68 - 3,75 (m, 1 H) 4,03 - 4,10 (m, 2 H) 4,15 (dd, $J=11,33, 4,69$ Hz, 1 H) 4,26 - 4,33 (m, 1 H).

Èster de solketal de l'àcid palmític:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0,87 (t, $J=6,85$ Hz, 3 H) 1,17 - 1,35 (m, 28 H) 1,37 (s, 3 H) 1,43 (s, 3 H) 1,53 - 1,70 (m, 2 H) 2,33 (t, $J=7,57$ Hz, 2 H) 3,73 (dd, $J=8,61, 6,25$ Hz, 1 H) 4,04 - 4,12 (m, 2 H) 4,16 (dd, $J=6,64, 4,69$ Hz, 1 H) 4,27 - 4,36 (m, 1 H).

Èster de solketal de l'àcid esteàric:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0,87 (t, $J=6,85$ Hz, 3 H) 1,17 - 1,35 (m, 28 H) 1,37 (s, 3 H) 1,43 (s, 3 H) 1,53 - 1,70 (m, 2 H) 2,33 (t, $J=7,57$ Hz, 2 H) 3,73 (dd, $J=8,61, 6,25$ Hz, 1 H) 4,04 - 4,12 (m, 2 H) 4,16 (dd, $J=6,64, 4,69$ Hz, 1 H) 4,27 - 4,36 (m, 1 H).

Èster de solketal de l'àcid oleic:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0,87 (t, $J=7,03$ Hz, 3 H) 1,09 - 1,36 (m, 24 H) 1,36 (s, 3 H) 1,43 (s, 3 H) 1,52 - 1,72 (m, 2 H) 2,32 (t, $J=7,42$ Hz, 2 H) 3,73 (dd, $J=8,60, 6,25$ Hz, 1 H) 4,04 - 4,11 (m, 2 H) 4,16 (dd, $J=11,33, 4,69$ Hz, 1 H) 4,20 - 4,36 (m, 1 H) 5,23 - 5,40 (m, 2 H).

Espectres de carboni (^{13}C):

Èster de solketal de l'àcid làuric:

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14,08 (s, 1 CH_3) 22,66 (s, 1 CH_2) 24,88 (s, 1 CH_3) 25,38 (s, 1 CH_2) 26,67 (s, 1 CH_3) 29,10 (s, 1 CH_2) 29,22 (s, 1 CH_2) 29,30 (s, 1 CH_2) 29,43 (s, 1 CH_2) 29,57 (s, 2 CH_2) 31,89 (s, 1 CH_2) 34,10 (s, 1 CH_2) 64,50 (s, 1 CH_2) 66,34 (s, 1 CH_2) 73,65 (s, 1 CH) 109,81 (s, 1 C) 173,65 (s, 1 C).

Èster de solketal de l'àcid mirístic:

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14,08 (s, 1 CH_3) 22,66 (s, 1 CH_2) 24,87 (s, 1 CH_3) 25,37 (s, 1 CH_2) 26,66 (s, 1 CH_3) 29,10 (s, 1 CH_2) 29,22 (s, 1 CH_2) 29,32 (s, 1 CH_2) 29,42 (s, 1 CH_2) 29,57 (s, 1 CH_2) 29,62 (s, 1 CH_2) 29,64 (s, 2 CH_2) 31,89 (s, 1 CH_2) 34,09 (s, 1 CH_2) 64,48 (s, 1 CH_2) 66,34 (s, 1 CH_2) 73,65 (s, 1 CH) 109,78 (s, 1 C) 173,60 (s, 1 C).

Èster de solketal de l'àcid palmític:

^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ ppm 14,11 (s, 1 CH_3) 22,68 (s, 1 CH_2) 24,89 (s, 1 CH_3) 25,39 (s, 1 CH_2) 26,67 (s, 1 CH_3) 29,10 (s, 1 CH_2) 29,23 (s, 1 CH_2) 29,34

(s, 1 CH₂) 29,44 (s, 1 CH₂) 29,57 (s, 1 CH₂) 29,63 (s, 1 CH₂) 29,65 (s, 1 CH₂) 29,67 (s, 3 CH₂) 31,91 (s, 1 CH₂) 34,10 (s, 1 CH₂) 64,50 (s, 1 CH₂) 66,34 (s, 1 CH₂) 73,65 (s, 1 CH) 109,80 (s, 1 C) 173,64 (s, 1 C).

Èster de solketal de l'àcid esteàric:

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14,10 (s, 1 CH₃) 22,68 (s, 1 CH₂) 24,88 (s, 1 CH₃) 25,38 (s, 1 CH₂) 26,67 (s, 1 CH₃) 29,10 (s, 1 CH₂) 29,23 (s, 1 CH₂) 29,34 (s, 1 CH₂) 29,44 (s, 1 CH₂) 29,57 (s, 1 CH₂) 29,62 (s, 1 CH₂) 29,64 (s, 1 CH₂) 29,68 (s, 5 CH₂) 31,91 (s, 1 CH₂) 34,10 (s, 1 CH₂) 64,50 (s, 1 CH₂) 66,34 (s, 1 CH₂) 73,65 (s, 1 CH) 109,79 (s, 1 C) 173,62 (s, 1 C).

Èster de solketal de l'àcid oleic:

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 14,08 (s, 1 CH₃) 22,66 (s, 1 CH₂) 24,86 (s, 1 CH₃) 25,37 (s, 1 CH₂) 26,67 (s, 1 CH₃) 27,15 (s, 1 CH₂) 27,21 (s, 1 CH₂) 29,03 (s, 1 CH₂) 29,25 (s, 2 CH₂) 29,31 (s, 1 CH₂) 29,43 (s, 1 CH₂) 29,50 (s, 1 CH₂) 29,67 (s, 1 CH₂) 29,74 (s, 1 CH₂) 31,89 (s, 1 CH₂) 34,10 (s, 1 CH₂) 64,51 (s, 1 CH₂) 66,33 (s, 1 CH₂) 73,64 (s, 1 CH) 109,92 (s, 1 C) 129,80 (s, 1 CH) 130,09 (s, 1 CH) 173,69 (s, 1 C).

Els valors de desplaçaments obtinguts corresponen als valors de predicció obtinguts mitjançant les aplicacions HNMR i CNMR del software ACDLabs (versió 9.0), i en el cas de l'èster de solketal de l'àcid esteàric, el valor per a l'experiment de ¹H, coincideix també amb valors trobats a la bibliografia (Yu et al., 2003).

5.3. Metodologies experimentals.

5.3.1. Monitorització de l'activitat lipàsica de Rhizopus oryzae.

Pel fet de fer servir miceli liofilitzat de *R. oryzae* com a biocatalitzador, i no una lipasa comercial estandarditzada, és previsible que existeixi una certa variabilitat en l'activitat enzimàtica entre diferents lots d'obtenció de miceli, lligada principalment a la producció de lipasa durant el cultiu del fong. Aquesta variabilitat en l'activitat enzimàtica de cultius de fongs pot ser deguda, per exemple, a canvis en la velocitat d'agitació del cultiu en creixement (Nahas, 1988), o als canvis en l'estructura secundària de l'enzim induïts pel procés de liofilització (Xiao et al., 2009). És per això que es va fer necessari el desenvolupament d'un mètode de determinació de l'activitat lipàsica que ens permetés comparar l'estabilitat en el temps del miceli (en termes d'activitat enzimàtica) i el comportament de diferents lots de miceli cultivat de *R. oryzae*.

Tal i com s'explica a l'apartat 4.4.1, es va buscar una reacció enzimàtica model per ser utilitzada com a mesura de l'activitat enzimàtica de miceli liofilitzat de *R. oryzae*.

5.3.1.1. Resultats de les proves preliminars.

Els resultats de les diferents reaccions d'esterificació assajades a les proves preliminars per a l'establiment d'una reacció que ens permeti determinar l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat de *R. oryzae* es presenten a la Taula 21.

Taula 21. Rendiments de les reaccions d'esterificació catalitzades per miceli liofilitzat de *R. oryzae* assajades en les proves preliminars (promig \pm desviació estàndard de $n=3$). n.d. = no detectat.

Reactius i proporcions molars	Dissolvent	Volum total (mL)	Massa de miceli de <i>R. oryzae</i> (mg)	Condicions de Reacció	Rendiment (%)
Àcid palmític:Isopropanol 1:1	TBME	0,5	15 mg	40 °C / 30 min	1,06 \pm 0,04
				40 °C / 1 h	2,69 \pm 0,02
				40 °C / 2 h	2,99 \pm 0,01
				40 °C / 6 h	4,28 \pm 0,19
Àcid palmític:Isopropanol 1:1	Hexà	0,5	15 mg	40 °C / 30 min	4,34 \pm 0,21
				40 °C / 1 h	n.d.
				40 °C / 2 h	n.d.
Àcid palmític:1-propanol 1:1	Hexà	0,5	15 mg	40 °C / 15 min	49,00 \pm 2,18
				40 °C / 30 min	49,41 \pm 2,61
				40 °C / 1h	48,51 \pm 1,15
Àcid palmític:1-propanol 1:1	Hexà	1	15 mg	40 °C / 5 min	44,89 \pm 0,60
				40 °C / 10 min	47,79 \pm 0,37
				40 °C / 30 min	49,45 \pm 3,83
Àcid palmític:1-propanol 1:1	TBME	0,5	5 mg	40 °C / 5 min	11,50 \pm 0,25
				40 °C / 15 min	13,68 \pm 0,94
			10 mg	40 °C / 5 min	12,64 \pm 0,78
				40 °C / 15 min	13,66 \pm 0,20
			15 mg	40 °C / 5 min	11,24 \pm 0,85
				40 °C / 15 min	14,07 \pm 0,71
Àcid palmític:1-propanol 1:1	TBME	0,5	5 mg*	40 °C / 5 min	6,57 \pm 0,37
				40 °C / 15 min	16,37 \pm 0,08
			10 mg*	40 °C / 5 min	8,85 \pm 0,22
				40 °C / 15 min	14,83 \pm 0,45
			15 mg*	40 °C / 5 min	9,81 \pm 0,11
				40 °C / 15 min	15,04 \pm 0,61

*Agitació prèvia del miceli amb la solució d'àcid palmític durant 15 min a 40 °C

Les reaccions d'esterificació de l'àcid palmític amb isopropanol donen rendiments molt baixos o inferiors al límit de detecció del mètode cromatogràfic, probablement degut a la dificultat de la lipasa continguda en el miceli per a esterificar alcohols secundaris. Al substituir l'isopropanol per 1-propanol, els rendiments augmenten, sobretot en utilitzar hexà com a dissolvent, però també amb l'ús de TBME. Tot i això, la reacció no sembla ser gaire sensible a la massa de miceli emprada, donat que els rendiments no sempre augmenten a l'augmentar la quantitat de miceli.

Donats aquests resultats per les reaccions d'esterificació, es va decidir estudiar l'activitat lipàsica a partir de reaccions d'hidròlisi per tal d'obtenir una

reacció model que s'adaptés a les característiques desitjades. Els resultats es mostren a la Taula 22.

Taula 22. Rendiments de les reaccions d'hidròlisi catalitzades per miceli liofilitzat de *R. oryzae* assajades en les proves preliminars (promig \pm desviació estàndard de $n=3$). n.d. = no detectat.

Reactius i proporcions molars	Dissolvent	Volum total (mL)	Massa de miceli de <i>R. oryzae</i> (mg)	Condicions de Reacció	Rendiment (%)
Palmitat d'isopropil	Acetona:H ₂ O 1:1	1	5 mg	40 °C / 10 min	n.d.
				40 °C / 30 min	n.d.
			10 mg	40 °C / 10 min	n.d.
				40 °C / 30 min	n.d.
			15 mg	40 °C / 10 min	n.d.
				40 °C / 30 min	n.d.
Estearat de metil	Hexà	1	5 mg	40 °C / 10 min	1,61 \pm 0,11
				40 °C / 30 min	1,11 \pm 0,03
			10 mg	40 °C / 10 min	1,88 \pm 0,05
				40 °C / 30 min	2,69 \pm 0,13
			15 mg	40 °C / 10 min	2,15 \pm 0,06
				40 °C / 30 min	2,05 \pm 0,10
Estearat de metil	<i>tert</i> -Butanol	0,5	5 mg	40 °C / 5 min	1,12 \pm 0,09
				40 °C / 15 min	1,78 \pm 0,04
				40 °C / 30 min	3,42 \pm 0,06
			10 mg	40 °C / 5 min	2,36 \pm 0,07
				40 °C / 15 min	3,65 \pm 0,09
				40 °C / 30 min	6,36 \pm 0,12
				40 °C / 45 min	12,21 \pm 0,33
			15 mg	40 °C / 1 h	18,06 \pm 0,86
				40 °C / 5 min	4,21 \pm 0,08
				40 °C / 15 min	5,58 \pm 0,10
				40 °C / 30 min	8,35 \pm 0,16

No es va observar reacció d'hidròlisi en el cas del palmitat d'isopropil catalitzada pel miceli en el dissolvent assajat. En quant a la reacció d'hidròlisi d'estearat de metil, la utilització d'hexà com a dissolvent va donar rendiments molt baixos després de 30 min. A més, no sembla una reacció sensible a la quantitat de miceli. Finalment es va veure que l'ús de *tert*-butanol com a dissolvent donava rendiments més elevats a mesura que augmentava tant la massa de miceli com el temps de reacció. A la Figura 25 es representa l'augment de la velocitat d'hidròlisi en funció de la quantitat de miceli emprat. Es pot observar una bona relació lineal encara que la dispersió dels resultats és alta quan s'emprà 15 mg de miceli.

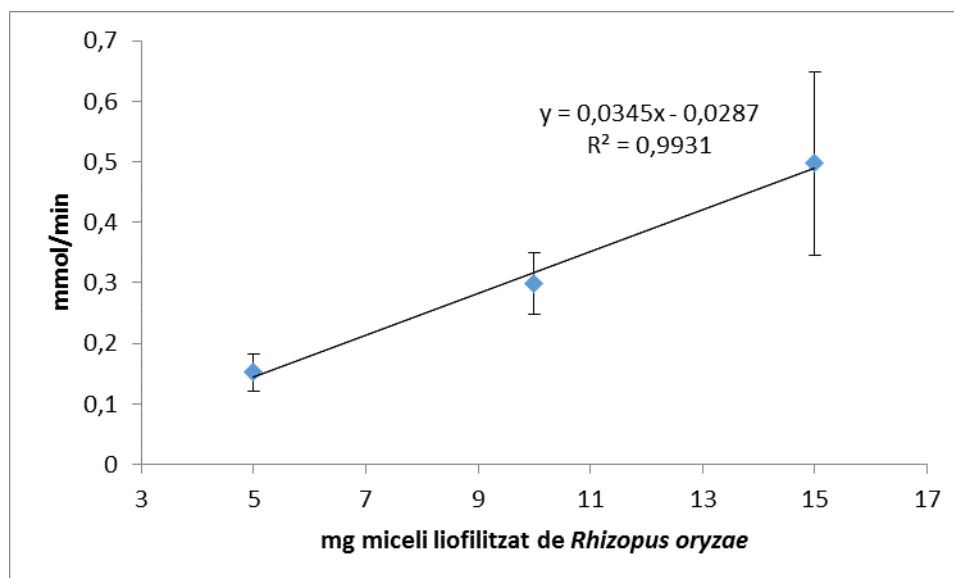


Figura 25. Velocitat d'hidròlisi d'estearat de metil en funció de la quantitat de miceli de *R. oryzae* emprat com a biocatalitzador. La reacció es realitza a 40 °C emprant 0,5 mL de *tert*-butanol com a medi de reacció.

A partir d'aquestes dades es procedí a escollir com a condicions per a la monitorització de l'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de *R. oryzae* la reacció d'hidròlisi d'estearat de metil emprant 10 mg de miceli, 1 h, 40 °C i *tert*-butanol com a dissolvent. Finalment, es va definir l'activitat lipàsica com els μmol d'àcid esteàric alliberats per minut mitjançant la hidròlisi d'estearat de metil en les condicions de reacció escollides. Per tal d'obtenir aquest valor, es va quantificar el contingut d'àcid esteàric després dels 60 min de l'assaig i es va calcular l'activitat segons la fórmula:

$$\text{Activitat lipàsica} = \frac{\mu\text{mol àcid esteàric}}{t}$$

On $t = 60$ min.

Aquestes unitats (μmol d'àcid gras alliberat a la hidròlisi d'un substrat lipídic per minut) s'han fet servir en altres estudis d'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de *R. oryzae* (Essamri et al., 1998; Razak et al., 1999).

5.3.1.2. Seguiment de l'activitat lipàsica de miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Un cop escollides les condicions per a monitoritzar l'activitat lipàsica, es va procedir al seguiment d'aquesta activitat al llarg de 20 mesos, en un nou lot de miceli de *R. oryzae* que va ser liofilitzat després del cultiu i es va mantenir a temperatura de congelació durant tot el període estudiat. Els rendiments de la reacció d'hidròlisi d'estearat de metil al llarg d'aquest temps es troben a la Taula 23.

Taula 23. Influència del temps de conservació i el lot de miceli en el rendiment i l'activitat lipàsica per a la reacció d'hidròlisi d'estearat de metil catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae*.

Miceli	Temps (mes)	n	Rendiment (%)	Activitat lipàsica (μmol àcid esteàric/min)	Desviació Estàndard
<i>R. oryzae</i> 1	11	5	18,06	0,25	0,86
<i>R. oryzae</i> 2	0 ^A	5	63,14	0,88	3,55
	2 ^A	5	63,03	0,88	2,82
	5 ^A	4	61,72	0,86	1,98
	8 ^B	5	55,91	0,78	2,59
	11 ^B	3	54,58	0,76	2,86
	14 ^B	5	52,45	0,73	3,58
	17 ^B	4	51,17	0,71	1,97
<i>R. oryzae</i> 3	0	3	30,89	0,43	2,57

Els resultats obtinguts als temps amb la mateixa lletra no són significativament diferents segons el test d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$)

Amb el miceli que va catalitzar les reaccions a les proves preliminars (*R. oryzae* 1) es van obtenir rendiments de reacció inferiors a les reaccions catalitzades pel miceli amb el que es va fer el seguiment de l'activitat lipàsica (*R. oryzae* 2). Això també s'observa per un altre miceli obtingut posteriorment (*R. oryzae* 3). Les diferències poden estar donades pels múltiples factors que poden incidir en el creixement fúngic, com són la població microbiana real inoculada, la temperatura, l'agitació, petites diferències en la preparació dels medis d'activació i creixement, així com els que tenen a veure amb la recuperació del miceli, com el filtrat, el rentat o el mateix procés de liofilització.

Respecte les diferències d'activitat en el temps de *R. oryzae* 2, s'observa una disminució dels rendiments a mesura que augmenta el temps d'emmagatzematge. La caiguda del rendiment després de 20 mesos va ser del 13,64%. Es va fer una separació mitjançant el test d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$) que mostra un primer descens significatiu de l'activitat a partir del mes 8 i un segon a partir del mes 20 de conservació del miceli.

Els resultats d'aquest estudi van demostrar *a posteriori* (ja s'havia portat a terme la major part d'assajos als quals intervé el miceli liofilitzat de *R. oryzae*) que diferents lots de miceli obtingut són susceptibles de presentar diferent activitat enzimàtica i que el miceli obtingut en cada lot, perd activitat lipàsica amb el temps, fent necessari establir una data límit d'ús de miceli liofilitzat de *R. oryzae* per a estudis posteriors.

5.3.2. Obtenció dels èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos continguts a les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae* en absència de solvent.

Com a primera etapa per a l'obtenció de 1-monoglicèrids a partir dels àcids grassos continguts en les llavors de soja i sèsam, es va desenvolupar un

procediment d'hidròlisi dels triglicèrids vegetals seguit d'una esterificació dels àcids grassos amb els alcohols solketal i glicidol en absència de dissolvent. Tots dos processos van ser catalitzats per miceli liofilitzat de *R. oryzae*. Aquest procediment permet l'obtenció d'èsters d'àcids grassos de glicerols protegits com a pas previ a la desprotecció i obtenció dels regioisòmers purs de monoglicèrids (Bornscheuer, 1995).

En primer lloc es va estudiar la hidròlisi de triglicèrids i l'esterificació dels àcids grassos de les llavors com a procediment conjunt (apartat 4.4.2.1) i seguidament es va optimitzar la fase d'hidròlisi (apartat 4.4.2.2), donat que els resultats suggerien que aquesta optimització permetria una millora dels rendiments del procés conjunt d'hidròlisi i esterificació.

5.3.2.1. Hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Es va desenvolupar un procediment que compregués la hidròlisi dels triglicèrids vegetals catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent, seguida de l'esterificació amb solketal i glicidol. Això permetrà obtenir els èsters de glicerols protegits dels àcids grassos, completant així la primera etapa per a l'obtenció d'1-monoglicèrids. Donat que la lipasa de *R. oryzae* presenta inhibició per substrat (Méndez, 2004), es van estudiar dues maneres d'addicionar l'alcohol d'esterificació (solketal i glicidol) un cop transcorregut el temps destinat a la hidròlisi dels triglicèrids (0, 4, 15 i 24 h) continguts a les llavors de soja i sèsam:

- a. Addició de l'alcohol en un sol moment: consisteix en l'addició d'un sol cop de tot l'alcohol d'esterificació (20 µL) a la barreja de reacció a un flux de 2 µL/min.
- b. Addició fraccionada de l'alcohol: consisteix en afegir l'alcohol de manera fraccionada en 5 addicions de 4 µL a un flux de 2 µL/min i amb 1 min d'agitació en vòrtex entre addicions.

Es va fer també, per a tots dos assaigs, un seguiment del contingut en tocoferols tant dels extractes obtinguts després de la biotransformació com dels residus sòlids (material vegetal i fúngic) que se'n deriven per tal de comprovar si és possible, en aquesta primera etapa d'obtenció de monoglicèrids, aconseguir extractes de reacció rics en aquests antioxidants.

5.3.2.1.1. Addició de l'alcohol en un sol moment.

En aquest primer assaig, es va estudiar la capacitat del miceli liofilitzat de *R. oryzae* per catalitzar, a 50 °C i diferents temps de reacció, la hidròlisi dels triglicèrids continguts en llavors de soja i sèsam seguida d'una esterificació dels àcids grassos formats amb solketal i glicidol mitjançant l'addició en un sol moment d'aquests alcohols.

Les concentracions totals d'èster format i els rendiments de la reacció d'hidròlisi més esterificació per a cada alcohol emprat (afegits en un sol moment) i per a cada temps de reacció assajat, es troben a la Taula 24 i la Taula 25.

Taula 24. Rendiments (n=3) de reacció d'hidròlisi més esterificació amb solketal o glicidol a 50 °C i a diferents temps de reacció per a la llavor de soja amb addició de l'alcohol en un sol moment i catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Concentració èsters totals (mg/mL)	Error Estàndard	Concentració màxima teòrica (mg/mL)	Rendiment (%)
Solketal	0	96	7,67	0,50	11,90	64,41 %
	4	92	6,63	0,29	12,04	55,09 %
	15	81	9,07	0,18	11,90	75,61 %
	24	72	9,40	0,24	11,92	78,86 %
Glicidol	0	96	0,63	0,04	10,16	6,23 %
	4	92	2,03	0,42	10,10	20,12 %
	15	81	2,16	0,42	10,07	21,42 %
	24	72	2,59	0,07	10,12	25,60 %

Taula 25. Rendiments (n=3) de reacció d'hidròlisi més esterificació amb solketal o glicidol a 50 °C i a diferents temps de reacció per a la llavor de sèsam amb addició de l'alcohol en un sol moment i catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Concentració èsters totals (mg/mL)	Error Estàndard	Concentració màxima teòrica (mg/mL)	Rendiment (%)
Solketal	0	96	8,25	0,45	37,07	22,25 %
	4	92	8,94	0,37	37,10	24,11 %
	15	81	9,42	0,53	37,15	25,37 %
	24	72	8,76	0,67	37,55	23,30 %
Glicidol	0	96	6,46	0,32	32,02	20,17 %
	4	92	9,24	0,51	31,91	28,96 %
	15	81	8,81	0,49	31,50	27,97 %
	24	72	8,52	1,26	31,69	26,84 %

En el cas de la llavor de soja s'observen rendiments moderats o alts per a l'esterificació amb solketal (fins a un 78,86% amb 24 h d'hidròlisi i 72 h d'esterificació) i rendiments baixos per a l'esterificació amb glicidol (màxim 25,60% amb 24 h d'hidròlisi i 72 h d'esterificació). Per a tots dos alcohols, el rendiment de reacció augmenta a mesura que augmenta el temps d'hidròlisi. La millora en el rendiment en el cas de fer servir solketal amb l'augment del temps d'hidròlisi pot venir també influenciat pel fet de que un major temps de processat implica una major possibilitat de que els 2-monoglicèrids isomeritzin a 1-monoglicèrids i, d'aquesta manera, la lipasa 1,3-específica de *R. oryzae* sigui ja capaç

d'hidrolitzar fàcilment el compost corresponent. Crida l'atenció el rendiment moderat en el cas del glicidol i la no millora d'aquest en el temps. En aquest cas, a part de la possible inhibició de l'enzim per part del substrat hi podria haver també un fenomen d'obertura del glicidol i polimerització del mateix o síntesi de nou triglicèrid. Qualsevol de les dues possibilitats donarien també com a resultat una no progressió de la reacció en termes macromoleculars. Donat que al medi de reacció no es troben cap dels iniciadors de la reacció de polimerització descrits a la bibliografia, com són algunes bases o determinats àcids de Lewis (Dworak et al., 1995; Weiss et al., 2012), aquests resultats podrien indicar una certa activitat epoxi hidrolàsica d'enzims presents a *R. oryzae* o de la mateixa lipasa, com la que presenta la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*, emprada en un treball descrit a la bibliografia precisament per a la polimerització enzimàtica de glicidol (Soeda et al., 2001).

Per a la llavor de sèsam, els rendiments de reacció amb tots dos alcohols oscil·la entre 20-30% i no s'observa cap variació en augmentar el temps d'hidròlisi. Aquest fet, que només s'observa en el cas de la matriu vegetal amb un percentatge més elevat d'oli, la llavor de sèsam (veure Taula 17), sembla indicar un possible efecte d'inhibició per substrat de l'enzim. Aquest efecte s'ha comprovat en estudis anteriors per al substrat donador del grup acil però no per al substrat donador del grup alquil (Garcia-Alles and Gotor, 1998; Singh et al., 2008).

D'altra banda, per a la llavor de sèsam no s'observen diferències substancials entre els rendiments de reacció d'esterificació amb solketal i amb glicidol. Això suggereix un efecte de la matriu vegetal, més enllà del seu contingut en greix, en la preferència de l'enzim pel substrat alcohol.

Per altra part, es va determinar també el contingut en alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes de reacció obtinguts després de la hidròlisi més esterificació i als residus sòlids resultants. A la Taula 26 i la Taula 27 es presenten els resultats corresponents als extractes i als residus resultants de la reacció d'esterificació per a la llavor de soja amb una addició en un sol moment de solketal o glicidol.

Taula 26. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació (mg/100g d'extracte) de la llavor de soja per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Alfa	Gamma	Delta
Solketal	0	96	25,02 \pm 0,05	63,36 \pm 0,09	39,58 \pm 0,11
	4	92	27,42 \pm 0,10	62,50 \pm 0,23	40,61 \pm 0,20
	15	81	25,78 \pm 0,17	60,08 \pm 0,36	38,31 \pm 0,22
	24	72	27,41 \pm 0,17	63,57 \pm 0,27	39,72 \pm 0,21
Glicidol	0	96	8,35 \pm 0,03	26,08 \pm 0,12	22,26 \pm 0,08
	4	92	7,15 \pm 0,07	19,77 \pm 0,14	17,79 \pm 0,05
	15	81	9,82 \pm 0,45	21,02 \pm 1,02	18,31 \pm 0,54
	24	72	11,05 \pm 0,31	27,29 \pm 0,61	24,84 \pm 0,34

Taula 27. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol als residus sòlids (mg/100g material sòlid) de la llavor de soja per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Alfa	Gamma	Delta
Solketal	0	96	7,98 \pm 0,29	22,47 \pm 1,50	16,93 \pm 1,03
	4	92	8,13 \pm 0,98	21,19 \pm 1,90	16,76 \pm 1,18
	15	81	7,34 \pm 0,51	18,90 \pm 1,21	15,49 \pm 1,18
	24	72	8,71 \pm 0,48	23,37 \pm 2,25	19,10 \pm 1,52
Glicidol	0	96	4,22 \pm 0,68	16,14 \pm 2,25	15,56 \pm 0,74
	4	92	3,49 \pm 0,38	13,08 \pm 0,98	12,73 \pm 0,42
	15	81	4,05 \pm 2,65	11,72 \pm 6,20	11,20 \pm 4,25
	24	72	2,37 \pm 0,44	7,87 \pm 1,07	8,96 \pm 1,99

Respecte als valors de contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol trobats per a la llavor de soja (Taula 18, soja 1: 44,88 mg d'alfa-tocoferol/100 g de llavor, 112,70 mg de gamma-tocoferol/100 g de llavor i 65,03 mg de delta-tocoferol/100 g de llavor), s'observa una pèrdua de tocoferols que pot ser atribuïda a l'oxidació d'aquests durant el procés d'hidròlisi de triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* i durant l'emmagatzematge tant de la llavor triturada com de les mostres d'extractes d'esterificació i residus sòlids. Per a una addició de l'alcohol en un sol moment, s'observa una tendència generalitzada a recuperar una major concentració de tocoferols quan la esterificació es realitza amb solketal, tant per als extractes com per als residus sòlids. Aquest fenomen podria ser igualment degut a la major reactivitat de l'anell oxirànic del glicidol en front del solketal, cosa que podria afavorir una reacció entre els hidroxils lliures dels tocoferols i l'anell oxirànic, provocant una disminució de la quantitat total de tocoferols lliures recuperats.

Pel que fa als extractes provinents de l'esterificació amb solketal addicionat en un sol moment, els valors obtinguts per a cada tocoferol són d'entre 25-27 mg d'alfa-tocoferol/100 g d'extracte, 60-64 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 38-41 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. Els extractes provinents de l'esterificació amb glicidol addicionat en un sol moment presenten concentracions de tocoferols d'entre 7-11 mg d'alfa-tocoferol/100 g d'extracte, 19-27 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 17-25 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. El contingut de alfa, gamma i delta-tocoferol no sembla mostrar cap tendència al variar el temps d'hidròlisi ni tampoc el temps d'esterificació amb l'addició en un sol moment de cap dels dos alcohols d'esterificació.

En quan al contingut en tocoferols dels residus sòlids s'observa que, per a tots els casos, és menor que el contingut dels seus corresponents extractes provinents de l'esterificació. Això indica que l'extracció dels productes de reacció permet també extreure, en tots els casos, més del 50 % dels tocoferols extractables després de la reacció, fet previsible, per altra part, donat que el procés d'extracció dels tocoferols dels residus sòlids consisteix en una reextracció del material vegetal i fúngic (apartat 4.5.2.1) amb el mateix dissolvent emprat per a l'extracció dels productes de reacció (hexà). Aquest fet es repetirà per a tots els assaigs posteriors.

Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb solketal addicionat en un sol moment són d'entre 7-9 mg d'alfa-tocoferol/100 g de material sòlid, 19-23 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 15-19 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb glicidol addicionat en un sol moment són d'entre 2-4 mg d'alfa-tocoferol/100 g de material sòlid, 8-16 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 9-16 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid.

En termes de percentatge de recuperació, els resultats de la recuperació de tocoferols en extractes i residus es presenten a la Taula 28.

Taula 28. Resultats de recuperació d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació i als residus sòlids (%) respecte al contingut en la llavor de soja crua per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Material	Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Alfa	Gamma	Delta
Extractes	Solketal	0	96	55,7%	56,2%	60,9%
		4	92	61,1%	55,5%	62,4%
		15	81	57,4%	53,3%	58,9%
		24	72	61,1%	56,4%	61,1%
	Glicidol	0	96	18,6%	23,1%	34,2%
		4	92	15,9%	17,5%	27,4%
		15	81	21,9%	18,7%	28,2%
		24	72	24,6%	24,2%	38,2%
Residus	Solketal	0	96	17,8%	19,9%	26,0%
		4	92	18,1%	18,8%	25,8%
		15	81	16,4%	16,8%	23,8%
		24	72	19,4%	20,7%	29,4%
	Glicidol	0	96	9,4%	14,3%	23,9%
		4	92	7,8%	11,6%	19,6%
		15	81	9,0%	10,4%	17,2%
		24	72	5,3%	7,0%	13,8%
Extractes + Residus	Solketal	0	96	73,5%	76,2%	86,9%
		4	92	79,2%	74,3%	88,2%
		15	81	73,8%	70,1%	82,7%
		24	72	80,5%	77,1%	90,5%
	Glicidol	0	96	28,0%	37,5%	58,2%
		4	92	23,7%	29,1%	46,9%
		15	81	30,9%	29,1%	45,4%
		24	72	29,9%	31,2%	52,0%

Les mateixes determinacions de tocoferols fetes per a la llavor de soja es van realitzar per a la llavor de sèsam. A la Taula 29 i la Taula 30 es presenten els resultats del contingut de gamma i delta-tocoferol tant de l'extracte com del residu sòlid de la reacció d'hidròlisi i esterificació per a la llavor de sèsam fent l'addició d'alcohol en un sol moment.

Taula 29. Contingut de gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació (mg/100g d'extracte) de la llavor de sèsam per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Solketal	0	96	65,46 \pm 2,39	17,55 \pm 2,69
	4	92	48,90 \pm 0,92	11,57 \pm 0,19
	15	81	54,64 \pm 2,17	13,49 \pm 1,45
	24	72	54,80 \pm 1,42	13,65 \pm 0,38
Glicidol	0	96	58,71 \pm 1,28	15,31 \pm 0,08
	4	92	32,74 \pm 0,83	8,22 \pm 0,02
	15	81	44,24 \pm 4,55	11,09 \pm 1,57
	24	72	43,77 \pm 1,82	10,88 \pm 0,73

Taula 30. Contingut de gamma i delta-tocoferol als residus sòlids (mg/100g material sòlid) de la llavor de sèsam per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Solketal	0	96	1,82 \pm 0,44	0,41 \pm 0,12
	4	92	1,23 \pm 0,13	0,26 \pm 0,03
	15	81	1,11 \pm 0,05	0,23 \pm 0,01
	24	72	1,27 \pm 0,04	0,27 \pm 0,01
Glicidol	0	96	1,23 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02
	4	92	0,80 \pm 0,09	0,14 \pm 0,02
	15	81	0,57 \pm 0,27	0,10 \pm 0,06
	24	72	0,90 \pm 0,26	0,16 \pm 0,06

Respecte als valors de contingut de gamma i delta-tocoferol trobats per a la llavor de sèsam (Taula 18: 96,77 mg de gamma-tocoferol/100 g de llavor i 103,31 mg de delta-tocoferol/100 g de llavor), s'observa el mateix fet que per a la llavor de soja: una pèrdua de tocoferols que pot ser atribuïda als mateixos factors esmentats anteriorment per a aquesta llavor.

Pel que fa als extractes provinents de l'esterificació amb solketal addicionat en un sol moment, els valors obtinguts per a cada tocoferol són d'entre 49-65 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 12-18 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. Els extractes provinents de l'esterificació amb glicidol addicionat en un sol moment presenten concentracions de tocoferols d'entre 33-59 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 8-15 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. El contingut de alfa, gamma i delta-tocoferol no sembla mostrar cap tendència al variar el temps d'hidròlisi ni tampoc el temps d'esterificació amb l'addició en un sol moment de cap dels dos alcohols d'esterificació, encara que els valors màxims per a tots dos tocoferols i tots dos alcohols es donen a 0 h

d'hidròlisi i 96 h d'esterificació. Per a totes les condicions assajades, els resultats són superiors quan l'esterificació es porta a terme amb solketal, tot i que les diferències respecte el glicidol no són tan marcades com als resultats presentats per a la llavor de soja.

En quan al contingut en tocoferols dels residus sòlids s'observa que, per a tots els casos, és menor que el contingut dels seus corresponents extractes provinents de l'esterificació, de la mateixa manera que succeïa amb la llavor de soja i per la mateixa raó argumentada abans. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb solketal addicionat en un sol moment són d'entre 1,1-1,8 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,2-0,4 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb glicidol addicionat en un sol moment són d'entre 0,6-1,2 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,1-0,3 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. De la mateixa manera que als valors trobats als extractes, els resultats són superiors quan l'esterificació es porta a terme amb solketal per a totes les condicions assajades.

En termes de percentatge de recuperació, els resultats de la recuperació de tocoferols en extractes i residus per a la llavor de sèsam es presenten a la Taula 31.

Taula 31. Resultats de recuperació d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes d'esterificació i als residus sòlids (%) respecte al contingut en la llavor de soja crua per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició en un sol moment (\pm error estàndard i n=3).

Material	Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Extractes	Solketal	0	96	67,6%	17,0%
		4	92	50,5%	11,2%
		15	81	56,5%	13,1%
		24	72	56,6%	13,2%
	Glicidol	0	96	60,7%	14,8%
		4	92	33,8%	8,0%
		15	81	45,7%	10,7%
		24	72	45,2%	10,5%
Residus	Solketal	0	96	1,9%	0,4%
		4	92	1,3%	0,3%
		15	81	1,1%	0,2%
		24	72	1,3%	0,3%
	Glicidol	0	96	1,3%	0,2%
		4	92	0,8%	0,1%
		15	81	0,6%	0,1%
		24	72	0,9%	0,2%
Extractes + Residus	Solketal	0	96	69,5%	17,4%
		4	92	51,8%	11,5%
		15	81	57,6%	13,3%
		24	72	57,9%	13,5%
	Glicidol	0	96	61,9%	15,1%
		4	92	34,7%	8,1%
		15	81	46,3%	10,8%
		24	72	46,2%	10,7%

5.3.2.1.2. Addició fraccionada de l'alcohol.

Donada la dificultat de l'agitació de la barreja de reacció en condicions d'absència de solvent, es va intentar augmentar els rendiments de reacció d'aquesta etapa amb una addició de l'alcohol que permetés una millor mobilitat d'aquest a través de la barreja sòlida de reacció. Així, després de l'assaig realitzat amb una esterificació addicionant l'alcohol en un sol moment, es va estudiar de quina manera podia afectar al procés una addició fraccionada de solketal o glicidol. Per fer-ho, es van sotmetre les llavors de soja i sèsam triturades a diferents temps de reacció d'hidròlisi dels triglicèrids i d'esterificació amb solketal o glicidol a 50 °C, catalitzades per miceli liofilitzat de *R. oryzae*, afegint la mateixa quantitat total d'alcohol i al mateix flux emprats a l'apartat anterior però fraccionada en 5 addicions de 4 μ L a un flux de 2 μ L/min i amb 1 min d'agitació en vòrtex entre addicions.

A la Taula 32 i la Taula 33 es presenten les concentracions totals d'èsters formats i els rendiments de reacció a la reacció d'hidròlisi més

esterificació amb una addició fraccionada de solketal o glicidol per a les llavors de soja i de sèsam, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Taula 32. Rendiments (n=3) de reacció d'hidròlisi més esterificació amb solketal i glicidol a 50 °C i a diferents temps de reacció per a la llavor de soja amb addició fraccionada de l'alcohol, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Concentració èsters totals (mg/mL)	Error Estàndard	Concentració màxima teòrica (mg/mL)	Rendiment (%)
Solketal	0	6	9,1	0,99	11,81	76,76 %
	4	6	8,9	0,69	11,80	74,97 %
	15	6	10,7	0,27	11,80	90,92 %
	24	6	11,2	1,78	11,80	95,02 %
	24	96	11,5	1,46	11,80	97,46 %
Glicidol	0	6	1,37	0,55	10,06	13,65 %
	4	6	2,85	0,64	10,06	28,38 %
	15	6	2,72	0,10	10,04	27,06 %
	24	6	3,40	0,16	10,06	33,77 %
	24	24	0,90	0,17	10,07	13,77 %
	24	96	0,37	0,14	10,08	3,65 %

Taula 33. Rendiments (n=3) de reacció d'hidròlisi més esterificació amb solketal i glicidol a 50 °C i a diferents temps de reacció per a la llavor de sèsam amb addició fraccionada de l'alcohol, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Concentració èsters totals (mg/mL)	Error Estàndard	Concentració màxima teòrica (mg/mL)	Rendiment (%)
Solketal	0	6	13,15	1,22	37,14	35,39 %
	4	6	11,42	0,13	37,08	30,80 %
	15	6	12,62	1,00	37,07	34,04 %
	24	6	11,87	0,96	37,08	31,98 %
	24	96	11,53	1,46	37,11	31,07 %
Glicidol	0	6	4,99	3,10	31,63	15,76 %
	4	6	12,15	0,51	31,65	38,37 %
	15	6	9,06	1,74	31,59	28,67 %
	24	6	4,02	1,66	31,62	12,70 %
	24	96	0,30	0,14	31,66	0,95 %

Tot i que per a ambdues llavors es comprova que l'addició fraccionada de l'alcohol fa augmentar el rendiment de reacció (fins a un 97,46% en el cas de l'esterificació de la llavor de soja amb solketal i temps d'esterificació de 96 h), per a l'esterificació de sèsam els rendiments continuen sent moderats o baixos amb tots dos alcohols.

Només per a l'esterificació de la llavor de soja amb solketal s'observa una tendència a augmentar el rendiment de reacció a l'augmentar el temps d'hidròlisi. El temps d'esterificació no sembla tenir cap efecte en el rendiment excepte per a l'esterificació amb glicidol durant 96 h d'ambdues llavors, amb rendiments molt baixos. Com ja s'ha

comentat anteriorment les importants diferències de rendiments de reacció entre l'esterificació amb solketal i glicidol podrien ser degudes a que al llarg del procés conjunt d'hidròlisi i esterificació té lloc una apertura del glicidol i la seva possible reesterificació o polimerització. En aquest segon cas es limitaria el paper del glicidol com a donador de grup alquil. Donat que al medi de reacció no es troben cap dels iniciadors de la reacció de polimerització descrits a la bibliografia, com són algunes bases o determinats àcids de Lewis (Dworak et al., 1995; Weiss et al., 2012), aquests resultats podrien indicar una certa activitat epoxi hidrolàsica de la lipasa de *R. oryzae*, com la que presenta la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*, emprada en un treball descrit a la bibliografia precisament per a la polimerització enzimàtica de glicidol (Soeda et al., 2001). Un o altre fenomen explicarien el fet de que els rendiments més baixos de l'esterificació amb glicidol es trobin amb el temps d'addició i d'hidròlisi més llargs (96 i 24 h respectivament).

Igual que pel cas de l'addició de l'alcohol d'esterificació en un sol moment, es va determinar el contingut de tocoferols dels extractes de reacció i dels residus sòlids obtinguts per a cada assaig d'hidròlisi i esterificació catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent i amb addició fraccionada de l'alcohol.

Per a la llavor de soja, els resultats de contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol tant de l'extracte de reacció com del residu sòlid resultant amb una addició fraccionada de l'alcohol es presenten a la Taula 34 i la Taula 35.

Taula 34. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació (mg/100g d'extracte) de la llavor de soja per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada de l'alcohol (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Alfa	Gamma	Delta
Solketal	0	6	13,58 \pm 0,53	63,37 \pm 6,01	23,34 \pm 0,48
	4	6	12,21 \pm 0,80	63,88 \pm 2,27	21,11 \pm 0,54
	15	6	13,63 \pm 0,44	65,02 \pm 3,15	23,52 \pm 0,81
	24	6	17,87 \pm 0,72	81,90 \pm 0,49	27,77 \pm 0,35
	24	24	12,62 \pm 0,10	65,44 \pm 1,11	23,29 \pm 0,37
Glicidol	0	6	3,18 \pm 0,09	24,95 \pm 0,29	14,42 \pm 0,05
	4	6	3,56 \pm 0,06	29,07 \pm 0,20	16,91 \pm 0,06
	15	6	3,31 \pm 0,01	27,82 \pm 0,01	16,44 \pm 0,06
	24	6	2,21 \pm 0,02	23,89 \pm 0,16	15,77 \pm 0,09
	24	24	2,47 \pm 0,10	22,08 \pm 0,44	15,13 \pm 0,23
	24	96	2,12 \pm 0,01	21,17 \pm 0,05	15,88 \pm 0,12

Taula 35. Contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol als residus sòlids (mg/100g material sòlid) de la llavor de soja per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada de l'alcohol (\pm error estàndard i n=3).

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Alfa	Gamma	Delta
Solketal	0	6	0,36 ± 0,08	2,43 ± 0,10	0,90 ± 0,05
	4	6	0,21 ± 0,06	1,96 ± 0,12	0,62 ± 0,04
	15	6	0,19 ± 0,07	1,65 ± 0,33	0,56 ± 0,08
	24	6	0,22 ± 0,04	2,11 ± 0,09	0,71 ± 0,02
	24	24	0,17 ± 0,01	1,38 ± 0,32	0,45 ± 0,08
Glicidol	0	6	0,39 ± 0,06	1,49 ± 0,22	0,76 ± 0,05
	4	6	0,35 ± 0,01	1,21 ± 0,09	0,69 ± 0,03
	15	6	0,32 ± 0,04	1,34 ± 0,11	0,75 ± 0,02
	24	6	0,28 ± 0,02	1,19 ± 0,02	0,71 ± 0,03
	24	24	0,38 ± 0,09	1,24 ± 0,22	0,63 ± 0,08
	24	96	0,34 ± 0,08	1,17 ± 0,18	0,66 ± 0,07

Respecte als valors de contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol trobats per a la llavor de soja (Taula 18, soja 1: 44,88 mg d'alfa-tocoferol/100 g de llavor, 112,70 mg de gamma-tocoferol/100 g de llavor i 65,03 mg de delta-tocoferol/100 g de llavor), s'observa una pèrdua important de tocoferols recuperats, de la mateixa manera que es mostrava per a l'addició de l'alcohol en un sol moment, que pot ser atribuïble a les mateixes raons esmentades abans.

Quan es fa una addició fraccionada de l'alcohol, s'observa una tendència a recuperar una major quantitat de tocoferols quan l'esterificació es realitza amb solketal. Aquest resultat s'observa pràcticament a totes les combinacions de temps de reacció excepte en el cas del contingut d'alfa tocoferols als residus sòlids de llavor de soja on la quantitat que s'obté per al glicidol és més elevada que per al solketal. Es particularment destacable la diferència en el contingut de alfa i gamma tocoferol quan es comparen els continguts dels extractes d'esterificació amb solketal i glicidol, sent els primers els que presenten un contingut més elevat de tots els tocoferols.

Pel que fa als extractes provinents de l'esterificació amb addició fraccionada de solketal, els valors obtinguts per a cada tocoferol són d'entre 12-18 mg d'alfa-tocoferol/100 g d'extracte, 63-82 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 21-28 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. Els extractes provinents de l'esterificació amb addició fraccionada de glicidol presenten concentracions de tocoferols d'entre 2,1-3,6 mg d'alfa-tocoferol/100 g d'extracte, 21-29 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 14-17 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. El contingut de alfa, gamma i delta-tocoferol no sembla mostrar cap tendència al variar el temps d'hidròlisi ni tampoc el temps d'esterificació amb l'addició fraccionada de cap dels dos alcohols d'esterificació.

En quant al contingut en tocoferols dels residus sòlids i de la mateixa manera que als assaigs fets amb addició dels alcohols en un sol moment, s'observa que per a tots els casos, és menor que el contingut dels seus corresponents extractes d'esterificació.

Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb addició fraccionada de solketal són d'entre 0,2-0,4 mg d'alfa-tocoferol/100 g de material sòlid, 1,4-2,4 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,5-0,9 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb addició fraccionada de glicidol són d'entre 0,3-0,4 mg d'alfa-tocoferol/100 g de material sòlid, 1,2-1,5 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,6-0,8 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid.

Els percentatges de recuperació de tocoferols es troben recollits a la Taula 36.

Taula 36. Resultats de recuperació d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació i als residus sòlids (%) respecte al contingut en la llavor de soja crua per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada (\pm error estàndard i n=3).

Material	Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Extractes	Solketal	0	6	30,3%	56,2%
		4	6	27,2%	56,7%
		15	6	30,4%	57,7%
		24	6	39,8%	72,7%
		24	24	28,1%	58,1%
	Glicidol	0	6	7,1%	22,1%
		4	6	7,9%	25,8%
		15	6	7,4%	24,7%
		24	6	4,9%	21,2%
		24	24	5,5%	19,6%
		24	96	4,7%	18,8%
Residus	Solketal	0	6	0,8%	2,2%
		4	6	0,5%	1,7%
		15	6	0,4%	1,5%
		24	6	0,5%	1,9%
		24	24	0,4%	1,2%
	Glicidol	0	6	0,9%	1,3%
		4	6	0,8%	1,1%
		15	6	0,7%	1,2%
		24	6	0,6%	1,1%
		24	24	0,8%	1,1%
		24	96	0,8%	1,0%
Extractes + Residus	Solketal	0	6	31,1%	58,4%
		4	6	27,7%	58,4%
		15	6	30,8%	59,2%
		24	6	40,3%	74,5%
		24	24	28,5%	59,3%
	Glicidol	0	6	8,0%	23,5%
		4	6	8,7%	26,9%
		15	6	8,1%	25,9%
		24	6	5,5%	22,3%
		24	24	6,4%	20,7%
		24	96	5,5%	19,8%

Si es comparen aquests resultats amb els trobats per a una addició de l'alcohol d'esterificació en un sol moment, la concentració de tocoferols als residus sòlids és de l'ordre de 10 vegades inferior a la concentració trobada als residus amb addició en un sol moment de l'alcohol. En canvi, per a la concentració de tocoferols dels extractes, el contingut d'alfa i delta-tocoferol, que és superior en el cas d'addició en un sol moment, mentre que el contingut de gamma-tocoferol es manté en tots dos tipus d'addició.

El mateix estudi es va fer amb les llavors de sèsam. A la Taula 37 i la Taula 38 es presenten els resultats del contingut de gamma i delta-tocoferol tant de l'extracte com del residu sòlid de la reacció d'hidròlisi i esterificació per a la llavor de sèsam i una addició fraccionada de l'alcohol.

Taula 37. Contingut de gamma i delta-tocoferol als extractes provinents de l'esterificació (mg/100g d'extracte) de la llavor de sèsam per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada de l'alcohol (\pm error estàndard) i n=3.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Solketal	0	6	72,21 \pm 5,26	5,25 \pm 0,38
	4	6	68,69 \pm 3,62	4,32 \pm 0,43
	15	6	73,81 \pm 1,57	5,42 \pm 0,29
	24	6	75,92 \pm 1,09	5,31 \pm 0,16
	24	24	72,83 \pm 1,30	5,02 \pm 0,63
Glicidol	0	6	73,15 \pm 0,03	12,01 \pm 0,06
	4	6	79,36 \pm 0,28	13,53 \pm 0,05
	15	6	68,30 \pm 0,04	12,03 \pm 0,03
	24	6	70,98 \pm 0,17	13,34 \pm 0,05
	24	96	60,76 \pm 0,16	11,72 \pm 0,01

Taula 38. Contingut de gamma i delta-tocoferol als residus sòlids (mg/100g material sòlid) de la llavor de sèsam per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada de l'alcohol (\pm error estàndard) i n=3.

Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Solketal	0	6	1,30 \pm 0,05	0,06 \pm 0,01
	4	6	1,02 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01
	15	6	1,03 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
	24	6	1,05 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02
	24	24	1,15 \pm 0,03	0,09 \pm 0,01
Glicidol	0	6	1,62 \pm 0,19	0,60 \pm 0,08
	4	6	1,18 \pm 0,11	0,85 \pm 0,18
	15	6	1,45 \pm 0,05	0,48 \pm 0,05
	24	6	1,46 \pm 0,02	0,47 \pm 0,02
	24	96	1,47 \pm 0,15	0,51 \pm 0,03

Respecte als valors de contingut de gamma i delta-tocoferol trobats per a la llavor de sèsam (Taula 18: 96,77 mg de gamma-tocoferol/100 g de llavor i 103,31 mg de delta-tocoferol/100 g de llavor), s'observa el mateix fet que per a la llavor de soja: una pèrdua de tocoferols que pot ser atribuïda als mateixos factors esmentats anteriorment per a aquesta llavor.

Pel que fa als extractes provinents de l'esterificació amb addició fraccionada de solketal, els valors obtinguts per a cada tocoferol són d'entre 69-76 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 4,3-5,4 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. Els extractes provinents de l'esterificació amb addició fraccionada de glicidol presenten concentracions de tocoferols d'entre 61-80 mg de gamma-tocoferol/100 g d'extracte i 12-14 mg de delta-tocoferol/100 g d'extracte. El contingut de alfa, gamma i delta-tocoferol no sembla mostrar cap tendència al variar el temps d'hidròlisi ni tampoc el temps d'esterificació amb l'addició addició fraccionada de cap dels dos alcohols. Per a gairebé totes les condicions assajades, els resultats de gamma-tocoferol són similars quan l'esterificació es porta a terme amb glicidol o amb solketal, mentre que els resultats de delta-tocoferol són superiors quan l'esterificació es porta a terme amb glicidol.

En quan al contingut en tocoferols dels residus sòlids s'observa que, per a tots els casos, és menor que el contingut dels seus corresponents extractes d'esterificació, de la mateixa manera que succeïa amb la llavor de soja i per la mateixa raó argumentada abans. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb addició fraccionada de solketal són d'entre 1,0-1,3 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,06-0,11 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. Els valors trobats per als residus sòlids després d'esterificació amb addició fraccionada de glicidol són d'entre 1,2-1,6 mg de gamma-tocoferol/100 g de material sòlid i 0,5-0,9 mg de delta-tocoferol/100 g de material sòlid. En aquest cas, els resultats tant de gamma com de delta-tocoferol són superiors quan l'esterificació es porta a terme amb glicidol.

Els percentatges de recuperació de tocoferols es troben recollits a la Taula 39.

Taula 39. Resultats de recuperació d'alfa, gamma i delta-tocoferol als extractes d'esterificació i als residus sòlids (%) respecte al contingut en la llavor de sèsam crua per a diferents temps d'hidròlisi i d'esterificació amb dos alcohols en condicions d'addició fraccionada (\pm error estàndard i n=3).

Material	Alcohol	Temps d'hidròlisi (h)	Temps d'esterificació (h)	Gamma	Delta
Extractes	Solketal	0	6	64,1%	8,1%
		4	6	60,9%	6,6%
		15	6	65,5%	8,3%
		24	6	67,4%	8,2%
		24	24	64,6%	7,7%
	Glicidol	0	6	64,9%	18,5%
		4	6	70,4%	20,8%
		15	6	60,6%	18,5%
		24	6	63,0%	20,5%
		24	24	53,9%	18,0%
Residus	Solketal	0	6	1,2%	0,1%
		4	6	0,9%	0,1%
		15	6	0,9%	0,2%
		24	6	0,9%	0,2%
		24	24	1,0%	0,1%
	Glicidol	0	6	1,4%	0,9%
		4	6	1,0%	1,3%
		15	6	1,3%	0,7%
		24	6	1,3%	0,7%
		24	24	1,3%	0,8%
Extractes + Residus	Solketal	0	6	65,2%	8,2%
		4	6	61,9%	6,8%
		15	6	66,4%	8,5%
		24	6	68,3%	8,3%
		24	24	65,6%	7,9%
	Glicidol	0	6	66,3%	19,4%
		4	6	71,5%	22,1%
		15	6	61,9%	19,2%
		24	6	64,3%	21,2%
		24	24	55,2%	18,8%

Comparant els resultats amb els trobats per a l'addició en un sol moment de l'alcohol, mentre que la concentració de tocoferols dels residus d'esterificació amb glicidol és superior per a l'addició fraccionada de l'alcohol, la dels residus d'esterificació amb solketal és inferior, sense que la diferència sigui molt marcada en cap dels casos. En canvi, per als extractes, s'observa una concentració lleugerament superior de gamma i delta-tocoferol en el cas de l'addició fraccionada per a tots els casos excepte pel contingut de delta-tocoferol i esterificació amb solketal, que és superior en el cas de l'addició de l'alcohol en un sol moment.

5.3.2.1.3. Tractament estadístic i discussió.

Els resultats de l'estudi d'obtenció d'èsters de solketal i glicidol dels àcids grassos continguts en les llavors de soja i sèsam mitjançant hidròlisi dels triglicèrids seguida d'esterificació amb aquests alcohols, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* van ser sotmesos a un tractament estadístic de separació de mitjanes per tal d'establir les condicions més favorables de totes les assajades per tal d'aconseguir rendiments de reacció òptims i la màxima recuperació de tocoferols de les llavors.

5.3.2.1.3.1. Productes de reacció.

En primer lloc es va aplicar una separació de mitjanes segons test d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$) als resultats de rendiments de reacció per als diferents nivells dels factors assajats per a l'obtenció dels èsters de solketal i glicidol mitjançant hidròlisi seguida d'esterificació catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent a 50 °C. Els resultats d'aquesta separació de mitjanes per a les llavors de soja i sèsam s'exposen a la Taula 40.

Taula 40. Resultat de la separació de mitjanes segons test d'Student-Newman-Keuls dels rendiments de reacció d'hidròlisi seguida d'esterificació per a les llavors de soja i de sèsam a 50 °C amb diferents factors assajats.

Factor	Nivell	Llavor					
		Soja			Sèsam		
		N	Mitjana (%)	Grup SNK*	N	Mitjana (%)	Grup SNK*
Addició de l'alcohol	Un sol moment	24	43,49	B	24	24,87	A
	Fracccionada	32	51,64	A	29	25,77	A
Temps d'hidròlisi (h)	0	12	40,27	C	12	23,39	B, C
	4	12	44,64	B, C	12	30,56	A
	15	12	53,90	A	12	29,01	A, B
	24	20	51,53	A, B	17	20,52	C
Alcohol	Glicidol	29	19,56	B	27	22,27	B
	Solketal	27	78,85	A	26	28,58	A
Temps d'esterificació (h)	6	24	55,07	A	23	28,31	A
	24	2	13,77	C	-	-	-
	72	6	52,23	A	6	25,07	A
	81	6	48,80	A, B	6	26,67	A
	92	6	37,61	B	6	26,53	A
	96	12	42,94	A, B	12	18,63	A

* Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents.

Una comparació entre llavors mostra que a partir de la soja s'obté un rendiment de reacció significativament superior al que s'obté a partir del sèsam. Aquest fet pot estar relacionat amb el contingut de greix de la llavor. De la mateixa manera que la lipasa presenta inhibició per substrat davant d'un excés d'alcohol, un excés de greix podria produir el mateix efecte en l'enzim, com s'ha comentat a l'apartat 5.3.2.1.1.

Per a la llavor de sèsam, no es troben diferències significatives entre els diferents tipus d'addició de l'alcohol ni entre els diferents temps d'esterificació. En canvi, el temps d'hidròlisi sí que afecta significativament al rendiment, de forma que trobem rendiments més elevats quan el temps d'hidròlisi és de 4 i 15 h. L'esterificació amb solketal presenta rendiments significativament superiors a l'esterificació amb glicidol.

Per a la llavor de soja sí que es troben diferències entre els dos tipus d'addició de l'alcohol, obtenint un rendiment de reacció significativament més alt en realitzar una addició fraccionada. De la mateixa manera que en el cas del sèsam, l'esterificació amb solketal presenta rendiments significativament més elevats que l'esterificació amb glicidol. En quant al temps d'esterificació, els rendiments més elevats s'obtenen per un temps mínim de 6 h, sense que es trobin diferències significatives amb temps de 72, 81 o 96 h. El temps d'hidròlisi que presenta rendiments significativament més elevats és de 15 h.

A totes dues llavors es comprova que l'etapa crítica és la hidròlisi. Així, la quantitat d'àcid gras lliure disponible per a l'enzim afectaria directament al rendiment de tot el procés. El fet de que el tipus d'addició de l'alcohol a la barreja sòlida (sistema llavor-miceli) no afecti al rendiment de reacció amb el sèsam i sí que ho faci amb la soja pot estar relacionat amb la composició de cada llavor: es possible que l'agitació que suposa l'addició fraccionada de l'alcohol d'esterificació (segons el procediment emprat, 1 min d'agitació en vòrtex a la màxima potència abans i després de cada addició) millori l'accés dels llocs actius de l'enzim contingut en el miceli al seu substrat en el cas de la soja (que conté només un 14,55 % de greix brut). En canvi, amb el contingut lipídic superior de la llavor de sèsam (45,76 % de greix brut, aproximadament el triple de la llavor de soja), aquesta agitació no fa variar gaire la disponibilitat de substrat per part de l'enzim contingut en el miceli.

Els millors rendiments de reacció s'obtenen amb l'esterificació amb solketal i no amb glicidol, coincidint amb els resultats trobats en estudis anteriors (Méndez, 2004). Això pot ser degut a la major inestabilitat del glicidol en comparació amb el solketal. El grup epoxi del glicidol podria obrir-se parcialment a les temperatures de reacció utilitzades amb la formació de glicerol, abans de l'esterificació amb els àcids grassos, com alguns estudis indiquen (Kim et al., 2009), la qual cosa podria portar a la formació de triacilglicèrids i, per tant, a una subvaloració del rendiment final de la reacció. Igualment podem estar davant d'una polimerització del glicidol o d'un major poder inhibitori de l'activitat enzimàtica del glicidol comparat amb el solketal en condicions d'absència de dissolvent, causes totes elles ja discutides prèviament.

Donats aquests resultats, les millors condicions per a la hidròlisi més esterificació dels àcids grassos de llavors de soja i sèsam, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* són:

Soja: temps d'hidròlisi de 24 h, addició fraccionada de solketal i temps d'esterificació de 6 h.

Sèsam: temps d'hidròlisi de 15 h, addició fraccionada de solketal i temps d'esterificació de 6 h.

En altres estudis es van obtenir èsters de solketal d'àcids grassos amb rendiments de conversió semblants als trobats per a la llavor de soja utilitzant aquest alcohol, emprant dissolvents com a medi de reacció (conversions de 70-95%) (Bornscheuer and Yamane, 1995) o mitjançant esterificació en absència de dissolvent (conversions superiors al 90%) (Akoh, 1993). S'ha de tenir en compte que tots dos estudis parteixen de productes purs comercials.

5.3.2.1.3.2. Tocoferols.

Es va fer també una separació de mitjanes segons tests d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$) dels resultats de contingut en tocoferols dels extractes de reacció i els residus sòlids obtinguts després d'hidròlisi i esterificació catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* a 50 °C en absència de solvent. Les condicions que permeten una major recuperació de tocoferols tant d'extractes com de residus, obtingudes a partir de la separació de mitjanes realitzada, es presenten a la Taula 41 i la Taula 42 per a les llavors de soja i sèsam respectivament.

Taula 41. Condicions òptimes per a la obtenció d'extractes i residus amb concentració de tocoferols màxima per a la llavor de soja. Resultats obtinguts a partir d'una separació de mitjanes segons test SNK ($\alpha=0,05$).

	Extractes			Residus		
	Alfa	Gamma	Delta	Alfa	Gamma	Delta
Addició	Única	Fraccionada	Única	Única	Única	Única
Temps d'hidròlisi (h)	Sense efecte	Sense efecte	Sense efecte	0 h	0 h	0 h
Temps d'esterificació (h)	72 h	6 h	72 h	72 h	72 h	72 h
Alcohol	Solketal	Solketal	Solketal	Solketal	Solketal	Solketal

Taula 42. Condicions òptimes per a la obtenció d'extractes i residus amb concentració de tocoferols màxima per a la llavor de sèsam. Resultats obtinguts a partir d'una separació de mitjanes segons test SNK ($\alpha=0,05$).

	Extractes		Residus	
	Gamma	Delta	Gamma	Delta
Addició	Fraccionada	Única	Fraccionada	Fraccionada

Temps d'hidròlisi (h)	Sense efecte	Sense efecte	0 h	Sense efecte
Temps d'esterificació (h)	6 h	72 h	96 h	6 h
Alcohol	Solketal	Glicidol	Glicidol	Glicidol

Per a la llavor de soja, es comprova que l'esterificació amb solketal és la que permet obtenir més quantitat de tocoferols tant als extractes de reacció com als residus sòlids. La resta de factors coincideixen en les condicions òptimes per a la recuperació de tocoferols (addició única de l'alcohol, temps d'hidròlisi sense efecte per als extractes i 0 h per als residus i 72 h d'esterificació), excepte pel cas del gamma-tocoferol dels extractes (addició fraccionada de l'alcohol i 6 h d'esterificació).

Al cas de la llavor de sèsam, les condicions òptimes per a la recuperació de tocoferols es troben en funció del tipus de tocoferol i de si es tracta dels extractes de reacció o dels residus sòlids.

Les condicions òptimes de la reacció d'hidròlisi i esterificació es van escollir en funció dels rendiments d'obtenció d'èsters de solketal, i no en funció d'una màxima recuperació de tocoferols als extractes. Les concentracions de tocoferols per a cada llavor en aquestes condicions es troben a la Taula 43.

Taula 43. Recuperacions de tocoferols als extractes i residus sòlids de la reacció d'hidròlisi i esterificació d'àcids grassos continguts en llavor de soja i sèsam, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent.

Material		Concentració Tocoferols (mg/100 g material)		
		Alfa	Gamma	Delta
Soja	Llavor	44,88 ± 5,76	112,70 ± 4,92	65,03 ± 7,34
	Extracte	17,82 ± 0,72	81,90 ± 0,49	27,77 ± 0,35
	Residu	0,22 ± 0,04	2,11 ± 0,09	0,71 ± 0,02
Sèsam	Llavor	-	96,77 ± 3,66	103,31 ± 4,97
	Extracte	-	73,81 ± 1,57	5,42 ± 0,29
	Residu	-	1,03 ± 0,01	0,11 ± 0,01

5.3.2.2. Hidròlisi dels triglicèrids de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

Els resultats de rendiments de reacció de la etapa d'hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal o glicidol dels àcids grassos de les llavors de soja i sèsam catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* (apartat 5.3.2.1.3.1) van

mostrar que l'etapa limitant del procés conjunt és la hidròlisi. Per això, es va decidir estudiar més en detall el procés d'hidròlisi dels triglicèrids continguts en les llavors de soja i sèsam catalitzat per miceli liofilitzat de *R. oryzae* amb l'objectiu d'optimitzar la temperatura, el temps de reacció i el sistema d'homogeneïtzació de la barreja de reacció abans de dur a terme l'esterificació.

A la Taula 44 i la Taula 45 es presenten, a diferents temps i temperatures de 40 i 50 °C respectivament els percentatges de triglicèrids residuals i els rendiments de la reacció d'hidròlisi (calculats a partir d'aquests percentatges trobats) per a la llavor de soja catalitzada amb miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de dissolvent, utilitzant dos sistemes d'homogeneïtzació prèvia o sense homogeneïtzació.

Taula 44. Percentatge de triglicèrids residuals i rendiments de reacció d'hidròlisi catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent, amb diferents sistemes d'homogeneïtzació prèvia i per a diferents temps de reacció per a la llavor de soja a 40 °C (n=3).

Homogeneïtzació prèvia	Temps de reacció (h)	%TGC residuals	Rendiment Promig (%)
Vòrtex	15	16,61	83,39
	24	14,43	85,57
	39	14,76	85,24
	48	13,28	86,72
	98	12,87	87,13
Ultrasons	15	20,71	79,29
	24	19,52	80,48
	39	17,78	82,22
	48	21,35	78,65
Thermomixer*	15	14,03	85,97
	24	19,65	80,35
	39	21,53	78,47
	48	17,87	82,13

*Sense homogeneïtzació prèvia
n=3

Taula 45. Percentatges de triglicèrids residuals i rendiments de reacció d'hidròlisi catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent, amb diferents sistemes d'homogeneïtzació prèvia i per a diferents temps de reacció per a la llavor de soja a 50 °C (n=3).

Homogeneïtzació prèvia	Temps de reacció (h)	%TGC residuals	Rendiment Promig (%)
Vòrtex	15	23,96	76,04
	24	18,45	81,55
	39	14,91	85,09
	48	11,20	88,80
Ultrasons	15	22,75	77,25
	24	20,16	79,84
	39	22,59	77,41
	48	17,26	82,74
Thermomixer*	15	13,75	86,25
	24	7,73	92,27
	39	14,00	86,00
	48	24,02	75,98

*Sense homogeneïtzació prèvia
n=3

Es pot observar que tots els rendiments de reacció, a totes dues temperatures d'hidròlisi es troben entre 75-92 %. En general tampoc s'observen grans diferències en el rendiment entre 15 i 48 hores de reacció.

A les Taula 46 i Taula 47 es mostren, a diferents temps i temperatures de 40 i 50 °C respectivament els percentatges de triglicèrids residuals i els rendiments de la reacció d'hidròlisi (calculats a partir d'aquests percentatges trobats) per a la llavor de sèsam catalitzada amb miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de dissolvent, utilitzant dos sistemes d'homogeneïtzació prèvia o sense homogeneïtzació.

Taula 46. Percentatges de triglicèrids residuals i rendiments de reacció d'hidròlisi catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent, amb diferents sistemes d'homogeneïtzació prèvia i per a diferents temps de reacció per a la llavor de sèsam a 40 °C (n=3).

Homogeneïtzació prèvia	Temps de reacció (h)	%TGC residuals	Rendiment Promig (%)
Vòrtex	15	36,44	63,56
	24	39,67	60,33
	39	10,82	89,18
	48	19,15	80,85
Ultrasons	15	24,08	75,92
	24	31,48	68,52
	39	23,75	76,25
	48	22,59	77,41
Thermomixer*	15	28,85	71,15
	24	34,16	65,84
	39	30,73	69,27
	48	19,86	80,14

*Sense homogeneïtzació prèvia
n=3

Taula 47. Percentatges de triglicèrids residuals i rendiments de reacció d'hidròlisi catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent, amb diferents sistemes d'homogeneïtzació prèvia i per a diferents temps de reacció per a la llavor de sèsam a 50 °C (n=3).

Homogeneïtzació prèvia	Temps de reacció (h)	%TGC residuals	Rendiment Promig (%)
Vòrtex	15	27,39	72,61
	24	33,48	66,52
	39	36,88	63,12
	48	42,63	57,37
Ultrasons	15	30,15	69,85
	24	18,97	81,03
	39	44,58	55,42
	48	37,03	62,97
Thermomixer*	15	27,46	72,54
	24	40,18	59,82
	39	36,77	63,23
	48	45,56	54,44

*Sense homogeneïtzació prèvia
n=3

Es pot observar que per a la llavor de sèsam, els rendiments de reacció es troben entre 55-89 % i són, en general, inferiors als rendiments d'hidròlisi dels triglicèrids de soja. La hidròlisi a 40 °C sembla reportar millors rendiments per a

tots els tipus d'homogeneïtzació respecte a la hidròlisi a 50 °C, tot i que sense presentar diferències molt marcades. D'altra banda, en general no es detecta un augment evident del rendiment de reacció a l'augmentar el temps d'hidròlisi i en algun cas es comprova una disminució del rendiment a les 48 h de reacció respecte el trobat a les 15 h (hidròlisi a 50°C sense homogeneïtzació prèvia). El sistema d'homogeneïtzació prèvia tampoc sembla tenir un efecte clar en els rendiments de reacció per a cap de les dues temperatures assajades.

Els resultats de la hidròlisi dels triglicèrids de cada llavor es van sotmetre a una separació de mitjanes dels diferents nivells de cada factor assajat. Això ens permet veure a quin nivell s'obtenen els millors resultats de rendiment d'hidròlisi per a cada factor estudiat (tipus d'homogeneïtzació prèvia, temperatura i temps de reacció). Així, es va dur a terme un test d'Student-Newman-Keuls amb un nivell de significança de $\alpha=0,05$. Els resultats d'aquest test es troben a la Taula 48.

Taula 48. Resultat del test de la separació de mitjanes (Student-Newman-Keuls) per als rendiments de la hidròlisi de les llavors de soja i de sèsam considerant els diferents factors assajats.

Factor	Nivell	Llavor					
		Soja			Sèsam		
		N	Mitjana (%)	Grup SNK*	N	Mitjana (%)	Grup SNK*
Homogeneïtzació prèvia	Vòrtex	24	84,52	A	16	69,19	A
	Thermomixer**	11	82,77	A, B	16	67,05	A
	Ultrasons	23	79,61	B	16	70,92	A
Temperatura (°C)	40	24	83,16	A	24	73,20	A
	50	34	81,58	A	24	64,91	B
Temps (h)	15	11	76,86	A	12	70,94	A
	24	15	83,95	A	12	69,41	A
	39	15	83,19	A	12	68,86	A
	48	14	82,56	A	12	67,01	A

* Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents ($\alpha=0,05$).

**Sense homogeneïtzació prèvia

Un primer tractament conjunt de totes les dades per tal de comparar entre llavors, troba diferències significatives entre soja i sèsam, sent la llavor de soja la que presenta un rendiment d'hidròlisi superior.

Per a la llavor de soja, ni la temperatura ni el temps de reacció influeixen al rendiment de la hidròlisi. Una agitació prèvia amb vòrtex faria augmentar el rendiment respecte a una agitació amb bany d'ultrasons previ, però no respecte a una agitació amb Thermomixer.

Per a la llavor de sèsam, en canvi, només l'efecte de la temperatura presenta diferències significatives entre els dos nivells (el rendiment de la reacció a 40 °C és significativament superior al de la reacció a 50 °C). La resta de factors (temps de reacció i tipus d'agitació) no tenen cap efecte diferenciat sobre el rendiment de reacció.

El fet d'obtenir menors rendiments amb la llavor de sèsam podria estar relacionat amb el contingut de greix de la llavor. L'enzim podria veure's inhibït per substrat davant un excés de greix. Aquesta inhibició per substrat de la lipasa de *R. oryzae* ha estat prèviament estudiada en treballs anteriors del grup de recerca (Méndez, 2004) i altres lipases d'origen fúngic presenten el mateix comportament (Kiran and Divakar, 2002). Aquesta inhibició també podria explicar el fet de que el temps de reacció no tingui cap efecte al rendiment.

Que l'agitació amb vòrtex faci augmentar el rendiment de la hidròlisi de soja es pot interpretar com que la matriu físicament més dura que suposa la soja respecte el sèsam fa necessària una millor barreja física de la llavor amb el miceli.

Donats aquests resultats, les condicions escollides per a la hidròlisi dels triglicèrids de llavors de soja i sèsam, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* són:

Soja: 50 °C, homogeneïtzació prèvia amb vòrtex i temps d'hidròlisi de 24 h.
Sèsam: 40 °C, homogeneïtzació prèvia amb vòrtex i temps d'hidròlisi de 24 h.

5.3.3. Desprotecció de l'1,2-acetònid dels èsters d'àcids grassos amb solketal.

L'estratègia de preparació d'1-monoglicèrids mitjançant la síntesi d'èsters de glicerol protegits d'àcids grassos comporta necessàriament una segona etapa de desprotecció dels èsters formats. En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts a l'estudi de la desprotecció del cetònid dels èsters d'àcids grassos amb solketal mitjançant diferents metodologies d'escalfament convencional i amb microones.

5.3.3.1. Desenvolupament d'un mètode assistit per microones.

En primer lloc, es va desenvolupar una metodologia per a la desprotecció de l'1,2-acetònid basada en escalfament mitjançant microones, una font energètica no convencional que ha demostrat reduccions considerables dels temps de reacció a nombrosos àmbits de la síntesi orgànica en diferents estudis publicats, especialment als últims anys (Kappe and Dallinger, 2009). A més, s'han reportat també bons resultats de rendiments de reacció mitjançant l'aplicació d'aquest tipus d'escalfament en reaccions amb absència de solvent (Gupta et al., 2009), una característica que s'ha tingut en compte en el present estudi com a part de l'estratègia d'obtenció de monoglicèrids amb aplicació dels principis de l'anomenada "química verda".

Per als apartats 5.3.3.1.1, 5.3.3.1.2, 5.3.3.1.3 i 5.3.3.1.4 es va partir de l'èster de solketal de l'àcid palmític com a model per a l'estudi de la reacció de desprotecció i per a l'apartat 5.3.3.1.5 es van assajar els èsters de solketal dels àcids làuric, mirístic, palmític, esteàric i oleic. Tots els èsters de solketal d'àcids grassos van ser sintetitzats al laboratori (segons la metodologia descrita a l'apartat 4.3.2.2).

5.3.3.1.1. Proves preliminars.

5.3.3.1.1.1. Estudi de les condicions de desprotecció usant aigua o etanol com a dissolvent.

Es van realitzar un seguit de proves preliminars per a la desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketal mitjançant escalfament amb microones, amb diferents àcids com a catalitzadors (TFA, HCl, CH₃COOH) i amb etanol o aigua com a dissolvent de reacció. Les diferents condicions de reacció assajades es troben a la Taula 10 i la Taula 11.

Per a les proves prèvies, només en el cas de les reaccions a 175 °C en presència de TFA o HCl es va detectar formació de monopalmitina, amb uns rendiments de reacció inferiors al 15% (rendiments cromatogràfics). Aquest resultat es repeteix per a tots dos dissolvents emprats, aigua i etanol. En aquests casos, als cromatogrames es comprova la presència d'àcid palmític. Això sembla indicar la hidròlisi de l'enllaç èster a aquesta temperatura, tant de l'èster de solketal, com de la monopalmitina formada. L'ús de TFA i HCl es troba descrit a la bibliografia com a catalitzadors en la desprotecció de l'anell de solketal mitjançant escalfament convencional amb rendiments d'obtenció de monoglicèrids superiors als trobats en aquests estudis preliminars (Akoh, 1993; Bornscheuer and Yamane, 1995).

5.3.3.1.1.2. Proves preliminars amb resina de bescanvi iònic com a catalitzador.

Donat que les proves preliminars de desprotecció de l'1,2-acetònid del palmítat de solketal amb els catalitzadors àcids i amb les condicions assajades a l'apartat anterior no permeten obtenir rendiments satisfactoris, es va buscar un altre catalitzador de la reacció. Es va decidir estudiar l'ús d'una resina de bescanvi catiònic (Amberlite IR-120) com a catalitzador de la reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid amb quantitats mínimes de dissolvents (aigua i etanol), donat que a la bibliografia en van trobar aplicacions d'aquest tipus de resines sulfòniques, amb diferents condicions de reacció i amb escalfament convencional, per a la desprotecció de l'1,2-acetònid present a l'anell de solketal (Wang et al., 2013) i l'apertura de l'anell d'oxirà d'olis vegetals epoxidats (Campanella and Baltanás, 2007, 2005, 2004).

En primer lloc es van realitzar unes proves preliminars per comprovar el comportament de la resina Amberlite IR120Na activada (s'entén per forma activa de la resina la seva forma àcida, obtinguda segons el protocol d'activació de l'apartat 4.4.3.1.1.3.1), amb escalfament amb microones i diferents proporcions i condicions de reacció, amb aigua i etanol com a dissolvents. Els rendiments trobats en aquestes proves es troben a la Taula 49.

Taula 49. Rendiments i condicions de les reaccions de desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil assajades a les proves preliminars utilitzant la resina de bescanvi iònic IR120Na activada com a catalitzador.

Dissolvent	Proporció èster:dissolvent:resina (*)	Condicions	Rendiment de Reacció (%)
H ₂ O	1:3:1	80 °C, 15 min	26,71
	1:3:1	120 °C, 15 min	16,46
	1:3:1	80 °C, 30 min	14,34
	1:3:1	50 °C, 15 min	n.d
	1:3:1	90 °C, 15 min	28,71
	1:3:1	70 °C, 15 min	n.d
	1:3:1	75 °C, 15 min	12,52
	1:3:1	85 °C, 15 min	35,97
	1:3:2	85 °C, 15 min	32,66
CH ₃ CH ₂ OH	1:3:3	85 °C, 15 min	33,90
	1:3:1	85 °C, 15 min	42,41
	1:3:1	120 °C, 15 min	16,57

(*)Proporcions molars de dissolvent i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

A les reaccions portades a terme a 120 °C s'observa la presència d'àcid palmític per als dos dissolvents emprats. Per altra banda, la temperatura òptima de la reacció sembla ser 85 °C. A un estudi de la degradació de l'anell d'oxirà d'olis vegetals epoxidats mitjançant H₂O₂ i utilitzant la mateixa resina de bescanvi iònic com a catalitzador, es van obtenir rendiments de reacció similars amb temperatura de reacció de 85 °C (Campanella and Baltanás, 2007).

La reacció amb etanol com a dissolvent a 85 °C és la que dona un rendiment més elevat (42,41 %).

5.3.3.1.2. Estudi de desprotecció utilitzant diferents alcohols i resina de bescanvi iònic IR-120Na.

Els resultats de les proves preliminars de l'apartat anterior (el rendiment de reacció més elevat s'obté a l'emprar etanol com a dissolvent), junt amb resultats d'estudis que reporten bons resultats per a l'obertura d'epòxids amb l'ús d'alcohols i escalfament amb microones (García-Vidal et al., 2006), ens van portar a realitzar una sèrie d'assaigs

per a la desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil, combinant l'ús de resina IR-120Na activada i de diferents alcohols. Els resultats de rendiments de reacció d'aquests assaigs es troben a la Taula 50.

Taula 50. Rendiments de la reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil utilitzant la resina IR120Na en presència de diferents alcohols mitjançant escalfament amb microones. Proporció molar èster alcohol 1:3 i proporció en pes èster:resina activada 1:1, Condicions de reacció 85 °C, 15 min. Resultats promig ± Desv. Estàndard, n=2 (n.d.: no detectat).

Alcohol	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	Rendiment d'obtenció de Palmitat d'alquil (%)
1-Metanol	36,75 ± 3,17	n.d.
1-Etanol	46,51 ± 5,40	n.d.
Isopropanol	66,31 ± 2,89	n.d.
1-Butanol	77,53 ± 2,13	5,36 ± 1,98
<i>tert</i> -Butanol	72,40 ± 2,57	n.d.
1-Pentanol	84,77 ± 2,21	8,28 ± 2,55
1-Hexanol	75,10 ± 3,81	21,77 ± 3,03
1-Heptanol	24,32 ± 7,43	66,06 ± 4,77
1-Decanol	49,31 ± 5,85	14,09 ± 2,29

Els resultats mostren una tendència a augmentar el rendiment de reacció a mesura que augmenta la llargada de la cadena de l'alcohol fins a l'1-pentanol, que presenta el rendiment d'obtenció de monopalmitina més elevat (84,77 %). Això coincideix amb els resultats de l'estudi de l'obertura de l'anell de l'epòxid de clorometiloxirà (Mirkhani et al., 2003), on es troben rendiments de reacció superiors, però s'observa la mateixa tendència a augmentar el rendiment de reacció a mesura que augmenta la llargada de la cadena de l'alcohol emprat.

Per als alcohols de cadena superior o igual a quatre carbonis, s'observa la presència de l'èster d'alquil corresponent a l'alcohol emprat excepte per al *tert*-butanol. Això tampoc succeeix amb l'altre alcohol no lineal, l'isopropanol, per tant, tot sembla indicar que es dona simultàniament una reacció de transesterificació quan s'utilitzen alcohols lineals de més de tres carbonis.

5.3.3.1.3. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i resina de bescanvi iònic IR-120Na.

Donat que els resultats de l'apartat anterior indiquen que l'ús d'1-pentanol i resina activada IR-120Na permeten la desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil amb l'obtenció d'1-monopalmitina mitjançant escalfament amb microones i amb un rendiment satisfactori (84,77 %), es va decidir estudiar aquesta reacció assajant diferents proporcions d'alcohol i de resina, així com diferents condicions de

reacció, amb l'objectiu d'augmentar el rendiment d'obtenció de monoglicèrid i minimitzar l'obtenció de l'èster d'alquil d'1-pentanol. Els resultats es mostren a la Taula 51.

Taula 51. Rendiments de la reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketal utilitzant diferents proporcions de la resina IR120Na i 1-pentanol mitjançant escalfament amb microones. Proporció molar èster alcohol 1:3 i proporció en pes èster:resina activada 1:1, Condicions de reacció 85 °C, 15 min. Resultats promig ± Desv. Estàndard, n=2, (n.d.: no detectat).

Proporció èster:1-pentanol:resina (*)	Condicions de Reacció	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	Rendiment d'obtenció de Palmitat de Pentil (%)
1:0:3	85 °C, 15 min	6,36 ± 0,44	n.d.
1:3:1	85 °C, 25 min	33,62 ± 1,70	49,04 ± 1,25
1:3:1	85 °C, 15 min	84,77 ± 2,21	8,28 ± 2,55
1:3:0,5	85 °C, 15 min	54,67 ± 2,69	6,17 ± 1,12
1:3:0,25	85 °C, 15 min	23,36 ± 1,83	3,23 ± 1,13
1:0,5:1	85 °C, 15 min	79,79 ± 2,17	n.d.
1:1,5:1	85 °C, 15 min	68,83 ± 3,49	10,03 ± 1,16
1:1:2	85 °C, 15 min	85,50 ± 2,96	3,28 ± 1,43
1:1:1	85 °C, 5 min	32,20 ± 1,22	n.d.
1:1:1	85 °C, 10 min	46,87 ± 2,49	2,80 ± 1,97
1:1:1	85 °C, 15 min	86,08 ± 2,09	7,24 ± 1,50
1:1:1	85 °C, 20 min	58,15 ± 2,32	n.d.

(*) Proporcions molars d'1-pentanol i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

Els resultats mostren que les proporcions mínimes a utilitzar de la resina IR120Na i d'1-pentanol respecte la quantitat del cetònid dels palmitat de solketal són èster:resina 1:1 (en pes) i èster:1-pentanol 1:1 molar, amb una temperatura de 85 °C i un temps de reacció de 15 min amb escalfament per microones, amb un rendiment de 86,06 %. Per a escollir les condicions i proporcions òptimes s'ha buscat maximitzar l'obtenció de monopalmitina i minimitzar l'obtenció de palmitat de pentil.

5.3.3.1.4. Estudi de desprotecció amb diferents proporcions d'1-pentanol i diferents resines sulfòniques.

Un cop obtingut un rendiment d'obtenció d'1-monopalmitina a partir d'èster de solketal de l'àcid palmític de 86,06% amb les condicions esmentades a l'apartat anterior, es va adquirir la mateixa resina de bescanvi iònic en la seva forma àcida (IR-120H) per tal de simplificar la metodologia. Al mateix temps, es va adquirir també un nou lot de la mateixa resina en la seva forma sòdica (anomenada aquí IR-120Na-B per tal de diferenciar aquest lot de l'antic, IR-120Na-A) emprada als assaigs realitzats anteriorment.

Amb les dues resines noves adquirides, es va realitzar una comparació respecte la resina IR120Na utilitzada fins al moment amb diferents condicions de reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil mitjançant escalfament amb microones. Els resultats de rendiment d'obtenció d'1-monopalmitina es troben a la Taula 52.

Taula 52. Rendiments d'obtenció de monopalmitina i palmitat de pentil en la desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil utilitzant 1-pentanol i diferents resines sulfòniques amb diferents temps de reacció. Resultats promig \pm Desv. Estàndard, n=2.

Resina	Proporció èster:1-pentanol:resina (*)	Condicions	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	Rendiment d'obtenció de Palmitat de Pentil (%)
IR120H Plus	1:1:1	85 °C, 15 min	3,44 \pm 0,25	54,23 \pm 1,79
IR120H Plus	1:3:1	85 °C, 5 min	n.d.	89,09 \pm 2,25
IR120H Plus	1:3:1	85 °C, 10 min	n.d.	94,05 \pm 2,10
IR120Na-B	1:0,5:1	85 °C, 15 min	52,86 \pm 3,21	n.d.
IR120Na-B	1:1:1	85 °C, 15 min	74,23 \pm 5,56	4,44 \pm 0,73

(*) Proporcions molars d'1-pentanol i en pes de resina respecte l'èster de solketal.

Els resultats indiquen que la resina sulfònica adquirida en la seva forma àcida (Amberlite IR120H Plus, Aldrich), funciona pel que fa a la transesterificació, donant rendiments elevats d'obtenció de palmitat de pentil, però no realitza la desprotecció de l'anell del solketal. Pel que fa a la nova resina IR210Na-B (Amberlite IR120Na, Carlo Erba), activada seguint el mateix procediment emprat fins ara, no assoleix els rendiments d'obtenció de monopalmitina que permetia l'ús de l'antiga resina.

Per tal de descartar l'efecte de la humitat retinguda per la resina un cop activada i rentada, es van comparar totes dues resines IR120Na activades i assecades, utilitzades per a la reacció de desprotecció de l'anell de solketal després de diferents temps d'exposició a la humitat dins d'una cambra tancada. Els resultats es mostren a la Taula 53.

Taula 53. Rendiments d'obtenció de monopalmitina i palmitat de pentil en la desprotecció de l'1,2-acetònid dels palmitat de solketil utilitzant 1-pentanol (proporció molar 1:1) i dues resines sulfòniques (proporció en pes 1:1) exposades a humitat durant diferents temps. Les condicions de reacció són 85 °C i 15 min amb escalfament mitjançant microones). Resultats promig \pm Desv. Estàndard, n=2; Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents.

Resina IR120	Temps en cambra d'humitat	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	Rendiment d'obtenció de Palmitat de Pentil (%)
IR120Na-B Nova	0	71,67 ^A \pm 4,08	4,78 \pm 0,33
	30min	73,12 ^A \pm 3,76	4,25 \pm 0,92
	1h	72,44 ^A \pm 4,57	4,00 \pm 0,52
	3h	73,94 ^A \pm 3,22	4,82 \pm 0,46
	6h	74,60 ^A \pm 3,78	4,07 \pm 0,23
	24h	78,55 ^A \pm 4,10	4,22 \pm 0,71
IR120Na-A Antiga	0	81,17 ^B \pm 3,66	7,72 \pm 1,10
	30min	87,88 ^B \pm 2,34	7,75 \pm 0,65
	1h	82,47 ^B \pm 3,96	7,42 \pm 0,43
	3h	81,32 ^B \pm 4,57	7,61 \pm 0,88
	6h	80,09 ^B \pm 4,21	7,57 \pm 0,53
	24h	79,89 ^B \pm 4,75	7,15 \pm 0,39

En aquests nous assaigs es continua observant diferències entre les dues resines assajades: per a tots els casos, el rendiment d'obtenció de monopalmitina és significativament superior quan s'utilitza la resina IR120Na-A. Una anàlisi de variància de les dades indica que el temps d'exposició de la resina a la humitat no és un factor que influeixi en el rendiment d'obtenció de monopalmitina, en canvi la resina utilitzada sí que té un efecte significatiu en el rendiment. Dins de cada una de les resines, una separació de mitjanes segons el test d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$) no troba cap diferència significativa entre cap dels temps d'exposició a la humitat.

5.3.3.1.5. Desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketil de diferents àcids grassos de cadena llarga en presència de *tert*-butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament amb microones.

Per tal d'evitar la formació de palmitat de pentil, es va decidir substituir l'alcohol emprat, 1-pentanol, per *tert*-butanol, amb l'objectiu de que la presència del grup hidroxil sobre un carboni trisubstituit minimitzi la transesterificació, segons l'observat als resultats de la Taula 50. Es van sotmetre tots els èsters de solketal sintetitzats a l'apartat 4.3.2.2 a la reacció de desprotecció del 1,2-acetònid en presència de *tert*-butanol (proporció molar èster:alcohol 1:1) i de resina IR120Na-B (proporció en

pes èster:resina 1:1), durant 15 min i a una temperatura de 85 °C mitjançant escalfament per microones. Els resultats es mostren a la Taula 54.

Taula 54. Rendiments d'obtenció de monoglicèrids en la desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketal de varis àcids grassos utilitzant *tert*-butanol (proporció molar èster: *tert*-butanol 1:1) i la resina IR120Na-B (proporció en pes èster resina 1:1). Les condicions de reacció són 85 °C i 15 min amb escalfament mitjançant microones. Resultats promig ± Desv. Estàndard, n=3.

Èster de Solketal	Rendiment d'obtenció de Monoglicèrid (%)
Laurat (C12:0)	57,57 ± 8,36
Miristat (C14:0)	59,88 ± 4,25
Palmitat (C16:0)	55,37 ± 2,86
Estearat (C18:0)	64,92 ± 3,24
Oleat (C18:1)	24,85 ± 6,03

Com era d'esperar, en cap cas es produeix transesterificació entre l'èster de solketal i el *tert*-butanol. Ara bé, els rendiments de desprotecció són en tots els casos menors que el rendiment de monoglicèrid obtingut a la desprotecció del palmitat de solketal quan s'utilitza 1-pentanol i la mateixa resina IR-120Na-B (Taula 53), observant-se el valor d'hidròlisi més baix en l'obtenció d'1-monooleïna a partir de l'èster de l'àcid oleic. La diferència dels rendiments de reacció entre els èsters dels àcids oleic i làuric coincideix amb els resultats d'un estudi on es van utilitzar altres resines de bescanvi iònic per a la obtenció de monoglicèrids a partir de la reacció directa entre àcids grassos i glicerol, on s'observa un rendiment d'esterificació amb àcid làuric superior al rendiment d'esterificació amb àcid oleic (Pouilloux et al., 1999).

El resultat de la desprotecció de l'èster de l'àcid palmític amb *tert*-butanol i resina IR120Na-B, la resina de nova adquisició, és inferior a que es va trobar a l'utilitzar resina IR120Na-A, la resina antiga (Taula 50). Això coincideix amb els resultats de l'apartat 5.3.3.1.4, on es comprova la pèrdua de rendiment quan s'utilitza la resina IR120Na-B.

5.3.3.2. Mètodes d'escalfament convencional.

Una vegada desenvolupada una metodologia de desprotecció dels de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketal de diferents àcids grassos mitjançant escalfament amb microones que permet obtenir rendiments de reacció satisfactoris, es va procedir a traslladar-la a un escalfament convencional per tal de comparar els resultats de rendiments de reacció entre tots dos mètodes d'escalfament. Abans, però, es van assajar diferents procediments d'obtenció de monoglicèrids per desprotecció d'èsters de solketal mitjançant escalfament convencional trobats a la bibliografia per tal de comparar els resultats amb els obtinguts segons la nostra metodologia.

5.3.3.2.1. Mètodes de referència.

L'obtenció de monoglicèrids mitjançant esterificació amb glicerols protegits i posterior desprotecció és una estratègia coneguda. És per això que existeixen diferents metodologies descrites a la bibliografia per a l'etapa de desprotecció (Akoh, 1993; Bornscheuer and Yamane, 1995; Halldorsson et al., 2004; Villeneuve et al., 1998). D'entre aquestes metodologies (alguns d'aquests estudis proposen varies alternatives), es van escollir tres mètodes de referència que es van aplicar a la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític per tal de comparar els resultats de rendiments de reacció amb els trobats aplicant les metodologies d'escalfament amb microones desenvolupades a l'apartat 5.3.3.1 i les d'escalfament convencional que es desenvoluparan a l'apartat següent (5.3.3.2.2).

Es van assajar els mètodes de referència escollits, basats en un escalfament convencional o en absència d'escalfament, per a la desprotecció de l'anell de l'èster de l'àcid palmític. Els resultats d'aquests assaigs es mostren a la Taula 55.

Taula 55. Rendiments d'obtenció de monopalmitina en la desprotecció de l'anell de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant diferents mètodes d'escalfament convencional (n=3).

Mètode	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)
Halldorsson et al., 2004 (Reflux amb àcid <i>p</i> -toluensulfònic i tetrahidrofurán, 12h)	60,05 ± 0,12
Villeneuve et al., 1998 (Acetonitril:HCl (aq) 1M 4:1 vol/vol, 6h, temperatura ambient)	88,71 ± 0,56
Akoh, 1993 (Àcid trifluoroacètic 90% (aquós), 10 min, temperatura ambient)	98,32 ± 0,29

Mitjançant el mètode proposat per Akoh, s'obté una desprotecció pràcticament total de l'anell de solketal. A més, és el mètode més curt de tots els assajats (10 min) i la reacció té lloc a temperatura ambient. Per contra, és un mètode que necessita de dissolvent, encara que sigui aigua, i d'un catalitzador car, com l'àcid trifluoroacètic, que és difícilment recuperable, a diferència de la resina que s'empra en el nostre cas. Els altres dos mètodes han donat percentatges d'hidròlisi menors, necessiten temps més llargs i l'ús de dissolvents més cars i tòxics que no l'aigua.

5.3.3.2.2. Desprotecció de l'1,2-acetònid del palmitat de solketil en presència d'1-pentanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.

Es va adaptar el mètode per a la desprotecció de l'anell de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament amb microones (proporció molar èster:1-pentanol 1:1, proporció en pes èster:resina IR120Na 1:1, 85 °C, 15 min) a un escalfament convencional, mantenint la mateixa temperatura durant diferents temps de reacció. D'aquesta manera es vol tenir una idea de les diferències de rendiments i temps de reacció necessaris a l'utilitzar totes dues tècniques d'escalfament. Els resultats es mostren a la Taula 56.

Taula 56. Rendiments d'obtenció de monopalmitina en la desprotecció de l'anell de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant diferents temps de reacció. Condicions de la reacció: proporció molar èster:1-pentanol 1:1, proporció en pes èster:resina IR120Na 1:1, 85 °C. Resultats promig \pm Desv. Estàndard, n=3.

Temps de Reacció	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	Rendiment d'obtenció de Palmitat de Pentil (%)
15 min	n.d.	n.d.
30 min	51,96 \pm 0,44	n.d.
45 min	66,98 \pm 0,21	1,14 \pm 0,03
1 h	78,81 \pm 0,28	2,62 \pm 0,02
2 h	74,41 \pm 0,17	5,17 \pm 0,51
6 h	49,15 \pm 0,24	9,46 \pm 0,19
24 h	24,03 \pm 0,39	12,81 \pm 1,12

Sembla haver-hi una tendència a augmentar el rendiment d'obtenció de monopalmitina a mesura que augmenta el temps fins a 1 h de reacció. A partir d'aquí, la disminució està relacionada amb l'aparició d'àcid palmític lliure (no quantificat) i amb la formació de palmitat de pentil. Així, sembla que la monopalmitina formada es va hidrolitzant a partir de 2 h de reacció. En quant a la formació de palmitat de pentil, augmenta amb el temps de reacció fins a les 24 h.

5.3.3.2.3. Desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketil de diferents àcids grassos de cadena llarga en presència de *tert*-butanol i de la resina de bescanvi iònic IR120Na mitjançant escalfament convencional.

Donat els resultats de la Taula 56, es va decidir assajar diferents temps intermedis entre 1 h i 2 h la reacció de desprotecció de l'anell de l'èster de solketal de l'àcid palmític mitjançant escalfament convencional segons el mètode adaptat d'escalfament amb microones, per tal d'optimitzar el temps de reacció. De la mateixa manera que a l'apartat 5.3.3.1.5, es va decidir substituir l'1-pentanol per *tert*-butanol, per tal de reduir el grau de transesterificació. A més, per veure un possible efecte de la formació de acetona a l'equilibri de la reacció de desprotecció, es

va repetir l'assaig amb els vials de reacció oberts, per tal d'afavorir-ne l'evaporació. Els resultats es troben a la Taula 57.

Taula 57. Rendiments d'obtenció de monopalmitina en la desprotecció de l'anell de l'èster de solketal de l'àcid palmític amb diferents temps de reacció, en vials oberts o tancats durant la reacció. Condicions de la reacció: proporció molar èster:*tert*-butanol 1:1, proporció en pes èster:resina IR120Na 1:1, 85 °C. Resultats promig \pm Desv. Estàndard, n=3, Les mitjanes amb la mateixa lletra no són significativament diferents ($\alpha=0,05$).

Temps de Reacció	Rendiment d'obtenció de Monopalmitina (%)	
	Vial Obert	Vial Tancat
60 min	52,36 ^D \pm 0,54	52,01 ^E \pm 0,23
75 min	72,09 ^C \pm 0,71	63,97 ^C \pm 0,34
90 min	86,98 ^B \pm 0,22	71,30 ^A \pm 0,25
105 min	90,86 ^A \pm 0,31	65,76 ^B \pm 0,62
120 min	71,31 ^C \pm 0,55	53,49 ^D \pm 0,47

En cap cas s'observa transesterificació. Excepte per al temps de reacció de 60 min, on els rendiments són similars, s'obtenen rendiments de reacció superiors al mantenir oberts els vials durant la reacció. El rendiment més alt d'obtenció de monopalmitina correspon a un temps de reacció de 105 min amb vial obert (90,86%). A partir dels 75 min, s'observa la presència d'àcid palmític lliure (no quantificat). Una separació de mitjanes segons test d'Student-Newman-Keuls ($\alpha=0,05$) confirma que el temps de 105 min per a un vial obert és el que reporta un rendiment d'obtenció de monopalmitina significativament superior. Per als vials tancats, els rendiments de reacció augmenten fins als 90 min, on s'assoleix el rendiment màxim (71,30%) i disminueixen després, fins al temps de reacció de 120 min. D'aquestes alternatives assajades, es decideix escollir com a temps de reacció òptim 105 min per a la reacció de desprotecció dels èsters de solketal amb escalfament convencional. Aquests valors són equivalents als obtinguts per desprotegir el mateix compost emprant una resina sulfònica i metanol. En el nostre cas no s'observa la formació del corresponent èster alquílic i el temps de reacció passa a ser de 105 min, mentre en el mètode descrit van ser necessàries 10 h de reacció per obtenir els mateixos resultats (Wang et al., 2013).

Una vegada s'havia obtingut un mètode adequat per la desprotecció de l'èster de solketal de l'àcid palmític, es va voler estudiar la seva aplicabilitat als altres èsters de solketal d'àcids grassos sintetitzats a l'apartat 4.3.2.2. Es va sotmetre la resta d'èsters de solketal d'àcids grassos sintetitzats a la reacció de desprotecció de l'anell del solketal, amb les condicions de reacció òptimes: vial de reacció obert, 85 °C, temps de reacció 105 min, proporció molar èster:*tert*-butanol 1:1 i proporció en pes èster:resina activada 1:1. Els resultats es presenten a la Taula 58.

Taula 58. Rendiments d'obtenció de monoglicèrids en la desprotecció de l'anell de l'èster de solketal d'àcids grassos utilitzant *tert*-butanol (proporció molar 1:1) i la resina IR120Na (proporció en pes 1:1). Les condicions de reacció són 85 °C i 105 min amb escalfament convencional. Resultats promig \pm Desv. Estàndard, n=3.

Èster de Solketal	Rendiment d'obtenció de Monoglicèrid (%)
Laurat (C12:0)	89,92 \pm 2,41
Miristat (C14:0)	92,61 \pm 2,12
Palmitat (C16:0)	90,86 \pm 0,31
Estearat (C18:0)	87,13 \pm 1,57
Oleat (C18:1)	39,68 \pm 0,22

Com es pot veure a la Taula 58 s'obtenen rendiments de reacció superiors al 85% per a tots els èsters excepte per a l'èster de solketal de l'àcid oleic, per al qual s'obté un 39,68%. De totes maneres els rendiments d'obtenció de monoglicèrid trobats al portar a terme la reacció amb escalfament convencional són superiors per a tots els èsters als trobats al fer la reacció mitjançant escalfament per microones. El baix rendiment de reacció de l'únic èster que presenta insaturacions coincideix amb els resultats de la reacció de desprotecció mitjançant escalfament amb microones (apartat 5.3.3.1.5).

Aquesta diferència en la resposta enfront d'aquest tipus de resina podria obrir un camí per l'enriquiment de fraccions amb àcids saturats o insaturats a partir de mescles de tots ells, estudi que va més enllà de l'objectiu d'aquesta tesi.

5.3.4. Obtenció de monoglicèrids a partir de llavor de soja.

Als apartats anteriors s'han desenvolupat les metodologies necessàries per a portar a terme les dues etapes per a la preparació de monoglicèrids a partir de llavors vegetals. Per a l'estudi de la primera etapa es van utilitzar de llavors de soja i sèsam com a material de partida per a la obtenció d'èsters de glicerols protegits d'àcids grassos. Per a l'estudi de la segona etapa de desprotecció d'aquest tipus d'èsters, es va partir de productes sintetitzats al laboratori.

En aquest apartat es van aplicar totes dues metodologies desenvolupades per a les dues etapes al material vegetal, això és, hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb solketal dels àcids grassos de llavor de soja catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en absència de solvent (1a etapa) i desprotecció de l'anell de solketal dels èsters d'àcids grassos obtinguts (2a etapa).

Per altra part, es va determinar el contingut de tocoferols dels extractes finals obtinguts després de totes dues etapes per tal d'establir si la metodologia permet l'obtenció d'extractes de monoglicèrids que continguin alguna fracció d'aquests antioxidants, presents al material vegetal de partida.

A la Taula 59 es presenten els resultats de rendiments de reacció de la primera etapa (columna 1), les diferents metodologies emprades a la 2a etapa (columna 2), les concentracions de monoglicèrids als extractes obtinguts després de totes dues etapes (columnes 3 i 4), els rendiments de la 2a etapa calculats a partir de la determinació mitjançant GC-FID (columna 5) i els rendiments globals d'obtenció de monoglicèrids de la llavor de soja (columna 6). Per al càlcul de rendiment d'obtenció de monoglicèrids s'han fet servir les dades de concentració de monoglicèrids a l'extracte final de reacció determinades mitjançant GC-FID (pels mètodes propis i els de referència) i RMN (pels mètodes de referència). La discussió d'aquests resultats es troba als següents apartats.

Taula 59. Resultats de la obtenció de monoglicèrids de llavor de soja mitjançant dues etapes: una primera etapa d'hidròlisi (24 h de reacció) i esterificació (6 h de reacció) a 50 °C amb addició fraccionada de solketal catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* i una segona etapa de desprotecció dels èsters de solketal portada a terme segons les metodologies descrites a les referències indicades o segons les metodologies desenvolupades: 85 °C amb escalfament convencional (105 min de reacció) o mitjançant microones (15 min de reacció) en presència de *tert*-butanol (proporció molar èster:alcohol 1:1) i de resina IR-120Na activada (proporció en pes èster:resina 1:1). (Promig ± Desv. Est. de n=4).

Rendiment 1a Etapa (%)	Metodologia 2a Etapa	Concentració Monoglicèrids (% p/p)		Rendiment 2a Etapa (%)	Rendiment Global d'Obtenció de Monoglicèrids (%)
		GC-FID	RMN		
65,39 ± 2,57	<i>tert</i> -Butanol / IR120Na (convencional)	4,12 ± 0,09	-	6,30 ± 0,09	< 5 %
66,71 ± 2,95	<i>tert</i> -Butanol / IR120Na (microones)	3,86 ± 0,13	-	5,79 ± 0,13	< 5 %
64,82 ± 2,28	Villeneuve <i>et al.</i> 1998	52,39 ± 1,87	51,78 ± 2,86	80,82 ± 1,87	53,23 ± 3,46
68,36 ± 3,15	Akoh 1993	35,68 ± 3,32	36,12 ± 2,59	52,19 ± 3,32	37,97 ± 3,77

5.3.4.1. 1a Etapa: Hidròlisi i esterificació amb solketal dels àcids grassos de la llavors de soja catalitzada per miceli liofilitzat de *Rhizopus oryzae*.

La primera etapa del procediment va consistir en la hidròlisi dels triglicèrids de llavor triturada de soja i esterificació dels àcids grassos resultants amb solketal, catalitzat per miceli liofilitzat i en absència de solvent. La metodologia utilitzada va ser la descrita a l'apartat 4.4.2.1.2 (addició fraccionada de l'alcohol), amb les següents condicions: 50 °C, temps d'hidròlisi de 24 h i temps d'esterificació de 6 h.

En aquesta etapa, la hidròlisi i esterificació dels triglicèrids continguts en la llavor de soja, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae*, reporta rendiments de reacció inferiors als trobats a l'apartat 5.3.2 (Taula 59, columna 1). Hi ha dos factors que poden haver influït en aquesta diferència:

En primer lloc, totes dues reaccions s'han dut a terme amb diferents lots de miceli liofilitzat de *R. oryzae*. Per als experiments realitzats quan es va desenvolupar la metodologia (apartat 5.3.2) es va fer servir un lot de miceli amb una activitat enzimàtica desconeguda donat que no s'havia establert encara l'assaig d'activitat enzimàtica del miceli (corresponent al lot *R. oryzae* 1 acabat de preparar de la Taula 23), mentre que als experiments realitzats al present apartat es va fer servir un lot de miceli amb una activitat enzimàtica de 0,43 µmol d'àcid esteàric/min (corresponent al lot de *R. oryzae* 3 acabat de preparar). Donades les diferents activitats lipàsiques trobades entre diferents lots de

miceli i la pèrdua d'activitat d'aquest amb el temps (Taula 23), això podria explicar, en part, les diferències trobades entre els rendiments de reacció.

D'altra banda, per a aquests assaigs, la trituració de la llavor s'ha fet de manera diferent, fins a l'obtenció d'una textura de pols. Per als experiments realitzats quan es va desenvolupar la metodologia (apartat 5.3.2), la llavor es va utilitzar amb una textura menys fina (descripció a l'apartat 4.2.1), en canvi, als experiments realitzats al present apartat es va utilitzar com a material vegetal de partida llavor de soja triturada fins a textura de farina. El fet de que la textura sigui més fina fa pensar que augmenta el contacte de l'enzim contingut en el miceli amb el seu substrat lipídic respecte a la llavor menys triturada. Això podria augmentar la inhibició per substrat que s'observa en diferents experiments realitzats al llarg d'aquest estudi.

5.3.4.2. 2a Etapa: Reacció de desprotecció de l'1,2-acetònid de carboxilats de solketil d'àcids grassos de llavor de soja.

La segona etapa del procediment va consistir en la desprotecció dels èsters de solketal d'àcids grassos de llavor de soja obtinguts a la primera etapa mitjançant dues metodologies desenvolupades en aquest estudi, una amb escalfament convencional (105 min de reacció a 85 °C) i l'altra amb escalfament amb microones (15 min a 85 °C), totes dues en presència de *tert*-butanol (proporció molar èster:alcohol 1:1) i resina de bescanvi iònic IR-120Na activada (proporció en pes èster:resina 1:1). Es van emprar també, per a la desprotecció dels èsters de solketal, dos mètodes de referència amb escalfament convencional per tal de comparar-ne els resultats amb els mètodes propis. Els protocols i les condicions de reacció dels diferents mètodes es troben descrits a l'apartat 4.4.3.2.1.

Els resultats de rendiments d'obtenció de monoglicèrids (respecte el material vegetal inicial i respecte a la quantitat d'èsters obtinguts a la primera etapa) i la concentració de monoglicèrids de llavor de soja a l'extracte final emprant diferents metodologies a la 2a etapa, es troben a la Taula 59 (columnes 2, 3, 4, 5 i 6).

El rendiment de la reacció segons la metodologia que combina l'ús de la resina de bescanvi iònic IR120Na i *tert*-butanol amb escalfament convencional és, contràriament a l'esperat considerant els resultats obtinguts amb els èsters model, inferior al 5 %. Aquest baix rendiment no és pot explicar només per les dificultats observades en la desprotecció del oleat de solketal, doncs fins hi tot en aquest cas teníem rendiments pròxims al 40 % quan s'emprà escalfament convencional i del 25 % per escalfament en microones. Això pot ser degut a la inhibició de la capacitat catalítica de la resina per substàncies diferents als èsters de solketal. Aquestes substàncies podrien provenir de la mateixa matriu vegetal (llavor de soja) o del biocatalitzador (miceli de *R. oryzae*) emprat en la síntesi d'aquestes mesclures. Es va repetir la mateixa reacció però amb escalfament mitjançant microones, obtenint resultats similars. Això donaria suport a la hipòtesi de la inhibició de la capacitat catalítica de la resina sulfònica.

A més, el fet de partir de llavor de soja triturada fins a textura de farina, pot augmentar l'extracció de diferents constituents de la llavor que poden suposar una interferència per a l'actuació de la resina.

Respecte als altres dos mètodes de referència assajats, el que té un rendiment de reacció més elevat és el que utilitza acetonitril:HCl (aq) 1M 4:1 vol/vol durant 6 h a temperatura ambient (Villeneuve et al., 1998). Mitjançant aquesta metodologia es va obtenir un extracte amb un contingut de monoglicèrids de soja de 52,39 % (GC-FID), amb un rendiment de la 2a etapa de 80,82 %. El fet d'obtenir rendiments de reacció d'obtenció de monoglicèrids menors que quan es parteix de palmitat de solketal (apartat 5.3.3.1.4) és degut, en gran mesura, a que la primera etapa del procés no és completa, i això limitaria el rendiment global de totes dues etapes. El rendiment del procés global en les millors condicions trobades és menor que el descrit per altres autors, tal com queda reflectit a la Taula 4 (apartat 1.3.2) i en la reacció descrita recentment emprant palmitat de vinil i glicerol amb o sense dissolvent (Wang et al., 2013). De totes maneres hem de tenir en compte que en el nostre cas partíem d'oli contingut directament en la llavor, mentre que tots els altres autors empraven triacilglicèrids o altres ésters ja purificats.

5.3.4.3. Tocoferols obtinguts als extractes finals.

Es va determinar el contingut de tocoferols dels extractes finals de monoglicèrids de soja obtinguts després de totes dues etapes. Donat que els monoglicèrids presenten un ampli camp d'aplicació com a emulsionants a les indústries alimentària i cosmètica, els extractes de monoglicèrids derivats de vegetals que continguin tocoferols naturals suposarien un ingredient (o additiu) amb un elevat valor afegit.

Pel que fa al contingut d'alfa, gamma i delta-tocoferol dels extractes finals, només es va detectar-ne la presència a l'únic extracte obtingut al realitzar la segona etapa de la reacció mitjançant escalfament amb microones. Probablement, al cas dels mètodes Villeneuve i Akoh, la presència d'àcids i l'augment local de la temperatura que això comporta, podria haver induït a l'oxidació dels tocoferols continguts al material vegetal. Pel cas de la metodologia que utilitza *tert*-butanol/IR120Na amb escalfament mitjançant microones, es comprova una reducció considerable de gamma-tocoferol i la pèrdua d'alfa-tocoferol (Taula 60).

Taula 60. Contingut en tocoferol dels extractes obtinguts després de totes dues etapes per a la obtenció de monoglicèrids de soja en realitzar la segona etapa mitjançant escalfament amb microones (mg/100 g material ± desviació estàndard, n=3).

		α -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol
Material	Llavor de soja	14,72 ± 2,61	134,85 ± 8,47	70,25 ± 5,24
	Extracte	-	72,90 ± 3,61	64,52 ± 3,09
Recuperació (%)		0 %	54,06 %	91,84 %

Respecte els resultats de tocoferols recuperats quan es va realitzar l'estudi de la primera etapa (Taula 43), tot i que es parteix d'un lot de llavor diferent, amb contingut de tocoferols diferent, s'observa que, després de totes dues etapes, es recupera una porció menor de gamma-tocoferol i pràcticament tot el delta-tocoferol, mentre que l'alfa-tocoferol es perd per complet. En canvi, després de la primera etapa, s'aconseguia recuperar part de l'alfa-tocoferol, una porció més elevada de gamma-tocoferol i una porció més petita de delta-tocoferol.

El fet de que, al realitzar la reacció mitjançant escalfament convencional durant 105 min a 85 °C no trobem restes de tocoferols i que en fer la reacció mitjançant escalfament amb microones (85 °C, 15 min) en detectem la presència d'aquests, tot i la reducció de les concentracions, fa pensar que la pèrdua d'aquests ha estat deguda a les condicions de reacció (85 °C durant 105 min).

6 Conclusions

Les conclusions d'aquest estudi són les següents:

1. S'ha establert una metodologia d'obtenció d'un extracte ric en monoglicèrids a partir de llavor de soja mitjançant un procediment de dues etapes: una primera etapa d'hidròlisi dels triglicèrids i esterificació amb un glicerol protegit, el solketal, catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en condicions d'absència de solvent i una segona etapa de desprotecció química del glicerol protegit mitjançant diferents metodologies descrites a la bibliografia i d'altres desenvolupades en aquest estudi.
2. Segons la metodologia descrita al punt anterior, el rendiment màxim d'obtenció de monoglicèrids a l'extracte final de reacció ha estat del 80,82 %, amb les següents condicions: una primera etapa catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae* en condicions d'absència de solvent, portada a terme a una temperatura de reacció d'hidròlisi i esterificació amb solketal de 50 °C i un temps de reacció d'hidròlisi de 24 h i de reacció d'esterificació amb solketal de 6 h, i una segona etapa de desprotecció del glicerol protegit (solketal) emprant com a solvent una barreja acetonitril:HCl 1M en proporció 4:1 (v/v), amb un temps de reacció de 6 h a temperatura ambient.
3. Els mètodes desenvolupats per a la segona etapa del procés, la desprotecció del glicerol protegit, que suposen el tractament a una temperatura de reacció de 85 °C en presència d'una proporció molar d'èster:*tert*-butanol 1:1 i una proporció en pes èster:resina de bescanvi iònic IR120Na 1:1, amb escalfament convencional (105 min de reacció) i mitjançant microones (15 min de reacció), tot i donar lloc a rendiments de reacció moderats i alts quan es parteix dels èsters purificats, no permeten bons rendiments de reacció quan es parteix de l'extracte d'èsters de solketal provinents de la reacció d'hidròlisi i esterificació catalitzada per miceli liofilitzat de *R. oryzae*.
4. Tan sols l'extracte final obtingut mitjançant una segona etapa de desprotecció del glicerol protegit a una temperatura de reacció de 85 °C en presència d'una proporció molar d'èster:*tert*-butanol 1:1 i una proporció en pes èster:resina de bescanvi iònic IR120Na 1:1, amb escalfament amb microones durant 15 min de reacció permet recuperar part dels tocoferols de partida de la llavor (un 54,06 % de γ -tocoferol i un 91,84 % de δ -tocoferol).
5. S'ha establert una metodologia de monitorització de l'activitat lipàsica del miceli liofilitzat de *R. oryzae*, basada en els μ mol d'àcid esteàric alliberats en 60 min mitjançant la hidròlisi d'estearat de metil

catalitzada per 10 mg de miceli a una temperatura de reacció 40 °C. Aquesta metodologia hauria de permetre l'avaluació de l'activitat lipàsica de diferents lots de miceli liofilitzat de *R. oryzae* obtinguts així com l'activitat d'aquest al llarg del temps de conservació a temperatura de congelació.

6. El procediment quimioenzimàtic desenvolupat permet, amb l'ús d'un sistema de reacció mediambientalment favorable, l'obtenció de monoglicèrids amb rendiments que es troben en un rang de 30-60 %.

7 Bibliografia

- (JCBN), I.-I.J.C. on B.N., 1982. Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds Recommendations. *Mol. Cell. Biochem.* 49, 183–185.
- Adachi, D., Hama, S., Nakashima, K., Bogaki, T., Ogino, C., Kondo, A., 2013. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. *Bioresour. Technol.* 135, 410–416.
- Adamczak, M., Bornscheuer, U.T., Bednarsky, W., 2009. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 808–813.
- Adamczak, M., Krishna, S.H., 2004. Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 251–264.
- Akoh, C.C., 1993. Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. *Biotechnol. Lett.* 15, 949–954.
- Akoh, C.C., Chang, S., Lee, G., Shaw, J., 2007. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8995–9005.
- Ali Khan, A., Alzohairy, M.A., 2010. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Res. J. Biol. Sci.* 5, 565–575.
- Al-Zuhair, S., Hasan, M., Ramachandran, K.B., 2003. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochem.* 38, 1155–1163.
- Antczak, M.S., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S., 2009. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renew. Energy* 34, 1185–1194.
- Arai, S., Nakashima, K., Tanino, T., Ogino, C., Kondo, A., Fukuda, H., 2010. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 51–55.
- Balasubramaniam, B., Perumal, A.S., Jayaraman, J., Mani, J., Ramanujam, P., 2012. Comparative analysis for the production of fatty acid alkyl esterase using whole cell biocatalyst and purified enzyme from *Rhizopus oryzae* on waste cooking oil (sunflower oil). *Waste Manag.* 32, 1539–1547.
- Balcão, V.M., Paiva, A.L., Malcata, F.X., 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 392–416.
- Barrigón, J.M., Montesinos, J.L., Valero, F., 2013. Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut+ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochem. Eng. J.* 75, 47–54.

- Batovska, D.I., Tsubota, S., Kato, Y., Asano, Y., Ubukata, M., 2004. Lipase-mediated desymmetrization of glycerol with aromatic and aliphatic anhydrides. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 3551–3559.
- Beisson, F., Tiss, A., Rivière, C., Verger, R., 2000. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 133–153.
- Bell, G., Blain, J.A., Patterson, J.D.E., Shaw, C.E.L., Todd, R., 1978. Ester and glyceride synthesis by *Rhizopus arrhizus* mycelia. *FEMS Microbiol. Lett.* 3, 223–225.
- Ben Salah, R., Gargouri, A., Verger, R., Gargouri, Y., Mejdoub, H., 2009. Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1375–1384.
- Ben Salah, R., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H., Gargouri, Y., 2007. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 368–372.
- Berglund, P., 2001. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomol. Eng.* 18, 13–22.
- Bogevik, A., Oxley, A., Olsen, R., 2008. Hydrolysis of Acyl-Homogeneous and Fish Oil Triacylglycerols Using Desalted Midgut Extract from Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Lipids* 43, 655–662.
- Bornscheuer, U.T., 1995. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 578–586.
- Bornscheuer, U.T., Yamane, T., 1995. Fatty acid vinyl esters as acylating agents: A new method for the enzymatic synthesis of monoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 193–197.
- Brigelius-Flohe, R., Traver, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 13, 1145–1155.
- Cabrera, Z., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Palomo, J.M., Guisan, J.M., 2009. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57, 171–176.
- Campanella, A., Baltanás, M.A., 2004. Degradation of the oxirane ring of epoxidized vegetable oils with solvated acetic acid using cation-exchange resins. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 524–530.
- Campanella, A., Baltanás, M.A., 2005. Degradation of the oxirane ring of epoxidized vegetable oils with hydrogen peroxide using an ion exchange resin. *Catal. Today* 107-108, 208–214.

- Campanella, A., Baltanás, M.A., 2007. Degradation of the oxirane ring of epoxidized vegetable oils in a liquid–liquid–solid heterogeneous reaction system. *Chem. Eng. Process.* 46, 210–221.
- Castro, H.F., Mendes, A.A., Santos, J.C., Aguiar, C.L., 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova* 27, 146–156.
- Ceni, G., Lerin, L.A., De Conto, J.F., Brancher, C. V, Da Silva, P.C., Toniazzo, G., Treichel, H., De Oliveira, D., Oliveira, J. V, Oestreicher, E.G., Antunes, O.A.C., 2010. Optimization of 1-glyceryl benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 107–112.
- Chamorro, S., Alcántara, A.R., De la Casa, R.M., Sinisterra, J. V, Sánchez-Montero, J.M., 2001. Small water amounts increase the catalytic behaviour of polar organic solvents pre-treated *Candida rugosa* lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11, 939–947.
- Chen, D., Peng, C., Zhang, H., Yan, Y., 2013. Assessment of Activities and Conformation of Lipases Treated with Sub- and Supercritical Carbon Dioxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 2189–2201.
- Christensen, M.W., Andersen, L., Husum, T.L., Kirk, O., 2003. Industrial lipase immobilization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 318–321.
- Codex Committee on Fats and Oils, 2005. Codex Stan 210-1999. Norma para Aceites Vegetales Especificados [WWW Document]. URL www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards (accessed 9.7.14).
- Compton, D.L., Vermillion, K.E., Laszlo, J.A., 2007. Acyl Migration Kinetics of 2-Monoacylglycerols from Soybean Oil via ¹H NMR. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84, 343–348.
- Converti, A., Del Borghi, A., Gandolfi, R., Molinari, F., Palazzi, E., Perego, P., Zilli, M., 2002. Simplified kinetics and thermodynamics of geraniol acetylation by lyophilized cells of *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 216–223.
- Das Sharma, S., Hazarika, P., Konwar, D., 2008. A simple, green and one-pot four-component synthesis of 1,4-dihydropyridines and their aromatization. *Catal. Commun.* 9, 709–714.
- De Cozar, A., Millan, M.C., Cebrian, C., Prieto, P., Diaz-Ortiz, A., De la Hoz, A., Cossio, F.P., 2010. Computational calculations in microwave-assisted organic synthesis (MAOS). Application to cycloaddition reactions. *Org. Biomol. Chem.* 8, 1000–1009.
- Di Lorenzo, M., Hidalgo, A., Haas, M., Bornscheuer, U.T., 2005. Heterologous Production of Functional Forms of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8974–8977.

- Dworak, A., Walach, W., Trzebicka, B., 1995. Cationic polymerization of glycidol. Polymer structure and polymerization mechanism. *Macromol. Chem. Phys.* 196, 1963–1970.
- Eras, J., Oro, R., Torres, M., Canela, R., 2008. Direct Quantitation of Fatty Acids Present in Bacteria and Fungi: Stability of the Cyclopropane Ring to Chlorotrimethylsilane. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4923–4927.
- Essamri, M., Deyris, V., Comeau, L., 1998. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. Biotechnol.* 60, 97–103.
- European Committee for Standardization CEN, 1999. prEN 12822. Foodstuffs- Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography- Measurement of α -, β -, γ - and δ -tocopherols.
- Eychenne, V., Mouloungui, Z., 1999. High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol. *Lipid / Fett* 101, 424–427.
- Faber, K., 1997. Biotransformation of non-natural compounds: State of the art and future development. *Pure Appl. Chem.* 69, 1613–1632.
- Foglia, T.A., Jones, K.C., Phillips, J.G., Mittelbach, M., 2004. Comparison of Chromatographic Methods for the Determination of Bound Glycerol in Biodiesel. *Chromatographia* 60, 305–311.
- Frankel, E.N., 1996. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Second Int. Food Data Base Conf. Food Compos. Res. - Broader Context* 57, 51–55.
- Freitas, L., Bueno, T., Perez, V.H., De Castro, H.F., 2008. Monoglicéridos: produção por via enzimática e algumas aplicações. *Quim. Nova* 31, 1514–1521.
- Fukuda, H., Hama, S., Tamalampudi, S., Noda, H., 2008. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 26, 668–673.
- Fukuda, H., Kondo, A., Tamalampudi, S., 2009. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. *Invit. Rev. Issue* 2009 44, 2–12.
- Fureby, A.M., Virto, C., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., 1996. Acyl Group Migrations in 2-Monoolein. *Biocatal. Biotransformation* 14, 89–111.
- Gandhi, N., 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 621–634.
- Gandolfi, R., Converti, A., Pirozzi, D., Molinari, F., 2001. Efficient and selective microbial esterification with dry mycelium of *Rhizopus oryzae*. *J. Biotechnol.* 92, 21–26.

- García-Alles, L., Gotor, V., 1998. Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 163–170.
- García-Vidal, J.A., Durán-Valle, C.J., Ferrera-Escudero, S., 2006. Green chemistry: Efficient epoxides ring-opening with 1-butanol under microwave irradiation. *Appl. Surf. Sci.* 252, 6064–6066.
- Gottsche, J., Nielsen, N., Nielsen, H., Mu, H., 2005. Lipolysis of different oils using crude enzyme isolate from the intestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Lipids* 40, 1273–1279.
- Gupta, M., Paul, S., Gupta, R., 2009. General characteristics and applications of microwaves in organic synthesis. *Acta Chim. Slov.* 56, 749–764.
- Halldorsson, A., Thordarson, P., Kristinsson, B., Magnusson, C.D., Haraldsson, G.G., 2004. Lipase-catalysed kinetic resolution of 1-O-alkylglycerols by sequential transesterification. *Integr. Biocatal. into Org. Synth.* 15, 2893–2899.
- Halling, P., 1992. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnol. Tech.* 6, 271–276.
- Hama, S., Tamalampudi, S., Fukumizu, T., Miura, K., Yamaji, H., Kondo, A., Fukuda, H., 2006. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 328–333.
- Hewavitharana, A.K., Lanari, M.C., Becu, C., 2004. Simultaneous determination of Vitamin E homologs in chicken meat by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1025, 313–317.
- Hirose, Y., Kariya, K., Sasaki, I., Kurono, Y., Ebiike, H., Achiwa, K., 1992. Drastic solvent effect on lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of prochiral 1,4-dihydropyridines. *Tetrahedron Lett.* 33, 7157–7160.
- Hobbs, H.R., Thomas, N.R., 2007. Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions. *Chem. Rev.* 107, 2786–2820.
- Holm, H.C., Cowan, D., 2008. The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 679–691.
- Holmberg, K., Osterberg, E., 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1544–1548.
- Huang, J., Liu, Y., Song, Z., Jin, Q., Wang, X., 2010. Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates. *Ultrason. Sonochem.* 17, 521–525.

- Huang, S.W., Frankel, E.N., German, J.B., 1994. Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2108–2114.
- Irimescu, R., Iwasaki, Y., Hou, C., 2002. 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.
- IUBMB Nomenclature Home Page [WWW Document], 2014. . Recomm. Biochem. Org. Nomencl. Symb. Terminol. URL <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> (accessed 9.7.14).
- Jackson, M., King, J., 1997. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 103–106.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16, 396–403.
- Jin, G., Bierma, T.J., 2010. Whole-cell Biocatalysts for Producing Biodiesel from Waste Greases - RR-117 [WWW Document]. URL www.istc.illinois.edu/info/library_docs/rr/rr-117.pdf (accessed 9.7.14).
- Kaewthong, W., Sirisansaneeyakul, S., Prasertsan, P., H-Kittikun, A., 2005. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem.* 40, 1525–1530.
- Kalantari, M., Kazemeini, M., Tabandeh, F., Arpanaei, A., 2012. Lipase immobilisation on magnetic silica nanocomposite particles: effects of the silica structure on properties of the immobilised enzyme. *J. Mater. Chem.* 22, 8385–8393.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Kapoor, M., Gupta, M.N., 2012. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. *Biomass-derived pentoses* 47, 503–508.
- Kappe, C., Dallinger, D., 2009. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004-2008 literature. *Mol. Divers.* 13, 71–193.
- Kawakami, K., Urakawa, T., Oda, Y., Iwai, Y., 2009. Activation of lipase by sol-gel coating with hydrophobic alkyl-substituted silicates in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1412–1417.
- Kelsey, J., Bayles, K., Shafii, B., McGuire, M., 2006. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. *Lipids* 41, 951–961.

- Kim, O.B., Luftmann, H., Steinbüchel, A., 2009. Biotransformation of glycidol by the unspecific wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 972–978.
- Kiran, K.R., Divakar, S., 2002. Enzyme inhibition by *p*-cresol and lactic acid in lipase-mediated synthesis of *p*-cresyl acetate and stearyl lactic acid: a kinetic study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 707–712.
- Klibanov, A.M., 2003. Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 427–431.
- Lampi, A.M., Piironen, V., 1998. Alpha- and gamma-tocopherols as efficient antioxidants in butter oil triacylglycerols. *Lipid - Fett* 100, 292–295.
- Leadbeater, N.E., Schmink, J.R., 2007. Use of a scientific microwave apparatus for rapid optimization of reaction conditions in a monomode function and then substrate screening in a multimode function. *Tetrahedron* 63, 6764–6773.
- Llovera, M., Balcells, M., Torres, M., Canela, R., 2005. Parallel Synthesis: A New Approach for Developing Analytical Internal Standards. Application to the Analysis of Patulin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6643–6648.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., Iborra, J.L., 2004. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Ion. Liq. as Promis. Altern. media Org. Synth. Catal.* 214, 113–119.
- Martínez-García, A., Martínez, R., 2008. Microwave Assisted Synthesis of Diosgenin Esters of Maleic and Itaconic Acids. *Synth. Commun.* 38, 1917–1925.
- Méndez, J.J., 2004. Métodos quimioenzimáticos para la obtención de derivados de polioles. Universitat de Lleida.
- Méndez, J.J., Canela, R., Torres, M., 2009. Kinetic Study of Palmitic Acid Esterification Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Resting Cells. *Acta Biológica Colomb.* 14, 161–172.
- Méndez, J.J., López, J.S., Canela, R., Torres, M., 2006. Reactive extraction of acylglycerides using a column bioreactor containing *Rhizopus oryzae* resting-cells. *Biocatal. Biotransformation* 24, 201–208.
- Metzger, J.O., 1998. Solvent-Free Organic Syntheses. *Angew. Chemie Int. Ed.* 37, 2975–2978.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L., González, J., 1988. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 927–931.

- Mirkhani, V., Tangestaninejad, S., Yadollahi, B., Alipanah, L., 2003. Efficient regio- and stereoselective ring opening of epoxides with alcohols, acetic acid and water catalyzed by ammonium decatungstocerate(IV). *Tetrahedron* 59, 8213–8218.
- Molinari, F., Gandolfi, R., Converti, A., Zilli, M., 2000. Mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*: an efficient catalyst for acetylation in organic solvent. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 626–630.
- Molinari, F., Mantegazza, L., Villa, R., Aragozzini, F., 1998. Resolution of 2-alkanols by microbially-catalyzed esterification. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 62–64.
- Molinari, F., Marianelli, G., Aragozzini, F., 1995. Production of flavour esters by *Rhizopus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 967–973.
- Monteiro, J.B., Nascimento, M.G., Ninow, J.L., 2003. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. *Biotechnol. Lett.* 25, 641–644.
- Muñío, M.M., Robles, A., Esteban, L., González, P.A., Molina, E., 2009. Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and esterification of 2-monoacylglycerols. *Process Biochem.* 44, 723–730.
- Muralidhar, R. V, Chirumamilla, R.R., Marchant, R., Ramachandran, V.N., Ward, O.P., Nigam, P., 2002. Understanding lipase stereoselectivity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 81–97.
- Nahas, E., 1988. Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. *J. Gen. Microbiol.* 134, 227–233.
- Ollevier, T., Nadeau, E., 2008. Microwave-enhanced bismuth triflate-catalyzed epoxide opening with aliphatic amines. *Tetrahedron Lett.* 49, 1546–1550.
- Oromí-Farrús, M., Eras, J., Sala, N., Torres, M., Canela, R., 2009. Preparation of (S)-1-halo-2-octanols using ionic liquids and biocatalysts. *Molecules* 14, 4275–4283.
- Ottosson, J., Hult, K., 2001. Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of *sec*-alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11, 1025–1028.
- Palomo, J.M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2002. Enzymatic resolution of (±)-trans-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxo-piperidin-3-ethyl carboxylate, an intermediate in the synthesis of (-)-Paroxetine. *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 2375–2381.

- Park, Y., Pastore, G., De Almeida, M., 1988. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 252–254.
- Partali, V., Melbye, A.G., Alvik, T., Anthonsen, T., 1992. Enzymatic resolution of 2,2-disubstituted-1,3-dioxolane-4-methanol carboxylic esters. *Tetrahedron: Asymmetry* 3, 65–72.
- Patane, J., Trapani, V., Villavert, J., McReynolds, K.D., 2009. Preparative production of colominic acid oligomers via a facile microwave hydrolysis. *Carbohydr. Res.* 344, 820–824.
- Paula, A. V, Nunes, G.F.M., Freitas, L., De Castro, H.F., Santos, J.C., 2010. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 65, 117–121.
- Pawongrat, R., Xu, X., H-Kittikun, A., 2007. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem.* 104, 251–258.
- Perreux, L., Loupy, A., 2001. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron* 57, 9199–9223.
- Petschow, B.W., Batema, R.P., Ford, L.L., 1996. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 302–306.
- Pfeffer, J., Freund, A., Bel-Rhliid, R., Hansen, C.E., Reuss, M., Schmid, R., Maurer, S., 2007. Highly Efficient Enzymatic Synthesis of 2-Monoacylglycerides and Structured Lipids and their Production on a Technical Scale. *Lipids* 42, 947–953.
- Piazza, G., Foglia, T., 2006. One-pot synthesis of fatty acid epoxides from triacylglycerols using enzymes present in oat seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 1021–1025.
- Pouilloux, Y., Abro, S., Vanhove, C., Barrault, J., 1999. Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins: Preparation of monoglycerides. *J. Mol. Catal. A Chem.* 149, 243–254.
- Razak, C.N.A., Musani, R., Basri, M., Salleh, A.B., 1999. Characterization of membrane-bound lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* isolated from palm oil mill effluent. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 171–174.
- Rincón, M.A., Venegas, E., Ramos, R., Rodríguez, I., Guil-Guerrero, J.L., 2013. Acyl migration evaluation in monoacylglycerols from *Echium plantagineum* seed oil and Marinol. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 518–522.
- Romano, D., Ferrario, V., Molinari, F., Gardossi, L., Sanchez, J.M., Torre, P., Converti, A., 2006. Kinetic resolution of (R, S)-1,2-O-isopropylidene-glycerol

- by esterification with dry mycelia of moulds. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 41, 71–74.
- Roy, I., Gupta, N., 2003. Applications of microwaves in biological sciences. *Curr. Sci.* 85, 1685–1693.
- Schmid, R.D., Verger, R., 1998. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* 37, 1609–1633.
- Sellami, M., Ghamgui, H., Frikha, F., Gargouri, Y., Miled, N., 2012. Enzymatic transesterification of palm stearin and olein blends to produce zero-trans margarine fat. *BMC Biotechnol.* 12, 48–55.
- Seppanen, C., Song, Q., Saari, A., 2010. The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 469–481.
- Shu, Z.Y., Jiang, H., Lin, R.F., Jiang, Y.M., Lin, L., Huang, J.Z., 2010. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 62, 1–8.
- Singh, A.K., Mukhopadhyay, M., 2012. Olive oil glycerolysis with an immobilized lipase *Candida antarctica* in a solvent free system. *Grasas y Aceites* 63, 202–208.
- Singh, M., Singh, S., Singh, R.S., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2008. Transesterification of primary and secondary alcohols using *Pseudomonas aeruginosa* lipase. *Bioresour. Technol.* 99, 2116–2120.
- Soeda, Y., Toshima, K., Matsumura, S., 2001. Novel Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Glycidol. *Chem. Lett.* 30, 76–77.
- Taylor, M., Singh, B., Minhas, S., 2005. Special Reports: Developments in Microwave Chemistry. *Chem. World* 2.
- Thude, S., Shukun, L., Said, M.B., Bornscheuer, U.T., 1997. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerides by glycerolysis of campher tree seed oil and cocoa-butter. *Fett/Lipid* 99, 246–250.
- Tomàs, A., Tor, M., Villorbina, G., Canela, R., Balcells, M., Eras, J., 2009. A rapid and reliable direct method for quantifying meat acylglycerides with monomode microwave irradiation. *J. Chromatogr. A* 1216, 3290–3295.
- Torres, C., Munir, F., Otero, C., Hill, C., 2002. Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosa*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 775–781.
- Torres, M., Barbosa, E., Loscos, V., Canela, R., 2000. Lipase activity of resting cells of *Aspergillus flavus* after solvent washing; memory effects from

- endogenous substrate arising from the original growth medium. *Biotechnol. Lett.* 22, 1265–1268.
- Torres, M., Dolcet, M.M., Sala, N., Canela, R., 2003a. Endophytic Fungi Associated with Mediterranean Plants as a Source of Mycelium-Bound Lipases. *J. Agric. Food Chem.* 51, 3328–3333.
- Torres, M., Méndez, J.J., Sanahuja, V., Canela, R., 2003b. Reactive Extraction of the Acylglycerides Present in Various Materials using *Rhizopus oryzae* Resting Cells. *Biocatal. Biotransformation* 21, 129–134.
- Villeneuve, P., Foglia, T.A., Mangos, T.J., Nuñez, A., 1998. Synthesis of polyfunctional glycerol esters: Lipase-Catalyzed esterification of glycerol with diesters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1545–1549.
- Walsh, P.J., Li, H., De Parrodi, C.A., 2007. A Green Chemistry Approach to Asymmetric Catalysis: Solvent-Free and Highly Concentrated Reactions. *Chem. Rev.* 107, 2503–2545.
- Wang, X., Jin, Q., Wang, T., 2013. Improved Synthesis of Monopalmitin on a Large Scale by Two Enzymatic Methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 1455–1463.
- Weiss, A., 1990. Enzymatische Herstellung von festen Fettsäuremonoglyceriden. *Lipid / Fett* 92, 392–396.
- Weiss, M.E.R., Paulus, F., Steinhilber, D., Nikitin, A.N., Haag, R., Schütte, C., 2012. Estimating Kinetic Parameters for the Spontaneous Polymerization of Glycidol at Elevated Temperatures. *Macromol. Theory Simulations* 21, 470–481.
- Xiao, M., Mathew, S., Obbard, J.P., 2009. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. *GCB Bioenergy* 1, 115–125.
- Xiao, Z., Shi, C., Mao, D., 2008. Effect of tocopherol on antioxygenic properties of green lubricating oil. *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.* 23, 289–292.
- Yadav, G.D., Thorat, P.A., 2012. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 83, 16–22.
- Yamane, T., 2001. Solvent-Free Biotransformations of Lipids, in: Vulfson, E.N., Halling, P.J., Holland, H.L. (Eds.), *Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*. Humana Press Inc., New Jersey, pp. 509–516.
- Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., Xu, X., 2005. Enzymatic Production of Monoacylglycerols Containing Polyunsaturated Fatty Acids through an Efficient Glycerolysis System. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1475–1481.

- Yu, C.C., Lee, Y.S., Cheon, B.S., Lee, S.H., 2003. Synthesis of Glycerol Monostearate with High Purity. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24, 1229–1231.
- Zaks, A., Klivanov, A.M., 1988. The effect of water on enzyme action in organic media. *J. Biol. Chem.* 263, 8017–8021.
- Zeng, J., Du, W., Liu, X., Liu, D., Dai, L., 2006. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. *Biocatal. Important W. to Environ. Benign Sustain. Dev. Our Common Globe - 11th YABEC (Young Asian Biochem. Eng. Community) Symp.* 2005 43, 15–18.
- Zhao, L.L., Xu, J.H., Zhao, J., Pan, J., Wang, Z.L., 2008. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. *Process Biochem.* 43, 626–633.

